การตรวจเอกสาร

ในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อให้ต้านทานต่อโรค ความรู้ในเรื่องเชื้อสาเหตุ ลักษณะอาการของโรค การแพร่ระบาดของโรค ตลอดจนลักษณะการแสดงความต้านทานของพืชต่อเชื้อ นับเป็นความรู้พื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการวางแผนการคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการคัดเลือกพันธุ์เพื่อให้ต้านทานต่อเชื้อไวรัส ต้องคำนึงถึงความสัมพันธ์ขององค์ประกอบทั้ง 3 อย่างร่วมกัน คือ เชื้อโรค แมลง และพืช ที่จะกล่าวต่อไปเป็นการทบทวนรายงานการศึกษาในเรื่องของโรคยอดไหม้ของถั่วลิสง ลักษณะอาการ สาเหตุของโรค การถ่ายทอดโดยเพลี้ยไฟ ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อกับเพลี้ยไฟ กลไกการเกิดความต้านทานของพืชต่อเชื้อไวรัส ตลอดจนวิธีการป้องกันกำจัดโรคด้วยวิธีต่างๆ

1. ลักษณะและการแสดงออกของอาการ (Symptomatology)

เชื้อ PBNV สามารถทำให้เกิดความผิดปกติกับถั่วลิสงได้หลายลักษณะ นับตั้งแต่อาการใบลาย (mosaic), ใบด่างวงแหวน (ringspot), ใบซีด (chlorosis), แตกช่อมากกว่าปกติ (rosette), ยอดกุด (bunchy top) ไปจนถึงตาไหม้หรือยอดไหม้ (bud blight) โดยลักษณะการเกิดอาการมีความเกี่ยวเนื่องกับสภาพภูมิอากาศค่อนข้างสูง (โสภณ, 2536; Reddy *et al.*, 1995)

อาการภายนอกที่เกิดขึ้นบนถั่วลิสง โสภณ (2536); Reddy และคณะ (1991) และ Reddy และคณะ (1995) ได้แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะอาการเริ่มแรก (primary symptom) และอาการระยะหลัง (secondary symptom) สำหรับอาการในระยะแรกในสภาพธรรมชาติถั่วลิสงในระยะ 2 สัปดาห์แรกหรือน้อยกว่า 1 เดือนของระยะการเจริญเติบโต จะมีความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อมากที่สุด โดยจะแสดงอาการเริ่มแรกเป็นจุดสีซีด หรือเป็นปื้นตายสีน้ำตาลบนใบที่เชื้อเข้าทำลาย ซึ่งมักจะอยู่บริเวณตอนกลางของลำต้นตอนช่วงที่เริ่มแสดงอาการ จากนั้นไม่นานจะเริ่มสังเกตเห็นอาการเส้นใบสีซีดหรือจุดกระสีซีดบนใบยอด ใบมีลักษณะโค้งงอ บิดเบี้ยว ขนาดเล็กกว่า

ปกติ และมีลักษณะเป็นกระจุก เนื่องจากปล้องสั้นกว่าที่ควรจะเป็น ใบยอดที่แสดงอาการเช่นนี้ก้านใบมักจะห้อยตัวลงไม่ตั้งตรง ใบยอดบางใบอาจมีแผลตายเกิดขึ้น ทำให้ใบแห้งตายในที่สุด ในระยะนี้มักพบอาการใบด่างวงแหวน (chlorotic ringspot), ด่างใบโอ๊ค (oak leaf pattern) หรือจุดตายวงแหวน (necrotic ringspot) กระจายอยู่บนใบส่วนใหญ่ หากเชื้อเข้าทำลายในช่วงที่พืชอายุมากแล้วจะแสดงอาการแผลตาย (necrosis) และการแพร่กระจายของเชื้อมักอยู่ที่ก้านใบ (petiole) เท่านั้น กรณีถั่วลิสงชนิด runner ถ้าเชื้อเข้าทำลายในระยะหลังๆของการเจริญเติบโต พบอาการบนใบบางกิ่งเท่านั้น โดยแสดงอาการ mild ringspot หรืออาการ necrosis ที่ส่วนยอด จากนั้นจึงพบอาการเหลือง (yellow) เหี่ยว (wilt) และบางครั้งอาจแห้งตาย ส่วนอาการระยะหลัง หลังจากที่แสดงอาการระยะแรกแล้ว หากเชื้อเป็นสายพันธุ์รุนแรง ถั่วลิสงเป็นพันธุ์อ่อนแอค่อนข้างมาก และถูกเชื้อเข้าทำลายตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบโต ถั่วลิสงดังกล่าวมักจะแคระแกรน และแห้งตายทั้งต้นในระยะต่อมา สำหรับต้นที่รอดตายจะมีลักษณะแคระแกรน ข้อปล้องสั้น มีการแตกตาข้างเป็นกระจุก และเกิดการตายบริเวณตายอดหรือตาข้าง ใบที่เกิดใหม่จะมีขนาดเล็กลงกว่าปกติมาก อาจเปลี่ยนรูปร่างและแสดงอาการต่างๆกัน บางครั้งแสดงอาการใบเล็กลีบ (shoe string) ถั่วลิสงที่ถูกเข้าทำลายในระยะแตกแขนงหรืออายุมากกว่า 1 เดือนของระยะการเจริญเติบโต การแสดงอาการในระยะหลังจะรุนแรงน้อยลง และมักจะแสดงความผิดปกติเฉพาะบนลำต้นหลักเท่านั้น

อาการที่เกิดกับเมล็ด พบว่าเมล็ดจากต้นถั่วลิสงที่ถูกเข้าทำลายตั้งแต่ระยะ 2 สัปดาห์แรกของการเจริญเติบโต ส่วนใหญ่จะเหี่ยวย่นและมีขนาดเล็กกว่าปกติ เปลือกหุ้มเมล็ด (testa) ปริแตก หรือเปลี่ยนสี เช่น สีแดงปนน้ำตาล หรือเป็นจุดสีม่วง ลักษณะเปลือกหุ้มเมล็ดแตกหรือด่าง อาจพบในเมล็ดที่ได้จากต้นที่ถูกเชื้อเข้าทำลายในระยะที่ถั่วเจริญมากแล้ว โดยเมล็ดนั้นยังมีขนาดปกติ (โสภณ, 2536; Reddy *et al.*, 1991)

ลักษณะอาการที่พบบนพืชอื่นๆ เช่น มะเขือเทศ อาการที่แสดงออกมามีหลายลักษณะแต่มักมีอาการด่างสีม่วง จุดตาย และวงแหวนสีดำ (black ring) บนใบปะปนอยู่ด้วยกันเสมอ ผลมะเขือเทศจากต้นที่ติดเชื้อมักแคระแกรนและมีแผลสะเก็ดปรากฏอยู่ด้วย คล้ายกับอาการที่ปรากฏบนผลแตงไมและพริก ในยาสูบจะแสดงอาการใบด่างและใบลดรูป

ถั่วพุ่มแสดงอาการใบด่างลายเส้น, โหงเหง (*Physalis minima*) แสดงอาการใบลดรูปและมีแผลตาย, ผักเผ็ด (*Spilanthes panicalata*) แสดงอาการใบด่างและมีแผลตาย, แพงพวย (*Vincia rosea*) แสดงอาการใบจุด และกระดุมใบ (*Richardia* sp.) แสดงอาการปล้องสั้น (โสภณ, 2536)

สำหรับความผิดปกติในระดับเซลล์ (cytopathology) เมื่อถูกเชื้อเข้าทำลาย ในกรณีเชื้อ PBNV ยังไม่พบรายงานการศึกษา เนื่องจากยังเป็นเชื้อชนิดใหม่ แต่มีรายงานการศึกษากับเชื้อ tomato spotted wilt virus (TSWV) ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม tospovirus เช่นเดียวกับเชื้อ PBNV และก่อให้เกิดโรคยอดไหม้ในถั่วลิสงเหมือนกัน แต่ขอบเขตการแพร่ระบาดแตกต่างกัน คือ TSWV แพร่ระบาดในประเทศสหรัฐอเมริกา ในรัฐทางตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่ปี ค.ศ.1986 (Culbreath *et al.*, 1994) และพบในยุโรป (Urban *et al.*, 1991) กรณีการศึกษาความผิดปกติในระดับเซลล์เมื่อถูกเชื้อ TSWV เข้าทำลาย พบว่าเชื้อ TSWV สามารถเข้าทำลายเนื้อเยื่อของพืชได้ทุกส่วน รวมทั้งเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว ไม่พบอนุภาคในละอองเกสรตัวผู้ (pollen) และเซลล์ไข่ (tapetal cells) อนุภาคที่ปรากฏในเซลล์พืชจะมีลักษณะคล้ายกันกับที่พบจากการเตรียมโดยวิธี leaf dip โดยพบกลุ่มของอนุภาคถูกห่อหุ้มอยู่ในช่องว่าง (cisternae) ของ endoplasmic reticulum โดยเฉพาะใน TSWV-lettuce strain (TSWV-L) (Francki *et al.*, 1985) แต่จากการศึกษาของ Urban และคณะ ในปี ค.ศ.1991 พบว่าใน TSWV-impatiens necrotic strain (TSWV-I) อนุภาคส่วนใหญ่อยู่ในลักษณะกระจัดกระจาย ไม่รวมตัวเป็นกลุ่ม ไม่ว่าจะอยู่ในยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) หรือ กล็อกซิเนีย (gloxinia; *Sinningia speciosa*)

นอกจากจะพบอนุภาคซึ่งรวมเป็นกลุ่ม หรือกระจัดกระจายแล้ว ยังพบกลุ่มวัตถุที่เรียกว่า complex dense mass อยู่ในเซลล์พืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลายด้วย กลุ่มวัตถุดังกล่าวปัจจุบันเรียกว่า viroplasm ซึ่งเป็นกลุ่มของโปรตีนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 nm ซึ่งอาจจะเป็น capsid protein ของเชื้อ เพราะ viroplasm นี้มักพบใกล้ๆกับบริเวณที่มีกลุ่มของอนุภาค และมักมี ribosome จำนวนมากล้อมรอบ จึงอาจเป็นไปได้ว่าการสร้างอนุภาค (particle) เกิดขึ้นบริเวณ viroplasm (Peters *et al.*, 1991)

นอกจาก viroplasm แล้ว ยังพบการสร้างวัตถุเยื่อใย (filament) ขึ้นในเซลล์ที่ติดเชื้อด้วย โดย filament จะเกาะตัวหลวมๆในเซลล์ที่ TSWV-L เข้าทำลาย แต่จะพบ filament รวมตัวเป็นกลุ่มคล้ายผลึก (paracrytalline) ในเซลล์ที่ TSWV-I เข้าทำลาย (Urban *et al.*, 1991)

การแปรเปลี่ยนของอาการในพืชอาศัยที่ถูกเชื้อในกลุ่ม tospovirus เข้าทำลาย อาการจะแปรเปลี่ยนตามชนิดหรือสายพันธุ์ของเชื้อ พืชอาศัย และสภาพแวดล้อม (German *et al.*, 1992) โดยทั่วไปพืชอาศัย เช่น มะเขือเทศที่ถูกเชื้อ TSWV เข้าทำลาย จะแสดงอาการรุนแรงมากหากพืชได้รับน้ำสม่ำเสมอทั้งก่อนและหลังปลูกเชื้อ แต่จะแสดงอาการน้อยลงหากพืชขาดน้ำเป็นบางช่วง โดยเฉพาะการขาดน้ำในช่วงขณะปลูกเชื้อและหลังปลูกเชื้อจะแสดงอาการน้อยที่สุด (Cardaba *et al.*, 1991) ผลของอุณหภูมิต่อการแสดงออกของอาการ จากการศึกษาผลของการถ่ายเชื้อหลายๆซ้ำภายใต้อุณหภูมิค่อนข้างสูง คือ 27/24°C (กลางวัน/กลางคืน) Lawson และคณะ (1993) พบว่าเชื้อ TSWV-I มีคุณสมบัติต่างไปจากเดิม คือ เชื้อที่ได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นสามารถสร้างอนุภาคที่สมบูรณ์ (virion) ได้มากขึ้น ในเซลล์ของยาสูบ (*N. benthamiana*) และสร้าง viroplasm มากขึ้นด้วยเช่นกัน แต่พบการสร้าง filamentous inclusion น้อยลง นอกจากนั้นโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาค (capsid protein) หรือเรียก N protein บางส่วนที่สร้างขึ้นมีคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาต่างไปจากเดิม แต่การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิไม่มีผลต่อเชื้อ TSWV-L ซึ่งผู้ทำการทดลองได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้น (ไม่มากนัก) ไปมีผลทำให้ TSWV-I สามารถสร้าง glycoprotein (G_1 และ G_2) ได้มากขึ้น จึงสามารถประกอบขึ้นเป็นอนุภาคที่สมบูรณ์ได้ ผลกระทบจากอุณหภูมินอกจากจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ที่ติดเชื้อแล้ว ยังทำให้อาการของพืชที่แสดงออกภายนอกเปลี่ยนไปด้วย โดยพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อที่ผ่านอุณหภูมิสูงแล้วจะแสดงอาการเป็นโรคเร็วขึ้นมาก คือ แสดงอาการหลังจากปลูกเชื้อเพียง 4 วัน และมักจะแสดงอาการรุนแรงมากในขณะที่เชื้อที่ถูกถ่ายเชื้อในสภาพเย็น คือ 21/18°C (กลางวัน/กลางคืน) พืชจะเริ่มแสดงอาการทั่วทั้งต้น (systemic) หลังปลูกเชื้อ 6-7 วัน

สำหรับเชื้อ PBNV Dharmaraj และคณะ (1995) สังเกตพบว่าลักษณะ genotype ของถั่วลิสงมีผลต่อความแปรปรวนของอาการ โดยได้แบ่งเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม

ตามลักษณะอาการที่แสดงออกมา คือ กลุ่มที่แสดงเฉพาะอาการ chlorotic และ necrotic ringspots เฉพาะใบอ่อน โดยไม่พบอาการตายที่ยอด ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มอาการแบบอื่นๆที่เกิดขึ้นในลักษณะตายยอดแสดงอาการยอดไหม้ตายโดยทันที ซึ่งอาจพบหรือไม่พบอาการ chlorotic หรือ necrotic ringspot บนใบมาก่อน อย่างไรก็ตาม Norris และคณะ ได้จัดแบ่งชนิดของเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะอาการที่แสดงออก คือ กลุ่มอาการยอดไหม้ (tip blight), กลุ่มอาการแคระแกรนและเนื้อเยื่อตาย (stunt and necrosis) และกลุ่มอาการอ่อน (mild) อาการที่แสดงออกโดยชนิดของเชื้อแต่ละกลุ่มจะมีลักษณะคงที่ (1946 quoted in Peters *et al.*, 1991)

2. การแพร่ระบาดและขอบเขตของพืชอาศัย (Epidemiology and host range)

การแพร่ระบาดของโรคที่แสดงอาการคล้ายโรคยอดไหม้ (peanut bud necrosis disease, PBND) ได้รับรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ.1949 ที่ประเทศอินเดีย ในวารสาร Annual Report ของ Indian Agriculture Research Institute แต่ในขณะนั้นยังไม่ทราบสาเหตุว่าเกิดจากเชื้อชนิดใด เพียงแต่มีลักษณะอาการคล้ายกับโรค PBND ในปัจจุบันมาก ต่อมาในปี ค.ศ.1962 การรายงานโรคดังกล่าวในประเทศอินเดีย พบการรายงานภายใต้ชื่อที่แตกต่างกันอย่างน้อย 7 ชื่อ ได้แก่ groundnut mosaic, groundnut rosette, bunchy top, chlorosis, ring mottle, bud blight และ ring mosaic จนกระทั่งในปี ค.ศ.1968 รู้จักกันดีในชื่ออาการ "Bud necrosis" (Reddy, Reddy and Appa Rao, 1968 quoted in Reddy *et al.*, 1995) สถาบัน International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT) ได้ทำการสำรวจการแพร่ระบาดของโรคนี้ในประเทศอินเดีย ตามแหล่งปลูกถั่วลิสงในพื้นที่ต่างๆของประเทศ ตั้งแต่ ค.ศ.1976-1982 และสำรวจอีกครั้งในปี ค.ศ.1992 พบว่าโรค PBND ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจในพื้นที่ของรัฐ Tamil Nadu, Karnataka, Andhra Pradesh, Maharashtra และ Uttar Pradesh (Reddy *et al.*, 1995) ปัจจุบัน PBND จัดเป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากขึ้นเรื่อยๆในประเทศอินเดีย จีน เนปาล ศรีลังกา

ฟิลิปปินส์ และไทย (Dwivedi *et al.*, 1993; Reddy *et al.*, 1995) แต่การแพร่ระบาดยังจำกัดอยู่เฉพาะในทวีปเอเชีย (Reddy *et al.*, 1995)

ในประเทศไทย โสภณ (2536) รายงานว่า พบโรคนี้ระบาดครั้งแรกที่เขตปลูกบริเวณเขื่อนน้ำอูน จังหวัดสกลนคร ในถั่วลิสงที่ปลูกช่วงฤดูแล้งปี พ.ศ.2528 ซึ่งพบเพียง 2-3 ต้น จากพื้นที่ปลูกกว่า 5 ไร่ และ 3 ปีต่อมาพบระบาดเพิ่มมากขึ้นในเขตปลูกจังหวัดลำปาง อุตรดิตถ์ และน่าน โดยพบต้นที่เป็นโรคในบางพื้นที่สูงถึง 5% การแพร่ระบาดได้ทวีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นทุกๆปี โดยเฉพาะกับถั่วที่ปลูกในช่วงหลังนา คือ ประมาณเดือนธันวาคมเป็นต้นไป ทั้งในพื้นที่เขตชลประทาน และนอกเขตชลประทานที่ปลูกโดยอาศัยความชื้นหลงเหลือ (residual moisture) หรือตามริมฝั่งแม่น้ำ โดยบางพื้นที่มีถั่วลิสงถูกทำลายถึง 90% อัตราการเกิดโรคพบค่อนข้างสูงในเขตปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือเกือบทุกจังหวัด ยกเว้นอุบลราชธานีและสุรินทร์ รองลงมาได้แก่ จังหวัดในเขตภาคตะวันออก ยกเว้นบริเวณใกล้ชายฝั่งทะเล ส่วนที่พบการแพร่ระบาดไม่มากนัก ได้แก่ จังหวัดในภาคเหนือและภาคกลาง คือ พบจำนวนต้นเป็นโรคต่ำกว่า 1% ในพื้นที่ส่วนใหญ่ จากรายงานการสำรวจโรคของ โสภณ และ จุฑารัตน์ (2537) พบว่า ในช่วงฤดูฝนมีการระบาดของเชื้อ PBNV น้อยมาก คือ พบพืชเป็นโรคน้อยกว่า 1% ในทุกแหล่งที่เข้าสำรวจ ทั้งๆที่แหล่งดังกล่าวเคยมีอัตราการแพร่ระบาดสูงกว่า 10% ในฤดูแล้ง จึงสรุปว่าลักษณะการแพร่ระบาดของโรคในประเทศไทยค่อนข้างแตกต่างจากที่พบในประเทศอินเดีย คือ ในอินเดียอัตราการเกิดโรคจะใกล้เคียงกันทั้งในฤดูฝนและฤดูแล้ง แต่ในประเทศไทยทำความเสียหายให้เฉพาะถั่วลิสงที่ปลูกในฤดูแล้ง

การขยายขอบเขตการระบาดในประเทศไทย พบว่ามีการแพร่ระบาดกว้างไกลขึ้นเรื่อยๆ จนอาจกลายเป็นโรคที่สำคัญที่สุดของถั่วลิสงในอนาคต ดังที่เคยเกิดขึ้นแล้วในประเทศอินเดีย เนื่องจากเชื้อ PBNV สามารถเข้าทำลายพืชปลูกอื่นๆได้ด้วย พืชดังกล่าวสามารถเป็นพืชพักพิง (alternate hosts) ของเชื้อ (โสภณ, 2536) และพืชพักพิงมักมีความสำคัญต่อเชื้อไวรัสที่มีเพลี้ยไฟเป็นพาหะ เพราะรูปแบบการเกิดโรคมักจะเกิดในลักษณะ monocyclic คือ การแพร่ระบาดของโรคในแปลงนั้น แหล่งเชื้อจะมาจากภายนอกแปลง โดยที่การกระจายของโรคในระยะที่ 2 (secondary spread) จะเกิดขึ้นน้อยหรือไม่มีเลย ซึ่งแตกต่างกับเชื้อไวรัสที่ถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อนที่มีลักษณะการถ่ายทอดแบบไม่

คงทน (non-persistant) การแพร่ระบาดของโรคจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในแปลงปลูก และก่อให้เกิดโรคแบบ polycyclic disease (Thresh, 1994) ความเปลี่ยนแปลงของการแพร่ระบาดของโรคนี้ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ จำนวนเพลี้ยไฟ ความแก่ของเนื้อเยื่อพืช และความต้านทานของพืช (Ranga Rao and Vijaya Lakshmi, 1993) สำหรับขอบเขตของพืชอาศัยนั้น พบว่า tospovirus เป็นกลุ่มเชื้อไวรัสที่มีพืชอาศัยกว้าง German และคณะ (1992) รายงานว่า เชื้อกลุ่มนี้มีพืชอาศัยมากกว่า 500 ชนิด จากจำนวนมากกว่า 50 สกุล ครอบคลุมทั้งพืชพวกไม้ดอกไม้ประดับ ไม้ผล และพืชผัก ในจำนวนดังกล่าวนี้มากกว่า 100 ชนิด เป็นพืชตระกูล solanaceae และ compositae สำหรับเชื้อ PBNV ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม tospovirus นี้ Reddy และคณะ (1991) รายงานว่า ในอินเดียทั้งเชื้อ PBNV และเพลี้ยไฟแมลงพาหะ ต่างก็มีพืชอาศัยที่กว้าง มีทั้งพืชปลูก ไม้ดอกไม้ประดับ และวัชพืช โดยเชื้ออาจจะมีชีวิตรอดอยู่ได้ในพืชดังกล่าว เพื่อเป็นแหล่งของเชื้อสำหรับการถ่ายทอดโดยเพลี้ยไฟ ตัวอย่างพืชปลูก เช่น มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), มะเขือยาว (*Solanum melongenum*), ถั่วเขียว (*Vigna radiata*) และ urd bean (*Vigna mungo*) ที่ปลูกในเขตชลประทานในฤดูแล้ง ไม้ดอกไม้ประดับ เช่น บานชื่น และเบญจมาศ ที่ปลูกอยู่ทั่วๆไป และวัชพืช เช่น สาบแร้งสาบกา (*Ageratum conyzoides*) และขี้เหล็กเทศ (*Cassia tora*) ที่อยู่รอบๆแปลงถั่วลิสง สำหรับในประเทศไทยพบพืชปลูกหลายชนิดที่เป็นที่พักอาศัยของเชื้อในสภาพธรรมชาติ คือ พริก มะเขือเทศ แตงโม แคนตาลูป ยาสูบ ถั่วพุ่ม และมะเขือ ซึ่งเป็นพืชที่มีการปลูกหมุนเวียนอยู่ตลอดปี และบางชนิดเป็นพืชที่อยู่ข้ามปีได้ นอกจากนั้นยังพบเชื้อ PBNV ในวัชพืชหลายชนิด คือ โทงเทง (*Physalis minima*), ผักเผ็ด (*Spilanthes paniculata*), แพงพวย (*Vincia rosea*), ผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa*), ผักแครด (*Synedrella nodiflora*) และกระดุมใบ (*Richardia* sp.) ซึ่งวัชพืชเหล่านี้พบอยู่ทั่วไปในแปลงถั่วลิสง (โสภณ, 2536)

ความหลากหลายของพืชที่เป็นแหล่งพักพิงของเชื้อ คือ พืชปลูก วัชพืช และพืชป่าหลายชนิด สามารถก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อในขั้นแรก โดยเฉพาะพืชที่เจริญในแปลงปลูก หรือตามข้างๆแปลง จึงมีผลกระทบต่อการแพร่ระบาดในแปลงปลูกมาก ในกรณีของเชื้อ PBNV และ groundnut rosette virus (GRV) การแพร่ระบาดของโรคใน

ขั้นแรกสามารถเกิดขึ้นได้จากแหล่งของเชื้อที่อยู่ห่างไกลจากแหล่งปลูก เนื่องจากเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณในแมลงพาหะได้ (Thresh, 1994)

ในด้านความเสียหาย เชื้อกลุ่ม tospovirus ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชที่ผลิตเพื่อการค้าสูงถึง 50-90% (Cho *et al.*, 1987) สำหรับความเสียหายที่เกิดจากโรค PBND เคยมีการประเมินไว้ว่ามีมากถึง 89 ล้านเหรียญสหรัฐต่อปี (Reddy *et al.*, 1995) ในรัฐ Karnataka ประเทศอินเดีย การระบาดของโรครุนแรงที่สุดทั้งในฤดูฝนและฤดูแล้ง ทำให้ผลผลิตเสียหาย 30-90% (Patil, 1993) ในฤดูฝนถ้าหากปลูกช้า คือ หลังเดือนมิถุนายน การเกิดโรค PBND อาจเกิดได้สูงถึง 90% ส่วนในฤดูแล้งเกิดได้สูงถึง 75% แต่จากการประเมินผลหลายๆปีที่ผ่านมาพบว่าการปลูกในช่วงฤดูแล้งเกิดการระบาดสูงกว่าการปลูกในฤดูฝน (Dharmaraj *et al.*, 1995) ซึ่งสภาพภูมิอากาศน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้าย (immigratory) ของเพลี้ยไฟเข้าสู่พืช (Reddy *et al.*, 1988 quoted in Dharmaraj *et al.*, 1995) Peters และคณะ (1995) รายงานว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อ tospoviruses ได้แก่ ประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อของเพลี้ยไฟ จำนวนของเพลี้ยไฟ การเคลื่อนที่ของเพลี้ยไฟ ชนิดของพืชอาศัย และจำนวนต้นพืชเป็นโรคที่เป็นแหล่งของเชื้อ

สำหรับประเทศไทย PBNV ทำความเสียหายให้เฉพาะถั่วลิสงที่ปลูกในช่วงฤดูแล้ง ซึ่งในบางพื้นที่ทำความเสียหายให้ถึง 90% (โสภณ, 2536) แต่ในฤดูฝนพบเพียง 1-10% (โสภณ และ จุฑารัตน์, 2537) แต่ความเสียหายของพืชไม่จำกัดอยู่เฉพาะถั่วลิสง เชื้อ PBNV ยังสามารถก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น มะเขือเทศ พริก และแตงโม โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการปลูกในฤดูแล้ง (โสภณ, 2536)

3. เชื้อสาเหตุ

เชื้อ PBNV จัดอยู่ในกลุ่ม (genus) tospovirus (Adam *et al.*, 1993) ในสกุล (family) bunyaviridae ซึ่งสกุลนี้ประกอบด้วย 6 genera ได้แก่ bunyavirus, phlebovirus, hantavirus, nariovirus, unkuvirus และ tospovirus โดยสมาชิกส่วนใหญ่เป็นไวรัสที่อาศัยและก่อให้เกิดโรคในแมลง (arthropod-

borne) ยกเว้น genus tospovirus ที่เป็นกลุ่มเดียวที่อาศัยอยู่ทั้งในแมลงและพืช (Elliott, 1990) ปัจจุบันสมาชิกของเชื้อในกลุ่มนี้ที่ได้รับการยืนยันแล้วแบ่งออกเป็น 7 ชนิด 5 ชนิด แบ่งโดยอาศัยความแตกต่างของปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของโปรตีนที่ห่อหุ้มนิวคลีอิค เอซิด (nucleocapsid protein) ได้แก่ tomato spotted wilt virus (TSWV), impatiens necrotic spot virus (INSV), peanut yellow spot virus (PYSV), peanut bud necrosis virus (PBNV) และ watermelon silver mottle virus (WSMV) (Law and Moyer, 1990 quoted in German *et al.*, 1992; Wongkaew, 1986; Adam *et al.*, 1993; Yeh and Chang, 1995) ส่วนอีก 2 ชนิด คือ tomato chlorotic spot virus (TCSV) และ groundnut ringspot virus (GRSV) แบ่งโดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nucleoprotein gene (N gene) (de Avila *et al.*, 1993)

TSWV เป็นเชื้อชนิดแรกในกลุ่ม tospovirus ที่ก่อให้เกิดโรคในพืช โดยสังเกตพบอาการ "spotted wilt" ครั้งแรกในประเทศออสเตรเลียในปี ค.ศ.1915 ต่อมาจึงทราบสาเหตุว่าเป็นเชื้อไวรัสในปี ค.ศ.1930 โดย Samuel และคณะ หลังจากนั้นเป็นต้นมาเชื้อ TSWV ก็ได้แพร่ระบาดเข้าไปในเขต tropical, subtropical และเขต temperate ได้แก่ northern hemisphere, Western Europe และ Asia (German *et al.*, 1992) ปี ค.ศ.1995 WSMV เป็นชนิดล่าสุดที่ค้นพบโดย Yeh และ Chang (1995) ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบลำดับ nucleotide ของ gene ของ WSMV (ขณะทำการศึกษาใช้ชื่อ tomato spotted wilt like virus, TSWV-W) กับเชื้ออื่น 5 ชนิด ในกลุ่ม tospovirus เพื่อยืนยันว่า WSWV เป็นเชื้อชนิดใหม่ในกลุ่ม tospovirus จากการศึกษาพบว่า ระดับความเหมือน (homology) อยู่ในระดับต่ำ คือ 54.4-55.9% กับเชื้อทั้ง 5 ชนิดที่นำมาทดสอบการเกิด cross hybridization เมื่อใช้ Tospo-W-specific cDNA probe ผลการทดลองเมื่อพิจารณาร่วมกับการเกิด host reaction, ความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยา, ขนาดโมเลกุลของ nucleoprotein (N protein), nucleic acid, รูปแบบของ double-stranded genemic RNAs และกลวิธีการเกิด ambisense gene ทำให้ Yeh และ Chang สรุปว่า WSMV เป็น

ไวรัสชนิดใหม่ในกลุ่ม tospovirus ที่ระบาดในแตงโม (*Citrullus lanatus* (Thunb.)) ในไต้หวัน โดยมีเพลี้ยไฟเป็นพาหะ

สำหรับเชื้อ PBNV เดิมใช้ชื่อ groundnut bud necrosis virus (GBNV) ต่อมาได้รับการเปลี่ยนชื่อเป็น peanut bud necrosis virus (ICRISAT, 1993) ในช่วงก่อนปี ค.ศ.1992 รู้จักทั่วไปในชื่อของ TSWV ที่เข้าทำลายถั่วลิสงในประเทศอินเดีย (Reddy *et al.*, 1991) และไทย (โสภณ, 2528) จนกระทั่งในปี ค.ศ.1993 จากการศึกษารายละเอียดของ Adam และคณะ (1993) ได้มีการขอเสนอตั้งชื่อให้เป็นไวรัสชนิดใหม่ เนื่องจากมีคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาต่างจากเชื้อ TSWV ทั้งสองสายพันธุ์ (strain) คือ TSWV-lettuce strain และ TSWV-impatiens necrotic strain ในประเทศไทยก็มีการศึกษาที่ให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Adam และคณะ คือ เชื้อที่รวบรวมได้จากถั่วลิสงที่เป็นโรคยอดไหม้ไม่ทำปฏิกิริยาทางเซรุ่มกับเชื้อ TSWV ทั้ง 2 strain แต่ให้ปฏิกิริยาบวกกับแอนติเซรุ่ม GBNV จากอินเดีย (โสภณ และจุฑารัตน์, 2537)

3.1 โครงสร้างและองค์ประกอบของอนุภาค

อนุภาคของ tospovirus มีรูปร่างค่อนข้างกลม (quasi-spherical) หรือกลม (spherical) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 80-110 nm โดยเฉลี่ย 85 nm อนุภาคถูกห่อหุ้มด้วย lipid ที่มีชั้น membrane ของ glycoprotein 2 ชั้น มีลักษณะเป็นปุ่ม (spikes) อยู่บน viral envelope อนุภาคประกอบด้วยโปรตีน 4 ชนิด คือ nucleocapsid protein (N protein) น้ำหนักโมเลกุล 29 kDa, Large protein (L protein) น้ำหนักโมเลกุล 200 kDa ทำหน้าที่เป็น putative viral polymerase (viral transcriptase) (de Haan *et al.*, 1991) และ glycoprotein ที่เป็น membrane ของอนุภาค 2 ชนิด คือ G_1 น้ำหนักโมเลกุล 78 kDa และ G_2 น้ำหนักโมเลกุล 58 kDa ในกรณี TSWV (Mohamed *et al.*, 1973 quoted in German *et al.*, 1992) และกรณี PBNV น้ำหนักโมเลกุลของ N

protein เท่ากับ 32 kDa ซึ่งเท่ากับ tospovirus isolate ของมะเขือเทศ และแตงไมในไต้หวัน (Adam *et al.*, 1993)

องค์ประกอบที่เป็นนิวคลีอิกเอซิด เป็น RNA สายเดี่ยว (single-stranded RNA; ssRNA) มี 3 ขนาดที่อยู่ในลักษณะเป็น pseudocircular structures ที่มี N protein ห่อหุ้มไว้ ได้แก่ RNA ขนาดใหญ่ (L) (8.9 kb), RNA ขนาดกลาง (M) (5.9 kb) และ RNA ขนาดเล็ก (S) (2.9 kb) (German *et al.*, 1992) TSWV-brazilian isolate มี L RNA ยาว 8,897 nucleotides (de Haan, 1991 quoted in Yeh and Chang, 1995), M RNA ยาว 4,821 nucleotide (Kormelink *et al.*, 1992a) และ S RNA ยาว 2,916 nuclotide (de Haan, 1990 quoted in Yeh and Chang, 1995; Kormelink *et al.*, 1991 quoted inYeh and Chang, 1995) Reddy และคณะ (1994) รายงานว่า PBNV จัดอยู่ในกลุ่ม tospovirus เช่นเดียวกับ TSWV เนื่องจากมีรูปร่างและโครงสร้างของอนุภาคที่เหมือนกัน นอกจากนั้นยังมีองค์ประกอบในส่วนของ RNA ที่คล้ายกัน คือ มี RNA 3 ชิ้น (tripatite genomic) แต่การศึกษาถึงการเรียงลำดับเบสบน RNA ยังมีการศึกษากันน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ TSWV อย่างไรก็ตาม Reddy และคณะ (1995) ได้รายงานขนาดของ RNA ทั้ง 3 ชิ้นของ PBNV ไว้ดังนี้ คือ L RNA น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 9 kb, M RNA ประมาณ 5.0 kb และ S RNA ประมาณ 3.0 kb และ Satyanarayana และคณะ (1995) รายงานขนาดของ N gene ว่ายาว 831 nucleotide ควบคุมการสร้างโปรตีนขนาด 30.7 kDa ขณะที่เมื่อ ค.ศ.1993 Adam และคณะ (1993) เคยรายงานว่ามีขนาดเท่ากับ 32 kDa

RNAs ทั้ง 3 ชิ้น จะบงการการสร้างโปรตีน 6 ชนิด คือ nucleocapside protein (N protein), glycoprotein (G protein) 2 ชนิด คือ G_1 และ G_2, nonstructural protein (NSs protein), movement protein และ viral polymerase (German *et al.*, 1992; Lawson *et al.*, 1996)

หน้าที่ของ RNAs แต่ละชิ้นของ tospovirus ที่มีการศึกษากันมาก คือ RNAs ของเชื้อ TSWV ซึ่งเคยรายงานไว้ดังนี้คือ S และ M RNA การบงการการสร้างโปรตีนมีลักษณะเป็นแบบ ambisense (RNA$\pm$) แต่เฉพาะ viral complementary

sense (RNA^+) เท่านั้นที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่เชื้อไวรัสนำไปใช้ประโยชน์ได้ ส่วน L RNA มีลักษณะเป็น antisense (RNA^-) (Pang *et al.*, 1994) S RNA มี 2 open reading frame (ORFs) และพบว่ามี sequence ขนาด 12-20 nucleotide ใน m RNA ของ S RNA ที่สกัดจากยาสูบ m RNA นี้เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยใช้ primer พบเป็นลำดับที่ไม่เกี่ยวข้องต่อการสร้างไวรัส ลำดับนี้อยู่ที่ปลายด้าน 5' ทั้งของ m RNA ที่ควบคุมการสร้าง N protein และ NSs protein แสดงว่า m RNA นี้มีกลไกที่ทำให้ poly A ที่คลุมอยู่ด้านปลาย 5' ของ m RNA หลุดออก (cap-snatching) เพื่อให้สามารถเริ่มต้นถอดรหัสของ viral genome จากทางด้าน 5' ได้ด้วย (Kormelink *et al.*, 1992b) ORF แรกของ S RNA อยู่ใน viral sense (RNA^-) ควบคุมการสร้าง NSs protein น้ำหนักโมเลกุล 52.4 kDa และอีก ORF หนึ่งอยู่ใน viral complementary sense (RNA^+) ควบคุมการสร้าง N protein น้ำหนักโมเลกุล 29 kDa ส่วน M RNA มี 2 ORFs เช่นกัน ORF หนึ่งอยู่ใน viral complementary sense (RNA^+) ควบคุมการสร้างโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 127.4 kDa เพื่อเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้าง G_1 และ G_2 glycoprotein ORF ที่สองอยู่ใน viral sense (RNA^-) ควบคุมการสร้าง NSs protein น้ำหนักโมเลกุล 33.6 kDa ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของอนุภาค (Kormelink *et al.*, 1992a; Pang *et al.*, 1994; Yeh and Chang, 1995) แต่จากรายงานของ Kormelink และคณะ (1994) พบ NSs protein นี้เป็น putative viral movement protein ซึ่งทำการทดลองโดยการ clone gene ส่วนที่ควบคุมการสร้าง NS protein ขนาด 33.6 kDa นี้ ถ่ายลงบน *Escherichia coli* pET-11 จากนั้นนำแบคทีเรียดังกล่าวไปสกัดเอาโปรตีนบริสุทธิ์เพื่อนำไปผลิต polyclonal antiserum สำหรับทำ western immunoblot เพื่อวิเคราะห์การเข้าทำลายของ TSWV ในยาสูบ (*N. rustica*) พบว่า NSs protein ถูกสร้างขึ้นมาในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ในขั้นแรกของการแสดงอาการแบบแพร่กระจายทั้งต้น (systemic) โดยจะพบ NSs protein อยู่ร่วมกับ N protein ใน cytoplasm แต่ NSs protein มักจะสูญเสียไปเมื่อทำการสกัดไวรัสบริสุทธิ์จากใบพืช และเมื่อวิเคราะห์ภายในเซลของต้นอ่อนพบว่าใบที่แสดงอาการ systemic จะพบ NSs protein บริเวณ cell wall และ cytoplasmic membranes และเมื่อทำ immunogold labeling

กับส่วนของเนื้อเยื่อของยาสูบที่ถูกเข้าทำลายจะมี NSs protein อยู่รวมกลุ่มกับ N protein ใน cytoplasm และภายในท่อต่อระหว่างเซลล์ (plasmodesmata) ทำให้ Kormelink และคณะ สรุปว่า NSs protein นี้เป็น viral movement protein ของ TSWV ก่อให้เกิดการเคลื่อนย้ายแบบ cell-to-cell ของโครงสร้าง RNA ที่ยังไม่มี envelope

สำหรับ L RNA เป็น negative polarity มี 1 ORF ขนาดใหญ่บน viral strand (RNA-) ควบคุมการสร้าง viral transcriptase (putative RNA polymerase) น้ำหนักโมเลกุล 331.5 kDa สำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณ (de Haan *et al.*, 1991; Yeh and Chang, 1995)

3.2 การเพิ่มปริมาณและการเคลื่อนย้ายของเชื้อ

การเพิ่มปริมาณของ tospovirus มีวงจรค่อนข้างซับซ้อน ซึ่งจะต้องเกี่ยวข้องกับ membrane ของพืช เพื่อใช้เป็น envelope ของเชื้อ และขณะที่เชื้อเข้าสู่ระยะเต็มวัย (mature) จะพบการสร้างสิ่งแปลกปลอม (inclusion) ภายในเซลล์พืชด้วย ซึ่งลำดับขั้นตอนการเพิ่มปริมาณของเชื้อมีดังนี้คือ หลังจากที่เชื้อเข้าสู่ cell พืชแล้ว ในขั้นแรกเอนไซม์ transcriptase ที่มีอยู่แล้วในอนุภาคจะควบคุมการสร้าง L RNA ชนิดบวก (RNA+) ให้มีมากขึ้นก่อน โดยอาศัย L RNA ชนิดลบ (RNA-) เป็นแบบพิมพ์ จากนั้น L RNA+ จะทำหน้าที่เป็น m RNA สร้างเอนไซม์ transcriptase ให้มีมากขึ้น เพื่อใช้สำหรับการสร้าง M RNA+ และ S RNA+ โดยใช้ M RNA- และ S RNA- เป็นแบบพิมพ์ กิจกรรมที่เกิดขึ้นนี้เกิดเฉพาะใน cytoplasm จนถึงขั้นตอนการเกิดการรวมกัน (assembly) ของส่วนประกอบต่างๆเป็นอนุภาค อนุภาคที่สมบูรณ์ของไวรัสจะเริ่มพัฒนาโดยการเข้าเกาะติดกับ endoplasmic reticulum (ER) ของพืช และจะดันตัวผ่าน (budding) ผนังของ ER ทำให้เกิดเป็นอนุภาคที่มีผนังหุ้ม 2 ชั้น (double envelope (DE) particle) หลังจากนั้นอนุภาคที่มีผนังหุ้ม 2 ชั้นจะเกาะรวมตัวกันหลายๆอนุภาค ทำให้ผนังชั้นนอกหลอมตัวรวมกัน ปล่อยให้เหลือเพียงชั้นเดียว (mature virion) รวมกลุ่มอยู่ภายในช่องว่าง (cisternae) ระหว่างผนัง (Francki *et al.*, 1985) อนุภาคของ

TSWV ในเนื้อเยื่อพืชสามารถพบได้ใน endoplasmic reticulum ชนิดหยาบ และในช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มนิวเคลียส (perinuclear space) แต่ไม่พบในองค์ประกอบของเซลล์ส่วนอื่นๆ หรือใน vacuoles เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Zielinska and Micinski, 1987)

โดยทั่วไปเมื่อเชื้อไวรัสเข้าสู่พืชแล้ว ไม่ว่าจะเข้าโดยวิธีการถ่ายทอดโดยวิธีกลหรืออาศัยพาหะ เชื้อจะประสบความสำเร็จในการเข้าทำลายพืชได้ต้องประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้คือ 1) การเข้าสู่เซลล์พืชของเชื้อ 2) การเพิ่มปริมาณของ viral genome และองค์ประกอบอื่น 3) การเคลื่อนย้ายขององค์ประกอบของเชื้อไวรัสจากเซลล์ที่ถูกเข้าทำลายสู่เซลล์ข้างเคียง (cell to cell movement หรือ short distance movement) และ 4) การเคลื่อนย้ายของ infectious particle จากบริเวณที่เข้าทำลายสู่ส่วนอื่นๆของพืช (long distance movement) (Berna, 1995) ความผิดปกติที่ขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งจะมีผลต่อความแปรปรวนของอาการ เพราะเชื้อมีองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับการแสดงอาการมากกว่า 1 องค์ประกอบ องค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญอาจจะเป็น viral nonstructure movement protein (MPs) เพราะองค์ประกอบนี้มีหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนย้ายเชื้อในระยะสั้น (short distance movement) และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่กำหนดความรุนแรงของโรค (virulence) (Berna, 1995)

การเคลื่อนย้ายขององค์ประกอบของเชื้อไวรัสแบบ cell-to-cell จะต้องผ่านส่วนของ plasmodesmata (PD) (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 nm) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มั่นใจว่าเป็น virion หรือ nucleic acids ที่เคลื่อนย้ายผ่านช่อง PD กรณีเชื้อ tobacco mosaic virus (TMV) มีการทดลองพบว่าเชื้อขาดส่วน coat protein (CP) ก็ยังสามารถเคลื่อนย้ายแบบ cell-to-cell ได้ (Lucas and Gilbertson, 1994) แต่ที่สำคัญคือ MPs มีหน้าที่ช่วยในการเคลื่อนย้ายอย่างแน่นอน วิธีการที่อาจจะเป็นกลไกที่ช่วยในการเคลื่อนย้าย viral nucleoprotein complexs (vNuPCs) มี 2 วิธี ดังนี้คือ 1) เชื้อกระตุ้นให้มีการสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นท่อ (tubular structure) ภายในช่อง PD เพื่อเป็นช่องทางให้เชื้อผ่านผนังเซลล์เข้าสู่เซลล์ข้างเคียงได้ ภายในท่อนี้สามารถพบทั้งอนุภาคของไวรัส และ MPs ตัวอย่างเชื้อไวรัสที่กระตุ้นให้สร้างท่อดังกล่าวนี้ ได้แก่ cauliflower mosaic virus (CaMV), cowpea mosaic

virus (CPMV), red clover mottle virus (RCMV) และ tomato ringspot virus (TomRSV) 2) MP gene ควบคุมขนาดของช่อง PD (PD size exclusion limit) ให้ขยายขนาดขึ้นเพื่อการเคลื่อนย้ายของ virion ซึ่งมีการทดลองโดยการฉีด fluorescent dyes เข้าสู่ต้นพืชที่มี MPs gene (transgenic plants) หรือใช้เทคนิคอื่นๆ แล้วพบว่า MPs gene ที่บงการให้ PD ขยายขนาดยอมให้สารโมเลกุลขนาดใหญ่ผ่านได้ คือ MPs gene (19-amino acid domain (195-213)) ใน TMV, MPs gene ของ alfalfa mosaic virus (AMV), MPs gene ของ red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) และ BL 1-protein (33 kDa) ซึ่งเป็น MPs ของเชื้อ bean dwarf mosaic geminivirus โดยมี DNA-B ควบคุมการสร้าง (Lucas and Gilbertson, 1994; Berna, 1995)

แหล่งที่พบ MPs ได้แก่ 1) PD เช่น MPs ของเชื้อ TMV, RCMV, CPMV และ CaMV 2) middle lamella เช่น MPs ของเชื้อ AMV 3) ผนังเซลล์ (cell wall) เช่น MPs ของเชื้อ RCNMV, tomato black ring virus, grapevine chrome mosaic virus 4) nucleolus เช่น MPs ของเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) และ 5) ในสิ่งแปลกปลอมที่เชื้อกระตุ้นให้สร้างใน cytoplasm (cytoplasmic inclusion bodies) เช่น MPs ของเชื้อ potato virus x (PVX) (Berna, 1995) สำหรับ TSWV พบ MPs อยู่ 2 แหล่ง คือ ที่ PD และใน N protein ใน cytoplasm (Kormelink *et al.*, 1994)

กรณีที่เชื้อสูญเสียคุณสมบัติในการทำให้เกิดโรค (defective) หรือมีความพิการในการสร้างอนุภาค อาจมีผลทำให้การถ่ายทอดเชื้อล้มเหลว การเกิด defective particle ของเชื้อเกิดขึ้นได้ในสภาพธรรมชาติ เช่น ในกรณี INSV บางไอโซเลต หรือในสภาพเรือนทดลอง เมื่อมีการถ่ายเชื้อแบบวิธีกลหลายครั้งติดต่อกัน เช่น กรณี TSWV บางไอโซเลต ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์บน M RNA ที่ควบคุมการสร้าง glycoprotein หายไป หรือเมื่อเชื้ออยู่ภายใต้สภาพอุณหภูมิสูง เช่น INSV (27/24° light/dark) ทำให้ antigen บน N protein เปลี่ยนแปลง (Resende *et al.*, 1991; Urban *et al.*, 1991; Lawson *et al.*, 1993) ความล้มเหลวในการทำให้เกิดโรคเกิดขึ้นได้จาก 4 กรณี คือ 1) เชื้ออาจสูญเสีย coat protein เช่น ไวรัสที่มีสารโพลีนิวคลีโอ

ไทด์แบบ RNA เป็นสารพันธุกรรม และอนุภาคมีรูปร่างกลมเช่นเดียวกันกับ tospovirus เช่น bromovirus, cucumovirus และ carmovirus มักต้องการ coat protein สำหรับการเคลื่อนย้ายระยะไกลภายในท่อลำเลียงอาหาร (phloem) สู่ส่วนต่างๆของพืช หรืออย่างน้อยที่สุดเพื่อป้องกันสารพันธุกรรมของเชื้อ เช่น เชื้อ brome mosaic virus (BMV) ในข้าวบาร์เลย์ และ cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) ในถั่วพุ่ม ซึ่งต้องการทั้ง coat protein และ MPs สำหรับการแพร่กระจายแบบ systemic (Allison *et al.*, 1990; De Jong and Ahlquist, 1991) แต่ยังพบเชื้อบางชนิด เช่น barley stripe mosaic virus (BSMV) ซึ่งไม่ต้องการ coat protein (Petty and Jackson, 1990) 2) เชื้ออาจสูญเสียเอนไซม์ replicase เนื่องจากการสูญเสีย replicase ทำให้ขาดความสัมพันธ์กันระหว่าง MPs กับ coat protein หรือกับพืชอาศัย (host) เพื่อที่จะก่อให้เกิดการเคลื่อนย้ายองค์ประกอบที่เป็น viral nucleoprotein complex เช่น ในกรณีของ BMV เมื่อขาด replicase แล้วจะสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนย้ายระยะไกล (Traynor *et al.*, 1991) 3) พืชอาศัยมีกลไกการปิดกั้นการเคลื่อนย้ายไวรัสเข้า-ออกจากเนื้อเยื่อ ท่อน้ำและท่ออาหาร (vascular tissue) (Hull, 1989) โดยอาจเกิดขึ้นในส่วนของ bundle sheath และ vascular parenchyma ดังเช่นกรณีของถั่วเหลืองในพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อ CCMV สามารถต้านทานการแสดงอาการแบบ systemic ได้ (Lucas and Gilbertson, 1994) และ 4) การสูญเสียคุณสมบัติของ MPs gene อาจเกิดการสูญเสียในส่วนของ gene ที่ทำหน้าที่กระตุ้นให้ช่อง PD ขยายขนาดขึ้น สำหรับการเคลื่อนย้ายแบบ cell-to-cell หรือเกิดการสูญเสียส่วนของ gene ที่ทำให้ MPs จับกับสารพันธุกรรม (nucleic acid) ได้ (Lucas and Gilbertson, 1994)

สำหรับ tospovirus ที่ defective คือ มีคุณสมบัติแปรเปลี่ยนไป เชื้อจะยังคงความสามารถในการควบคุมการสร้าง NSs protein ได้ แต่บางครั้งอาจจะพบหรือไม่พบ virion ในเซลล์พืช (Urban *et al.*, 1991; German *et al.*, 1992) Lawson และคณะ (1996) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบลักษณะทางเชรุ่ม และความผิดปกติระดับเซลล์ (cytopathology) บนต้น *Impatiens* cv. 'Accent Salmon' เมื่อถูก INSV 4 isolates เข้าทำลายโดย INSV-Igg isolate เป็น defective

isolate control ซึ่งได้จากต้น gloxinia จากการทดลองของ Urban และคณะ (1991), HT-1 และ HT-2 เป็น partially defective isolate เชื้อค่อนข้างมีความแปรปรวน ได้จากการต่อเชื้อไอโซเลต Igg ระหว่างครั้งที่ 1-4 บนยาสูบที่ 27/24°C, light/dark และ INSV-B isolate เป็นไอโซเลตที่ได้จากต้น *Schizanthus* ใช้เป็น nondefective isolate control ก่อนทำการทดลองได้ยืนยันเชื้อสาเหตุกับ polyclonal antiserum ต่อ N protein ของ INSV พบเฉพาะ INSV-Igg, HT-2 และ INSV-B ให้ปฏิกิริยาบวกกับ Anti-INSV คณะทำการทดลองจึงทำการทดลองต่อเพื่ออธิบายรายละเอียดของความแตกต่างให้มากขึ้น ทั้งในด้านเชร่มวิทยาและ cytopathology ผลการทดลองพบว่า INSV-Igg ซึ่งเป็น defective isolate control เชื้อไม่สามารถสร้าง virion ได้ แต่สามารถกระตุ้นให้เกิดเยื่อหุ้มผิวเรียบ 2 ชั้น (paired parallel membrane (PPMs)) สานต่อกันยาวในลักษณะเป็นวงซ้อนกัน (concentric ring) โดย PPMs พบอยู่ติดกับ endoplasmic reticulum ชนิดผิวหยาบ (rER) และเยื่อหุ้มนิวเคลียส นอกจากนี้พบอยู่ร่วมกับกลุ่มของ nucleocapsid (nucleocapsid aggregates (NCAs)) และสิ่งแปลกปลอมในเซลล์ (amorphous inclusion (AIs) แต่ไม่พบ paracrytalline filament inclusions ใน cytoplasm ที่เป็นลักษณะการเข้าทำลายของ INSV การติดเชื้อของ HT-1 สิ่งที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ประกอบด้วย NCAs, AIs และ PPMs เช่นเดียวกับ INSV-Igg แตกต่างที่ก่อให้ golgi bodies เกิดการเปลี่ยนแปลง และพบอนุภาคที่คล้าย virion อยู่ใน endoplasmic reticulum ชนิดผิวเรียบ (sER) การสร้าง virion จะดันตัวผ่าน PPMs แต่มีอนุภาคจำนวนมากที่ไม่สมบูรณ์ ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางเชร่มวิทยาให้ผลที่ไม่แน่นอน การติดเชื้อของ HT-2 ส่วนของ NCAs และ virion ให้ปฏิกิริยาบวกกับ anti-INSV และสิ่งที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ใน cytoplasm ประกอบด้วย virion ที่มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น (double-envelope virion (DEVs)) จำนวนมาก และพบ virion ที่มีเยื่อหุ้มชั้นเดียวใน sER และในช่องว่าง (cisternal) ของ rER ที่บวมพอง พบ NCAs และกลุ่มของ virion ที่มีเยื่อหุ้มชั้นเดียว รวมกลุ่มกันอยู่ใน rER ในขณะที่ virion ที่มีเยื่อหุ้มชั้นเดียวพบน้อยมากใน sER และบางครั้งพบ DEVs เกิดขึ้นที่ golgi bodies แต่ไม่ค่อยชัดเจนนัก ส่วน INSV-B ซึ่งเป็น nondefective isolate control พบ

virion ระยะเต็มวัยจำนวนมากรวมกลุ่มกันอยู่ใน rER แต่ไม่พบใน sER ลักษณะเดียวกับ HT-2, ไม่พบแผลในส่วนของ rER และ sER ในส่วนของ parenchyma cell, พบ SEV ใน ribosome (ribosome-studded), กลุ่มของ cisternae อยู่ติดกับ rER ขณะที่ NCA และ DEV รวมกลุ่มอยู่ใน sER, การคันตัว (budding) เกิดขึ้นที่ golgi body และการเกิดปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา พบว่าส่วนของ NCA จะให้ปฏิกิริยาบวกมากกว่าส่วน SEV จากผลการทดลองดังกล่าวนี้สรุปว่า แม้ HT-1 และ HT-2 ยังคงสามารถสร้าง virion ได้ แต่ยังมีความแตกต่างกับ INSV-B เกี่ยวกับความผิดปกติในระดับเซลล์ ซึ่งลักษณะความผิดปกติดังกล่าวนี้ อาจสะท้อนให้เห็นถึงการเกิดความไม่สมบูรณ์ในระยะการเพิ่มปริมาณของเชื้อในต้นพืช เมื่อได้รับเชื้อที่มีลักษณะเป็น defective

3.3 ความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยาของ tospoviruses

ความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยาระหว่างเชื้อไวรัสในกลุ่ม tospovirus เกิดขึ้นเนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อ (N protein, G_1 และ G_2) โดยโครงสร้างของโปรตีนดังกล่าวหรือส่วนของ epitopes (antigenic) บนโปรตีนระหว่างชนิดของเชื้อไวรัสอาจมีความสัมพันธ์กันในระดับหนึ่ง หรือไม่มีความสัมพันธ์กันเลย (German *et al.*, 1992) เชื้อ TSWV ไอโซเลตที่พบเห็นทั่วๆไป หรือที่เรียกว่า lettuce strain เป็นเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม L-serogroup (common serogroup) ซึ่งแตกต่างจากเชื้อ impatiens strain หรือ I-serogroup เนื่องจาก N protein ของ I-serogroup isolate ไม่มีความสัมพันธ์กันทางเซรุ่มวิทยา ส่วน envelope protein (G_1 และ G_2) ไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง 2 serogroup นี้ได้ ปัจจุบันไอโซเลตที่อยู่ใน I-serogroup ถูกเสนอให้เป็นเชื้อชนิดใหม่ คือ impatiens necrotic spot virus (INSV) (Law and Moyer, 1990; Law, Speck and Moyer, 1991) การจัดจำแนกกลุ่มทางเซรุ่มวิทยาในปัจจุบันจะอาศัยคุณสมบัติของ N protein เป็นหลักสำคัญ de Avila และคณะ (1993) ได้จำแนกกลุ่ม tospovirus เป็น 3 serogroup โดยอาศัยวิวัฒนาการ (Phylogeny) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nucleoprotein gene (N gene) พบว่าไอโซเลตของ Serogroup I (tomato

spotted wilt tospovirus) และไอโซเลตของ serogroup III (impatiens necrotic spot virus) มีลำดับของ nucleotide แตกต่างกันสูง (55.9%) ส่วน 2 ไอโซเลตของ serogroup II ลักษณะลำดับของนิวคลีโอไทด์อยู่กึ่งกลางระหว่าง serogroup I และ III โดยมีส่วนที่เป็น N gene ของ serogroup I 75% และมีส่วนที่เป็น N gene ของ serogroup III 57% และมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากเชื้ออื่นๆ 82.1% 2 ไอโซเลตที่กล่าวข้างต้น ซึ่งอยู่ใน serogroup II คือ BR-03 และ SA-05 ปัจจุบันได้ถูกเสนอชื่อให้เป็นเชื้อชนิดใหม่ คือ tomato chlorotic spot virus (TCSV) และ groundnut ring spot virus (GRSV) ตามลำดับ

โสภณ และ จุฑารัตน์ (2537) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยาระหว่าง PBNV กับเชื้อ TSWV ทั้ง 2 strain คือ lettuce strain และ impatiens necrotic strain พบว่า PBNV ไม่ทำปฏิกิริยาทางเซรุ่มกับเชื้อ TSWV ทั้ง 2 strain ซึ่งให้ผลการทดลองเหมือนกับของ Adam และคณะ (1993) Adam และคณะ (1993) และ Yeh และ Chang (1995) เคยกล่าวถึงความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยาระหว่าง PBNV ในประเทศอินเดีย, WSMV ในไต้หวัน และ tospovirus สาเหตุของอาการ silver mottle บนแตงไมในเมืองไอกินาว่า ประเทศญี่ปุ่น (Kameya-Iwaki *et al.*, 1984) ไว้ว่า เชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด แต่แตกต่างจาก TSWV และ INSV

การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาในเบื้องต้น สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ WSMV ออกจากเชื้อ TSWV และ INSV ได้ก่อนที่จะมีการศึกษาทางเซรุ่มวิทยาว่าเชื้อมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ กล่าวคือ เชื้อ TSWV และ INSV มักจะไม่ทำให้พืชตระกูลแตงแสดงอาการแพร่กระจายทั่วทั้งต้น แต่มักทำให้เกิดอาการเฉพาะจุด (local lesion) เท่านั้น (German *et al.*, 1992)

4. การถ่ายทอดโดยเพลี้ยไฟ

4.1 ลักษณะทั่วไปของเพลี้ยไฟ

เพลี้ยไฟ (Insecta : Thysanoptera : Thripidae) เป็นแมลงที่มีขนาดเล็กมาก ลำตัวยาวประมาณ 1-2 มม. ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยมีลักษณะคล้ายกัน ตัวเต็มวัยมีสีน้ำตาลหรือน้ำตาลดำ มีทั้งชนิดมีปีกและไม่มีปีก ชนิดมีปีกจะมีปีก 2 คู่ ลักษณะคล้ายขนนก ตัวอ่อนมีสีครีม เหลือง หรือเหลืองอ่อน แล้วแต่ชนิด ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเคลื่อนไหวได้รวดเร็วมาก เมื่อถูกรบกวนมักจะวิ่งหลบหนีซ่อนตัว หรือกระโดด หรือบินหนีไปอย่างรวดเร็ว (ทัศนีย์, 2526; พิสิษฐ์ และคณะ, 2535)

เพลี้ยไฟมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบ intermediate type คือ ลักษณะกึ่งกลางระหว่าง simple metamorphosis กับ complete metamorphosis โดยตัวอ่อนวัยสุดท้ายจะอยู่นิ่งๆคล้ายดักแด้ พฤติกรรมการจับคู่ผสมพันธุ์ของเพลี้ยไฟ ปี ค.ศ.1993 Terry และ Schneider ได้ทำการศึกษากับ *Frankliniella occidentalis* (Pergande) ในห้องปฏิบัติการ พบว่าการผสมพันธุ์เกิดขึ้นบนดอกซึ่งเพศผู้มักรวมตัวกันอยู่ โดยเพศเมียจะบินเข้าไปในกลุ่มของเพศผู้ซึ่งรวมกลุ่มกันอยู่ (swarms) เพศผู้สามารถผสมพันธุ์กับ virgin females ได้หลายๆตัวภายในเวลา 1-2 ชม. ขณะที่เพศเมียรับการผสมพันธุ์ได้เพียงครั้งหนึ่ง จนกระทั่งหลายวันผ่านไปจึงสามารถผสมได้อีก (1993, quoted in Terry and Dyreson, 1996) สีของดอกอาจจะมีผลในการดึงดูดเพศผู้ และเพศผู้จะต่อสู้กันเอง (Terry and Dyreson, 1996) ในสภาพธรรมชาติทั่วๆไปจะพบเพศเมียมากกว่าเพศผู้ เพศเมียวางไข่ในเนื้อเยื่อ เช่น ที่ตาดอก, floral lobes หรือที่ใบ โดยวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆประมาณ 2-3 ฟองต่อวัน เพศเมียเพลี้ยไฟวางไข่ได้ประมาณ 300 ฟอง ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจะฟักออกเป็นเพศผู้ ระยะไข่ประมาณ 2-3 วัน ตัวอ่อนลอกคราบ 3 ครั้ง ระยะตัวอ่อนประมาณ 5-9 วัน จากนั้นจะลอกคราบแล้วเข้าดักแด้ในดินระยะดักแด้ประมาณ 1-3 วัน ตัวเต็มวัยจะมีอายุอยู่ได้ประมาณ 1-7 วัน (พิสิษฐ์ และคณะ, 2534 อ้างถึงใน พิสิษฐ์ และคณะ, 2535; ศิริณี, 2533 อ้างถึงใน พิสิษฐ์ และคณะ, 2535) เพลี้ยไฟแต่ละชนิดมีวงจรชีวิต

ไม่เท่ากัน โดยเฉลี่ยรวมช่วงชีวิตทั้งหมดนานประมาณ 3 สัปดาห์ สามารถมี 5-10 ชั่วอายุขัย ใน 1 ปี (บรรพต, 2531)

เพลี้ยไฟทำลายโดยดูดน้ำเลี้ยงจากส่วนต่างๆของพืช เช่น ใบ ยอด ตาดอก และดอก เป็นต้น โดยใช้ปากในส่วนของ mandible ข้างซ้ายขูดขีดใบพืช ทำให้เกิดแผลบริเวณเนื้อเยื่อ และทำลายเซลล์พืชโดยใช้เส้นพัน (maxillary stylet; 2 เส้น) ช่วยเจาะซอนไชเนื้อเยื่อ epidermis และทำให้ mesophyll แตก จากนั้นจะดูดน้ำเลี้ยงออกจากเซลล์ทำให้สีของใบพืชเปลี่ยน เช่น สีน้ำเงิน และน้ำตาลในที่สุด ใบที่ถูกทำลายจะม้วนงอขึ้นด้านบน หรือเกิดการหงิกงอบิดเบี้ยว แห้งกรอบ และอาจจะหลุดร่วงก่อนเวลา ซึ่งเป็นการทำลายพืชโดยตรงของเพลี้ยไฟ ในถั่วลิสงจะทำให้ฝักลีบ ทำให้ผลผลิตลดลงได้มากถึง 0.66 เปอร์เซ็นต์ต่อ 1 เปอร์เซ็นต์ใบถั่วที่ถูกทำลาย (พิสิษฐ์ และคณะ, 2532)

เพลี้ยไฟชนิดที่ถ่ายทอดเชื้อกลุ่ม tospoviruses มี 8 ชนิด ได้แก่ 1) *F. occidentalis* (western flower thrips) นำเชื้อ TSWV และ INSV 2) *F. fusca* (Hinds) (tobacco thrips) นำเชื้อ TSWV 3) *F. schultzei* (Trybom) (common blossom หรือ cotton bud thrips) นำเชื้อ TSWV 4) *Thrips tabaci* Lindeman (onion thrips) นำเชื้อ TSWV 5) *T. setosus* Moulton นำเชื้อ TSWV 6) *T. palmi* Karny (melon thrips) นำเชื้อ WSMV และ PBNV 7) *Scirtothrips dorsalis* Hood (chilli thrips) นำเชื้อ PYSV, PBNV (อยู่ในระหว่างการพิสูจน์) (German *et al.*, 1992; Yeh and Chang, 1995; Reddy *et al.*, 1995; โสภณ, 2536) และ 8) *F. intonsa* เป็นชนิดใหม่ที่นำ tospoviruses (Peters *et al.*, 1995)

F. fusca และ/หรือ *F. occidentalis* เป็นพาหะที่สำคัญนำ TSWV ในทั่วโลก, *T. palmi* เป็นพาหะสำคัญนำ PBNV ในเอเชียตอนใต้ และ *S. dorsalis* เป็นพาหะนำ PYSV ในอินเดียและไทย ซึ่งจัดเป็นเชื้อที่มีความสำคัญน้อย เนื่องจากไม่สามารถทำให้พืชแสดงอาการ systemic แต่แสดงอาการเฉพาะบริเวณที่ถูกทำลายเท่านั้น (Todd, Culbreath and Demski, 1994) แต่ก่อน Amin และคณะ (1981) เคยรายงานว่า *F. schultzei* และ *S. dorsalis* เป็นพาหะนำ PBNV ในประเทศอินเดีย แต่

หอสมุดกลาง
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
กพ
SB
9651

ปัจจุบันมีการพิสูจน์และจำแนกใหม่ พบว่า *T. palmi* เป็นพาหะที่แท้จริง (Vijaya Laksmi *et al.*, 1995 quoted in Buiel, 1996) ในประเทศอินโดนีเซีย *T. palmi* เป็นศัตรูสำคัญของยาสูบ ผ้าย แตง (cucurbit) และผักในตระกูล Solanaceae โดยเฉพาะพื้นที่ที่ใกล้กับมหาสมุทรแปซิฟิก แต่ *T. palmi* จะเป็นพาหะ tospovirus หรือไม่ยังไม่มีการพิสูจน์ (Wightman *et al.*, 1995) ส่วน *F. schultzei* เป็นพาหะหลักนำ TSWV ในออสเตรเลีย (Reddy *et al.*, 1991)

ในอินเดียมีเพลี้ยไฟ 3 ชนิดหลักบนถั่วลิสง โดยเฉพาะในเขต Andhra Pradesh ในระยะก่อนออกดอก ชนิดแรกที่พบมากที่สุด (dominant species) คือ *S. dorsalis* (72%) ชอบอาศัยอยู่ตามซอกใบ หลังจากถั่วลิสงออกดอกแล้วจะพบ *F. schultzei* ซึ่งชอบอาศัยอยู่ภายในดอก และ *T. palmi* ซึ่งพบทั้งในดอกและตามซอกใบ (Wightman *et al.*, 1995)

ประเทศไทยเพลี้ยไฟชนิดที่พบมากที่สุดบนถั่วลิสง และสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นพาหะของเชื้อ PBNV ได้ด้วย คือ *S. dorsalis* แต่ในพืชอื่นๆที่เป็น alternate host คือ แตงโม พริก มะเขือเทศ และมะเขือม่วง (egg plant) ส่วนใหญ่พบ *T. palmi* (โสภณ และ จุฑารัตน์, 2537) ซึ่งเพลี้ยไฟชนิดนี้ Reddy และคณะ (1995) ยืนยันว่าเป็นพาหะสำคัญของเชื้อ PBNV ในอินเดีย แต่ โสภณ และ จุฑารัตน์ (2537) พบเพลี้ยไฟชนิดนี้น้อยมากในถั่วลิสง คือ พบเพียง 2 ตัว จาก 20 ยอด (1 ตัวอย่าง) ในอำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี ซึ่งปลูกถั่วลิสงอยู่ใกล้แหล่งปลูกแตงกวา แต่ก่อนเมื่อ พ.ศ.2533 โสภณ (2533) รายงานว่า *Frankliniella* sp. เป็นพาหะนำโรคยอดไหม้ในถั่วลิสง ซึ่งขณะนั้นยังเข้าใจว่าเกิดจากเชื้อ TSWV

เพลี้ยไฟเป็นแมลงศัตรูที่มีขนาดเล็กมาก ปัจจัยด้านสิ่งไม่มีชีวิต เช่น แรงลม ปริมาณฝน อุณหภูมิ ความชื้น จึงเป็นปัจจัยที่ควบคุมประชากรของแมลงชนิดนี้ เพลี้ยไฟพบได้ตลอดทั้งปีทั่วทุกภาคของประเทศ แต่พบมากในระยะถั่วเริ่มออกดอกไปจนถึงระยะติดฝัก (พิสิษฐ์ และคณะ, 2535) การระบาดทำความเสียหายแก่พืชอย่างรุนแรงจะเกิดในสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยและอายุพืชเหมาะสม เช่น ถั่วลิสงอายุประมาณ 2 สัปดาห์หลังปลูก ในสภาวะที่แล้ง ฝนทิ้งช่วงยาวนาน อากาศร้อน และความชื้นสูง การระบาดรุนแรงก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (พิสิษฐ์ และ เตือนจิตต์, 2523;

ไสภณ, 2536) การกระจายตัวของเพลี้ยไฟจะเป็นแบบรวมกลุ่มในระยะการเจริญเติบโตของพืชช่วงแรกๆ และจะมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอเมื่อพืชมีอายุมากขึ้น (พิสิษฐ์ และคณะ, 2535) Barbour และ Brandenburg (1994) ทำการเปรียบเทียบความเสียหายของถั่วลิสงที่เกิดจากเพลี้ยไฟ โดยเปรียบเทียบ 2 ลักษณะ คือ เปรียบเทียบความเสียหายของถั่วลิสงที่อยู่นอกกรงในสภาพไร่ โดยมีเพลี้ยไฟที่อยู่ตามธรรมชาติเข้าทำลายกับความเสียหายของถั่วลิสงที่อยู่ภายในกรงในสภาพไร่ อาศัยเพลี้ยไฟที่อยู่ภายในกรงซึ่งพักออกมาจากดักแด้ภายในดินเข้าทำลาย พบว่าถั่วลิสงที่อยู่ในกรงเกิดความเสียหายต่ำกว่าถั่วลิสงที่อยู่นอกกรง และเมื่อเก็บเพลี้ยไฟจากกับดักกาวเหนียวภายในกรงได้จำนวนทั้งหมด 9,102 ตัว ในจำนวนนี้พบเพลี้ยไฟชนิดที่เป็นพาหะของเชื้อ TSWV เกือบ 20% ซึ่งได้แก่ *F. fusca* 17.3%, *F. occidentalis* 0.2% และ *T. tabaci* 0.09% จากการทดลองนี้สรุปว่า เพลี้ยไฟที่มีอยู่แล้วในแปลงไม่ได้เป็นเพลี้ยไฟที่มีความสำคัญ ที่จะก่อให้เกิดความเสียหายแก่ถั่วลิสง ทำนองเดียวกับ Thresh (1994) กล่าวว่า การแพร่ระบาดของไรคไวรัสที่เกิดจากเพลี้ยไฟ การแพร่ระบาดในแปลงในขั้นแรกเกิดจากเพลี้ยไฟที่อยู่ห่างไกลจากแปลงปลูก หรือตามข้างๆแปลงปลูก เข้ามาดูดกินพืช และเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสเข้ามาด้วย

4.2 การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟในถั่วลิสง

เพลี้ยไฟเป็นแมลงศัตรูประเภทปากดูดในพืชไร่ตระกูลถั่ว พบ 6 ชนิด ได้แก่ *Caliothrip indicus* (Bagnall), *F. williamsi* Hood, *Megalurothrips usitatus* Bagnall, *S. dorsalis*, *T. palmi* และ *T. tabaci* (พิสิษฐ์ และคณะ, 2535) Reddy และคณะ (1991) ได้รายงานลักษณะของเพลี้ยไฟไว้สำหรับการจัดจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟตัวเต็มวัยในถั่วลิสงที่เป็นพาหะของเชื้อ TSWV โดยดัดแปลงมาจากวิธีการจัดจำแนกของ Amin และ Palmer (1985) ไว้ดังนี้คือ *S. dorsalis* มีหนวด 8 ปล้อง, tergite ที่ 8 มี comb แบบสมบูรณ์ และในส่วนของ pronotum มีลายเส้นที่ดีและเห็นเป็นลายเส้นชัดเจน, *T. palmi* มีหนวด 7 ปล้อง, tergite ที่ 8 มี comb แบบสมบูรณ์ และมีเส้นขน (interocellar setae) อยู่บริเวณด้านนอกของ ocellar

triangle สำหรับ *F. schultzei* มีหนวด 8 ปล้อง, tergite ที่ 8 มี comb แบบไม่สมบูรณ์ และที่ส่วนหัวมี ocellar setae จำนวนสามคู่

มโนชัย และคณะ (2533) รายงานว่า เพลี้ยไฟที่ทำความเสียหายแก่ถั่วลิสงในประเทศไทยมีเพียง 3 ชนิด ทั้งทำความเสียหายให้กับถั่วลิสงโดยตรง และเป็นพาหะถ่ายทอดโรคไวรัสด้วย ซึ่งลักษณะการทำลายของเพลี้ยไฟมีความจำเพาะเจาะจง สามารถนำมาใช้แยกชนิดของแมลงชนิดนี้ได้จากลักษณะการทำลาย เช่น *F.* spp. การทำลายของเพลี้ยไฟชนิดนี้ทำให้ใบที่ถูกทำลายหงิกงอ บิดเบี้ยว เมื่อใบคลี่ออกจะพบอาการเสียหายมีลักษณะเป็นจุดประเป็นขีด หรือรอยสีน้ำตาลอ่อน ถ้าการระบาดเกิดขึ้นพร้อมๆกับอากาศร้อนแห้งแล้ง ยอดอ่อนอาจไหม้และตายได้ (เตือนจิตต์, 2531 อ้างถึงใน มโนชัย, 2533)

ความเสียหายที่เกิดจากการเข้าทำลายของ *C. indicus* มีลักษณะเป็นแถบสีน้ำตาลคล้ายสนิมเฉพาะบริเวณโคนใบและแนวเส้นใบ แต่ใบจะไม่บิดงอหรือเปลี่ยนรูปร่าง และไม่พบว่าเป็นแมลงพาหะของโรคไวรัส สำหรับเพลี้ยไฟ *S. dorsalis* ความเสียหายที่เกิดจากเพลี้ยไฟชนิดนี้จะพบเพียงว่าบนผิวใบขรุขระไม่เรียบ และมีจุดสีน้ำตาลบริเวณใต้ใบ และมักพบควบคู่ไปกับอาการของโรคใบจุดเหลือง (PYSV) เสมอ (มโนชัย และคณะ, 2533)

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ tospoviruses กับเพลี้ยไฟ

เชื้อ tospovirus สามารถถ่ายทอดโดยวิธีการในห้องปฏิบัติการ โดยการทำ sap transmission แต่ในสภาพธรรมชาติการถ่ายทอดเชื้อจากพืชสู่พืชต้องอาศัยเพลี้ยไฟ โดยเชื้อและเพลี้ยไฟมีความสัมพันธ์กันแบบคงทน (persistent) ซึ่งรายละเอียดของความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อและเพลี้ยไฟมีลักษณะที่พิเศษ คือ เพลี้ยไฟจะต้องได้รับ (acquire) เชื้อไวรัสเฉพาะในช่วงที่ยังเป็นตัวอ่อน (laval stage) เท่านั้น จึงจะสามารถถ่ายทอดไวรัสได้ และเมื่อเพลี้ยไฟรับมาแล้วจะคงความสามารถในการถ่ายทอดไปจนตลอดอายุขัย และเชื้อเองต้องมีองค์ประกอบที่สมบูรณ์ โดยเฉพาะถ้าขาดส่วนของ glycoprotein เพลี้ยไฟก็จะไม่สามารถรับเชื้อไวรัสได้ (Wijkamp, 1995 quoted in Adkins *et al.*, 1996) เคยมีรายงานว่าไวรัสในตระกูล bunyaviridae นั้น

เมื่อเข้าทำลายสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate) ส่วนของ glycoprotein จะทำหน้าที่อยู่ 2 ช่วงในวงจรการเข้าทำลาย ช่วงแรก คือ ช่วงการเกิด maturation/assembly ของ virion และช่วงที่ 2 คือ ช่วงการเกาะติด (attachment) กับ receptor cell (Petterson, 1991 quoted in Adkins *et al.*, 1996; Nathanson and Gonzalez-Scarano, 1994 quoted in Adkins *et al.*, 1996) ปัจจุบันมีการพิสูจน์หน้าที่ของ glycoprotein โดยเอาส่วน cDNA ของ polyprotein gene ของ MRNA ในเชื้อ TSWV ไปเพิ่มกับ baculovirus ซึ่งเป็นไวรัสของแมลง แล้วตรวจการแสดงออกของ glycoprotein ใน cell ของ *Spodoptera frugiperta* IPLB-SF 21 (SF 21) พบว่ามีการสร้าง glycoprotein ขึ้นมาได้ใน plasmalemma แสดงว่าส่วนของ gene นี้สามารถควบคุมการสร้าง polyprotein สำหรับสร้าง glycoprotein ได้เมื่ออยู่ร่วมกับ gene ของไวรัสชนิดอื่นใน cell แมลง (Adkins *et al.*, 1996) จะอย่างไรก็ตามในเพลี้ยไฟถ้าหากเชื้อขาด glycoprotein ไปก็จะไม่สามารถผ่านเข้าออกในเซลล์ของเพลี้ยไฟได้

สำหรับสาเหตุที่เพลี้ยไฟตัวแก่ไม่สามารถถ่ายทอดไวรัสได้ หากดูดรับไวรัสมาในช่วงที่เป็นตัวแก่ Ullman และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาและให้เหตุผลว่า เป็นเพราะไวรัสที่ดูดรับมานั้นถูกย่อยสลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในลำไส้ส่วนกลาง จนหมดความสามารถที่จะเพิ่มปริมาณได้ในเซลล์บุผนังลำไส้ (epithelial cells) และอวัยวะอื่นๆ ของเพลี้ยไฟ แต่ถ้าเพลี้ยไฟดูดรับเชื้อในช่วงที่เป็นตัวอ่อนจะพบอนุภาคที่สมบูรณ์ในเซลล์บุผนังลำไส้ ท่อโลหิต (haemocoel) และต่อมน้ำลาย (salivary gland) และสามารถตรวจพบเชื้อเรื่อยไปจนเพลี้ยไฟกลายเป็นตัวแก่ ผลของการศึกษาของ Ullman และคณะครั้งนี้สนับสนุนสมมติฐานของ Day และ Irzykiewicz (1954) ซึ่งเคยแสดงความเห็นไว้ว่า การที่ตัวอ่อนและตัวแก่มีความสามารถรับเชื้อได้ต่างกัน เกิดขึ้นเนื่องจากทางเดินอาหารของตัวอ่อนและตัวแก่มีค่า pH แตกต่างกัน ค่า pH ในตัวแก่จะมีผลต่อความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อ ต่อมา Ullman และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมและพบว่า เชื้อ TSWV ที่ได้รับการดูดโดยตัวแก่จะหายไป หรือถูกทำลายในช่วงระหว่างลำไส้ส่วนกลางกับต่อมน้ำลาย เหลือแต่เพียง glycoprotein ใน vacuole ซึ่งพบค่อนข้างมากและพบจำนวนเล็กน้อยใน putative golgi membrane แสดงว่าเมื่อ vision ขาด

ส่วน glycoprotein ซึ่งถูกทำลายไปนั้น เชื้อจะไม่สามารถเคลื่อนย้ายผ่านเข้า-ออกจากเซลล์บริเวณนั้นได้ ส่งผลให้ไม่สามารถเคลื่อนย้ายเข้าสู่ต่อมน้ำลาย ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญในการเพิ่มปริมาณของเชื้อ (Ullman *et al.*, 1993; Wijkamp *et al.*, 1993) โดยในการเพิ่มปริมาณของเชื้อจะพบ NSs protein ในบริเวณที่มีการเพิ่มปริมาณเสมอ (Ullman *et al*, 1993) การตรวจ TSWV ในเพลี้ยไฟ Tsuda และคณะ (1994) รายงานว่า การใช้วิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) สามารถนำมาตรวจ SRNA ของ TSWV ในทุกระยะการเจริญเติบโตของ *T. setosus* ที่เลี้ยงบนต้นลำโพง (*Datura stramonium*) หรือพริก (*Capsicum annum*) ซึ่งวิธีนี้จะมีความ sensitive สูงต่อเชื้อในตัวอ่อนของเพลี้ยไฟ

ความสัมพันธ์ระหว่าง tospovirus กับเพลี้ยไฟ สามารถเกิดขึ้นได้ตั้งแต่วันแรกหลังจากตัวอ่อนวัยแรก (first larval instar) ฟักออกจากไข่ โดยการรับไวรัส (acquire) เกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ตัวอ่อนวัยแรกๆที่ได้รับเชื้อจะมีเปอร์เซ็นต์ในการถ่ายทอดเชื้อได้สูงก่อนที่จะมีการเข้าดักแด้ ดังนั้นประสิทธิภาพในการเข้าทำลายพืชจึงขึ้นกับปริมาณเชื้อที่ได้รับ การลองชิม (probing) หรือการดูดกิน (feeding) (Tsuda *et al.*, 1994; Peters *et al.*, 1995)

Wijkamp และ Peters (1993) รายงานว่า Acquisition access period (AAPs) ของตัวอ่อนวัยแรก (อายุ 0-4 วัน) ของ *F. occidentalis* มีค่าเท่ากับ 24 ชม. และพบว่า 80% ของตัวอ่อนจะกลายเป็นแมลงติดเชื้อ (viruliferous) ที่สามารถถ่ายทอดเชื้อ TSWV และ INSV ได้ก่อนเข้าดักแด้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อได้ของแมลงเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ก่อนการเข้าดักแด้ นอกจากนี้ยังพบว่า median latent period (LP_{50}) ในตัวอ่อนมีค่าประมาณ 80-170 ชม. โดยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ได้รับในระหว่างการทดลอง (20, 24 และ 27°C) ค่า LP_{50} จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และ LP_{50} ของเชื้อ TSWV และ INSV จะไม่แตกต่างกัน แต่ประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อจะแตกต่างกัน *F. occidentalis* ถ่ายทอด TSWV ได้ 55.1% และถ่ายทอด INSV ได้มากถึง 92.5% Wightman และคณะ (1995) รายงานว่า ตัวอ่อนของ *T. palmi* พาหะ PBNV ที่มีอายุประมาณ 5 วันจะมี latent period 8 วัน โดยตัวอ่อนสามารถรับเชื้อไวรัสได้ภายในระยะเวลา 5 นาที

ของระยะเวลาการดูดกิน (AAPs) จนถึง 24 ชม. ซึ่งเป็นระยะเวลาสูงสุด และจะมีอัตราการรับเชื้อได้มากถึง 67% และถ้าปล่อยให้ดูดกินนานกว่านี้อัตราการรับเชื้อจะไม่เพิ่มขึ้น สำหรับเวลาที่ใช้ในการถ่ายทอดเชื้อ (median inoculation access period, IAP_{50}) จะอยู่ประมาณ 8 ชม. ในตัวอ่อน แต่ถ้าเป็นตัวแก่ต้องใช้ IAPs อย่างน้อย 1 วัน ส่วน IAPs สำหรับการทดสอบในห้องปฏิบัติการควรใช้ระยะเวลา 2 วัน และ AAPs นาน 24 ชม. (Ranga and Vijaya Lakshmi, 1993)

สำหรับผลกระทบของเชื้อไวรัสต่อแมลงเพลี้ยไฟพาหะนั้น Peters และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาโดยให้ตัวอ่อน (0-4 ชม.) ได้รับเชื้อในช่วงเวลา AAPs สั้นๆ (6 ชม.) แล้วนำไปเลี้ยงบนพืชปกติ พบว่า viruliferous และ nonviruliferous thrips และเพลี้ยไฟที่ไม่เคยผ่านการรับเชื้อไวรัส ต่างมีอัตราการตายเท่าๆกัน (ช่วงชีวิตประมาณ 33 วัน) และการสร้างไข่ของเพศเมียก็ไม่แตกต่างกัน แสดงว่าเชื้อไวรัสไม่ได้ก่อให้เกิดความผิดปกติในแมลง การที่เพลี้ยไฟรับเชื้อได้ตั้งแต่ตัวอ่อนจะเป็นการเปิดโอกาสให้เชื้อมีโอกาสแพร่ระบาดได้มากยิ่งขึ้น

5. การป้องกันกำจัดโรคยอดไหม้

การป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส อาทิเช่น การใช้เมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ที่ปราศจากเชื้อ การป้องกันไม่ให้พืชปลูกถูกเชื้อเข้าทำลาย การควบคุมวัชพืชที่เป็นพืชพักพิงของเชื้อ การควบคุมการถ่ายทอดเชื้อโดยพาหะ การใช้พันธุ์ต้านทาน และการใช้พืชที่ได้รับการถ่ายยีนที่มีผลควบคุมการเข้าทำลายของเชื้อ (transgenic plants)

หลักการป้องกันกำจัดโรคยอดไหม้ โดยทั่วไปใช้วิธีการผสมผสานของวิธีการ 4 วิธีร่วมกัน คือ การใช้สารเคมี การใช้วิธีการทางเขตกรรม การควบคุมโดยชีววิธี และการใช้พันธุ์ต้านทาน การจะพิจารณาใช้วิธีใดเป็นหลัก ขึ้นอยู่กับสภาพการเพาะปลูก และมูลค่าของพืชที่ได้รับผลกระทบจากเชื้อ PBNV (ไสภณ, 2536)

5.1 การใช้สารเคมี

5.1.1 การใช้สารเคมีควบคุมเชื้อไวรัส (antiphytoviral chemicals)

การใช้สารเคมีควบคุมการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัสไม่เป็นที่นิยมกันมากนัก เนื่องจากสารเคมีที่ใช้มีราคาแพง และมักมีผลข้างเคียงต่อขบวนการ metabolism ของพืชด้วย (Basu and Giri, 1993) อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาค้นคว้ากันพอสมควรในกรณีของเชื้อ TSWV ตัวอย่างเช่น De Fazio และ Vicente (1991) ได้ทำการศึกษาสารประกอบ 12 ชนิด เพื่อใช้ควบคุมเชื้อ TSWV ในมะเขือเทศและยาสูบ พบว่า tiazofurin และ ribavirin (virazole) สามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณของ TSWV ได้ รองลงมาคือ acetylsalicylic acid และ bromoparazino-pyrazine ตามลำดับ เนื่องจาก PBNV เป็นเชื้อในกลุ่มเดียวกับ TSWV สารเคมีกลุ่มดังกล่าวจึงอาจใช้ได้ผลกับ PBNV ด้วย

5.1.2 การใช้สารเคมีควบคุมเพลี้ยไฟ

มโนชัย และคณะ (2533) กล่าวว่า ปัญหาของแมลงศัตรูถั่วลิสงโดยทั่วไปสามารถควบคุมได้ นอกจากในบางปีที่มีอากาศร้อนผิดปกติ ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูถั่วลิสงควรจะพ่นสารฆ่าแมลง 2 ครั้ง ในช่วงพืชมีอายุไม่เกิน 45 วัน แต่จำเป็นต้องมีการสำรวจการระบาดของแมลงก่อนที่จะทำการป้องกันกำจัด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของประชากรของแมลงยังมีความแปรปรวนอยู่เสมอ อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีทำกันน้อยมากในถั่วลิสง เนื่องจากผลตอบแทนที่ได้มักไม่คุ้มกับการลงทุน การจัดการโรคอาจกระทำในลักษณะป้องกัน คือ หยอดอัลดิคาร์บ (aldicarb) หรือคาร์โบฟูแรน (carbofuran) รองก้นหลุมก่อนปลูก หลังจากนั้น 3 สัปดาห์จึงพ่นด้วยคาร์โบซัลแฟน (carbosulfan) หรือโมโนโครโตฟอส (monocrotophos) ทุก 7 หรือ 14 วัน โดยใช้อัตราสูง (โสภณ, 2536) Singh และ Srivastava (1995) รายงานว่า การพ่น quinalphos 0.02% หรือน้ำคั้นจากใบโอ๊ค 1.00% จำนวน 2 ครั้ง ในช่วงที่พืชมีอายุไม่เกิน 40 วัน สามารถควบคุมเพลี้ยไฟได้ และถั่วลิสงมีผลผลิตเพิ่มมากขึ้นด้วย ขณะที่ Dharmaraj และคณะ (1995) รายงานว่า การพ่น Dichlorovos (DDVP) อัตรา 1 มล.ต่อลิตร ที่ 30 และ 45 วันหลังปลูก สามารถลดประชากรของเพลี้ยไฟ และลดการเกิดโรคยอดไหม้ที่ระยะเก็บเกี่ยวลงได้ ในรัฐ

จอร์เจียร์ ประเทศสหรัฐอเมริกา Todd และคณะ (1994) แนะนำให้ใช้สารเคมีชนิดดูดซึม (systemic insecticide) ในการควบคุมเพลี้ยไฟ *F. fusca* ระยะตัวอ่อน ซึ่งถ้าควบคุมได้ตั้งแต่ระยะแรกของการปลูกถั่วลิสง จะมีผลทำให้การแพร่พันธุ์ของเพลี้ยไฟต่ำลง และส่งผลให้ถั่วลิสงเกิดโรคยอดไหม้น้อยลง อย่างไรก็ตามปี ค.ศ.1995 Todd และคณะ รายงานว่า การใช้สารฆ่าแมลงควบคุมเพลี้ยไฟ ป้องกันการเกิดโรคยอดไหม้ให้ผลไม่สอดคล้องกับการลดลงของโรคเมื่อเปรียบเทียบกับ control (nontreated plots) (1995 quoted in Culbreath *et al.*, 1996)

สารสะกัดจากธรรมชาติชนิดอื่นๆที่ได้มีการนำมาใช้ควบคุมเพลี้ยไฟ ได้แก่ น้ำคั้นจากใบมะพร้าวหรือข้าวฟ่าง ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ PBNV ได้ (Dharmaraj *et al.*, 1995) ส่วนสารฆ่าแมลงประเภทหลังเคราะห์ ที่ใช้ป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟถั่วลิสงที่ได้ผลดี ได้แก่ formetoate 0.05%, omethoate 0.08%, methomyl 0.04%, dimethoate 0.07%, carbosulfan 0.02%, prothiophos 0.05%, triazophos 0.1%, monocrotophos 0.075%, alphomethrin 0.04% และ fenvalerate 0.01% (มโนชัย และคณะ, 2533)

5.2 การใช้วิธีการทางเขตกรรม (cultural control)

5.2.1 การกำจัดแหล่งพักพิงของเชื้อ

ควรกำจัดพืชตกค้าง (volunteer) ในแปลง และวัชพืชซึ่งเป็นแหล่งพักพิงของเชื้อหรือพาหะให้หมดไปก่อนเริ่มปลูกพืช แต่มีบางกรณีที่วัชพืชอาจมีแมลงศัตรูธรรมชาติของพาหะอาศัยอยู่ ซึ่งอาจจะช่วยเป็นตัวขัดขวาง (barrier) การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสได้ แต่ส่วนใหญ่วัชพืชที่งอกขึ้นมาหลังจากปลูกพืชแล้ว มักจะเป็นตัวผลักดันให้พาหะเคลื่อนย้ายเข้าสู่พืช (Basu and Giri, 1993) วัชพืชที่เป็นแหล่งพักพิงของเชื้อ PBNV ที่ควรทำลายให้หมดไป ได้แก่ โหงวเหง ผักเผ็ด แพงพวย ผักเสี้ยนผี ผักแครด และกระดูมใบ ซึ่งวัชพืชดังกล่าวพบอยู่ทั่วไปในแปลงถั่วลิสง (โสภณ, 2536) เนื่องจากเชื้อ PBNV ไม่เป็น seed-borne virus ในถั่วลิสง (Wongkaew, 1994) ดังนั้นเมล็ดพันธุ์จึงไม่ใช่

แหล่งพักพิงของเชื้อ การทำ heat treatment เพื่อหยุดการเจริญของเชื้อไวรัส (inactivated) จึงไม่จำเป็นต้องกระทำในกรณีของเชื้อ PBNV

5.2.2 การยับยั้งไม่ให้เกิดการแพร่กระจาย (measures against spread)

5.2.2.1 การทำลายพืชที่เป็นโรค

การถอนต้นเป็นโรคทิ้งในระยะแรกของการเจริญเติบโตของถั่วลิสงใช้ไม่ค่อยได้ผลกับการเกิดโรคยอดไหม้ เพราะจะทำให้เกิดช่องว่างระหว่างต้น ทำให้ความหนาแน่นของประชากรพืชเบาบางลง มีผลทำให้การเกิดโรคเพิ่มขึ้น (โสภณ, 2536; Reddy *et al.*, 1995) เนื่องจากเมื่อประชากรเบาบางลง ทำให้เกิดสภาพชักนำให้มีการแพร่ระบาดของเพลี้ยไฟเข้ามาในแปลง หรือเพลี้ยไฟเคลื่อนย้ายจากต้นที่ถูกถอนไปยังต้นอื่นๆแทน ส่งผลให้เกิดการระบาดของโรคเพิ่มมากขึ้น (โสภณ, 2536)

5.2.2.2 การเลือกพื้นที่ปลูก

การเลือกพื้นที่ปลูกให้ห่างจากแหล่งเชื้อเป็นระยะทางเท่าใดนั้น ต้องคำนึงถึงปริมาณของเชื้อในแหล่งที่มีการระบาด ระดับประชากรของแมลงพาหะ และความแรงลม วิธีนี้มักจะนิยมทำในกรณีที่ต้องการรับรองการปลอดเชื้อ เช่น กรณีต้องการมันฝรั่งที่ปราศจากเชื้อ ควรเลือกปลูกในพื้นที่ที่มีความหนาวเย็นและมีลม (Basu and Giri, 1993) สำหรับการเลือกพื้นที่ปลูกถั่วลิสงในประเทศไทยอาจทำได้ยาก เนื่องจากเกษตรกรมีที่ดินทำกินจำกัด ฐานะยากจน ไม่สามารถเลือกที่ทำกินได้ จำเป็นต้องปลูกหมุนเวียนกับพืชอื่นๆ การแก้ไขโรคยอดไหม้ด้วยวิธีนี้จึงอาจไม่ได้ผล

5.2.2.3 การเลือกเวลาปลูก

โดยทั่วไปพืชส่วนใหญ่มักจะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสเมื่อยังเป็นต้นอ่อน และจะมีความต้านทานสูงขึ้นเมื่อพืชอายุมากขึ้น ดังนั้นถ้าปรับเปลี่ยนเวลาปลูกไม่ให้ช่วงการเจริญเติบโตระยะแรกของพืชตรงกับช่วงการระบาดของพาหะ ก็จะช่วยลดการเกิดโรคได้ สำหรับโรคยอดไหม้ Reddy และคณะ (1995) แนะนำว่า ควรใช้วิธีการปรับเปลี่ยน

วันปลูก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Dharmaraj และคณะ (1995) ที่พบว่า การปลูกถั่วฤดูฝนในรัฐ Karnataka ประเทศอินเดีย โดยเลื่อนวันปลูกเร็วขึ้น คือ เริ่มปลูกตั้งแต่สัปดาห์แรกๆของเดือนมิถุนายน จะพบโรคเพียง 1-10% ซึ่งต่ำกว่าพืชที่ปลูกในสัปดาห์สุดท้ายของเดือนมิถุนายนที่พบพืชเป็นโรค 4-30% และจะพบการเกิดโรคสูงสุดถึง 90% หากเริ่มปลูกประมาณสัปดาห์แรกของเดือนสิงหาคม อย่างไรก็ตามสำหรับในรัฐ Uttar Pradesh ประเทศอินเดีย Singh และ Srivastava (1995) แนะนำให้ปลูกช้าลง คือ จากที่เคยปลูกสัปดาห์สุดท้ายของเดือนมิถุนายน ให้ปรับเปลี่ยนไปปลูกสัปดาห์สุดท้ายของเดือนกรกฎาคมแทน ซึ่งมีผลทำให้การเกิดโรคในรัฐนี้ลดน้อยลง

จากข้อแนะนำที่แตกต่างกันดังกล่าวข้างต้น การเลือกเวลาปลูกจึงควรจะมีการทดลองเวลาปลูกที่เหมาะสมในแต่ละพื้นที่ปลูก เนื่องจากพื้นที่แต่ละแห่งมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ในประเทศไทยเนื่องจากโรคยอดไหม้ระบาดมากเฉพาะในฤดูแล้ง การเปลี่ยนฤดูปลูกในพื้นที่ที่มีปัญหามาก อาจจำเป็นต้องสลับไปปลูกถั่วลิสงในฤดูฝนแทนการปลูกในฤดูแล้ง ซึ่งวิธีนี้อาจปฏิบัติได้ยาก เนื่องจากอาจขัดกับกิจกรรมปกติในบางพื้นที่ ดังนั้นในพื้นที่ที่มีปัญหาโรคยอดไหม้การปลูกถั่วในฤดูแล้งควรเลื่อนเวลาปลูกให้เร็วขึ้นกว่าเดิม หรือเลื่อนเวลาปลูกให้ล่าออกไปมากๆ (ปลายเดือนกุมภาพันธ์) ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน คือ พบต้นเป็นโรคน้อย หรือไม่พบเลย ซึ่งอาจเป็นเพราะอุณหภูมิในเวลากลางวันสูงมาก ทำให้เพลี้ยไฟลดหรือหยุดการเคลื่อนย้าย (โสภณ, 2536)

5.3 การปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการบินและการตั้งถิ่นฐานของพาหะ (modifying vector flight and settling behaviour)

5.3.1 การเพิ่มความหนาแน่นของพืช

การควบคุมโรคยอดไหม้ในประเทศอินเดียด้วยวิธีนี้ได้ผลดีมาก (Reddy *et al.*, 1995) คือ ใช้ระยะปลูกแคบ เช่น 10 x 20 ซม. ซึ่งได้รับการทดลองแล้วว่าเป็นระยะที่เหมาะสมต่อการลดการเกิดโรค (Dharmaraj *et al.*, 1995; Basu, 1995) จากการสำรวจของ โสภณ (2536) พบว่า ในพื้นที่ที่ใช้ระยะปลูกแคบในระดับ 10 x 20 ซม.

หรือแคบกว่านี้ การแพร่ระบาดของโรคยอดไหม้มีน้อยมากเมื่อเทียบกับในพื้นที่ปลูกที่ใช้ระยะปลูกกว้าง

อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้วิธีนี้อาจจะมีปัญหาคือ สิ้นเปลืองเมล็ดพันธุ์ และการระบายอากาศในแปลงไม่ดี ทำให้เหมาะต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในดิน โดยเฉพาะหากปลูกในฤดูฝน

5.3.2 การปลูกพืชแซม

การปลูกพืชโตเร็ว เช่น งา, pearl millet (Singh and Srivastava, 1995; Reddy *et al.*, 1995), ข้าวโพด และข้าวฟ่าง (Reddy *et al.*, 1995; โสภณ, 2536) สามารถลดการเกิดโรคได้ โดยปลูกพืชแซมในลักษณะพืชโตเร็ว 1 แถว สลับกับถั่วลิสง 3 แถว (โสภณ, 2536) วิธีนี้พบว่าสามารถลดการเข้าทำลายของเพลี้ยไฟ *T. palmi* ในถั่วลิสง (Reddy *et al.*, 1995)

5.3.3 การใช้วัสดุผิวสะท้อนแสง (reflective surfaces)

หลังจากมีการพบว่า aluminium foil สามารถใช้ไล่เพลี้ยอ่อนแล้วลดการระบาดของเชื้อ CMV ได้ ในปี ค.ศ.1964 วิธีการนี้ได้ถูกนำไปใช้กับ whitefly-borne disease และแมลงพาหะอื่นๆอีกหลายชนิด เนื่องจากแมลงเหล่านี้ไม่ชอบแสงสะท้อนจาก aluminium foil (Basu and Giri, 1993) ในกรณีของเชื้อ PBNV (เคยรายงานเป็นเชื้อ TSWV) Reddy และ Wightman (1988) รายงานว่า การเลือกใช้พลาสติกอลูมิเนียมในแปลงปลูกมะเขือเทศ พริก และยาสูบ สามารถลดการเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้พลาสติกสีดำคลุมแปลง โดยพบว่าการเกิดโรคในแปลงที่คลุมด้วยพลาสติกมีปฏิภาคโดยตรงกับประชากรของเพลี้ยไฟ ผลการทดลองดังกล่าวตรงกับข้อสังเกตของ โสภณ และ จุฑารัตน์ (2537) ซึ่งทำการสำรวจแปลงปลูกพืชเพื่อผลิตเมล็ดลูกผสม คือ มะเขือเทศ พริกหวาน และแตงชนิดต่างๆ ระหว่างเดือนกันยายนถึงธันวาคม พ.ศ.2536 ผลการสำรวจพบว่าอัตราการเกิดโรคยอดไหม้มีประมาณ 1-10% โดยแปลงที่มีโปรแกรมการฉีดพ่นสารฆ่าแมลงและมีพลาสติกสีเงินคลุมแปลง จะมีอัตราการเกิดโรคต่ำกว่าแปลงที่มีการฉีดพ่นสารเคมี แต่ไม่คลุมพลาสติกสีเงิน

5.4 การควบคุมโรคโดยชีววิธีด้วยแมลงศัตรูธรรมชาติ (natural enemies)

ขบวนการทำงานของแมลงศัตรูธรรมชาติไม่รวดเร็วเหมือนการฉีดพ่นสารฆ่าแมลง แต่มีความสำคัญ คือ ช่วยรักษาสมดุลทางธรรมชาติระหว่างปริมาณของแมลงศัตรูพืชและแมลงศัตรูธรรมชาติ บทบาทของแมลงตัวห้ำและตัวเบียนจะเกิดขึ้นได้ หรือมีชีวิตอยู่รอดได้ก็ต้องมีแมลงศัตรูพืชเป็นเหยื่อ (host) (เตือนจิตต์, มโนชัย และ สาทร, 2539) ในสภาพธรรมชาติเพลี้ยไฟจะถูกควบคุมโดยแมลงตัวห้ำ (predator) และตัวเบียน (parasite) หลายชนิด ตัวอย่างของตัวห้ำได้แก่ แมงมุม, หนอนของแมลงวันดอกไม้ (Syrphid fly), ด้วงเต่า (lady bettles; *Micrapis discolor*) และมวนดอกไม้ สำหรับตัวเบียนที่พบบ่อยมักทำลายหรือเบียดเบียนแมลงศัตรูพืช ในขณะที่ตัวเบียนยังไม่เจริญเป็นตัวเต็มวัย ตัวอย่างเช่น แตนเบียนไตรโคแกรมม่า Cooper (1990) รายงานว่า ไร (Ascidae; *Lasioscius* sp.), เชื้อรา (*Entomophthora* sp.) และ *Coleomegilla maculata* (De Geer) เป็นตัวเบียนที่สำคัญของเพลี้ยไฟ *T. palmi* และที่กำลังศึกษาคือ *Ceranisus* sp. (Hymenoptera : Eulophidae) จากประเทศไทย การลดอันตรายที่จะเกิดกับศัตรูธรรมชาติของเพลี้ยไฟเหล่านั้น อาจกระทำได้โดยเลือกใช้สารเคมีในรูปใส่ลงดิน (granular form) แทนการใช้สารเคมีประเภทฉีดพ่น (โสภณ, 2536)

5.5 การใช้พันธุ์ต้านทาน

วิธีที่ดีที่สุดในการลดความเสียหายของพืชจากโรคไวรัส คือ ใช้วิธีการทางเขตกรรมและพันธุ์ต้านทานที่มียีนต้านทานโรคเองโดยธรรมชาติ พันธุ์ต้านทานที่ดีนั้นควรจะต้องต้านทานทั้งเชื้อไวรัสและแมลงพาหะ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการพัฒนาปรับเปลี่ยนวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ซึ่งช่วยให้ได้พืชที่ต้านทานเร็วขึ้น ตัวอย่างเช่น การใช้พืชที่ได้รับการปลูกถ่ายยีน (transgenic plants) ด้วย viral coat protein gene (CP gene), replicase-associated gene และ sattellite RNA (Fitchen and Beachy, 1993)

5.5.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อไวรัส

การพัฒนาการใช้พันธุ์ต้านทานในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา มักกระทำโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดการใช้สารเคมีในการปกป้องพืช เพื่อลดผลกระทบต่อผู้บริโภคและสภาพแวดล้อม การคัดหาพันธุ์ต้านทานนั้น โดยทั่วไปมักจะกระทำเฉพาะกับโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นวิธีการที่ต้องการการลงทุนสูงมากเมื่อเทียบกับวิธีการอื่นๆ (Wynne *et al.*, 1991)

5.5.1.1 ประเภทของความต้านทาน

Matthews (1992) ได้ให้คำจำกัดความเกี่ยวกับปฏิกิริยาของพืชต่อเชื้อไวรัสไว้ดังนี้คือ พืชที่อ่อนแอ (susceptible) หมายถึง พืชที่ยอมให้เชื้อเพิ่มปริมาณและแผ่กระจายทั่วต้นได้ โดยเกิดขึ้น 2 แบบ คือ sensitive และ tolerant ความอ่อนแอแบบ sensitive คือ ลักษณะที่ชนิดหรือพันธุ์พืชนั้นยอมให้เชื้อไวรัสเพิ่มปริมาณ แล้วเชื้อสามารถเคลื่อนย้ายทั่วทั้งต้นได้ และเชื้อมีผลกระทบต่อพืช โดยพืชอาจแสดงอาการรุนแรงมากหรือรุนแรงน้อย ส่วนความอ่อนแอแบบ tolerant หมายถึง พืชยอมให้เชื้อเพิ่มปริมาณและเคลื่อนย้ายทั่วทั้งต้นได้ แต่พืชไม่แสดงอาการติดเชื้อออกมาให้เห็น (latent infection) และเชื้อไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตต่อพืช ซึ่ง Ponz และ Bruening (1986) เคยกล่าวว่า ลักษณะ tolerant ยังเป็นลักษณะสำคัญของการเกิดความต้านทานในสภาพไร่ (field resistance) และการปกป้องพืชในระยะยาว (long-term plant protection) ซึ่งจัดเป็นการต้านทานต่อการแสดงอาการและความเสียหายของผลผลิตมากกว่าที่จะต้านทานต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้อ

สำหรับการเกิดความต้านทานต่อเชื้อไวรัส Matthews (1992) ได้จำแนกไว้ 3 แบบ คือ

1) Extreme hypersensitive คือ พืชจำกัดการเพิ่มปริมาณของเชื้อตั้งแต่เซลล์แรกที่ถูกเข้าทำลาย เนื่องจาก viral-coded protein ซึ่งจำเป็นสำหรับการเคลื่อนย้ายแบบ cell-to-cell ไม่สามารถทำหน้าที่ในพืชนั้นได้ ทำให้พืชไม่แสดงอาการติดเชื้อ แต่ก่อนเรียกความต้านทานแบบนี้ว่า immune Berna (1995) ได้แสดงให้เห็นว่า viral nonstructural movement protein (MPs) เป็นองค์ประกอบที่มีหน้าที่

ควบคุมการเคลื่อนย้ายแบบ cell-to-cell และเป็นองค์ประกอบที่กำหนดความรุนแรงของโรค Basu และ Giri (1993) กล่าวว่า MPs นี้เชื้อจะสร้างขึ้นมามากเฉพาะในระยะแรกของการเข้าทำลาย หลังจากนั้นอัตราการสร้างจะลดลง การสูญเสีย MPs gene ทำให้สูญเสียส่วนของ gene ที่ทำหน้าที่ปรับเปลี่ยนขนาดของ plasmodesmata ให้เหมาะสมต่อการเคลื่อนย้ายของเชื้อ (Lucas and Gilbertson, 1994)

2) Acquired resistance คือ การยับยั้งการติดเชื้อซึ่งเกิดขึ้นในส่วนของเซลล์ที่อยู่รอบๆเซลล์ที่ถูกเข้าทำลายตั้งแต่แรก โดยมักจะเกิดอาการเป็นแผลเฉพาะแห่ง (necrotic local lesion) ส่งผลให้เนื้อเยื่อที่อยู่รอบๆแผลเกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส การเกิดความต้านทานแบบนี้จะก่อให้เกิด host protein หรือที่เรียกว่า pathogenesis-related (PR) protein อย่างน้อย 14 ชนิด โปรตีนดังกล่าวจะถูกสร้างขึ้นหลังจากเชื้อเข้าทำลายพืช ทำให้เกิดปฏิกิริยาความต้านทานแบบไม่เฉพาะเจาะจงเหมือนกรณีถูกเชื้อรา แบคทีเรีย ปรสิตต่างๆ และแมลงเข้าทำลาย หรือถูกรบกวนโดยสารเคมี หรือพืชได้รับความเสียหายเนื่องจากวิธีกล โดยพบพืชหลายชนิดที่มีความต้านทานแบบนี้ แล้วตอบสนองแบบ necrotic hypersensitive response ลักษณะของความต้านทานในพืชดังกล่าวมักจะถูกควบคุมโดย single dominant Mendelian gene

3) ความต้านทานแบบอื่นๆ เช่น cultivar resistance คือ เป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ โดยความต้านทานต่อการติดเชื้อถูกควบคุมด้วย one dominant gene หรือ dominant gene แบบไม่สมบูรณ์ (incompletely dominant gene)

Fraser (1990) ได้รายงานว่า gene ที่ควบคุมความต้านทานต่อเชื้อเป็น dominant allele โดยกลไกความต้านทานมักทำให้เกิดแผลตายเฉพาะที่ (localized necrotic lesion) และยีนที่ควบคุมการแสดงความต้านทานต่อเชื้อส่วนใหญ่เป็น homozygous (R/R) มากกว่า heterozygous (R/+) การแสดงจะแสดงออกได้เต็มที่หรือไม่ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของอาการของโรค น้อยมากที่ความต้านทานแบบนี้จะถูกควบคุมโดยยีนด้อย (recessive gene) (Matthews, 1992) ตัวอย่างเช่น การแสดงออกของลูกผสมรุ่น F_1 ของพริก (*Capsicum chinense*) พันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อ TSWV ซึ่งพันธุ์ต้านทานตอบสนองต่อสายพันธุ์เชื้อ severe strain โดยการเกิด

localized lesion ที่มีลักษณะเป็น hypersensitive reaction (HR) จากการทดลองพบว่าลูกผสมรุ่น F_1 ทั้งหมดแสดงความต้านทานโดยเกิดปฏิกิริยาแบบ HR เหมือนกันหมด แสดงว่ายีนที่ควบคุมความต้านทานต่อเชื้อ TSWV เป็นยีนเด่นทั้งหมด (Boiteux, 1995)

5.5.1.2 กลไกการเกิดความต้านทาน

โดยทั่วไปพืชมีกลไกสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส 3 ลักษณะ คือ

1) การเกิด hypersensitive reaction (HR)

ซึ่งเป็นผลตอบสนองต่อผลิตผลที่ได้จากการทำงานของ viral gene ภายในเซลล์พืช โดยพืชจะส่งสัญญาณไปทั้งต้นเพื่อให้ส่วนอื่นๆมีความต้านทานต่อเชื้อ ทำให้เกิดความสัมพันธ์แบบ incompatible ระหว่างพืชกับเชื้อ ซึ่งจะแสดงออกเมื่อพืชสามารถจดจำเชื้อได้ (Culver *et al.*, 1991) ตัวอย่างเช่น ในกรณีของเชื้อ TMV ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่มีการศึกษากันมากเกี่ยวกับการตอบสนองของพืชต่อเชื้อในลักษณะดังกล่าว คือ พืชสามารถจดจำองค์ประกอบของเชื้อได้ ตัวอย่างเช่น ยาสูบ (*N. glutinosa*) ที่มียีนเด่นชนิด N' gene จะจดจำส่วนที่เป็น coat protein ของเชื้อ ขณะที่ยาสูบที่มียีนชนิด N gene จะจดจำองค์ประกอบอย่างอื่นที่ไม่ใช่ coat protein ของเชื้อ TMV และกรณีมะเขือเทศที่มี Tm-2 gene จะจดจำ movement protein ของเชื้อ TMV (Fraser, 1990; Culver *et al.*, 1991)

2) โดยการเกิด green islands

การเกิด green islands เป็นกลไกการแสดงความต้านทานต่อเชื้อที่ไม่เกี่ยวข้องกับกลไกยับยั้งการเข้าทำลายตั้งแต่เริ่มแรก แต่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายเชื้อแบบ long-distance ภายในต้นพืชที่อาศัยระบบท่อน้ำท่ออาหาร (Jones and Tolin, 1972) ในส่วนที่เป็นสีเขียวเข้ม (dark green) ของใบ โดยทั่วไปจะพบอนุภาคของเชื้อไวรัสน้อยกว่าส่วนที่เป็นสีซีด (yellow green) เช่น ในกรณีพืชถูกเชื้อ TMV, PVX (Ponz and Bruening, 1986) และ maize dwarf mosaic virus (MDMV) (Jones and Tolin, 1972) เข้าทำลาย Culver และคณะ (1991) แสดงให้เห็น

ว่าการเกิด dark green และ yellow green mosaic เกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อทำให้ปริมาณของ chlorophyll ลดลง โดยเชื้อไปปรับเปลี่ยนหน้าที่และโครงสร้างของ chloroplast โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นสีซีด อย่างไรก็ตามกลไกการเกิด green island ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่เข้าใจนัก

3) โดยการสร้างสารเคมีต่อต้านเชื้อไวรัสของพืช

Ponz และ Breuning (1986) ได้รายงานว่า อาการ necrotic ที่เกิดขึ้นภายหลังจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายพืชเกิดจากความเป็นพิษในระดับเซลล์ เนื่องจากมีการสะสมของสาร O-quinones ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขบวนการสังเคราะห์สารประกอบพวกอโรมาติก เช่น สาร phenylalanine ammonia-lyase (PAL), cinnamic acid-4-hydroxylase (CAH) และ cafferic acid-O-methyltransferase (OMT) โดยการเพิ่มขึ้นของ PAL นี้ชักนำให้เกิดการสร้าง phytoalexin รอบๆแผล เพื่อยับยั้งการบุกรุกของเชื้อไวรัส โดยการสร้าง phytoalexin นี้จะเกิดขึ้นหลังจากเกิดแผล กรณีพืชที่ถูกเชื้อ TMV เข้าทำลาย พบว่ามีการสร้าง 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) ขึ้นมาก่อน จากนั้นจึงเกิดการสูญเสีย membrane permeability ทำให้พืชแสดงอาการแผลตาย (necrotic) ในลักษณะ HR ในที่สุด

5.5.1.3 การประเมินความต้านทานของพืชต่อเชื้อไวรัส

การประเมินความต้านทานของพืชต่อเชื้อไวรัส ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

1) การประเมินความต้านทานของพืชต่อเชื้อไวรัสในสภาพไร่

มีวิธีการประเมินที่แตกต่างกันไป กรณีการประเมินความต้านทานของพืชพวกธัญพืชต่อเชื้อ BYDV กระทำโดยการปลูกเชื้อลงบนต้นพืชก่อน จากนั้นจึงนำพืชเหล่านั้นไปปลูกในไร่ทดลอง แล้ววัดความเข้มข้นของเชื้อบริเวณส่วนของใบยอดโดยวิธี ELISA ทุก 2 สัปดาห์ กระทำการวัด 3-4 ครั้งต่อการทดลอง (Skaria *et al.*, 1985) หรือบางกรณีประเมินโดยการสังเกตอาการ แล้วใช้ดรรชนีการเกิดโรค (disease severity index) ให้เป็นค่าคะแนน เช่น การประเมินความต้านทานของข้าวโพดต่อเชื้อ MDMV โดย Lei และ Agrios (1986) ได้ตั้งค่าคะแนนไว้เท่ากับ 0-4 ซึ่งได้ดัดแปลงมาจาก

วิธีการของ Scott และ Rosenkranz (1975) โดยที่ 0 = ไม่แสดงอาการเป็นโรค, 1 = แสดงอาการด่างเป็นแถบ มีขอบเขตชัดเจนบน 1 หรือ 2 ใบ, 2 = แสดงอาการด่างกระจายทั่วผิวใบ 1-2 ใบ, 3 = แสดงอาการด่างกระจายทั่วผิวใบ 3-6 ใบ และ 4 = แสดงอาการด่างปกคลุมทั่วผิวใบมากกว่า 6 ใบ หรือมากที่สุด

สำหรับการประเมินความต้านทานของถั่วลิสงต่อเชื้อไวรัส Subrahmanyam และคณะ (1994) ได้ทำการทดลองคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วลิสงเพื่อต้านทานต่อโรค groundnut rosette โดยใช้เทคนิค infector-row แล้วประเมินความต้านทานของถั่วลิสงต่อเชื้อโดยสังเกตอาการ chlorotic rosette บนต้น วัดระดับการเกิดโรคเป็นเปอร์เซ็นต์ ทำนองเดียวกับการทดลองของ Culbreath และคณะ (1994) ซึ่งประเมินความต้านทานของถั่วลิสงต่อโรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ TSWV จากการสังเกตอาการร่วมกับการตรวจเชื้อด้วยวิธี ELISA ต้นที่พบอาการบนใบเพียง 1 ใบหรือมากกว่านับเป็นพืชติดเชื้อ จากนั้นจึงให้ค่าระดับการเกิดโรคเป็นเปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์ผลโดยการสร้าง disease progress curves

ในการทดลองของ Dwivedi และคณะ (1993) และ Dwivedi และคณะ (1995) ทำการประเมินความต้านทานของถั่วลิสงต่อโรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ PBNV โดยการวัดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค จากการสังเกตอาการบนต้นพืชร่วมกับการประเมินความต้านทานของถั่วลิสงต่อแมลงพาหะด้วย โดยวัดความเสียหายที่เกิดจากเพลี้ยไฟเป็นค่าคะแนน 1-9 โดยที่ 1 = heighly resistant, 2-3 = resistant, 4-5 = moderate resistant, 6-7 = susceptible และ 8-9 = highly susceptible พันธุ์ที่แสดงความต้านทานต่อโรคยอดไหม้ในสภาพไร่ จะพิจารณาจากระดับเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคร่วมกับคะแนนความเสียหายจากเพลี้ยไฟ ลักษณะเดียวกันกับการทดลองของ Buiel และ Parlevliet (1995a) ซึ่งได้ประเมินความต้านทานของถั่วลิสงต่อเชื้อ PBNV เช่นกัน โดยปลูกเชื้อในแหล่งที่มีการระบาดของโรคสูง แล้ววัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากการสังเกตอาการหลังพืชงอก 2 สัปดาห์ วัดทุกๆ 2 สัปดาห์ ทำสัญลักษณ์ต้นเป็นโรคไว้ วัดผลจนกระทั่งถึง 3 สัปดาห์ก่อนการเก็บเกี่ยว โดยให้เหตุผลของการเช็คบ่อยครั้งว่า เนื่องจากต้นที่ถูกเชื้อเข้าทำลายมักจะตาย

ในบางกรณีมีการประเมินความต้านทานของพืชต่อเชื้อจากระดับความรุนแรงของโรค โดยใช้สูตรทางคณิตศาสตร์ ตัวอย่างเช่น การประเมินความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อ CMV ในมะเขือเทศ Raupach และคณะ (1996) รายงานสูตรการคำนวณไว้ดังนี้ คือ Disease severity = [(rating no. x no. plant in rating) x 100%]/(total no. plant x highest rating)

2) การประเมินความต้านทานของพืชต่อเชื้อไวรัสในสภาพเรือนทดลอง

จุดประสงค์เพื่อทำการแยกสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสจากสายพันธุ์ที่แสดงความต้านทานต่อแมลงพาหะ วิธีการประเมินโดยทั่วไปมักจะกระทำโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล หรือใช้แมลงพาหะ แล้วสังเกตอาการ และ/หรือวัดความเข้มข้นของเชื้อด้วยวิธี ELISA ซึ่ง Hunger และ Sherwood (1985) ได้รายงานว่า การประเมินความต้านทานของพืชต่อเชื้อไวรัสโดยการสังเกตอาการ (visual assessment) เพียงอย่างเดียวให้ผลไม่ชัดเจน เนื่องจากพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ในระดับเท่าๆกัน จึงควรทำการประเมินร่วมกับวิธีการวัดความเข้มข้นของเชื้อเพื่อความแม่นยำมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจวัดความเข้มข้นของเชื้อโดยวิธี ELISA มีความเหมาะสมมากกว่าการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน เนื่องจากวิธีการดังกล่าวตรวจตัวอย่างได้คราวละมากๆ และมีความสะดวกกว่า

การวัดความต้านทานของพืชจากการประเมินด้วยวิธี ELISA วัดได้จากค่า absorbance ($A_{405\ nm}$) ซึ่งอาจแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น การประเมินความต้านทานของข้าวสาลีต่อเชื้อ soilborne wheat mosaic virus (SBWMV) Myers และคณะ (1993) รายงานว่า ถ้าค่า $A_{405\ nm} < 0.100$ แสดงว่าพืชมีความต้านทานต่อเชื้อ, $A_{405\ nm} > 0.100$ แสดงว่าพืชอ่อนแอต่อเชื้อ โดยที่พืชปกติมีค่า $A_{405} = 0$ สำหรับการประเมินความต้านทานของข้าวโอ๊ตต่อเชื้อ BYDV Gray และคณะ (1993) เปรียบเทียบค่า A_{405} ของ unknown samples กับค่า A_{405} ของไวรัสบริสุทธิ์ที่ทำเจือจางในน้ำคั้นพืชปกติแบบ two fold dilution แล้วทำเป็น standard curve โดย $A_{405} = 0.05$ เป็นค่าที่วัดได้จากเชื้อเจือจางต่ำสุด ขณะที่ $A_{405} = 1.5$ เป็นค่าที่วัดได้จากเชื้อเข้มข้นสูงสุด โดยที่ค่า A_{405} ของ unknown sample จะตกอยู่ภายในช่วงดังกล่าว จากนั้นจึงนำค่า absorbance data (หมายถึง ค่า titer ของ viral

antigen) มาวิเคราะห์ความแปรปรวน หรือนำมาวิเคราะห์ในโปรแกรม ONEWAY ของ Minitab (1991) สังเกตความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์กับค่า titer ของ viral antigen ทุกๆสัปดาห์

5.5.2 การใช้พันธุ์ต้านทานสำหรับกรณีโรคยอดไหม้

5.5.2.1 แหล่งของความต้านทานต่อโรค

International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT) Asia Center ประเทศอินเดีย นับเป็นหน่วยงานที่มีการคัดเลือกพันธุ์ถั่วลิสงเพื่อให้ต้านทานต่อโรคยอดไหม้มากที่สุด ถั่วลิสงจำนวนกว่า 8,000 สายพันธุ์ ได้ถูกนำมาคัดเลือก ซึ่งในจำนวนนี้มี subsp. *hypogaea* และ subsp. *fastigiata* รวมอยู่ด้วย จากการประเมินความต้านทานโรค พบว่าสายพันธุ์ส่วนใหญ่มีความอ่อนแอต่อโรคมาก มีบางสายพันธุ์ที่มีระดับการเกิดโรคต่ำในสภาพไร่ แต่ยังไม่พบพันธุ์ใดที่แสดงความต้านทานแบบสมบูรณ์ (complete resistance) สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคในสภาพไร่ส่วนใหญ่แสดงความต้านทานเนื่องจากความไม่ชอบดูดกินของพาหะ (Dwivedi *et al.*, 1993) Dharmaraj และคณะ (1995) รายงานว่า สายพันธุ์พวก spanish bunch ที่ปลูกในรัฐ Karnataka ประเทศอินเดีย เช่น พันธุ์ JL 24, KRG-1 และ S-206 มีความอ่อนแอต่อเชื้อมาก ส่วนสายพันธุ์ที่มักจะมีความต้านทานในสภาพไร่ คือ สายพันธุ์ Robut 33-1 (Amin, 1985 quoted in Buiel *et al.*, 1995b) ปี ค.ศ.1993 Dwivedi และคณะ (1993) รายงานว่า พันธุ์ ICGV 86031 เป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคในสภาพไร่ นอกจากนี้ยังพบว่าพันธุ์ดังกล่าว รวมทั้ง ICGV 86388 และ ICGV 90266 มีความต้านทานต่อเชื้อ PBNV ที่ระดับความเข้มข้น 1:100 ในสภาพเรือนทดลอง

สายพันธุ์ที่ ICRISAT เคยรายงานและบ่งบอกว่าเป็นพันธุ์ต้านทานโรคในสภาพไร่ ได้แก่ ICGVs 86029, 86030, 86031, 86032, 86033 และ 86538 (Basu, 1993) พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีความต้านทานต่อโรคในสภาพไร่ด้วย ซึ่งใช้เป็นพันธุ์แนะนำเกษตรกรในประเทศอินเดีย ได้แก่ ICGVs 87123 (ICGS 11), 87128 (ICGS 44) (Dwivedi *et al.*, 1993; Reddy *et al.*, 1995), 87187 (ICGS 37),

87141 (ICGS 76) (Dwivedi *et al.*, 1995) และ Kadiri 3 (Reddy *et al.*, 1995), R 8806 และ R 8808 (Basu, 1995)

Dwivedi และคณะ (1995) รายงานถึงพันธุ์ที่ต้านทานทั้งในสภาพไร่และเรือนทดลอง ที่ความเข้มข้นของเชื้อต่ำ (ระดับความเจือจาง 1:100) แต่อ่อนแอที่ความเข้มข้นสูง (ระดับความเจือจาง 1:10) ได้แก่ พันธุ์ ICGVs 86388, 91239 และ 91245 โดยเกิดโรคเพียง 23-42% เมื่อเปรียบเทียบกับ ICGV 86031 ซึ่งใช้เป็น resistance control ที่มีจำนวนต้นเป็นโรค 40% และ JL 24 ซึ่งใช้เป็น Susceptible control เป็นโรคสูงถึง 80% และเมื่อนำพันธุ์ ICGV 86388 ไปทดสอบอีก 3 ครั้งที่ช่วงเวลาต่างกัน (ค.ศ.1993-1995) แต่ยังใช้ความเข้มข้นของเชื้อเท่าเดิม คือ 1:100 พบว่าพันธุ์ ICGV 86388 ยังคงแสดงความต้านทานในสภาพเรือนทดลอง คือ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโดยเฉลี่ยจาก 3 ครั้งเท่ากับ 31% ขณะที่ ICGV 86031 และ JL 24 เกิดโรค 45 และ 87% ตามลำดับ ส่วน Buiel และคณะ (1995b) รายงานถึงพันธุ์ที่แสดงความต้านทานต่อโรคในสภาพไร่ไว้ดังนี้คือ ICGV 86430, 2192-8(50) และ 2169-5(9) Dharmaraj และคณะ (1995) รายงานว่า พันธุ์ KRG-2 เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง และมีความต้านทานต่อโรค ซึ่งสถานีวิจัย (Regional Research Station) ที่ Raichur ใช้ในการแก้ปัญหาโรคยอดไหม้ในรัฐ Karnataka และยังมีพันธุ์อื่นๆที่เคยทำการคัดเลือกในฤดูต่างๆ ในแหล่งที่มีโรคยอดไหม้ระบาดมากของเมือง Raichur ซึ่งเกิดโรคต่ำกว่า 5% ได้แก่ R-8806, R-8970, R-8976, R-9021, R-9251, R-9214, R-9227, R-9204, ICGV numbers 86029, 86030, 86031, 89304, 86696 และ ICG 2271 ขณะที่ JL 24 (Susceptible control) เกิดโรคมากกว่า 30%

Basu (1995) คัดเลือกพันธุ์ต้านทานจาก 1,380 พันธุ์ ในพื้นที่ที่มีปัญหา ระหว่าง ค.ศ.1990-1994 พบ 56 สายพันธุ์แสดงความต้านทาน คือ เกิดโรคน้อยกว่า 10% ขณะที่ JL 24 (susceptiible control) เกิดโรค 60% พันธุ์ที่สำคัญได้แก่ Spanish 5512, Spanish C7-5, ICGS 18, ICGV 86699, J 14, R 33-1, R 8821, R 7015, R 9012, ICG 1703, ICG 2711, EC 2215, ICG 5042, ICGV 98304 และ RSG 1 ซึ่งพันธุ์ดังกล่าวได้นำมาใช้เป็นพันธุ์พ่อ-แม่ในการปรับปรุงพันธุ์

สำหรับพันธุ์ ICGV 86388 ซึ่งมีความต้านทานต่อเชื้อ PBNV มากกว่า ICGV 86031 (Dwivedi *et al.*, 1995) จัดเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ซึ่งได้จากการผสมระหว่าง (Dh 3-20 x USA 20) x NCAc 2232 เป็นพันธุ์แตกกิ่งแขนง ใบรูปไข่ สีเขียวเข้ม ฝักขนาดเล็ก ส่วนใหญ่มี 2 เมล็ดต่อฝัก เปอร์เซ็นต์กะเทาะ 70% น้ำหนัก 100 เมล็ดขนาด 37 กรัม เมล็ดสีน้ำตาล (tan) และมีเปอร์เซ็นต์น้ำมัน 53% (Dwivedi *et al.*, 1995)

อย่างไรก็ตามพันธุ์ที่ต้านทานเชื้อซึ่งมี resistant gene มีข้อเสียคือ ทำให้เกิด pathotype ใหม่ๆ ในกรณีของเชื้อไวรัสในสภาพธรรมชาติจะเกิดน้อยกว่าเชื้อรา โดยเฉพาะถ้าความสัมพันธ์ระหว่าง host กับเชื้อไวรัสเป็นแบบ complex และ dynamic genetic ความต้านทานของพืชจะถูกทำลายได้เรื่อยๆ ตัวอย่างที่ดีที่สุดคือ ความสัมพันธ์ระหว่าง common bean (*Phaseolus vulgaris*) กับเชื้อ bean common mosaic virus พันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อนี้ก่อให้เกิด strain ของเชื้อใหม่มากถึง 10 strain (Basu and Giri, 1993)

5.5.2.2 แหล่งของความต้านทานต่อเพลี้ยไฟ

การคัดเลือกพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรคยอดไหม้ อาจใช้พันธุ์พืชที่ต้านทานต่อเพลี้ยไฟ ซึ่งจะมีผลทำให้ระดับการเกิดโรคในสภาพไร่ลดลง เนื่องมาจากความไม่ชอบของเพลี้ยไฟหรือความต้านทานของพืชเอง Dwivedi และคณะ (1995) รายงานว่า พันธุ์ ICGV 86031 และ ICGV 86388 มีความต้านทานต่อเพลี้ยไฟในระดับปานกลาง มโนชัย และคณะ (2533) ทำการประเมินความต้านทานต่อแมลงที่สำคัญของพันธุ์ถั่วลิสง ซึ่งส่วนใหญ่ทำการทดลองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แมลงที่ประเมินได้แก่ เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยไฟ และหนอนชอนใบ ซึ่งเป็นแมลงที่พบในแปลงถั่วลิสงเสมอ การประเมินความเสียหายเนื่องจากการทำลายของแมลง ทำเมื่อพืชมีอายุ 1 เดือนหลังจากปลูกทุกๆสัปดาห์ รวมทั้งหมดประมาณ 10 ครั้ง ผลการทดลองพบว่าพันธุ์ GP-NC 343 และลูกผสมพันธุ์นี้มีแนวโน้มที่จะต้านทานต่อแมลง พันธุ์อื่นๆที่แสดงความต้านทานต่อการทำลายของแมลงกลุ่มดังกล่าว คือ GP-NC 343 x NC 5, NC 7 x GP-NC 343, Manfredi 68 x GP-NC 343, Robut 33-1 x NC 2214, Mani Pintar x (Robut 33-1 x NCAc 2232) และ PI 459088

Toyokodachi พันธุ์ถั่วลิสงที่ปลูกในประเทศไทยที่เพลี้ยไฟเข้าทำลายปานกลาง ได้แก่ พันธุ์ขอนแก่น 60-3 รองลงมาได้แก่ พันธุ์สุโขทัย 38 และลำปาง ตามลำดับ (มโนชัย และคณะ, 2532)

5.5.3 การสร้างพันธุ์ต้านทานด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม

เนื่องจากการย้ายยีนที่แสดงความต้านทานโรคด้วยวิธี conventional breeding หรือ protoplast fusion มักประสบปัญหาการควบคุมจำนวนและชนิดของยีนที่ถูกย้ายในขั้นตอนการ selection และ backcrossing ปัจจุบันจึงมีเทคนิคการตบแต่งพันธุกรรมของเซลล์ด้วยวิธีพันธุวิศวกรรมให้สะดวกต่อการย้าย single gene โดยยีนที่ทำให้พืชแสดงความต้านทานต่อเชื้อไวรัส อาจจะนำมาจากพืชหรือตัวเชื้อไวรัสเอง (Sanford and Johnston, 1985 quoted in Busu and Giri, 1993) Coat protein gene (CP gene) ของเชื้อไวรัสเป็นยีนที่นิยมนำมาใช้ในการถ่ายสู่พืชเพื่อสร้างพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อไวรัส โดย Coat protein mediated ที่ถูกสร้างขึ้นภายในพืชจะสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสที่เป็น heterologous กับชนิดของเชื้อที่ถูกนำ CP gene มาใช้ โดยที่ลำดับของ coat protein gene จะต้องมีความเหมือนกันมากกว่า 60% (Nijidat and Beachy, 1990)

กรณีการควบคุมเชื้อในกลุ่ม tospoviruses โดยใช้ CP gene หรือ N gene Vaira และคณะ (1995) ได้ทำการย้าย CP gene ของเชื้อ TSWV ลงบนต้นยาสูบ (*N. benthamina*) แล้วเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนกับการป้องกันเชื้อในขั้นแรก เชื้อที่ทดสอบได้แก่ TSWV, INSV, PBNV และ GRSV ผลการทดลองพบว่า เมื่อมีการแสดงออกของ CP gene สูง เฉพาะเชื้อ TSWV, INSV และ GRSV เท่านั้นที่ถูกยับยั้งการสร้าง coat protein แต่กับเชื้อ GRSV การแสดงออกเกิดขึ้นช้า ส่วนยาสูบที่ไม่พบการแสดงออกของ CP gene พบว่าเกิดการจำกัดการถอดรหัสของ CP gene ทำให้ยาสูบแสดงความต้านทานต่อบาง isolate ของเชื้อ TSWV

ความก้าวหน้าของการศึกษาการควบคุมเชื้อ PBNV ในถั่วลิสงโดยวิธีพันธุวิศวกรรมเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ที่มีความต้านทานแบบยืนยาว (durable resistance) ยังอยู่ในขั้นตอนการถ่าย SRNA ของเชื้อเข้าสู่ pUC 119 vector เพื่อบ่งบอกลำดับของยีน (Reddy

et al., 1994) Sharma และคณะ (1994) รายงานว่า การสร้างพันธุ์ต้านทานด้วยวิธีพันธุวิศวกรรมในกรณีของถั่วลิสง พบมีข้อจำกัดอย่างหนึ่งคือ ถั่วลิสงมักอ่อนแอต่อเชื้อ *Agrobacterium* ที่ใช้ในเทคนิคการย้ายยีน ทำให้ลำบากต่อการสร้างถั่วลิสงพันธุ์ใหม่จากการ transformed plant cells ส่วนในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่มีปัญหาเนื่องจากสามารถใช้ส่วนต่างๆของพืชได้ เช่น ส่วนของ cotyledon