การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวเพื่อต้านทานโรคไวรัสใบด่างเหลือง โดยใช้เทคนิคอณูชีวิทยา

The Selection of Resistance Mungbean Varieties to *Mungbean Yellow Mosaic by* Molecular Biology

กาญจนา วาระวิชะนี[1/] วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1/] สุมนา งามผ่องใส[2/]
เชาวนาถ พฤทธิเทพ[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

บทคัดย่อ

การตรวจโรคไวรัสใบด่างเหลือง (*Mungbean Yellow Mosaic Virus*, MYMV) โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพร์เมอร์ ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ (specific primer) กับ DNA-A ทั้งวง จำนวน 3 คู่ คือ MYMV-V2-F1 & MYMV-C3-F1, MYMV-V2-R2 & MYMV-C3-F2 และ MYMV-V2-R3 & MYMV-C1-F3 เป็นวิธีการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวต้านทานโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ให้ต่อไปในอนาคต และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัส MYMV-A สาเหตุโรคไวรัสใบด่างเหลือง จำนวน 2746 bp กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าคล้ายกับเชื้อไวรัส MYMV ประเทศ อินเดีย และปากีสถาน อยู่ในระดับ 95-96 เปอร์เซ็นต์ และบริเวณ intergenic region มีโครงสร้างแบบ hairpin structure อยู่ 9 นิวคลีโอไทด์ (nonanucleotide) เป็น 5' TAATATTAC 3' ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนอนุรักษ์ของกลุ่มเจมินีไวรัสทุกชนิด ในส่วนการทดสอบความต้านทานโรคไวรัสใบด่างเหลืองของเมล็ดพันธุ์ถั่วจากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาทในปี 2554-2556 จำนวน 2 ชุด รวมทั้งหมด 130 สายพันธุ์ๆ ละ 20 ต้น โดยนำถั่วเขียวทุกสายพันธุ์มาปลูกเชื้อไวรัส MYMV ด้วยแมลงหวี่ขาวและสังเกตอาการภายในเรือนทดลอง รวม 45 วัน หลังจากนั้นประเมินความรุนแรงของโรคจากการสังเกตด้วยตาเปล่าและอ้างอิงตามเกณฑ์ Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV (Sadiq *et al.*, 2006) ผลการทดสอบของเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวชั่วที่ 3 (F3) จำนวน 12 คู่ผสม (คู่ผสมละ 5 สายพันธุ์) พบถั่วเขียว 2 สายพันธุ์เท่านั้น ที่แสดงความทนทานต่อโรค ได้แก่ CNMB-MYMV-08-06-12 (คู่ผสมที่ 6 KPS 2 x NM 54) และ CNMB-MYMV-08-07-14 (จากคู่ผสมที่ 7 ระหว่างพันธุ์ NM92 x KPS2) ซึ่งประเมินการเข้าทำลายของโรคอยู่ที่ 25 % เกณฑ์คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 5 สำหรับผลการทดสอบของเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวชุดอุณหภูมิต่ำและฉายรังสีพบมีถั่วเขียวเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้น ที่แสดงความต้านทานปานกลางต่อโรค ได้แก่ VC 2901-11-2B-1-B ซึ่งประเมินการเข้าทำลายของโรคอยู่ที่ 15 % เกณฑ์คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 4 สรุปจากข้อมูลข้างต้นพบเชื้อไวรัส MYMV-A

รหัสการทดลอง 01-13-54-01-01-01-04-54

พบระบาดทำความเสียหายให้กับพืชถั่วเขียวในประเทศไทย ดังนั้น เมื่อนำพันธุ์ถั่วเขียวจากแถบประเทศดังกล่าวมาใช้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ จึงมีความเสี่ยงสูงที่จะอ่อนแอต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ จึงควรมีการทดสอบระดับความต้านของพันธุ์ถั่วเขียวก่อนนำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์ เพื่อลดโอกาสเสี่ยงและความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นได้ทั้งด้านผลิต ระยะเวลา และต้นทุน

คำนำ

โรคไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว (*Mung Bean Yellow Mosaic Virus*, MYMV) เป็นโรคหนึ่งที่สร้างความเสียหายกับผลผลิตถั่วเขียวเป็นอย่างมากในหลายประเทศ เช่น อินเดีย ปากีสถาน ศรีลังกา สำหรับในประเทศไทยพบการระบาดของโรคครั้งแรกเมื่อปี 2520 ที่ จังหวัดกำแพงเพชร พื้นที่ความเสียหายประมาณ 10,000 ไร่ และต่อมาพบโรคนี้ระบาดรุนแรงขึ้นอีกครั้งในปี 2549 และ 2550 ที่จังหวัดสุโขทัย ได้มีรายงานว่าถั่วเขียวที่ได้รับเชื้อไวรัส MYMV ในช่วงอายุการเจริญ 1-2 เดือน สามารถสร้างความเสียหายกับผลผลิตถึงประมาณ 35-80 เปอร์เซ็นต์ (Thongmeearkom *et al*.,1981) ถ้าโรคนี้เกิดในระยะที่ติดฝักแล้ว ฝักจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจัด มีขนาดเล็กสั้นผิดปกติคดงอขึ้นข้างบน (บุษราคัม และคณะ, 2538) ลักษณะอาการเริ่มแรกใบถั่วเขียวมีจุดด่างสีเหลืองเล็กๆ กระจายให้เห็นที่ใบรวม 3 ใบแรก (compound trifoliate leaves) ต่อมาจุดด่างสีเหลืองขยายใหญ่จนใบเปลี่ยนจากสีเหลืองปนสีเขียวกลายเป็นสีเหลืองจัด ใบยอดที่แตกใหม่จะด่างเหลือง ถ้าถั่วเขียวเป็นโรครุนแรงมากจะสังเกตเห็นใบรวม 3 ใบแรกมีลักษณะเป็นคลื่นม้วนงอลง ลำต้นแคระแกร็น ไม่สามารถออกดอกและติดฝักได้เลย (Chiemsombat, 1991) โรคนี้เกิดจากไวรัสในกลุ่มเจมินีไวรัส (Geminiviruses) Genus *Begomovirus* มีอนุภาคเป็นทรงกลมคู่หลายเหลี่ยมที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete icosahedral) อนุภาคมีขนาดประมาณ 18x30 นาโนเมตร จีโนมของไวรัสกลุ่มนี้ มี 2 ประเภท คือ แบบโมเลกุลเดี่ยวและแบบโมเลกุลคู่ ดีเอ็นเอทั้ง 2 โมเลกุลมีขนาดใกล้เคียงกันประมาณ 2,500-2,800 นิวคลีโอไทด์ ภายในจีโนมของไวรัสประกอบด้วย ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ssDNA) ขดเป็นวงอยู่ในอนุภาคซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ monopartite genome มีสายพันธุกรรมหนึ่งโมเลกุล และ bipartite genome มีสายพันธุกรรมสองโมเลกุลที่เรียกว่า component A และ component B ถ่ายทอดโรคโดยแมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) แบบ persistent circulative (Harrison and Robinson, 2002)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวจากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาทที่ต้องทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว รวม 2 ชุด
  - ชุดที่ 1 คือ ถั่วเขียวชั่วที่ 3 ในสายพันธุ์ (F3) รวม 12 คู่ผสม (คู่ผสมละ 5 สายพันธุ์) รวมพันธุ์ถั่วเขียวทั้งหมดที่ต้องทดสอบจำนวน 60 สายพันธุ์
  - ชุดที่ 2 คือ ถั่วเขียวเมล็ดชุดอุณหภูมิต่ำและชุดฉายรังสี ทั้งหมดที่ต้องทดสอบจำนวน 70 สายพันธุ์

- ต้นถั่วเขียวที่แสดงอาการโรคไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว *Mung Bean Yellow Mosaic virus*, MYMV)

- แมลงพาหะ ได้แก่ แมลงหวี่ขาวยาสูบ (*Bemisia tabaci*)
- อุปกรณ์ทางการเกษตร ได้แก่ โรงเรือน, กระถาง, ตะกร้า, ดิน, ถุงปลูก, ปุ๋ย และป้ายชื่อ

- อุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ตู้แช่แข็ง 4, -20, -40 และ -80 องศาเซลเซียส,เครื่องชั่งวิเคราะห์ (analytical balance) ทศนิยม 3 ตำแหน่ง, อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker), ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, โกร่งบดตัวอย่าง, เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter) (Denver,USA), เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมความเย็น (refrigerated centrifuge) (Jouan, USA), เครื่อง Thermal cycler (PCR), ชุดอุปกรณ์อิเลคโตรโฟริซิส (electrophoresis equipment) (Hoefer, USA), Gel Documentation UV-transilluminator, ปิเปตต์อัตโนมัติ (autopipette: Pipetteman, Gilson, France),เครื่องผสมสาร (vortex mixer) (Fisher scientific, USA) และหลอดไมโครทิวป์ขนาดต่างๆ ปริมาณเป็นไมโครลิตร

- สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่ สารประกอบ CTAB buffer, เอ็นไซม์ PLATINUM Taq polymeras, High quality (Invitrogen), เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase, Recombinant (Invitrogen), β-mercaptoethanol (AR grade) (Sigma, USA) สารปฏิชีวนะ, ชุดไพรเมอร์, GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas), ชุด kit สกัด DNeasy Plant Mini Kit, ชุด kit สกัด agarose gel: QIAquick Gel Extraction Kit, pGEM-T easy vector (Promega),T4 DNA Ligase (Promega), competent cell (E. coli DH5α), สารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-galactoside (X-gal) และสารละลาย isopropyl-6-D thiogalactopyranoside (IPTG) Agarose gel (SeaKem)

วิธีการ

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างถั่วเขียวที่แสดงอาการใบด่างเหลือง (*Mung Bean Yellow Mosaic virus*, MYMV) จากแปลงปลูก จ. สุโขทัย และชัยนาท **(ภาพที่ 1)** แล้วนำตัวอย่างถั่วเขียวใบด่างเหลืองมาถ่ายทอดโรคลงบนต้นถั่วเขียวปกติโดยใช้แมลงหวี่ขาวเป็นพาหะ และเก็บไว้เป็นแหล่งเชื้อสำหรับทดสอบในเรือนทดลองต่อไป

ภาพที่ 1 แสดงแปลงถั่วเขียว จ. ชัยนาท ที่ถูกเชื้อไวรัสใบด่างเหลืองเข้าทำลายอย่างรุนแรง

2. เตรียมแมลงหวี่ขาวยาสูบเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV

เตรียมเพิ่มปริมาณแมลงหวี่ขาวยาสูบโดยเลี้ยงในกรงกันแมลงปลอดเชื้อให้ได้ชั่วอายุแมลงประมาณ 3 รุ่น เพื่อให้แน่ใจว่าได้แมลงที่สะอาดปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำมาปล่อยบนต้นถั่วเขียวที่เป็นโรคไวรัสด่างเหลืองเป็นระยะเวลานาน 48 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นพาหะทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV ต่อไป

3. การทดสอบถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV โดยแมลงหวี่ขาวยาสูบ

ปลูกถั่วเขียวที่ต้องการทดสอบความต้านโรคของศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท ชุดที่ 1 คือ ถั่วเขียวชั่วที่ 3 ในสายพันธุ์ (F3) รวม 12 คู่ผสม (คู่ผสมละ 5 สายพันธุ์) รวมพันธุ์ถั่วเขียวทั้งหมดที่ต้องทดสอบจำนวน 60 สายพันธุ์ และชุดที่ 2 คือ ถั่วเขียวเมล็ดชุดอุณหภูมิต่ำและชุดฉายรังสี ทั้งหมดที่ต้องทดสอบจำนวน 70 สายพันธุ์ โดยปลูกสายพันธุ์ละ 20 ต้น เมื่อต้นกล้าถั่วเขียวมีอายุได้ 5 วัน นำถ้วยพลาสติกตาข่ายมาครอบต้นพืชไว้ หลังจากนั้นใช้ aspirator ดูดแมลงหวี่ขาวยาสูบที่มีเชื้อไวรัส MYMV จำนวน 10-15 ตัว มาปล่อยบนต้นถั่วเขียวปกติที่ทดสอบและปล่อยให้แมลงถ่ายทอดโรคภายในสภาพห้องที่ควบคุมแสงและอุณหภูมิ เป็นระยะเวลานาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นฉีดยาฆ่าแมลงแล้วนำถั่วเขียวที่ทดสอบดังกล่าวไปเก็บไว้ในกรงป้องกันแมลงเพื่อสังเกตอาการโรคนาน 45 วัน **(ภาพที่ 2ก-ง)**

ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV โดยใช้แมลงหวี่ขาวยาสูบเป็นพาหะ

2-ก : การใช้ aspirator ดูดแมลงหวี่ขาวยาสูบที่มีเชื้อไวรัส MYMV

2-ข : ปล่อยแมลงหวี่ขาว~10-15 ตัว/1 ถ้วยพลาสติกตาข่ายพืชทดสอบ

2-ค : ปล่อยให้แมลงถ่ายทอดโรคภายใต้ถ้วยพลาสติกตาข่าย นาน 48 ชั่วโมง

2-ง : เก็บถั่วเขียวทดสอบไว้ในกรงป้องกันแมลงเพื่อสังเกตอาการโรคนาน 45 วัน

4. ระดับความต้านทานโรคตามเกณฑ์ Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV

ทำการสังเกตโรคด้วยตาเปล่าและจดบันทึกลักษณะอาการ ความรุนแรงโรคบนต้นถั่วเขียว หลังถ่ายทอดเชื้อไปแล้ว ทุกๆ 7 วัน รวมเป็นเวลา 45 วัน และแสดงระดับความต้านทานโรคจากคะแนนความรุนแรงโรค 9 ระดับ ตามเกณฑ์ของ Sadiq *et al.*, 2006 **(ตารางที่ 1)**

ตารางที่ 1 คะแนนความรุนแรงของโรคใบด่างเหลืองถั่วเขียว 9 ระดับ (Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV)

% การเข้าทำลายของโรค* (Percent Infected)	คะแนนความรุนแรงโรค (Disease Score)	การแสดงระดับต้านทานโรค (Disease reaction)
0	1	ไม่แสดงอาการโรค (Immune, I)
1-5	2	ต้านทานมาก (Highly resistant, HR)
6-10	3	ต้านทาน (Resistant, R)
11-20	4	ต้านทานปานกลาง (Moderately resistant, MR)
21-30	5	ทนทาน (Tolerant, T)
31-40	6	ทนทานปานกลาง (Moderately tolerant, MT)
41-50	7	อ่อนแอปานกลาง (Moderately susceptible, MS)
51-80	8	อ่อนแอ (Susceptible, S)
81-100	9	อ่อนแอมาก (Highly susceptible, HS)

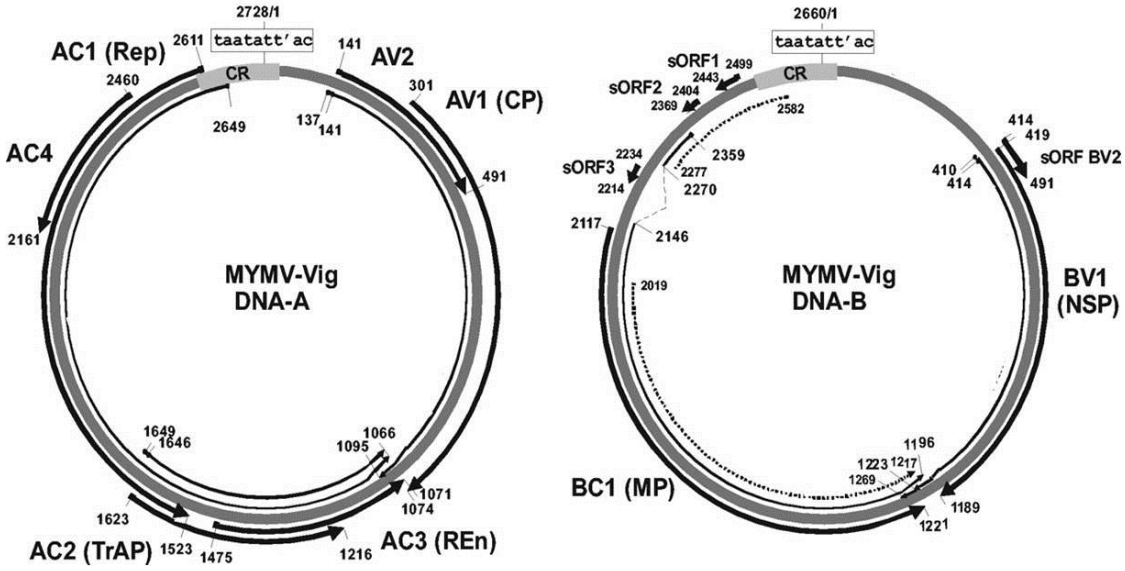
* หมายเหตุ วิธีคิด % infected $= \frac{\text{infection rate} \times 100}{\text{total number of plant}}$

6. ออกแบบไพร์เมอร์

ออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส MYMV-A โดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ จาก GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) **(ตารางที่ 2) (ภาพที่ 3)** และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) หลังจากนั้นใช้โปรแกรม Primer3 (http://simgene.com/Primer3) ออกแบบไพร์เมอร์จำนวน 2 ชุด และคำนวณค่า Annealing Temperature (Tm °C) โดยใช้โปรแกรม Oligonucleotide Properties Calculator (http://www.basis.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html)

ตารางที่ 2 แสดงฐานข้อมูล GenBank ของเชื้อไวรัส MYMV-A สำหรับออกแบบไพร์เมอร์ แหล่งที่มา : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Name (DNA-A complete sequence)	**Accession No.**	**Acronym**	**Length (nt)**
Mungbean yellow mosaic India virus-[Bangladesh] DNA-A	AF314145	MYMIV-A-**(BG)**	2741
Mungbean yellow mosaic India virus -[Nepal] segment DNA-A	AY271895	MYMIV-A-**Mg(Nep)**	2746
Mungbean yellow mosaic India virus -[Cowpea Pakistan] segment A	AY269990	MYMV-A-**Cp**(PK)	2751
Mungbean yellow mosaic India virus -[Mungbean Pakistan] segment A	AY269992	MYMV-A-Mg(PK)	2746
Mungbean yellow mosaic India virus segment DNA A	DQ389154	MYMV-A-**Cp**(Kp)	2747
Cowpea golden mosaic virus segment DNA-A	AY618902	MYMV-A- Cp(Varanasi)	2743
Mungbean yellow mosaic India virus complete viral DNA-A, clone MV11	FR837935	MYMV-A-(PK-MV11)	2751
Legume yellow mosaic virus complete genomic DNA-A, isolate 14	AJ512495	MYMV-A-**Lg**(PK)	2746
Mungbean yellow mosaic India virus Indonesia isolate Rembang segment A	JN368437	MYMIV-A-**(ID**-Rembang**)**	2746
Mungbean yellow mosaic India virus isolate Bengal, segment A	HF922628	MYMIV-A-**Gly(ID**-Bengal**)**	2745
Mungbean yellow mosaic India virus, segment DNA-A	FM208837	MYMV-A-Vig(PK)	2746
Mungbean yellow mosaic India virus Indonesia isolate Brebes 2	JN368436	MYMIV-A-(ID-Brebes2)	2746
Mungbean yellow mosaic India virus segment DNA A	DQ389154	MYMV-A-**Cp**(Kanpour)	2747
Mungbean yellow mosaic India virus Indonesia isolate Purwakarta	JN368433	MYMV-A- (Id-Purwakarta)	2746



ภาพที่ 3 แสดงภาพจำลองโครงสร้างจีโนมและ open reading frame(ORF) ต่างๆ ของเชื้อไวรัส Mungbean Yellow Mosaic,MYMV-Vig ทั้ง component-A (2,728 nt) และ component-B (2,660 nt) (Shivaprasad et al,. 2005)

7.สกัดดีเอ็นเอเชื้อไวรัส MYMV ด้วยชุดสกัด DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

ชั่งตัวอย่างใบพืชที่ทดสอบให้ได้น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม แล้วใส่ลงในโกร่งบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารละลาย AP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ที่มี RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วย้ายใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม AP2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วบ่มบนน้ำแข็ง นาน 10 นาที นำไปปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่ แล้วเติม AP3/E buffer ปริมาตร 1.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย (volumes) ทำการผสมเบา ๆ ให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันแล้วดูดสารละลายปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด DNeasy Mini column นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ให้ตะกอนดีเอ็นเอเกาะที่แผ่นเมมเบรนของ DNeasy Mini column และล้างด้วย AW buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย AE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

8. ทำการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส MYMV-A ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอเชื้อไวรัส MYMV และดีเอ็นเอพืชปกติ ที่ได้สกัดด้วยชุดสกัด DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) ทำการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพร์เมอร์ 3 คู่ ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส MYMV-A

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ได้แก่

- น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O)	17.0	ไมโครลิตร
- 10x buffer	2.5	ไมโครลิตร
- $MgCl_2$ (25 mM)	1	ไมโครลิตร
- dNTP (10 mM)	1	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ forward (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ reverse (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- platinum Taqmix (Invitogen,0.5unit/µl)	0.5	ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอต้นแบบ	1	ไมโครลิตร
รวม	**25.0**	**ไมโครลิตร**

นำมาส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา PCR ผสมกัน แล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยการตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1: Pre-denaturing	94°C	นาน 3 นาที
ขั้นที่ 2: Denaturing	94°C	นาน 1 นาที
ขั้นที่ 3: Annealing	53 - 55°C	นาน 1 นาที
ขั้นที่ 4: Elongation	72°C	นาน 1 นาที
*** ปฏิกิริยาซ้ำขั้นที่ 2 - 4 จำนวน 29 รอบ**		
ขั้นที่ 5: Final-elongation	72°C	นาน 10 นาที
ขั้นที่ 6: Hold	15°C	นาน 15 นาที

นำผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel เตรียมในสารละลาย 0.5x TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide นาน 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที แล้วนำแผ่น agarose gel มาตรวจขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ทำการบันทึกภาพและสรุปผลการทดลอง

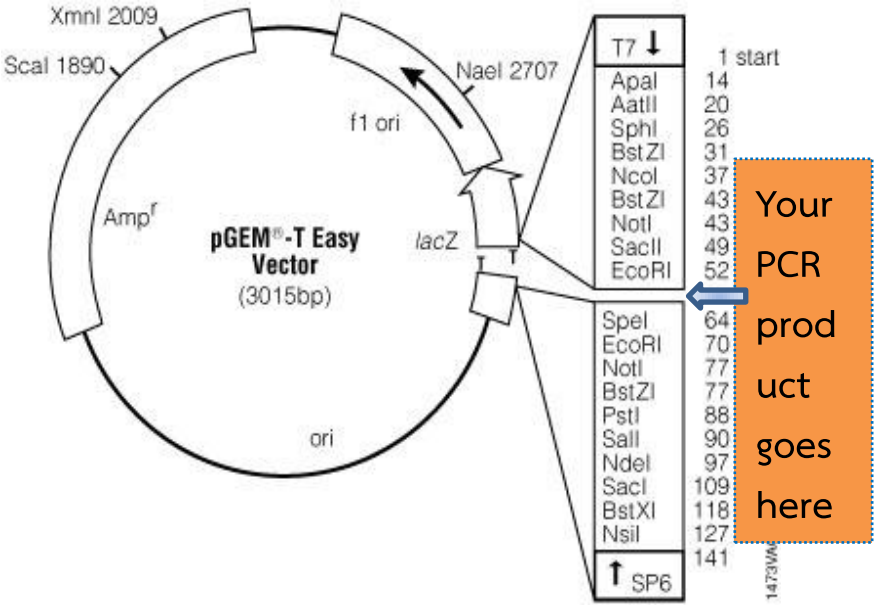
9. โคลนแถบดีเอ็นเอโดยเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector

เตรียม DNA ขนาดประมาณ 500 เบส จากการทดลองที่ 6.3 ให้บริสุทธิ์ด้วยการแยกดีเอ็นเอตามขนาดโดยใช้วิธีการอีเล็คโตรโฟริซิส ด้วย 1.2% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ ใส่หลอด centrifuge tube ชั่งน้ำหนักของเจล โดยจะต้องไม่เกิน 300 มิลลิกรัม นำมาสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit

(QIAGEN) เชื่อมต่อ DNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase **(ภาพที่ 4)** และบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

- T4 DNA Ligase 2X buffer	10.0 ไมโครลิตร
- PGEM-T easy vector	1.0 ไมโครลิตร
- PCR product	8.0 ไมโครลิตร
- T4 DNA Ligase (3 unit/μl)	1.0 ไมโครลิตร
รวม	**20.0 ไมโครลิตร**

นำพลาสมิดลูกผสมถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ DH 5α ด้วยวิธีการ heat shock transformation โดยเติมสารละลายพลาสมิดลูกผสมจากปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มีเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่พร้อมรับ พลาสมิดลูกผสม (competent cell) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบา ๆ แช่หลอดทดลองในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดมาแช่ในน้ำอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และรีบนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 - 3 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทอาหาร LB เดิมทิ้งและเติมอาหารเหลว LB ใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงไปแทน เพื่อละลายตะกอนของเชื้อแบคทีเรีย ทำการ spread บนผิวหน้าอาหารแข็ง LB agar ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และสารละลาย isopropyl-6-D thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง จากนั้นนำสารละลายของเชื้อแบคทีเรีย spread บนอาหารแข็ง LB agar ดังกล่าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วน DNA



ภาพที่ 4 แสดงแผนที่พลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector ขนาด 3,015 bp (แหล่งที่มา:http://www.enslyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects_techniques/tp_gfp/Fig3.htm)

10. การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

หลังจากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อในพลาสมิดพาหะและได้โคลนที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดตามที่ต้องการแล้ว นำโคลนดังกล่าวส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST) เพื่อยืนยันว่าไพร์เมอร์ที่ออกแบบไว้มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุจริงและทำการจัดจำแนกความสัมพันธ์ของตัวอย่างที่ตรวจด้วยโปรแกรม ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2554-กันยายน 2555

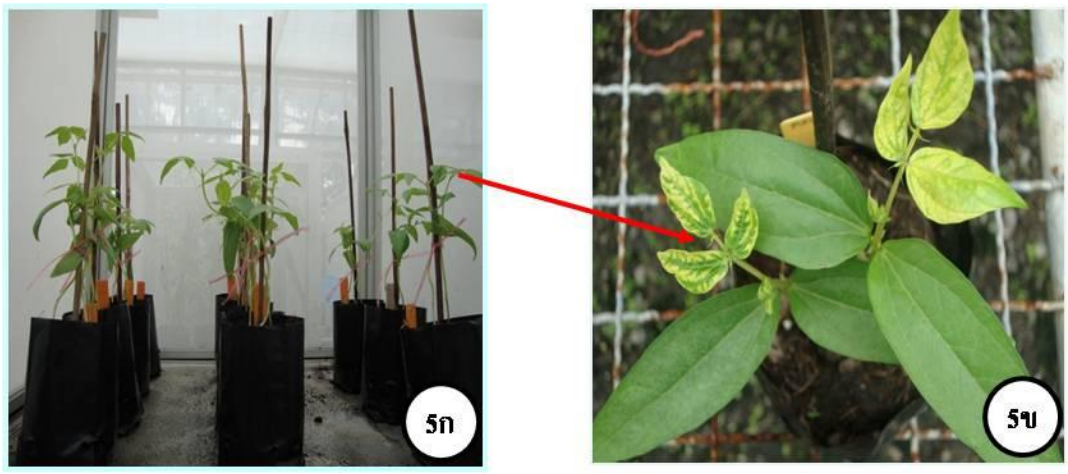
สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

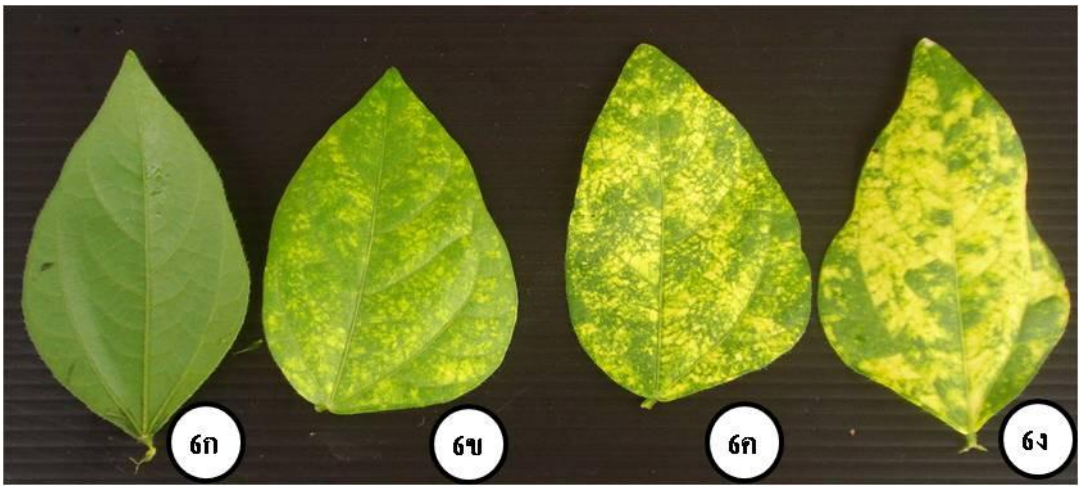
1. ผลการทดสอบถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV โดยแมลงหวี่ขาวยาสูบ แล้ว 45 วัน

ถ่ายทอดเชื้อไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว (MYMV) ด้วยแมลงหวี่ขาวให้กับถั่วเขียวชั่วที่ 3 ในสายพันธุ์ (F3) รวม 12 คู่ผสม (คู่ผสมละ 5 สายพันธุ์) ได้แก่ คู่ผสมที่ 1 CN 72 x NM 92, คู่ผสมที่ 2 CN 72 x NM 54, คู่ผสมที่ 3 NM 92 x CN 72, คู่ผสมที่ 4 NM 54 x CN 72 คู่ผสมที่ 5 KPS 2 x NM 92, คู่ผสมที่ 6 KPS 2 x NM 54, คู่ผสมที่ 7 NM 92 x KPS 2, คู่ผสมที่ 8 NM 54 x KPS 2, คู่ผสมที่ 9 SUT 1 x NM 92, คู่ผสมที่ 10 SUT 1 x NM 92, คู่ผสมที่ 11 NM 92 x SUT 1 และคู่ผสมที่ 12 NM 54 x SUT 1 รวมพันธุ์ถั่วเขียวทั้งหมดที่ทดสอบระหว่าง ปี 2554-2555 รวมจำนวน 60 สายพันธุ์ พบว่ามีจำนวน 33 สายพันธุ์ แสดงอาการโรคทุกต้นที่ทดสอบ ซึ่งในจำนวนนี้มี 20 สายพันธุ์ แสดงอาการจุดด่างสีเหลืองเล็กๆ กระจายไปทั่วใบรวม 3 ใบแรก (compound trifoliate leaves) ให้เห็นภายใน 10 วัน **(ภาพที่ 5)** และที่เหลืออีก 26 สายพันธุ์แสดงอาการโรคให้เห็นที่ 15 วัน และจากการสังเกตโรคด้วยตาเปล่าหลังจากถ่ายทอดโรคไปแล้วที่ 45 วัน พบว่าถั่วเขียวคู่ผสมที่ 1 CN 72 x NM 92, คู่ผสมที่ 2 CN 72 x NM 54, คู่ผสมที่ 4 NM 54 x CN 72 และคู่ผสมที่ 12 NM 54 x SUT 1 แสดงอาการด่างเหลืองชัดเจนทุกสายพันธุ์ ส่วนคู่ผสมที่ 6 KPS 2 x NM 54, คู่ผสมที่ 8 NM 54 x KPS 2 และคู่ผสมที่ 10 SUT 1 x NM 92 แสดงอาการใบด่างเหลืองปานกลาง และคู่ผสมที่ 7 NM 92 x KPS 2 แสดงอาการใบด่างเหลืองน้อยกว่าคู่ผสมอื่นๆ เนื่องจากสามารถสังเกตพบพื้นที่สีเขียวบนใบพืชเมื่อเปรียบเทียบกับใบถั่วเขียวปกติ **(ภาพที่ 6ก-6ง)**

สำหรับถั่วเขียวเมล็ดชุดอุณหภูมิต่ำและชุดฉายรังสี ทดสอบระหว่าง ปี 2556 จำนวนทั้งหมด 70 สายพันธุ์ พบว่าจำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ VC 1448-7-3B, VC 1448-3B, VC 1587-5-3B, VC 2797-9-2B-3-B, VC 2832-1-38-B, VC 3021-2-2B-1-B, VC 1587-2B-12-2-6, VC 1587-2B-18-2-2, 1-2 (SSDVC 3948), VC 2802 A และ 800452 พืชแสดงอาการด่างเหลืองที่ใบรวม 3 ใบแรก (compound trifoliate leaves) อย่างรุนแรงและใบไหม้ตายให้เห็นหลังจากถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV ไปแล้ว 7 วัน **(ภาพที่ 7ก-7ข)** พบ 2 สายพันธุ์ ที่พืชแสดงอาการใบด่างเหลืองชัดเจน ลดรูปและลำต้นเตี้ยแคระ ได้แก่ VC 1937 A และ VC 3116-3-2B-1-B **(ภาพที่ 8)** และหลังจากการสังเกตโรคด้วยตาเปล่าเมื่อถ่ายทอดโรคไปแล้วที่ 45 วัน พบว่า 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 1-2 (SSDVC 3948), VC 2802 A และ 800452 แสดงอาการใบด่างเหลืองชัดเจน ส่วนสายพันธุ์ VC 2815-1-2B-2-B, ชัยนาท 2, CNMB 06-02-20-4, CNMB 06-03-60-7 และ VC 2901-11-2B-1-B แสดงอาการด่างเหลืองน้อยกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ที่ทดสอบ ส่วนที่เหลืออีก 54 สายพันธุ์ พบจุดด่างสีเหลืองกระจายทั่วทุกใบทั้งต้นไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 5 แสดงอาการใบด่างเหลืองของสายพันธุ์ถั่วเขียว หลังจากถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV ด้วยแมลงหวี่ขาวไปแล้ว 15 วัน แสดงอาการจุดด่างสีเหลืองเล็กๆ กระจายไปทั่วใบรวม 3 ใบแรก (compound trifoliate leaves)



ภาพที่ 6 แสดงตัวอย่างลักษณะอาการใบด่างเหลืองของถั่วเขียวชั่วที่ 3 ในสายพันธุ์ (F3) จากการสังเกตโรคด้วยตาเปล่าหลังจากถ่ายทอดถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV ไปแล้ว 45 วัน

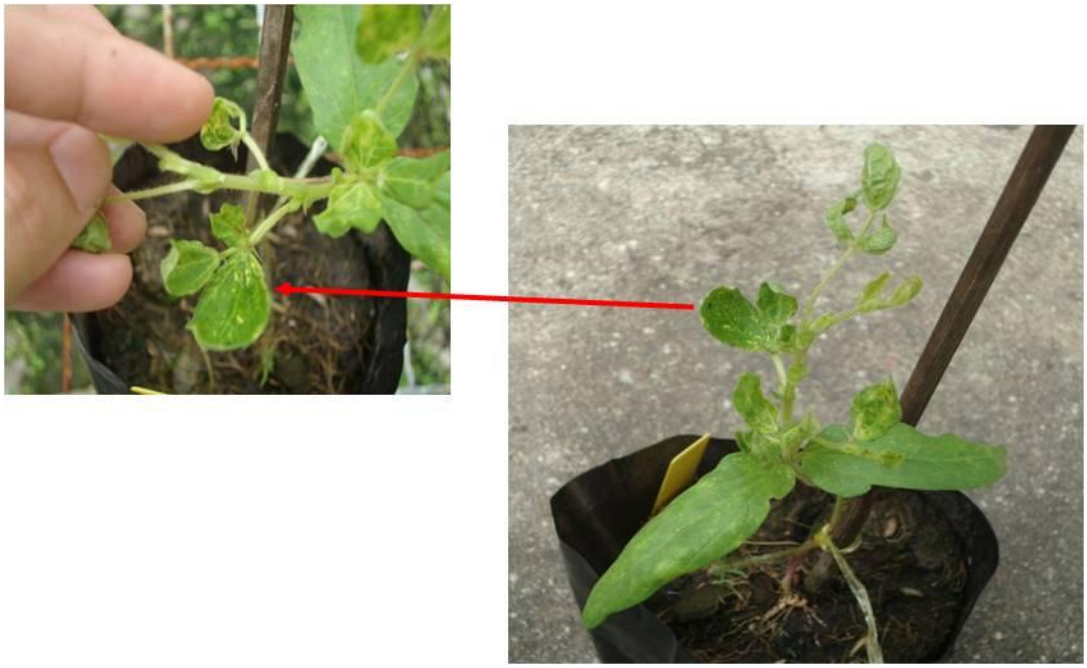
6ก : แสดงใบถั่วเขียวปกติ

6ข : แสดงอาการใบด่างเหลืองที่ยังพบพื้นที่สีเขียวจากคู่ผสมที่ 7 NM 92 x KPS 2

6ค : แสดงอาการใบด่างเหลืองปานกลางจากคู่ผสมที่ 10 SUT 1 x NM 92

6ง : แสดงอาการใบด่างเหลืองชัดเจนทุกสายพันธุ์จากคู่ผสมที่ 1 CN 72 x NM 92

ภาพที่ 7 แสดงตัวอย่างลักษณะใบไหม้ แห้งตาย ของถั่วเขียวชุดเมล็ดอุณหภูมิต่ำและชุดฉายรังสี หลังจากถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV ด้วยแมลงหวี่ขาวไปแล้ว 7 วัน
2ก : แสดงอาการใบยอดไหม้ แห้งตาย ของถั่วเขียวสายพันธุ์ VC 1448-7-3B
2ข : แสดงอาการใบไหม้ของถั่วเขียวสายพันธุ์ VC 1448-3B



ภาพที่ 8 แสดงตัวอย่างอาการใบด่างเหลือง ลดรูปชัดเจน และลำต้นเตี้ยแคระ ของ VC 1937 A หลังจากถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV ด้วยแมลงหวี่ขาวไปแล้ว 15 วัน

2. แสดงความต้านทานโรคไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว (MYMV) จากคะแนนความรุนแรงของโรค 9 ระดับ

จากการทดสอบพบว่าถั่วเขียวชั่วที่ 3 ในสายพันธุ์ (F3) รวม 12 คู่ผสม (คู่ผสมละ 5 สายพันธุ์) ระหว่าง ปี 2554-2555 รวมจำนวน 60 สายพันธุ์ หลังจากนั้นประเมินความรุนแรงของโรคจากการสังเกตด้วยตาเปล่าและอ้างอิงตามเกณฑ์ Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV (Sadiq *et al.,* 2006) พบว่า 62 สายพันธุ์ ประเมินเข้าทำลายของโรคอยู่ระหว่าง 90-100 % คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 9 หมายถึง พืชแสดงความ อ่อนแอต่อโรคมาก(Highly susceptible, HS) และพบ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ CNMB-MYMV-08-08-12 (คู่ผสมที่ 8 NM 54 x KPS 2), CNMB-MYMV-08-10-01 และ CNMB-MYMV-08-10-03, CNMB-MYMV-08-10-08 (คู่ผสมที่ 10 SUT 1 x NM 92) และ CNMB-MYMV-08-11-10 และ CNMB-MYMV-08-11-11(คู่ผสมที่ 11 NM 92 x SUT 1) ประเมินเข้าทำลายของโรคใบด่างเหลืองอยู่ที่ 60-80 % คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 8 หมายถึง พืชแสดงความอ่อนแอต่อโรค (Susceptible, S) ซึ่งผลจากผลการทดสอบความต้านทานโรคใบด่างเหลืองถั่วเขียวของถั่วเขียวชั่วที่ 3 ในสายพันธุ์ (F3) ครั้งนี้ พบมี ถั่วเขียวเพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้น ที่แสดงความทนทานต่อโรค ได้แก่ CNMB-MYMV-08-06-12 (คู่ผสมที่ 6 KPS 2 x NM 54) และ CNMB-MYMV-08-07-14 (คู่ผสมที่ 7 NM92 x KPS2) ซึ่งประเมินการเข้าทำลายของโรคอยู่ที่ 25 % เกณฑ์คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 5

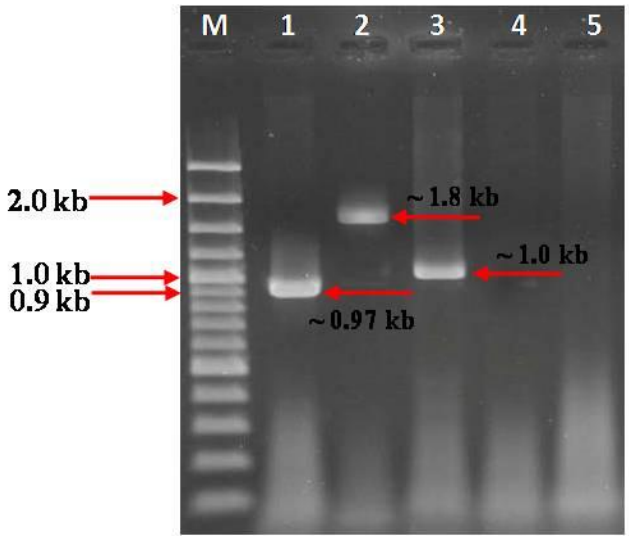
จากการทดสอบถั่วเขียวเมล็ดชุดอุณหภูมิต่ำและชุดฉายรังสี ระหว่าง ปี 2556 รวมจำนวน 70 สายพันธุ์ หลังจากนั้นประเมินความรุนแรงของโรคจากการสังเกตด้วยตาเปล่าและอ้างอิงตามเกณฑ์ Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV (Sadiq *et al.,* 2006) พบว่า 63 สายพันธุ์ ประเมินเข้าทำลายของโรคเป็น 100 % คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 9 หมายถึง พืชแสดงความ อ่อนแอต่อโรคมาก (Highly susceptible, HS) และพบ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ VC 2815-1-2B-2-B, ชัยนาท 60, มอ. 1, ชัยนาท 80, CNMB 06-02-20-4 และ CNMB 06-03-60-7 ประเมินเข้าทำลายของโรคใบด่างเหลืองอยู่ที่ 75-80 % คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 8 หมายถึง พืชแสดงความอ่อนแอต่อโรค (Susceptible, S) ซึ่งจากผลการทดสอบความต้านทานโรคใบด่างเหลืองถั่วเขียวเมล็ดชุดอุณหภูมิต่ำและชุดฉายรังสี ครั้งนี้ พบมี ถั่วเขียวเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้น ที่แสดงความต้านทานปานกลาง (Moderately resistant, MR) ได้แก่ VC 2901-11-2B-1-B ประเมินการเข้าทำลายของโรคอยู่ที่ 15 % เกณฑ์คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 4

6. ผลการออกแบบไพร์เมอร์

ได้ออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส MYMV-A โดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัส MYMV-A ที่มีอยู่ใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) **(ตารางที่ 3)** และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) หลังจากนั้นใช้โปรแกรม Primer3 (http://simgene.com/Primer3) ได้ไพร์เมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมเชื้อไวรัส MYMV-A จำนวน 3 คู่ และคำนวณค่า Annealing Temperature (Tm °C) เพื่อให้เกิดการเกาะแบบเข้าคู่กันของเบส(Complementary base pair) อย่างเหมาะสมกับต้นแบบดีเอ็นเอ (Template DNA) อุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 53-56 องศาเซลเซียส ซึ่งได้แสดงชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ ใน ตารางที่ 3 และเมื่อทำการทดสอบความสามารถของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส MYMV สาเหตุโรคใบด่างเหลืองถั่วเขียวพบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับที่ออกแบบไพร์เมอร์ไว้ ได้แก่ 970 bp, 1,800 bp และ 1,000 bp จากคู่ไพร์เมอร์ MYMV-V2-F1/ MYMV-C3-R1, MYMV-C3-F2/ MYMV-V2-R2 และ MYMV-C1-F3/ MYMV-V2-R3 ตามลำดับ ซึ่งนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป **(ภาพที่ 9)**

ตารางที่ 3 แสดงชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับสังเคราะห์จีโนมของเชื้อไวรัส MYMV-A

Primer Name	Primer Sequences 5' ⇨ 3'to	bp	Tm °C	Product Size (bp)
MYMV-V2-F1	TGC GAT CCA TTG GTG AAC GAC	21	61.2	¬ 970 bp
MYMV-C3-R1	GTG GAG GAT GAT AGC TTT ACG	21	59.5	
MYMV-C3-F2	CGT AAA GCT TAC ATC CTC CAC	21	59.5	¬ 1,800 bp
MYMV-V2-R2	GTC GTT CAC CAA TGG ATC GCA	21	61.2	
MYMV-C1-F3	ATG AGG ACC TAT GGC ACG TGC	21	63.2	¬ 1,000 bp
MYMV-V2-R3	TGC CAA CAT GCA CCG GAA TCC AT	23	58.5	



ภาพที่ 9 แสดงแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส MYMV-A สาเหตุโรคใบด่างเหลืองถั่วเขียว ขนาดประมาณ 0.97 kb, 1.8 kb และ 1.0 kb จากคู่ไพร์เมอร์ MYMV-V2-F1/ MYMV-C3-R1, MYMV-C3-F2/ MYMV-V2-R2 และ MYMV-C1-F3/ MYMV-V2-R3 ตามลำดับ

M = marker 100 bps DNA Ladder (fermentus)
ช่อง 1 = แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด ~ 0.97 kb จากคู่ไพร์เมอร์ MYMV-V2-F1/ MYMV-C3-R1
ช่อง 2 = แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด ~ 1.8 kb จากคู่ไพร์เมอร์ MYMV-C3-F2/ MYMV-V2-R2
ช่อง 3 = แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด ~ 1.0 kb จากคู่ไพร์เมอร์ MYMV-C1-F3/ MYMV-V2-R3
ช่อง 4 = ดีเอ็นเอจากถั่วเขียวปกติ (Negative control)
ช่อง 5 = น้ำ

3. ผลสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส MYMV ด้วย Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยไพร์เมอร์ที่ออกแบบให้เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ (specific primer)

เมล็ดถั่วเขียวชั่วที่ 3 ในสายพันธุ์ (F3) รวม 12 คู่ผสม (คู่ผสมละ 5 สายพันธุ์) นำมาปลูกทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV โดยแมลงหวี่ขาวยาสูบจำนวนสายพันธุ์ละ 20 ต้น หลังจากนั้นประเมินความรุนแรงของโรคตามเกณฑ์ Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV (Sadiq *et al.*, 2006) พบว่าถั่วเขียวที่ทดสอบมี 75 ต้น ไม่แสดงอาการโรค จึงนำมาตรวจด้วยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ MYMV-V2-F1/ MYMV-C3-R1 ซึ่งออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัส MYMV-A ส่วน *AV1* gene (coat protein gene, *CP*) ผลการตรวจสอบพบถั่วเขียวเพียง 5 ต้นไม่แสดงแถบดีเอ็นขนาด 970 bp ได้แก่ ถั่วเขียวสายพันธุ์ CNMB-MYMV-08-06-12 (คู่ผสมที่ 6 KPS 2 x NM 54) จำนวน 3 ต้น และถั่วเขียวสายพันธุ์ CNMB-MYMV-08-07-14 (คู่ผสมที่ 7 NM92 x KPS2) จึงทำการปลูกจนถึงระยะเก็บเกี่ยวเมล็ดเพื่อประโยชน์ต่องานปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต

ถั่วเขียวเมล็ดชุดอุณหภูมิต่ำและชุดฉายรังสี นำมาปลูกทดสอบสายถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV โดยแมลงหวี่ขาวยาสูบจำนวนสายพันธุ์ละ 20 ต้น หลังจากนั้นประเมินความรุนแรงของโรคตามเกณฑ์ Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV (Sadiq *et al.*, 2006) พบว่าถั่วเขียวที่ทดสอบมี 82 ต้น ไม่แสดงอาการโรค จึงนำมาตรวจด้วยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ MYMV-V2-F1/ MYMV-C3-R1 ซึ่งออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัส MYMV-A ส่วน *AV1* gene (coat protein gene, *CP*) ผลการตรวจสอบพบถั่วเขียว 17 ต้น ไม่แสดงแถบดีเอ็นขนาด 970 bp ได้แก่ ถั่วเขียวสายพันธุ์ VC 2901-11-2B-1-B

4. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัส MYMV-A สาเหตุโรคไวรัสใบด่างเหลือง กับฐานข้อมูล GenBank

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 2746 bp เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์เป็นเชื้อไวรัส MYMV-A สาเหตุโรคใบด่างเหลืองถั่วเขียว ให้มีค่า % identity (ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์) กับ เชื้อไวรัส MYMIV-A ของประเทศ อินเดีย และปากีสถาน อยู่ในระดับ 95-96 เปอร์เซ็นต์ มีค่า score อยู่ในช่วง 4141-4497 bits และมีค่า expect value เท่ากับ 0.0 และยังมีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในบริเวณ intergenic region มีโครงสร้างแบบ hairpin structure มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ loop อย่างจำเพาะอยู่ 9 นิวคลีโอไทด์ (nonanucleotide) เป็น 5' TAATATTAC 3' ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนอนุรักษ์ของกลุ่มเจมินีไวรัสทุกชนิดนิวคลีโอไทด์เหล่านี้มีบทบาทเกี่ยวกับการจำลองตัวของไวรัสและการถอดรหัส (transcription)โดย Rep protein จะมาย่อย(nick) นิวคลีโอไทด์อย่างจำเพาะตรงตำแหน่งที่ 7 ของ 5' TAATATT∇AC 3' (Hanley Bowdoin *et al*., 2000) และส่วนประกอบที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือ TATA box GC-rich inverted repeat ซึ่งส่วน inverted repeat (ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกัน) พบอยู่บริเวณหน้า TATA box (Usharani *et al*., 2004) ซึ่งบริเวณ TATA box เป็นส่วนที่ทำให้เจมินีไวรัสสามารถเพิ่มปริมาณในพืชอาศัยได้หลายชนิด (Hanley Bowdoin *et al*., 2000; Harrison and Robinson,2002) **(ภาพที่ 10)** จากข้อมูลข้างต้นสรุปว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่งวิเคราะห์เป็นเชื้อไวรัส MYMV-A สาเหตุโรคใบด่างเหลืองถั่วเขียว ที่พบระบาดทำความเสียหายให้กับพืชถั่วเขียวในประเทศไทย ดังนั้น เมื่อนำพันธุ์ถั่วเขียวจากแถบประเทศดังกล่าวมาใช้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์จึงมีความเสี่ยงสูงที่จะอ่อนแอต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ จึงควรมีการทดสอบระดับความต้านของพันธุ์ถั่วเขียวก่อนนำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์ เพื่อลดโอกาสเสี่ยงและความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นได้ทั้งด้านผลิต ระยะเวลา และต้นทุน เป็นต้น

5'ATTTGAAGTCGTTTTTGTATCGGTGTACACCGATTACTTCTCTATCCCCCTATCGGTGTATCGGTGTACTATATATACTAGA
GCTATTAAAAGCCCATAGGGGCACTCAGA*TATAATATT*∇ACCTGAGTGCCCCGCGACCGGTGTATTGGGGTTACTTTAACTTT
TCTGCTTTTTTGGTACCCTTATCTTTAGTCGTTCAATCAGAAGCGCTACTCAGCGCTATGTTAATTCAAATTTGAATTATAAA
GCAAGTGGACACTCTGAACCCACTAACA3'

ภาพที่ 10 แสดงบริเวณ intergenic region เชื้อไวรัส MYMV-A สาเหตุโรคใบด่างเหลืองถั่วเขียว **จำนวน 276 bp** โดยแสดงตำแหน่ง TATA box GC-rich inverted repeat; ATCGGTGT ATCGGTGT และ nonanucleotide sequence ; 5' *TATAATATT*∇A 3'

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ได้ทำการปลูกทดสอบระดับความต้านทานเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวจากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาทตั้งแต่ปี 2554 -2556 รวมทั้งหมด 2 ชุดการทดลอง โดยทำการปลูกทดสอบรวมทั้งหมด 130 สายพันธุ์ๆ ละ 20 ต้น และนำมาถ่ายทอดโรคแมลงหวี่ขาว และทำการจดบันทึกข้อมูลลักษณะอาการของโรคทุกๆ 15 วัน รวม 45 วัน หลังจากนั้นประเมินความรุนแรงของโรคจากการสังเกตด้วยตาเปล่าและอ้างอิงตามเกณฑ์ Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV (Sadiq et al., 2006) ได้ผลการทดสอบดังนี้

- ปี 2554-2555 คัดเลือกหาพันธุ์ต้านทานโรคไวรัสใบด่างเหลืองของเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวที่อยู่ในชั่วที่ 3 (F3) จำนวน 12 คู่ผสม คู่ผสมละ 5 สายพันธุ์ รวมจำนวนทั้งหมด 60 สายพันธุ์ พบว่ามีจำนวน 33 สายพันธุ์ แสดงอาการโรคทุกต้นที่ทดสอบ ซึ่งในจำนวนนี้มี 20 สายพันธุ์ แสดงอาการจุดด่างสีเหลืองเล็กๆ กระจายไปทั่วใบรวม 3 ใบแรก (compound trifoliate leaves) ให้เห็นภายใน 10 และที่เหลืออีก 26 สายพันธุ์แสดงอาการโรคให้เห็นที่ 15 วัน และจากการสังเกตโรคด้วยตาเปล่าหลังจากถ่ายทอดโรคไปแล้วที่ 45 วัน พบว่าถั่วเขียวคู่ผสมที่ 1 CN 72 x NM 92, คู่ผสมที่ 2 CN 72 x NM 54, คู่ผสมที่ 4 NM 54 x CN 72 และคู่ผสมที่ 12 NM 54 x SUT 1 แสดงอาการด่างเหลืองชัดเจนทุกสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามจากการสังเกตโรคด้วยตาเปล่าถั่วเขียวทุกสายพันธุ์คู่ผสมที่ 7 NM 92 x KPS 2 แสดงอาการใบด่างเหลืองน้อยกว่าคู่ผสมอื่นๆ เมื่อนำมาประเมินความรุนแรงของโรคจากการสังเกตด้วยตาเปล่าและอ้างอิงตามเกณฑ์ Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV (Sadiq *et al.,* 2006) พบมีถั่วเขียว 2 สายพันธุ์เท่านั้น ที่แสดงความทนทานต่อโรค ได้แก่ CNMB-MYMV-08-06-12 (คู่ผสมที่ 6 KPS 2 x NM 54) และ CNMB-MYMV-08-07-14 (จากคู่ผสมที่ 7 ระหว่างพันธุ์ NM92 x KPS2) ซึ่งประเมินการเข้าทำลายของโรคอยู่ที่ 25 % เกณฑ์คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 5 ส่วนสายพันธุ์อื่นที่ทดสอบพบว่า 62 สายพันธุ์ ประเมินเข้าทำลายของโรคอยู่ระหว่าง 90-100 % คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 9 หมายถึง พืชแสดงความอ่อนแอต่อโรคมาก(Highly susceptible, HS) และพบ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ CNMB-MYMV-08-08-12 (คู่ผสมที่ 8 NM 54 x KPS 2), CNMB-MYMV-08-10-01 และ CNMB-MYMV-08-10-03, CNMB-MYMV-08-10-08 (คู่ผสมที่ 10 SUT 1 x NM 92) และ CNMB-MYMV-08-11-10 และ CNMB-MYMV-08-11-11(คู่ผสมที่ 11 NM 92 x SUT 1) ประเมินการเข้าทำลายของโรคใบด่างเหลืองอยู่ที่ 60-80 % คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 8 หมายถึง พืชที่ทดสอบแสดงความอ่อนแอต่อโรค (Susceptible, S) และพบถั่วเขียว 3 สายพันธุ์ แสดงอาการด่างเหลืองชัดเจนกว่าพันธุ์อื่นๆ ที่ทดสอบหลังจากถ่ายทอดโรคไปเพียง 7 วัน ได้แก่ CNMB-MYMV-08-07-04 และ CNMB-MYMV-08-07-15 (จากคู่ผสมที่ 7 ระหว่างพันธุ์ NM92 x KPS2) และ CNMB-MMV-08-08-01 (จากคู่ผสมที่ 8 ระหว่างพันธุ์ NM54 x KPS2)

- ปี 2556 คัดเลือกหาพันธุ์ต้านทานโรคไวรัสใบด่างเหลืองของเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวชุดอุณหภูมิต่ำและฉายรังสี รวมจำนวนทั้งหมด 70 สายพันธุ์ จากการสังเกตพบว่าพืชแสดงอาการของโรคไวรัสใบด่างเหลืองได้เร็วและรุนแรงกว่าชุดเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวที่อยู่ในชั่วที่ 3 (F3) จำนวน 12 คู่ผสมที่ทดสอบในปี 2554-2555 โดยพบว่าหลังจากถ่ายทอดเชื้อไปแล้วเพียง 7 วัน พืชแสดงอาการใบหดเล็ก ต้นเตี้ยแคระ ทั้ง 20 ต้น และหลังจาก 15 วันใบพืชเริ่มใบไหม้และแห้งตายในบางต้น จำนวน 13 สายพันธุ์ ได้แก่ VC 1448-7-3B, VC 1448-3B, VC 1587-5-3B, VC 2797-9-2B-3-B, VC 2832-1-38-B, VC 3021-2-2B-1-B, VC 1587-2B-12-2-6, VC 1587-2B-18-2-2, 1-2 (SSDVC 3948), VC 2802 A, 800452 VC 1937 A และ VC 3116-3-2B-1-B และหลังจากจากการสังเกตโรคด้วยตาเปล่าเมื่อถ่ายทอดโรคไปแล้วที่ 45 วัน พบว่า 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 1-2 (SSDVC 3948), VC 2802 A และ 800452 แสดงอาการใบด่างเหลืองชัดเจน ส่วนสายพันธุ์ VC 2815-1-2B-2-B, ชัยนาท 2, CNMB 06-02-20-4, CNMB 06-03-60-7 และ VC 2901-11-2B-1-B แสดงอาการด่างเหลืองน้อยกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ที่ทดสอบ ส่วนที่เหลืออีก 54 สายพันธุ์ พบจุดด่างสีเหลืองกระจายทั่วทุกใบทั้งต้นไม่แตกต่างกัน เมื่อนำมาประเมินความรุนแรงของโรคจากการสังเกตด้วยตาเปล่าและอ้างอิงตามเกณฑ์ Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV (Sadiq *et al.,* 2006) พบมีถั่วเขียวเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้น ที่แสดงความต้านทานปานกลางต่อโรค ได้แก่ VC 2901-11-2B-1-B ซึ่งประเมินการเข้าทำลายของโรคอยู่ที่ 15

% เกณฑ์คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 4 ส่วนสายพันธุ์อื่นที่ทดสอบมีการเข้าทำลายของโรคอยู่ระหว่าง 75-100 % คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 8-9 หมายถึง พืชแสดงความอ่อนแอต่อโรค ถึง อ่อนแอต่อโรคมาก

ได้ไพร์เมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมเชื้อไวรัส MYMV-A จำนวน 3 คู่ จากคู่ไพร์เมอร์ MYMV-V2-F1/ MYMV-C3-R1, MYMV-C3-F2/ MYMV-V2-R2 และ MYMV-C1-F3/ MYMV-V2-R3 ที่สามารถนำตรวจหาเชื้อไวรัสไวรัสใบด่างเหลืองได้ด้วยเทคนิค PCR ให้แถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับที่ออกแบบไพร์เมอร์ไว้ ได้แก่ 970 bp, 1,800 bp และ 1,000 bp ตามลำดับ

หลังจากนั้นประเมินความรุนแรงของโรคตามเกณฑ์ Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV (Sadiq *et al.*, 2006) ถั่วเขียวที่ทดสอบชั่วที่ 3 (F3) พบถั่วเขียวที่ทดสอบจำนวน 75 ต้น ที่ไม่แสดงอาการโรค และเมล็ดชุดอุณหภูมิต่ำและชุดฉายรังสี พบถั่วเขียวที่ทดสอบจำนวน 82 ต้น ไม่แสดงอาการโรค จึงนำมาตรวจด้วยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ MYMV-V2-F1/ MYMV-C3-R1 ซึ่งออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัส MYMV-A ส่วน *AV1* gene (coat protein gene, *CP*) ผลการตรวจสอบพบว่าถั่วเขียวที่ทดสอบชั่วที่ 3 (F3) พบถั่วเขียวที่ทดสอบชั่วที่ 3 (F3) เพียง 5 ต้น ที่ไม่แสดงแถบดีเอ็นขนาด 970 bp ได้แก่ ถั่วเขียวสายพันธุ์ CNMB-MYMV-08-06-12 (คู่ผสมที่ 6 KPS 2 x NM 54) จำนวน 3 ต้น และถั่วเขียวสายพันธุ์ CNMB-MYMV-08-07-14 (คู่ผสมที่ 7 NM92 x KPS2) สำหรับถั่วเขียวเมล็ดชุดอุณหภูมิต่ำและชุดฉายรังสี พบถั่วเขียว 17 ต้น ไม่แสดงแถบดีเอ็นขนาด 970 bp ได้แก่ ถั่วเขียวสาพันธุ์ VC 2901-11-2B-1-B จึงทำการปลูกจนถึงระยะเก็บเกี่ยวเมล็ดเพื่อประโยชน์ต่องานปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัส MYMV-A สาเหตุโรคไวรัสใบด่างเหลือง จำนวน 2746 bp กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn พบค่า % identity (ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์) กับ เชื้อไวรัส MYMIV-A ของประเทศ อินเดีย และปากีสถาน อยู่ในระดับ 95-96 เปอร์เซ็นต์ มีค่า score อยู่ในช่วง 4141-4497 bits และมีค่า expect value เท่ากับ 0.0 โดยที่ค่า expect value จะเป็นค่าที่บอกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับสิ่งที่เปรียบเทียบมากน้อยแค่ไหน โดยทั่วไปแล้วจะมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ และหากมีค่าเป็นศูนย์หมายความว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เดียวกัน และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในบริเวณ intergenic region มีโครงสร้างแบบ hairpin structure อยู่ 9 นิวคลีโอไทด์ (nonanucleotide) เป็น 5' TAATATTAC 3' และพบส่วนประกอบที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือ TATA box GC-rich inverted repeat จากข้อมูลข้างต้นสรุปว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่งวิเคราะห์เป็นเชื้อไวรัส MYMV-A สาเหตุโรคใบด่างเหลืองถั่วเขียว ที่พบระบาดทำความเสียหายให้กับพืชถั่วเขียวในประเทศไทย ดังนั้น เมื่อนำพันธุ์ถั่วเขียวจากแถบประเทศดังกล่าวมาใช้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ จึงมีความเสี่ยงสูงที่จะอ่อนแอต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ จึงควรมีการทดสอบระดับความต้านของพันธุ์ถั่วเขียวก่อนนำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์ เพื่อลดโอกาสเสี่ยงและความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นได้ทั้งด้านผลิต ระยะเวลา และต้นทุน เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

บุษราคัม อุดมศักดิ์ อำภา สืบรสปลื้ม และปรีชา สุรินทร์. 2538 งานวิจัยโรคถั่วเขียว ปี 2518-2538 หน้า 129-146. *ใน* รายงานสัมมนาเชิงปฏิบัติการงานวิจัยถั่วเขียว ครั้งที่ 6. ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท.

Chiemsombat, P. 1991. Mungbean yellow mosaic disease in Thailand : review in Mungbean yellow mosaic disease,pp. 54-58. *In* Proceedings of an Internation Workshop July 2-3, 1991. Bangkok. Thailand.

Hanley-Bowdoin, L., S.B. Settlage, B.M. Orozco, S. Nagar and D. Robertson. (2000). Geminivirus: model for plant DNA replication, Transcription and cell cycle Regulation Biochem. Mol. Biol. 35: 105-140

Harrison, B.D. and D.J. Robinson. 2002. Green shoots of geminivirology. Physio. and Mol. Plant Pathology 60 : 215-218.

Sadiq, M.S. M. Saleem, S. Haidar and G. Abbas. Niab mung 2006 : A high yielding and disease resistant mungbean variety. J. Agric. Res., 44(2) : 97-103.

Thongmeearkom, P., K. Kittipakorn and P. Surin. 1981 b. Outbreak of mungbean yellow mosaic disease in Thailand. Thai. J. Agric. Sci. 14 : 201-206.

Harrison, B.D. and D.J. Robinson. 2002. Green shoots of geminivirology. Physio. and Mol.Plant Pathology 60 : 215-218.

Usharani, K.S., B. Surendranath, Q.M.R. Haq and V.G. Malathi. 2004. Yellow mosaic virus infecting soybean in northern India is distinct from the species infecting soybean in southern and western India. CURRENT SCIENCE, VOL. 86, NO. 6, 25.