การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานโรคไวรัสใบด่างเหลืองในเรือนทดลอง

Selection of Mungbean Varieties Resistance to *Mungbean Yellow Mosaic* virus under Screenhouse Condition

กาญจนา วาระวิชะนี[1] วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1]
สุมนา งามผ่องใส[2] เชาวนาถ พฤทธิเทพ[2]
กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช[1]
ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท สถาบันวิจัยพืชไร่[2]

บทคัดย่อ

โรคไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว (*Mumg Bean Yellow Mosaic Virus*, MYMV) สร้างความเสียหายให้กับพืชตระกูลถั่วได้ทุกระยะการเจริญเติบโตโดยเฉพาะถั่วเขียวผิวมัน เมื่อโรคเข้าทำลายในระยะต้นกล้าจะไม่สามารถเก็บผลผลิตได้เลย ดังนั้น นักปรับปรุงพันธุ์จึงพยายามปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานโรค ทั้งนี้ต้องมีวิธีการคัดเลือกพันธุ์ดีและมีประสิทธิภาพควบคู่กันไปด้วย ในปี 2552-2553 ทางกลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ร่วมกับศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาททดสอบคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวต้านทานโรคภายในโรงเรือนให้จำนวนปีละ 11 สายพันธุ์ และ 12 สายพันธุ์ ตามลำดับ โดยนำถั่วเขียวทุกสายพันธุ์มาปลูกเชื้อไวรัส MYMV ด้วยแมลงหวี่ขาวและสังเกตอาการภายในเรือนทดลองเป็นเวลารวม 45 วัน หลังจากนั้นประเมินความรุนแรงของโรคจากการสังเกตด้วยตาเปล่าและอ้างอิงตามเกณฑ์ Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV (Sadiq *et al*., 2006) และตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อไวรัส MYMV ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ specific primer สรุปผลได้ดังนี้ ในปี 2552 จากการสังเกตด้วยโรคตาเปล่าพบถั่วเขียว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 6601, NM94-10, VC-07-1-1 มีแนวโน้มนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ การเข้าทำลายของโรคอยู่ที่ 20%, 30% และ 35 % คือ พืชแสดงความต้านทานโรคปานกลาง ทนทานโรค และทนทานโรคปานกลาง ตามลำดับ และพบถั่วเขียว 5 สายพันธุ์ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส MYMV ที่ขนาดประมาณ 1000 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่ 6601, VC-07-1-1, VC02-3-5, NM94-10 และ Ramzan สายพันธุ์ละ 4, 3, 3, 2 และ 2 ตามลำดับ ในปี 2553 ถั่วเขียวทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบพบการเข้าทำลายของโรคอยู่ระหว่าง 60-90 % คือ พืชแสดงความอ่อนแอต่อโรค ถึง อ่อนแอต่อโรคมาก อย่างไรก็ตามจากการสังเกตโรคด้วยตาเปล่าถั่วเขียวสายพันธุ์ NM92 x CN72, NM92 x KPS2 และ NM54 x CN72 แสดงอาการด่างเหลืองน้อยกว่าพันธุ์อื่นๆ ที่ทดสอบ และพบถั่วเขียว 7 สายพันธุ์ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส MYMV ที่ขนาดประมาณ 1000 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่ ถั่วเขียว CN72 x NM54, NM54 x CN72, NM54 x SUT1, NM92 x SUT1 สายพันธุ์ละ 2 ต้น และ NM92 x CN72, KPS2 x NM54, NM92 x KPS2 สายพันธุ์ละ 1 ต้น จึงทำการเก็บเมล็ดพันธุ์จากต้นดังกล่าวให้ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาทนำไปปรับพันธุ์ต่อไป

รหัสการทดลอง **01-17-49-07-01-01-05-51**

คำนำ

ถั่วเขียวเป็นพืชไร่ที่ใช้น้ำน้อยกว่าพืชไร่อื่นหลายชนิด จึงสามารถใช้ร่วมกับระบบปลูกพืชได้ดี สามารถทำปุ๋ยพืชสดที่ให้ปริมาณไนโตรเจนสูงเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน ด้านคุณค่าทางอาหาร เป็นพืชที่ให้โปรตีนสูง จึงผลิตเพื่อการบริโภคโดยตรงและเป็นวัตถุดิบสำหรับการแปรรูปมากมาย เช่น วุ้นเส้น แป้งถั่วเขียว เป็นต้น ถั่วเขียวที่ปลูกมีอยู่สองชนิด ได้แก่ ถั่วเขียวผิวมัน และถั่วเขียวผิวดำ จากประโยชน์ต่างๆ จึงทำให้ความต้องการใช้ภายในประเทศเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี แต่ผลผลิตที่ได้ยังมีคุณภาพต่ำปัญหาส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากโรคไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว (*Mumg Bean Yellow Mosaic Virus*, MYMV) เป็นโรคที่สร้างความเสียหายกับผลผลิตถั่วเขียวเป็นอย่างมากในหลายประเทศ เช่น อินเดีย ปากีสถาน ศรีลังกา สำหรับในประเทศไทยพบการระบาดของโรคครั้งแรกเมื่อปี 2520 ที่จังหวัดกำแพงเพชร คิดพื้นที่ความเสียหายประมาณ 10,000 ไร่ และต่อมาพบโรคนี้ระบาดรุนแรงขึ้นอีกครั้งในปี 2549 และ 2550 ที่จังหวัดสุโขทัย (Nene, 1972) มีได้รายงานว่าถั่วเขียวที่ได้รับเชื้อไวรัส MYMV ในช่วงอายุการเจริญ 1-2 เดือน สามารถสร้างความเสียหายกับผลผลิตถึงประมาณ 35-80 เปอร์เซ็นต์ (Thongmeearkom *et al*.,1981) ประเทศอินเดียเคยรายงานไว้ว่าโรคนี้สร้างความเสียหายให้กับผลผลิตถั่วเขียวผิวดำ (black gram) ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อโรคเข้าทำลายในระยะต้นกล้า (Nene, 1973) ลักษณะอาการเริ่มแรกใบถั่วเขียวมีจุดด่างสีเหลืองเล็กๆ กระจายให้เห็นที่ใบรวม 3 ใบแรก (compound trifoliate leaves) ต่อมาจุดด่างสีเหลืองขยายใหญ่จนใบเปลี่ยนจากสีเหลืองปนเขียวกลายเป็นสีเหลืองจัด ใบยอดที่แตกใหม่จะด่างเหลือง ถ้าถั่วเขียวเป็นโรครุนแรงมากจะสังเกตเห็นใบรวม 3 ใบแรกมีลักษณะเป็นคลื่นม้วนงอลง ลำต้นแคระแกร็น ไม่สามารถออกดอกและติดฝักได้เลย (Chiemsombat, 1991) หากโรคนี้เกิดในระยะที่ติดฝักแล้ว ฝักจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจัดมีขนาดเล็กสั้นผิดปกติคดงอขึ้นข้างบน (บุษราคัม และคณะ, 2538) โรคนี้เกิดจากไวรัสในกลุ่มเจมินีไวรัส (Geminiviruses) Genus *Begomovirus* มีอนุภาคเป็นทรงกลมคู่หลายเหลี่ยมที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete icosahedral) อนุภาคมีขนาดประมาณ 18x30 นาโนเมตร จีโนมของไวรัสกลุ่มนี้มี 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

1. เมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวจากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท

- ปี 2552 ทดสอบ จำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ KPS2, NM94-10, VC02-3-5, VC-07-1-1, CN72, NM54 NM92, SUT1(มทส.1), Ramzan, ชน.80 และ 6601

- ปี 2553 ทดสอบ จำนวน 12 สายพันธุ์ ได้แก่ CN72 x NM54, NM54 x CN72, CN72 x NM92, NM92 x CN72, KPS2 x NM54, NM54 x KPS2, KPS2 x NM92, NM92 x KPS2, NM54 x SUT1, SUT1 x NM54, NM92 x SUT1 และ SUT1 x NM92

2. อุปกรณ์ทางการเกษตร ได้แก่ โรงเรือนกันแมลง กรงกันแมลง กระถาง ตระกร้า แก้วครอบ ดิน ถุงปลูก ปุ๋ย ป้ายชื่อ และที่ดูดแมลง (aspirstor)

3. แมลงพาหะ ได้แก่ แมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*)

4. ต้นถั่วเขียวที่แสดงอาการโรคไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว

5. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่ โกร่งบดตัวอย่าง กระติกสูญกาศ หลอดพลาสติกขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร ตู้แช่แข็ง -20^{0}C อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker) เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) ตู้ดูดควันและสารพิษ (Hood) เครื่อง Thermal cycler เครื่อง Gel electrophoresis และเครื่อง UV -transilluminator

6. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ไนโตรเจนเหลว สารประกอบ CTAB buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 และ 2.0% PVP-40; Na_2SO_3 และ PVP-40) เอ็นไซม์ *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen) 100 bp DNA Ladder (Fermentas) Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1) Ethanol และTE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

วิธีการ

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างถั่วเขียวที่แสดงอาการใบด่างเหลือง (*Mumg Bean Yellow Mosaic virus*, MYMV) จากแปลงปลูก จ. สุโขทัย และชัยนาท แล้วนำตัวอย่างถั่วเขียวใบด่างเหลืองมาถ่ายทอดโรคลงบนต้นถั่วเขียวปกติโดยใช้แมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) เป็นพาหะ และเก็บไว้เป็นแหล่งเชื้อสำหรับทดสอบในเรือนทดลองต่อไป

2. นำแมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) มาปล่อยให้รับเชื้อไวรัส MYMV บนต้นถั่วเขียวที่เป็นโรค นาน 48 ชั่วโมง ก่อนใช้เป็นแหล่งถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV ต่อไป

3. ปลูกถั่วเขียวที่ต้องการทดสอบความต้านโรคสายพันธุ์ละ 20-30 ต้น เมื่อต้นกล้าถั่วเขียวมีอายุได้ 5 วัน ใช้ aspirator ดูดแมลงหวี่ขาวที่มีเชื้อไวรัส MYMV จำนวน 10-15 ตัว / ต้น มาปล่อยบน

ต้นถั่วเขียวปกติที่ทำการทดสอบ ทิ้งให้แมลงถ่ายทอดโรคนาน 48 ชั่วโมง แล้วฉีดยาฆ่าแมลงก่อนนำต้นถั่วเขียวไปเก็บไว้ในกรงป้องกันแมลงเพื่อสังเกตอาการโรคต่อไป

4. สังเกตโรคด้วยตาเปล่าและจดบันทึกลักษณะอาการ ความรุนแรงโรคที่แสดงบนต้นถั่วเขียวที่ทดสอบทุกสายพันธุ์ หลังถ่ายทอดเชื้อไปแล้วทุกๆ 7 วัน รวมเป็นเวลา 45 วัน และแสดงระดับความต้านทานโรคจากคะแนนความรุนแรงโรค 9 ระดับ ตามเกณฑ์ของ Sadiq *et al.,* 2006 **(ตารางที่ 1)**

ตารางที่ 1 แสดงคะแนนความรุนแรงของโรคใบด่างเหลืองถั่วเขียว 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(Highlyresistant, 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 = $\frac{\text{infection rate} \times 100}{\text{total number of plant}}$

5. หลังจากถ่ายทอดโรคไปแล้ว 45 วัน ให้เก็บใบของต้นถั่วเขียวที่ไม่แสดงอาการโรคไวรัสใบด่างเหลืองมาสกัด ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส MYMV ด้วยวิธี CTAB buffer แล้วเก็บดีเอ็นเอที่ - 20 องศาเซลเซียล เพื่อนำมาตรวจหาเชื้อ MYMV ในขั้นตอน Polymerase Chain Reaction (PCR) ต่อไป

6. ออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัส MYMV จากส่วนของ coat protein gene โดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ จาก GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

7. ทำการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส MYMV ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยไพร์เมอร์ที่ได้ออกแบบให้เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ (specific primer)

8. ตรวจสอบผล PCR ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis หากผลการตรวจสอบไม่พบแถบดีเอ็นของเชื้อไวรัส MYMV ที่ขนาดประมาณ 1000 นิวคลีโอไทด์ จะทำการเก็บเมล็ดจากต้นพันธุ์ดังกล่าวให้ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาทนำไปปรับพันธุ์ต่อไป

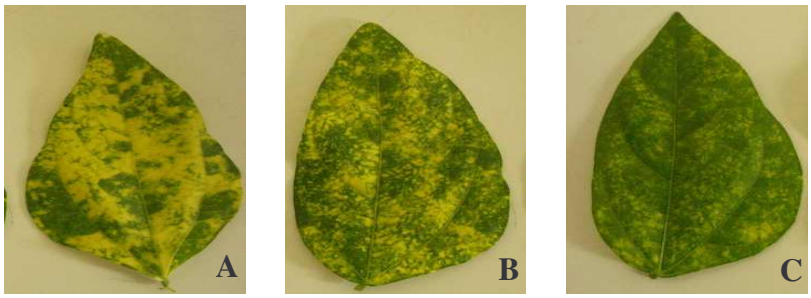
ระยะเวลา **เริ่มต้น** ตุลาคม 2551 **สิ้นสุด** กันยายน 2553

สถานที่ดำเนินการ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะอาการของถั่วเขียวหลังจากการถ่ายทอดโรคด้วยแมลงหวี่ขาวไปแล้ว 45 วัน

เมื่อถ่ายทอดเชื้อไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว (MYMV) ด้วยแมลงหวี่ขาวไปแล้ว 15 วัน ให้กับถั่วเขียวที่ทดสอบในปี 2552 ทั้ง 11 สายพันธุ์ พบถั่วเขียว 6 สายพันธุ์ ได้แก่ CN72, KPS2, SUT1 (มทส.1) , ชน.80, NM54 และ NM92 ตามลำดับ แสดงอาการจุดด่างสีเหลืองเล็กๆ กระจายทั่วใบรวม 3 ใบแรก (compound trifoliate leaves) เร็วกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ที่ทดสอบ และหลังจากถ่ายทอดโรคไปแล้วที่ 45 วัน จุดด่างสีเหลืองกระจายทั่วทุกใบทั้งต้นจนใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจัดไม่แตกต่างกัน ยกเว้นถั่วเขียวสายพันธุ์ 6601 และ NM94-10 แสดงอาการใบด่างเหลืองน้อยกว่าพันธุ์อื่น ๆ ที่ทดสอบใบพืชยังพบสีเขียวปนอยู่มากและอาการด่างที่แสดงไม่ชัดเจนในบางต้น (ภาพที่ 1 A, B, C)



ภาพที่ 1 แสดงอาการใบด่างเหลืองของถั่วเขียวที่ทดสอบในปี 2552 ทั้ง 11 สายพันธุ์ หลังจากถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV ด้วยแมลงหวี่ขาวไปแล้ว 45 วัน

1-A : ถั่วเขียวสายพันธุ์ CN72, KPS2, SUT1 (มทส.1) , ชน.80, NM54 และ NM92

1-B : ถั่วเขียวสายพันธุ์ VC02-3-5, VC-07-1-1 และ Ramzan

1-C : ถั่วเขียวสายพันธุ์ 6601 และ NM94-10

สำหรับถั่วเขียวที่ทดสอบในปี 2553 รวม 12 สายพันธุ์ พบถั่วเขียว 5 สายพันธุ์ แสดงอาการจุดด่างสีเหลืองเล็กๆ กระจายไปทั่วใบรวม 3 ใบแรก (compound trifoliate leaves) ให้เห็นที่ 13 วัน ได้แก่ CN72 x NM54, KPS2 x NM54, NM54 x KPS2, KPS2 x NM92, และ SUT1 x NM54 (ภาพที่ 2 A) และถั่วเขียวอีก 7 สายพันธุ์แสดงอาการให้เห็นที่ 15 วัน ได้แก่ NM54 x CN72, CN72 x NM92, NM92 x CN72, NM92 x KPS2, NM54 x SUT1, NM92 x SUT1 และ SUT1 x NM92 (ภาพที่ 2 B) สำหรับถั่วเขียวสายพันธุ์ CN72 x NM54 และ KPS2 x NM54 แสดงอาการจุดด่างเหลืองได้ชัดเจนกว่าทุกพันธุ์ที่ทดสอบครั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับ control คือ CN72 (ภาพที่ 2 C) และหลังจากถ่ายทอดโรคไปแล้วที่ 45 วัน จุดด่างสีเหลืองกระจายทั่วทุกใบทั้งต้นจนใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองชัดเจนไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 3 A และ B) ยกเว้นถั่วเขียวสายพันธุ์ NM92 x CN72, NM92 x KPS2, และ NM54 x CN72 อาการจุดด่างเหลืองที่แสดงสังกตได้ไม่ชัดเจนแสดง (ภาพที่ 4 A และ B)

2-A **2-B** **2-C**

ภาพที่ 2 แสดงอาการใบด่างเหลืองของสายพันธุ์ถั่วเขียวที่ทดสอบในปี 2553 หลังจากถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV ด้วยแมลงหวี่ขาวไปแล้ว 15 วัน

2-A : ถั่วเขียวสายพันธุ์ KPS2 x NM54 แสดงอาการจุดด่างสีเหลืองเล็กๆ กระจายไปทั่วใบรวม 3 ใบแรก (compound trifoliate leaves) ให้เห็นชัดเจนที่ 13 วัน

2-B : ถั่วเขียวสายพันธุ์ NM92 x KPS2 แสดงอาการจุดด่างสีเหลืองเล็กๆ กระจายไปทั่วใบรวม 3 ใบแรก (compound trifoliate leaves) ให้เห็นที่ 15 วัน

2-C : ถั่วเขียวสายพันธุ์ CN72 (control) แสดงอาการจุดด่างสีเหลืองเล็กๆ กระจายไปทั่วใบรวม 3 ใบแรก (compound trifoliate leaves ให้เห็นที่ 13 หรือ 14 วัน

3-A

3-B

ภาพที่ 3 แสดงอาการใบด่างเหลืองของสายพันธุ์ถั่วเขียวที่ทดสอบในปี 2553 หลังจากถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV ด้วยแมลงหวี่ขาวไปแล้ว 45 วัน

3-A : แสดงอาการจุดด่างสีเหลืองกระจายทั่วทุกใบเมื่อถั่วเขียวมีอายุ 28 วัน

3-B : แสดงอาการจุดด่างสีเหลืองกระจายทั่วทุกใบต่อมาใบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจัด ไม่แตกต่างกันในถั่วเขียวทุกสายพันธุ์เมื่อถั่วเขียวมีอายุ 45 วัน

4-A

4-B

ภาพที่ 4 (A และ B) ถั่วเขียวสายพันธุ์ NM92 x CN72, NM92 x KPS2, และ NM54 x CN72 แสดงอาการจุดด่างเหลืองกระจายทั่วทุกใบและในบางต้นอาการจุดด่างเหลืองแสดงไม่ชัดเจน หลังจากถ่ายทอดเชื้อไวรัส MYMV ด้วยแมลงหวี่ขาวไปแล้ว 45 วัน

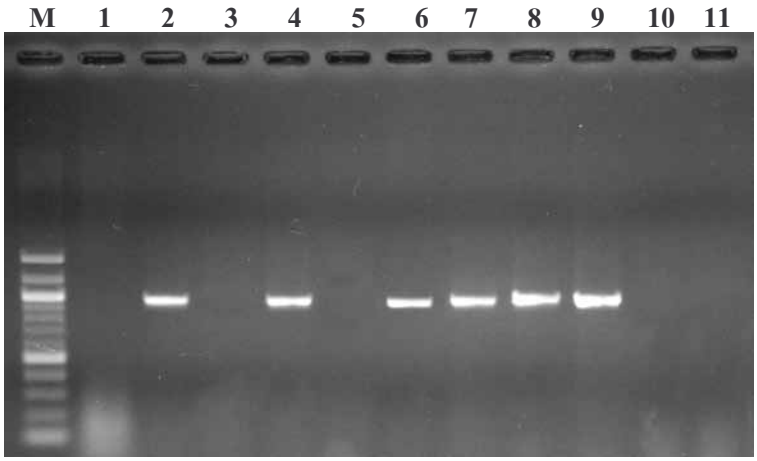
2.แสดงความต้านทานโรคไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว (MYMV) จากคะแนนความรุนแรงของโรค 9 ระดับ ตามเกณฑ์ของ Sadiq *et al.,* 2006 (ตารางที่ 1)

จากการสังเกตอาการโรคด้วยตาเปล่า พบว่า ถั่วเขียวที่ทดสอบในปี 2552 ทั้ง 11 สายพันธุ์ พบ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ KPS2, CN72, SUT1 (มทส.1), และ ชน.80 พบการเข้าทำลายโรคเท่ากับ 100 % คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 9 หมายถึงพืชแสดงความอ่อนแอต่อโรคมาก ส่วนถั่วเขียวอีก 7 สายพันธุ์ ยังพบถั่วเขียวบางต้นไม่แสดงอาการโรคใบด่างเหลืองให้เห็น ได้แก่ NM94-10 จำนวน 14 ต้น, VC02-3-5 จำนวน 10 ต้น , VC-07-1-1 จำนวน 13 ต้น, NM54 จำนวน 2 ต้น, NM92 จำนวน 7 ต้น, Ramzan จำนวน 8 ต้น และ 6601 จำนวน 16 ต้น และถั่วเขียวที่ทดสอบในปี 2553 ทั้ง 12 สายพันธุ์ พบการเข้าทำลายของโรค อยู่ระหว่าง 60-90 % คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 8-9 หมายถึง พืชแสดงความอ่อนแอต่อโรค ถึง อ่อนแอต่อโรคมาก พบถั่วเขียวบางต้นไม่แสดงอาการโรคใบด่างเหลืองให้เห็นได้แก่ สายพันธุ์ CN72 x NM54 จำนวน 6 ต้น, NM54 x CN72 จำนวน 9 ต้น , CN72 x NM92 จำนวน 5 ต้น, NM92 x CN72 จำนวน 12 ต้น, KPS2 x NM54 จำนวน 4 ต้น, NM54 x KPS2 จำนวน 5 ต้น, KPS2 x NM92 จำนวน 4 ต้น, NM92 x KPS2 จำนวน 9 ต้น, NM54 x SUT1 จำนวน 6 ต้น , SUT1 x NM54 จำนวน 6 ต้น, NM92 x SUT1 จำนวน 4 ต้น และ SUT1 x NM92 จำนวน 3 ต้น และนำใบถั่วเขียวสายพันธุ์ดังกล่าวไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อนำมาตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส MYMV ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ specific primer

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

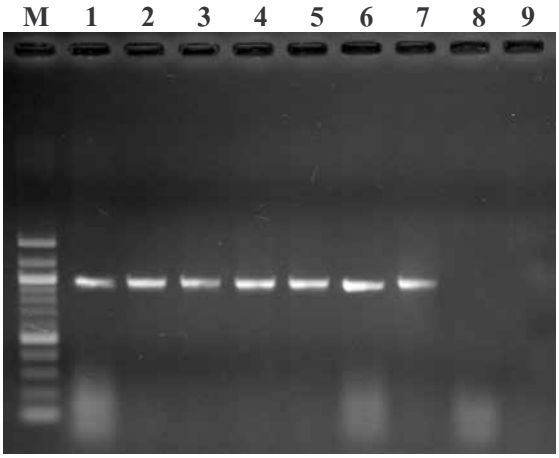
นำดีเอ็นของถั่วเขียวที่ทดสอบมาตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส MYMV ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยไพร์เมอร์ที่ออกแบบให้จับเฉพาะเจาะจง (specific primer) กับลำดับนิวคลีไทด์ของเชื้อไวรัส MYMV ที่ขนาดประมาณ 1000 นิวคลีโอไทด์ ผลการตรวจดีเอ็นเอของถั่วเขียวที่ทดสอบในปี 2552 พบว่าถั่วเขียวสายพันธุ์ 6601 จำนวน 16 ต้น ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV จำนวน 4 ต้น, ถั่วเขียวสายพันธุ์ NM94-10 จำนวน 14 ต้น และ Ramzan จำนวน 8 ต้น ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV สายพันธุ์ละ 2 ต้น (ไม่แสดงภาพ) ถั่วเขียวสายพันธุ์ VC02-3-5 จำนวน 10 ต้น และ VC-07-1-1 จำนวน 13 ต้น ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV สายพันธุ์ละ 3 ต้น (ภาพที่ 5) สำหรับถั่วเขียวสายพันธุ์ NM54 และ NM92 ตรวจพบแถบดีเอ็นของเชื้อไวรัส MYMV ขนาดประมาณ 1000 นิวคลีโอไทด์ ในทุกต้นที่ทำการตรวจสอบ (ไม่แสดงภาพ) สำหรับผลการตรวจของดีเอ็นเอของถั่วเขียวที่ทดสอบในปี 2553 พบว่าถั่วเขียวสายพันธุ์ CN72 x NM54 จำนวน 6 ต้น ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV จำนวน 2 ต้น, NM54 x CN72 จำนวน 9 ต้น ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV จำนวน 2 ต้น, NM92 x CN72 จำนวน 12 ต้น ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV จำนวน 1 ต้น, KPS2 x NM54 จำนวน 4 ต้น ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV

จำนวน 1 ต้น, NM92 x KPS2 จำนวน 9 ต้น ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV จำนวน 1 ต้น , NM54 x SUT1 จำนวน 6 ต้น ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV จำนวน 2 ต้น, NM92 x SUT1 จำนวน 4 ต้น ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV จำนวน 2 ต้น (ไม่แสดงภาพ) สำหรับถั่วเขียวสายพันธุ์ SUT1 x NM92 จำนวน 3 ต้น, CN72 x NM92 จำนวน 5 ต้น, NM54 x KPS2 จำนวน 5 ต้น, KPS2 x NM92 จำนวน 4 ต้น, SUT1 x NM54 จำนวน 6 ต้น ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV แสดงแถบดีเอ็นของเชื้อไวรัส MYMV ที่ขนาดประมาณ 1000 นิวคลีโอไทด์ ในทุกต้นที่ทำการตรวจสอบ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว (MYMV) ด้วยเทคนิค PCR ของถั่วเขียวสายพันธุ์ VC02-3-5

ช่องที่ M = Marker 100 bps DNA Ladder
ช่องที่ 1 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 2 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 3 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 4 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 5 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 6 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 7 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 8 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 9 = ถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV จะแสดงแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 1000 นิวคลีโอไทด์ (Positive control)
ช่องที่ 10 = ต้นถั่วเขียวปกติ (Negative control)
ช่องที่ 11 = น้ำ (Negative control)



ภาพที่ 6 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว (MYMV) ด้วยเทคนิค PCR ของถั่วเขียวสายพันธุ์ SUT1 x NM54

ช่องที่ M = Marker 100 bps DNA Ladder
ช่องที่ 1 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 2 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 3 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 4 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 5 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 6 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 7 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 8 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 9 = ต้นถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV
ช่องที่ 10 = ถั่วเขียวที่ตรวจพบเชื้อไวรัส MYMV จะแสดงแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 1000 นิวคลีโอไทด์ (Positive control)
ช่องที่ 11 = ต้นถั่วเขียวปกติ (Negative control)
ช่องที่ 12 = น้ำ (Negative control)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ถั่วเขียวที่ทดสอบในปี 2552 ทั้ง 11 สายพันธุ์ หลังถ่ายทอดเชื้อไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว (MYMV) ด้วยแมลงหวี่ขาวไปแล้ว 45 วัน พบจุดด่างสีเหลืองกระจายทั่วทุกใบทั้งต้นจนใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจัดไม่แตกต่างกัน ยกเว้นถั่วเขียวสายพันธุ์ 6601 และ NM94-10 แสดงอาการใบด่างเหลืองน้อยกว่าพันธุ์อื่นๆ พื้นที่ใบพืชยังพบส่วนสีเขียวปนอยู่มากและอาการด่างที่แสดงไม่ชัดเจนในบางต้น จากการสังเกตโรคด้วยตาเปล่าและประเมินความรุนแรงโรคตามเกณฑ์ Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV (Sadiq *et al*., 2006) ถั่วเขียว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 6601, NM94-10 และ VC-07-1-1 มีแนวโน้มนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ การเข้าทำลายของโรคอยู่ที่ 20%, 30% และ 35 % หมายถึง พืชแสดงความต้านทานโรคปานกลาง ทนทานโรค และทนทานโรคปานกลาง ตามลำดับ และพบถั่วเขียว 5 สายพันธุ์ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส MYMV ที่ขนาดประมาณ 1000 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่ 6601, VC-07-1-1, VC02-3-5, NM94-10 และ Ramzan สายพันธุ์ละ 4, 3, 3, 2 และ 2 ตามลำดับ จึงทำการเก็บเมล็ดพันธุ์จากต้นดังกล่าวให้ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาทนำไปใช้ปรับพันธุ์ต่อไป

ถั่วเขียวที่ทดสอบในปี 2553 ทั้ง 12 สายพันธุ์ หลังถ่ายทอดเชื้อไวรัสใบด่างเหลืองถั่วเขียว (MYMV) ด้วยแมลงหวี่ขาวไปแล้ว 45 วัน พบการเข้าทำลายของโรค อยู่ระหว่าง 60-90 % คะแนนความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 8-9 หมายถึง ถั่วเขียวที่ทดสอบทุกสายพันธุ์แสดงความอ่อนแอต่อโรคถึงอ่อนแอต่อโรคมาก แต่อย่างไรก็ตามจากสังเกตอาการโรคด้วยตาเปล่า พบถั่วเขียว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ NM92 x CN72, NM92 x KPS2 และ NM54 x CN72 แสดงอาการด่างเหลืองน้อยกว่าพันธุ์อื่นๆ เมื่อนำมาประเมินความรุนแรงโรคตามเกณฑ์ Disease Scoring Scale (1-9) for MYMV (Sadiq *et al*., 2006) พบการเข้าทำลายของโรคอยู่ระหว่าง 60-70 % และพบถั่วเขียว 7 สายพันธุ์ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส MYMV ที่ขนาดประมาณ 1000 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่ ถั่วเขียว CN72 x NM54, NM54 x CN72, NM54 x SUT1, NM92 x SUT1 สายพันธุ์ละ 2 ต้น และ NM92 x CN72, KPS2 x NM54, NM92 x KPS2 สายพันธุ์ละ 1 ต้น จึงทำการเก็บเมล็ดพันธุ์จากต้นดังกล่าวให้ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาทนำไปปรับพันธุ์ต่อไป

จากการทดลองสรุปว่าวิธีการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานโรคใบด่างเหลืองภายในโรงเรือนสามารถนำมาใช้คัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวที่ต้านทานโรคได้ แต่การประเมินความรุนแรงของโรคจากการสังเกตด้วยตาเปล่านั้นยังให้ข้อมูลการประเมินโรคที่คลาดเคลื่อน เนื่องจากการประเมินโรคด้วยตาเปล่าของแต่ละคนอาจมีมาตรฐานที่แตกต่างกัน ดังนั้นการใช้เทคนิคทางชีวอณูชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัส MYMV สามารถช่วยคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวที่ต้านทานโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพราะเทคนิค PCR มีความสามารถในการตรวจโรคได้ถึงระดับยีนของเชื้อสาเหตุทำให้ข้อมูลที่ได้มีความน่าเชื่อถือสูงจึงเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์พืช

13. คำขอบคุณ(ถ้ามี)

ขอขอบคุณ ดร. วันเพ็ญ ศรีทองชัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ขอขอบคุณคุณสุมนา งามผ่องใส ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ด้านเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว และความช่วยเหลือพร้อมคำแนะ และขอขอบบุคลากรทุกท่านที่ให้ความสะดวกในด้านต่าง ๆ เป็นอย่างดี

14. 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.

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

Nene, Y. L. 1972. A survey fo viral diseases fo pulse crops in Ultar Pradesh. G.B. Plant University of Agricuture and Technology. Pantnagar (Distt. Nainital), U.P. Research Bulletin No. 4. 191 p.

Nene, Y. L. 1973. Viral diseases of some warm weather pules crops in India. Plant Disease report. 57 : 463-467.

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