ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วลิสงที่ต้านทานต่อโรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ peanut bud necrosis virus (PBNV)

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ นางสาวจุฑารัตน์ เชื้อพงษ์

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ไสยน วงศ์แก้ว)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.มโนชัย กีรติกสิกร)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมัน จอกลอย)

บทคัดย่อ

โรคยอดไหม้ของถั่วลิสงเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ peanut bud necrosis virus (PBNV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม tospovirus แพร่ระบาดโดยมีแมลงเพลี้ยไฟเป็นพาหะ ในประเทศไทยพบระบาดทั่วไปในทุกพื้นที่ปลูก โดยเฉพาะในฤดูแล้ง ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีการระบาดเพิ่มมากขึ้น โดยสามารถทำให้เกิดความเสียหายได้ถึง 80% ในบางพื้นที่ ในปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีถั่วลิสงสายพันธุ์ใดที่ต้านทานต่อโรคยอดไหม้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วลิสงที่ต้านทานต่อโรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ PBNV ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเตรียมไวรัสบริสุทธิ์เพื่อผลิตแอนติเซรุ่มที่จะใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อของสายพันธุ์ที่นำเข้าทดสอบ ขั้นที่สองคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วลิสงเบื้องต้นในสภาพไร่ ขั้นที่สามปลูกเชื้อลงบนสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำในสภาพไร่ เพื่อทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อ และขั้นสุดท้ายตรวจดูลักษณะทางเกษตรของพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในสภาพไร่ต่ำ

ทำการทดลองทำเชื้อ PBNV บริสุทธิ์โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT) เพื่อผลิตแอนติเซรุ่มสำหรับใช้ในการตรวจสอบเชื้อในตัวอย่างพืชโดยใช้เชื้อ PBNV ไอโซเลตที่เก็บจากถั่วลิสงในพื้นที่อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี ซึ่งเป็นเชื้อที่แสดงอาการระดับอ่อน โดยใช้ถั่วลิสงพันธุ์ไหนาน 9 เป็นพืชเพิ่มปริมาณ ผลการทดลองพบว่าหลังจากหมุนเหวี่ยงในหม้อหมุนชนิดเหวี่ยงออกครั้งสุดท้ายในสารละลายน้ำตาลเข้มข้น 30-60% อนุภาคของไวรัสจะลอยตัวอยู่ที่ 2.0-3.6 ซม. และจะพบว่าช่วง 2.8-3.6 จากก้นหลอดมีความเข้มข้นของอนุภาคไวรัสสูงที่สุดเมื่อตรวจด้วยวิธี direct antigen coating-indirect enzyme linked immunosorbent assay (DAC-indirect ELISA) และเมื่อนำชิ้นดังกล่าวไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงจะได้ตะกอนของไวรัสบริสุทธิ์ ซึ่งเมื่อนำไปผลิตแอนติเซรุ่ม พบว่าแอนติเซรุ่มที่ผลิตได้ทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงเฉพาะกับเชื้อ PBNV โดยให้ titer สูงกว่า 1:12,800 เมื่อตรวจด้วยวิธี DAC-indirect ELISA การทดสอบแอนติเซรุ่มที่ได้กับน้ำคั้นของถั่วลิสงปกติ พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้จนถึงระดับความเจือจาง 1:400 แต่ปฏิกิริยาดังกล่าวจะหมดไปหากใช้น้ำคั้นจากพืชปกติเจือจางแอนติเซรุ่ม

การทดสอบความต้านทานของถั่วลิสงต่อโรคยอดไหม้ในสภาพไร่ ใช้ถั่วลิสงทั้งหมด 32 พันธุ์ จาก 3 กลุ่ม คือ พันธุ์ที่มีประวัติต้านทานโรคยอดไหม้จาก ICRISAT จำนวน 13 พันธุ์ พันธุ์ที่ได้รับการทดลองในประเทศไทยว่ามีอัตราการเข้าทำลายของเพลี้ยไฟต่ำจำนวน 12 พันธุ์ และพันธุ์เปรียบเทียบจำนวน 7 พันธุ์ โดยทำการประเมินอัตราการเกิดโรคเมื่อพืชอายุ 30 และ 60 วันหลังปลูก และสุ่มตรวจจำนวนของเพลี้ยไฟที่พบบนถั่วลิสงหลังปลูก 30 วัน ทำการทดสอบในพื้นที่ที่ได้รับการสำรวจแล้วว่ามีการแพร่ระบาดของโรคยอดไหม้ตามสภาพธรรมชาติสูง คือ ที่ตำบลคลองตาสูตร อำเภอวังน้ำเย็น จังหวัดสระแก้ว ในฤดูแล้งระหว่างเดือนมกราคม-พฤษภาคม 2538 ผลการทดลองพบว่า จำนวนต้นเป็นโรคที่ประเมินในช่วง 30 วันในบางสายพันธุ์จะสูงกว่าที่ประเมินได้ที่ 60 วันหลังปลูก เนื่องจากถั่วลิสงบางสายพันธุ์เกิดปฏิกิริยา hypersensitivity มีผลทำให้ใบที่แสดงอาการขั้นต้น (primary symptom) หลุดร่วง หรือเกิดแผลตายเฉพาะที่ ทำให้พืชต้นดังกล่าวหายจากการเป็นโรคเมื่อประเมินที่ 60 วัน ดังนั้นการสรุปผลการเปรียบเทียบขั้นสุดท้ายจึงใช้อัตรา

การเกิดโรคที่ 60 วันหลังปลูกเป็นหลัก ซึ่งพบว่ามี 13 สายพันธุ์ที่มีจำนวนต้นเป็นโรคน้อยกว่า 10% โดยสายพันธุ์ Robut 33-1 x NCAc 2214 (IC 10), ICGV 86388 และ 2134-I (48) B มีอัตราการเกิดโรคต่ำสุด คือ 0.57, 0.66 และ 2.88% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์วังน้ำเย็นที่มีอัตราการเกิดโรคสูงถึง 23.09% สำหรับพันธุ์ไทนาน 9 มีอัตราการเกิดโรค 14.29%

การศึกษาเพลี้ยไฟบนถั่วลิสง กระทำโดยสุ่มเก็บเพลี้ยไฟจากใบยอดของถั่วลิสงที่อายุ 30 วัน, ดองในเอทธิลแอลกอฮอล์ 70% จากนั้นนำมานับจำนวนและแบ่งแยกชนิดในห้องปฏิบัติการ พบว่าเพลี้ยไฟที่อาศัยอยู่บนถั่วลิสงส่วนใหญ่เป็น *Scirtothrips dorsalis* แต่จำนวนประชากรที่พบไม่มีสหสัมพันธ์ต่ออัตราการเกิดโรคยอดไหม้บนสายพันธุ์ถั่วลิสงที่นำเข้าทดสอบ การสุ่มตรวจชนิดเพลี้ยไฟบนพืชที่อยู่รอบๆแปลงทดสอบพบ *Thrips palmi* จำนวนมากบนพืชตระกูลแตง (Cucurbitaceae), พริก (*Capsicum* spp.) และโหงเหง (*Physalis minima*) แต่พบน้อยมากบนถั่วลิสง

การทดสอบปฏิกิริยาของสายพันธุ์ถั่วลิสงต่อการเข้าทำลายของเชื้อ PBNV (ต้านทานในสภาพเรือนทดลอง) กระทำโดยนำสายพันธุ์ที่มีอัตราการเกิดโรคในสภาพไร่ต่ำกว่า 10% ทั้ง 13 สายพันธุ์ มาปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกล (mechanical inoculation) โดยใช้เชื้อ PBNV จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์รุนแรงมาก (severe) จากจังหวัดอุดรธานี (UD-isolate) สายพันธุ์รุนแรงปานกลาง (moderate) จากจังหวัดนครราชสีมา (NR-isolate) และสายพันธุ์อ่อน (mild) จากจังหวัดสิงห์บุรี (SB-isolate) ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 1:10 และ 1:100 ผลการทดสอบปรากฏว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1:10 ถั่วลิสงทั้ง 13 สายพันธุ์แสดงอาการติดเชื้อบนใบที่ได้รับการปลูกเชื้อ ซึ่งต่อมาพัฒนาไปเป็นอาการแพร่กระจายทั้งต้นในระยะหลัง ยกเว้นในสายพันธุ์ Robut 33-1 x NCAc 2214 (IC 10), ICGV 86388 และ NCAc 1107 x (NCAc 2232 x NCAc 2214) (IC 34) ที่ตรวจไม่พบอาการระยะหลัง และไม่พบ virus antigen เมื่อตรวจโดยวิธี DAC-indirect ELISA เมื่อได้รับเชื้อสายพันธุ์รุนแรงมาก (UD) หรือมีจำนวนต้นที่ติดเชื้อระยะหลังต่ำเมื่อได้รับเชื้อสายพันธุ์รุนแรงปานกลาง (NR) หรือสายพันธุ์อ่อน (SB) สำหรับที่ความเข้มข้น 1:100 เฉพาะเชื้อสายพันธุ์รุนแรงปานกลางที่ทำให้ถั่วบางสายพันธุ์แสดงอาการติดเชื้อแบบแพร่กระจายทั้งต้น

เมื่อนำสายพันธุ์จำนวน 13 สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกในสภาพไร่มาศึกษาลักษณะทางเกษตร คือ น้ำหนัก 100 เมล็ด น้ำหนักฝักแห้งต่อต้น น้ำหนักเมล็ดต่อต้น ผลผลิตฝักแห้ง และเปอร์เซ็นต์กะเทาะ พบว่าสายพันธุ์ Robut 33-1 x NCAc 2214 (IC 10), ICGV 86388 และ NCAc 1107 x (NCAc 2232 x NCAc 2214) (IC 34) เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงกว่าหรือใกล้เคียงกับพันธุ์ไหนาน 9 โดยที่พันธุ์ ICGV 86388 ให้ผลผลิตต่อไร่สูงสุด มีขนาดและสีเมล็ดใกล้เคียงกับพันธุ์ไหนาน 9 ทั้ง 3 พันธุ์ดังกล่าวมีความต้านทานต่อการเกิดโรคยอดไหม้ทั้งในสภาพไร่และสภาพเรือนทดลองสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นๆ

THESIS TITLE : SCREENING OF PEANUT CULTIVARS RESISTANT TO BUD NECROSIS DISEASE CAUSED BY PEANUT BUD NECROSIS VIRUS

AUTHOR : MISS JUTHARAT CHUAPONG

THESIS ADVISORY COMMITTEE :

.....Chairman

(Dr.Sopone Wongkaew)

.....Member

(Associate Professor Dr.Manochai Keerati-Kasikorn)

.....Member

(Associate Professor Dr.Sanun Jogloy)

ABSTRACT

Bud necrosis disease in peanut is caused by peanut bud necrosis virus (PBNV), a tospovirus which has thrips as its natural vector. The disease is widespread in Thailand and in some locations the incidence of up to 80% could be observed especially during the dry season. The disease has been predicted to be of considerable importance in the near future. At present, the peanut cultivars commonly grown in Thailand are susceptible and sensitive to the disease. As a consequence the experiment was conducted with the objective of screening peanut cultivars resistant to bud necrosis disease caused by PBNV. It was done in

4 steps. Firstly, the virus was purified so that an antiserum could be produced and utilized to confirm infection in the test cultivars. Secondly, the selected peanut cultivars were screened under a field condition. Subsequently, those that showed low infection frequencies were inoculated with the virus to test their resistance to the infection. And finally, the agronomic traits of the promising lines were studied.

The PBNV mild isolate collected from infected peanut in Laem Singh District, Chantaburi was selected as a representative isolate for purification. The virus was propagated in Tainan 9 peanut and purified using a modified method of the International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT). After being subjected to the final density gradient centrifugation in 30-60% sucrose, virus bands could be detected at 2.0-3.6 cm from the tube bottom. But the highest concentration band was between 2.8-3.6 cm when assayed by the direct antigen coating-indirect enzyme linked immunosorbent assay (DAC-indirect ELISA). This band yielded sufficient amount of clean antigen after being subjected to a differential ultracentrifugation. The antiserum obtained was highly specific to most PBNV isolates and had a titer of over 1:12,800 in DAC-indirect ELISA. Cross reaction with healthy peanut sap was observed at the dilutions 1:400 but disappeared when the serum was cross-absorbed with healthy sap prior to use.

Screening for bud necrosis disease (BND) field resistance was done in the dry season from January to May of 1995 at the Klong-Ta-Sutra subdistrict, Wang Nam Yen district, Sra Kaew

province where high disease incidences had been observed in the preceeding years. Thirty two peanut lines devided in 3 groups were tested. First group of 13 lines from ICRISAT had a good record of BND resistance. The second group of 12 lines were those that had been tested in Thailand to have low thrip infestation. The third group of 7 lines were those that have been released and widely cultivated to serve as control. Bud necrosis incidences were assessed at 30 and 60 days after sowing. The thrips were randomly collected on peanut plants at 30 days after sowing. The BND incidences assessed at 30 days were higher than those observed at 60 days in some cultivars resulting from hypersensitivity reaction at the later stage of infection. Plants with this type of reaction appeared healthy at 60 days. As a consequence, the BND incidences at 60 days were used in comparing the field resistance level of each cultivar. There were 13 lines that showed BND incidences less than 10%. Among them Robut 33-1 x NCAc 2214 (IC 10), ICGV 86388 and 2134-I (48)B had the lowest incidences of 0.57, 0.66 and 2.88% respectively. The susceptible indiginous line, Wang Nam Yen had 23.09% disease incidence while Tainan 9 had 14.29%.

By randomly collecting thrips from the shoot tips of peanut at 30 days after sowing. It was found that thrips species on peanut were mostly *Scirtothrips dorsalis* but the number was not correlated with the BND incidence. *Thrips palmi* which has been indicated as PBNV major vector were found in plants surrounding the peanut field but only rarely on peanut. Those plants were

cucurbits (Cucurbitaceae), peppers (*Capsicum* spp.) and *Physalis minima*.

Screening for resistance to virus infection was done on 13 peanut lines which showed low BND incidence in the field trial. The test lines were mechanically inoculated with 3 PBNV isolates representing severe (UD-isolate), moderate (NR-isolate) and mild isolates (SB-isolate) at 2 level of concentrations, 1:10 and 1:100. At 1:10, all test plants were infected and showed primary symptoms on the inoculated leaves. Systemic infection was observed in most lines except in Robut 33-1 x NCAc 2214 (IC 10), ICGV 86388 and NCAc 1107 x (NCAc 2232 x NCAc 2214) (IC 34) in which the symptoms disappeared and no virus antigen could be detected when inoculated with the severe isolate. These lines also had very low infection rate with moderate and mild isolates. At 1:100, only the moderate isolate could infect some of the lines, although with a very low frequency.

The thirteen lines which showed low BND incidence under the field condition were further selected for agronomic triats. Among them, Robut 33-1 x NCAc 2214 (IC 10), ICGV 86388 and NCAc 1107 x (NCAc 2232 x NCAc 2214) (IC 34) gave a higher or comparable yields to that of Tainan 9. ICGV 86388 was the best among the three and has a similar seed testa color to that of Tainan 9. All these three lines also have the highest level of field and infection resistances.