อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ **ขั้นแรก** เตรียมไวรัสบริสุทธิ์เพื่อผลิตแอนติเจนเซรุ่มที่จะใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อของสายพันธุ์ที่นำเข้าทดสอบ **ขั้นที่สอง** คัดเลือกสายพันธุ์เบื้องต้นในสภาพไร่ **ขั้นที่สาม** ปลูกเชื้อลงบนสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำในสภาพไร่ เพื่อทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อ และ**ขั้นสุดท้าย** ตรวจดูลักษณะทางเกษตรของพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในสภาพไร่ต่ำ

1. การแยกไวรัสบริสุทธิ์ (virus purification) และการผลิตแอนติเซรุ่ม

1.1 การแยกไวรัสบริสุทธิ์

วัตถุประสงค์ของการแยกเชื้อบริสุทธิ์ คือ เพื่อผลิตแอนติเซรุ่มสำหรับใช้ในการตรวจสอบ (detection) เชื้อ PBNV ในตัวอย่างพืช การตรวจสอบการติดเชื้อโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยามีความจำเป็น เนื่องจากในบางครั้งการสังเกตเฉพาะอาการไม่สามารถบ่งบอกได้แน่ชัดว่าพืชนั้นติดเชื้อจาก PBNV หรือไม่

1.1.1 ไวรัสไอโซเลตและการเพิ่มปริมาณ

ใช้เชื้อ PBNV ไอโซเลตที่เก็บจากถั่วลิสงในพื้นที่ อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี ซึ่งแสดงอาการระดับอ่อน (mild isolate) คือ แสดงเฉพาะอาการใบลาย (mosaic) และระแกรนเล็กน้อย แต่ไม่แสดงอาการยอดไหม้ (bud blight) นำตัวอย่างพืชเป็นโรคดังกล่าวมาตรวจสอบยืนยันชนิดเชื้อสาเหตุโดยวิธี direct antigen coating indirect enzyme-linked immunosorbent assay (DAC-indirect ELISA) (ภาคผนวก) จากนั้นนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อแอนติเซรุ่ม PBNV ที่ได้จาก International Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics (ICRISAT) มาทำการแยกแผลเดี่ยว (single lesion isolation) โดยนำตัวอย่างมาบดในโกร่งแช่เย็น

ใช้ 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ที่ผสม 0.2% 2-mercaptoethanal และ 1% celite เป็น inoculating buffer (ภาคผนวก) ในอัตราส่วนใบพืช 1 กรัม (ก.) ต่อ buffer 10 มิลลิลิตร (มล.) เก็บน้ำคั้นที่ได้ไว้ในภาชนะที่บรรจุน้ำแข็ง ใช้นิ้วจุ่มน้ำคั้นทาลงบนผิวใบของถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 อายุ 7-10 วัน หลังจากปลูกเชื้อประมาณ 5-7 วัน เก็บใบยอดที่แสดงอาการด่างเฉพาะจากต้นเดียวมาทำเป็นน้ำคั้น แล้วปลูกเชื้อลงบนถั่วลิสงที่มีอายุประมาณ 7-10 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อให้ได้มากที่สุด และเพื่อใช้เป็นแหล่งของเชื้อสำหรับการทำเชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาพืชไว้ในกรงที่กันแมลงได้ และฉีดสารควบคุมโรคและแมลงตามความจำเป็น

1.1.2 ขั้นตอนการทำเชื้อ peanut bud necrosis virus บริสุทธิ์

การทำเชื้อ PBNV บริสุทธิ์ใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ ICRISAT (Reddy *et al.*, 1991) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. เก็บใบถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 2-3 สัปดาห์ นำมาชั่งน้ำหนักแล้วแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20° C นาน 1 คืน

2. นำเข้าบดในเครื่องปั่น (blender) พร้อมกับเติม 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 ผสม 0.1 M Na_2SO_3 ซึ่งแช่เย็น โดยใช้อัตราบัฟเฟอร์ 3-4 มล. ต่อใบพืช 1 กรัม

3. กรองผ่านผ้าขาวบาง

4. นำน้ำกรองเข้าหมุนในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่แรงเหวี่ยง 3,000 g (5,000 rpm; เครื่อง Kontron H 401 Refrigerated Centrifuge หม้อหมุน A 8.24) นาน 5 นาที อุณหภูมิ 4° C

5. นำน้ำใสที่ได้มาเติม NaCl และ polyethylene glycol (PEG 6000) ให้ได้ความเข้มข้น 0.2 M และ 4% ตามลำดับ โดยแช่ภาชนะบรรจุในถังน้ำแข็ง กวนขณะเติมจนละลายประมาณ 10 นาที จากนั้นนำเข้าเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 1.5-2.0 ชม. เพื่อให้ไวรัสตกตะกอน

6. นำเข้าหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 g (10,000 rpm) ในเครื่องเดียวกับขั้นตอน 4 นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4° C

7. ละลายตะกอนที่ได้ใน 0.01 M phosphate buffer pH 7.5 ผสม 0.01 M Na_2SO_3 (PPBS) โดยการดูดผ่านเข็มฉีดยาหลายๆครั้ง

8. นำเข้าหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 g (5,000 rpm) นาน 10 นาที ที่ 4°C

9. เตรียมสารละลายน้ำตาลความเข้มข้นต่างระดับ (sucrose density gradient) ลงในหลอดสำหรับหม้อหมุนชนิดเหวี่ยงออก (Swinging bucket rotor; RPS-40T rotor) ให้ได้น้ำตาลความเข้มข้น 20%, 30%, 60% อย่างละ 2, 2 และ 3 มล. ตามลำดับ ทิ้งค้างคืนในตู้เย็น (สารละลายเตรียมใน PPBS)

10. นำน้ำใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงในขั้นตอนที่ 8 มาใส่ลงบนชั้นบนสุดของสารละลายน้ำตาลหลอดละ 5 มล. จากนั้นนำเข้าบรรจุใน RPS-40 T rotor หมุนเหวี่ยงที่แรง 111,100 g (25,000 rpm) ในเครื่อง Automatic preparative ultracentrifuge Hitachi รุ่น 55p-72 นาน 40 นาที ที่ 4°C

11. นำหลอดไปส่องดูด้วยแสงไฟจากด้านปากหลอด ดูดเก็บชั้นสีขาวขุ่นในระยะ 2.2-4.6 ซม.จากก้นหลอด

12. ละลายตะกอนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงในขั้นตอน 10 ใน PPBS อัตรา 1 มล./หลอด จากนั้นเทรวมกับชั้นของสารละลายจากข้อ 11

13. เตรียมสารละลายน้ำตาลความเข้มข้นต่างระดับ โดยใช้น้ำตาลความเข้มข้น 30, 40, 50 และ 60% ใน PPBS บรรจุสารละลายน้ำตาลลงในหลอดสำหรับหม้อหมุน RPS-40T ปริมาตร 2 มล. ในแต่ละความเข้มข้น ทิ้งค้างคืนในตู้เย็น

14. นำสารแขวนลอยที่ได้ในขั้นตอน 12 มาหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 g (5,000 rpm) นาน 5 นาที ที่ 4°C เก็บเฉพาะน้ำใสส่วนบน

15. นำน้ำใสที่ได้ใส่ลงบนชั้นบนสุดของสารละลายน้ำตาลที่เตรียมไว้ในข้อ 13 หลอดละ 4 มล. จากนั้นนำเข้าหมุนเหวี่ยงในหม้อหมุน RPS-40T ที่ 111,100 g (25,000 rpm) นาน 2 ซม. ที่ 4°C

16. เก็บชั้นสีขาวขุ่นที่เกิดขึ้นในช่วง 1.0-4.5 ซม.จากก้นหลอด นำมาทำให้เจือจางด้วย PPBS อัตรา 1:4 (v/v)

17. นำเข้าหมุนเหวี่ยงในหม้อหมุนชนิดมุมคงที่ (fixed angle) RP 50-2 ด้วยแรงเหวี่ยง 135,500 g (35,000 rpm) ในเครื่องเดียวกับขั้นตอนที่ 10 นาน 1.5 ซม. ที่ 4°C

18. ละลายตะกอนใน 0.01 M phosphate buffer ผสม 0.85% NaCl (PBS) อัตรา 1 มล./ใบพืชเริ่มต้น 100 กรัม แล้วนำเข้าหมุนเหวี่ยงในเครื่องหมุนเหวี่ยง (เครื่อง Hitachi รุ่น Himac CR 15D) ที่แรงเหวี่ยง 5,000 rpm นาน 5 นาที ที่ 4°C เก็บเฉพาะน้ำใสส่วนบน

ตรวจสอบตะกอนและชั้นสีขาวขุ่นในการทำบริสุทธิ์แต่ละขั้นตอนว่ามีเชื้อไวรัสอยู่หรือไม่ โดยวิธี DAC-indirect ELISA โดยใช้แอนติเซรุ่มจาก ICRISAT เป็นแอนติเซรุ่มปฐมภูมิ

สารแขวนลอยที่ได้จะมีสารละลายไวรัสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ (partially purified virus) วัดความเข้มข้นของไวรัสด้วยเครื่อง UV-visible recording spectrophotometer (UV-240) ของ Shimadzu โดยใช้แสงความยาวช่วงคลื่น 260 nm จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4°C เพื่อนำไปผลิตแอนติเซรุ่ม

1.2 การผลิตแอนติเซรุ่ม

1.2.1 การเตรียม normal serum

นำกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ เพศเมีย ขนาดน้ำหนัก 3-4 กก. จำนวน 1 ตัว ซึ่งไม่เคยได้รับการฉีดสารที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนมาก่อน มาเจาะเก็บเลือด โดยเจาะบริเวณเส้นเลือดกลางใบหู เก็บเลือดประมาณ 10 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง จึงใช้เข็มปลายแหลมกรีดตรงขอบผิวหน้าของเลือดที่แข็งตัวติดกับผิวหลอดบรรจุก่อนนำไปเก็บในตู้เย็นข้ามคืน เพื่อให้ส่วนของ plasma แข็งตัว จากนั้นดูดเก็บส่วนน้ำใสหรือ normal serum ไว้ใน eppendorf tube โดยผสม 0.02% NaN_3 ลงไปด้วยก่อนนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

1.2.2 การเตรียมแอนติเซรุ่ม

นำสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์ที่ได้มาผลิตแอนติเซรุ่มในกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ที่ผ่านการเก็บ normal serum แล้วในข้อ 1.2.1 โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular) ในรูปผสม Freund's adjuvant (ชนิด incomplete) 1 ส่วน ต่อสารแขวนลอยไวรัส

ที่ทำบริสุทธิ์จากใบพืช 100 กรัม 1 ส่วน (1:1, v/v) จำนวน 2 ครั้งๆละ 2 มล. แต่ละครั้งผสมสารละลายจากแต่ละส่วนให้เข้ากันจนมีลักษณะเป็นครีมขาวข้น (emulsion) ก่อนนำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ซึ่งแต่ละครั้งห่างกัน 10 วัน จากนั้นตามด้วยการฉีดเข้าเส้นเลือด (intravenous) 1 ครั้ง ปริมาตร 1 มล. เฉพาะของไวรัสที่ทำบริสุทธิ์จากใบพืช 100 กรัม ฉีดหลังจากฉีดเข้ากล้ามเนื้อครั้งสุดท้าย 14 วัน จากนั้นเริ่มเก็บแอนติเซรุ่มครั้งแรกหลังจากฉีดเข้าเส้นเลือดได้ 10 วัน และเก็บแอนติเซรุ่มครั้งที่ 2 หลังจากฉีดเข้าเส้นเลือดได้ 15 วัน วิธีการเก็บแอนติเซรุ่มปฏิบัติเช่นเดียวกับการเก็บ normal serum จากนั้นนำแอนติเซรุ่มต่อเชื้อ PBNV ที่ได้ไปทดสอบหา titer

1.2.3 วิธีการหา titer

เป็นการหา dilution end point ของแอนติเซรุ่มที่เตรียมได้ ที่ยังคงความสามารถทำปฏิกิริยากับ virus infected sap ได้ และเป็นการหาระดับการปนเปื้อนของ host protein ในสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์ที่ใช้เตรียมแอนติเซรุ่ม โดยใช้วิธี DAC-indirect ELISA ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ ทำการทดสอบแอนติเซรุ่ม 2 ลักษณะ คือ เจือจางทีละ 2 เท่า (two flod serial dilution) ด้วย conjugate buffer ที่ผสมน้ำคั้นพืชปกติ และที่ไม่ผสมน้ำคั้นพืชปกติ เปรียบเทียบกับแอนติเซรุ่มอ้างอิง (reference) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ICRISAT เตรียม virus infected plant sap ที่ใช้ในการตรวจสอบโดยบดใบพืชที่เป็นโรคจาก PBNV ไอโซเลตแหลมสิงห์ ในอัตรา 1:20 ใน coating buffer เป็นแอนติเจน และเตรียมน้ำคั้นจากใบพืชปกติเช่นเดียวกับการเตรียมน้ำคั้นจากใบพืชที่เป็นโรค วัดผลการทดสอบโดยใช้เครื่อง ELISA reader ของ Uniskan ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 405 nm

2. การคัดเลือกพันธุ์ต้านทานในสภาพไร่ (screening for field resistance)

การคัดเลือกพันธุ์ต้านทานในสภาพไร่ทำ 2 ขั้นตอน ขั้นแรกทำการรวบรวมสายพันธุ์และขยายพันธุ์พืชทดสอบ ขั้นที่สองทำการทดสอบความต้านทานของสายพันธุ์ต่างๆในสภาพไร่ เหตุผลที่ดำเนินการทดลองในขั้นตอนนี้ก่อนทำการทดสอบในสภาพเรือนทดลอง เนื่องจาก

สายพันธุ์ที่นำเข้าทดสอบมีจำนวนมาก ทำให้การปลูกเชื้อในลักษณะเลียนแบบธรรมชาติ (artificial inoculation) ปฏิบัติได้ยาก เพราะเชื้อ PBNV เป็นเชื้อที่เสื่อมสภาพได้ง่ายมาก ประการที่สองเนื่องจากเชื้อนั้นนำโดยเพลี้ยไฟ การนำพันธุ์ไปทดสอบในสภาพไร่จึงเป็นการประเมินความต้านทานต่อเพลี้ยไฟไปพร้อมกันด้วย

2.1 การรวบรวมสายพันธุ์และการขยายพันธุ์พืชทดสอบ

รวบรวมสายพันธุ์ถั่วลิสงที่มีประวัติต้านทานโรคยอดไหม้ หรือต้านทานต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยไฟ รวมทั้งพันธุ์อ่อนแอ เพื่อใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบรวมทั้งหมดจำนวน 32 สายพันธุ์ จากนั้นนำไปขยายพันธุ์เพื่อนำไปใช้สำหรับการทดสอบความต้านทานในสภาพไร่ พันธุ์ที่ใช้ทดสอบแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้คือ

2.1.1 พันธุ์ที่มีประวัติต้านทานโรคยอดไหม้จาก ICRISAT จำนวน 12 สายพันธุ์ ได้แก่ ICGV 86030, ICGV 86031, ICGV 86300, ICGV 86363, ICGV 86388, ICGV 86430, ICGV 86598, 86012 x 86030 (Tan), 2134-I(48)B, 2169-5(9), 2192-6(65), 2192-8(50) และ Southern runner จาก University of Georgia, U.S.A.

2.1.2 พันธุ์ที่มีอัตราการเข้าทำลายของเพลี้ยไฟต่ำ 12 พันธุ์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.มโนชัย ทีรติกสิกร ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้แก่ Robut 33-1 x NCAc 2214 (รหัส IC10), Robut 33-1 x NCAc 2214 (รหัส IC14), 28-206 (France) x NCAc 10247 (รหัส IC22), Manfredi 68 x GP-NC 343 (รหัส IC23), NC 1107 x (NC 2232 x NC 2214) (รหัส IC34), (Goldin-1 x Faizpur 1-5) x NCAc 2232 (รหัส IC38), GP-NC 343 (รหัส IC42), UPL-Pn 4 x NC 10247 (รหัส INT 24), NC7 (รหัส INT 25), NC 5 x GP-NC 343 (รหัส IGT 18), Bhaihwa local (รหัส IGT 45) และ PI 459088 toyokodach (รหัส IGT 66) พันธุ์เหล่านี้ได้รับการทดสอบแล้วว่ามีความทนทานต่อเพลี้ยไฟ (มโนชัย และคณะ, 2532)

2.1.3 พันธุ์เปรียบเทียบจำนวน 7 พันธุ์ คือ JL 24 เป็นพันธุ์อ่อนแอมาตรฐาน ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ICRISAT, พันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ Tainan 9, Khon Kaen 60-1, Khon Kaen 60-2, Khon Kaen 60-3 และ SK 38 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.สนั่น จอกลอย ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และพันธุ์พื้นเมืองของอำเภอวังน้ำเย็น จังหวัดสระแก้ว จากนายสุนทร ศรีเกียรติ เกษตรกรอำเภอวังน้ำเย็น จังหวัดสระแก้ว

2.2 การทดสอบความต้านทานของถั่วลิสงสายพันธุ์ต่างๆในสภาพไร่

ทำการทดลองคัดเลือกพันธุ์ต้านทานในสภาพไร่ในฤดูแล้ง ในพื้นที่ที่ได้รับการสำรวจแล้วว่ามีการแพร่ระบาดของโรคยอดไหม้ตามสภาพธรรมชาติสูง คือ ที่ตำบลคลองตาสูตร-คลองหินปูน อำเภอวังน้ำเย็น จังหวัดสระแก้ว (โสภณ, 2536) โดยใช้แผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) จำนวน 4 ซ้ำ ปลูกสายพันธุ์ละ 2 แถวต่อซ้ำ ระยะปลูก 25 x 50 ซม. จำนวน 20 หลุมต่อแถว หยอดเมล็ดจำนวน 2 เมล็ดต่อหลุม ใช้พันธุ์ไหนาน 9 เป็นแถวกัน (guard rows) และพันธุ์พื้นเมือง (วังน้ำเย็น) ของพื้นที่ทดสอบเป็นพันธุ์กระจายโรค (spreader rows)

ก่อนปลูกใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ในอัตรา 25 กก./ไร่ โดยวิธีหว่านแล้วพรวนกลบ พ่นสารกำจัดวัชพืชคลีโทดีม (clethodim) อัตรา 50-60 มล./น้ำ 20 ลิตร เมื่อถั่วลิสงอายุประมาณ 4 สัปดาห์ ให้น้ำในลักษณะปล่อยท่วม (flooding) เท่าที่จำเป็น ในระหว่างการทดสอบไม่มีการใช้สารเคมีควบคุมแมลง

2.2.1 การบันทึกข้อมูล

ประเมินความเสียหายเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อ PBNV ในสภาพแปลงทดลอง เมื่อถั่วลิสงอายุ 30 และ 60 วันหลังจากปลูก โดยการนับจำนวนต้นเป็นโรค/จำนวนต้นทั้งหมด เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคยอดไหม้ ต้นที่พบอาการบนใบเพียง 1 ใบ หรือมากกว่า ถือว่าพืชแสดงอาการเป็นโรค (symptomatic) ยืนยันการติดเชื้อโดยเด็ดใบ 1-2 ใบ จาก 1 ต้น ในแต่ละ plot ในแต่ละครั้งของการเช็ค นำมาวิเคราะห์ในห้อง

ปฏิบัติการด้วยวิธี DAC indirect ELISA โดยใช้ anti-PBNV จาก ICRISAT และที่เตรียมได้จากการทดลองครั้งนี้

เก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟนำมาศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเพลี้ยไฟ กับเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคยอดไหม้ และแยกชนิดของเพลี้ยไฟเพื่อประเมินการเข้าทำลายของเพลี้ยไฟ โดยทำการสุ่มเก็บใบยอดจาก 10 ต้นต่อสายพันธุ์ต่อซ้ำ ในทุกๆซ้ำ ประเมินที่อายุ 30 วันหลังปลูก ดองตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 70% ในขวดดองขนาดเล็ก (vial) เพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ ทำการนับจำนวนเพลี้ยไฟภายใต้กล้องสเตอริโอ (stereo microscope) และแยกชนิดของเพลี้ยไฟภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) การแยกชนิดใช้ลักษณะตามคู่มือของ Amin และ Palmer (1985) (Amin and Palmer, 1985 quoted in Reddy *et al.*, 1991) และเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr.J.W. Demski, University of Georgia, U.S.A.

2.2.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

2.2.2.1 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์

ข้อมูลที่ได้จากการประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคยอดไหม้ (0-100%) ตัวเลขมีค่าความแตกต่างกันสูงระหว่าง 0-50% ใช้วิธีแปลงค่าเป็น arcsin (Gomez and Gomez, 1981) และข้อมูลที่ได้จากการนับจำนวนเพลี้ยไฟเป็นตัวเลขจำนวนนับต่อ 10 ต้น หรือต่อ 10 ยอด จึงใช้แปลงค่าเป็น log (x+1) เมื่อ x คือ จำนวนของเพลี้ยไฟ (Gomez and Gomez, 1981) ในการวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบ randomized complete block และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละสายพันธุ์โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation) จากสูตร

$$C.V. = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

เมื่อ s = standard deviation

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค กรณีประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

หรือ $\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของจำนวนเพลี้ยไฟ/10 ยอด กรณีประเมินจำนวนเพลี้ยไฟต่อ 10 ยอด

2.2.2.2 การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคกับจำนวนเพลี้ยไฟ (ตัว/10 ยอด)

ใช้วิธีการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อย่างง่าย (simple correlation coefficient) ระหว่างคู่ของลักษณะเปรียบเทียบ (Gomez and Gomez, 1981) โดยอาศัยหลักการคำนวณ จากสูตร

$$r = \frac{\sum X_1 X_2}{\sqrt{(\sum X_1^2)\ (\sum X_2^2)}}$$

เมื่อ $\sum X_1 X_2 = \sum_{i=1}^{n} (X_{1i} - \bar{X}_1)\ (X_{2i} - \bar{X}_2)$

$$\sum X_1^2 = \sum_{i=1}^{n} (X_{1i} - \bar{X}_1)^2$$

$$\sum X_2^2 = \sum_{i=1}^{n} (X_{2i} - \bar{X}_2)^2$$

X_{1i}, X_{2i} = ค่าสังเกต X_1 และ X_2 ในคู่ที่ i

$\bar{X}_1$, $\bar{X}_2$ = ค่าเฉลี่ยของ X_1 และ X_2

3. การทดสอบความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ PBNV (resistance to virus infection)

3.1 การรวบรวมสายพันธุ์เชื้อ PBNV

รวบรวมไอโซเลตของเชื้อ PBNV โดยเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการเป็นโรคยอดไหม้จากถั่วลิสงในแหล่งปลูกที่สำคัญ นำมาตรวจหาเชื้อโดยวิธี DAC-indirect ELISA ตามวิธีของ โสภณ (2536) และตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกลลงบนถั่วพุ่มพันธุ์ KC-84R อายุ 7 วัน จากนั้นทำการแยกเชื้อ PBNV จากตัวอย่างพืชที่ให้ผลบวกกับแอนติเซรุ่ม anti-PBNV ที่ผลิตได้จากข้อ 1.2.2 กระทำในลักษณะ single lesion isolation โดยใช้ถั่วลิสงพันธุ์ไหนาน 9 เป็นพืชเพิ่มปริมาณ และเก็บรักษาเชื้อไว้สำหรับการทดลอง วิธีการทำในลักษณะเดียวกับข้อ 1.1.1 จากนั้นจึงแยกแต่ละไอโซเลตตามระดับความรุนแรงของอาการที่แสดงออกในถั่วลิสงและพื้นที่ปลูก ซึ่งแบ่งเป็น 3 ระดับ ดังนี้ คือ ระดับรุนแรง (severe) ได้จากจังหวัดอุดรธานี (UD-isolate), ระดับปานกลาง (moderate) ได้จากจังหวัดนครราชสีมา (NR-isolate) และระดับอ่อน (mild) ได้จากจังหวัดสิงห์บุรี (SB-isolate) ตามแสดงในภาพที่ 11 และ 12 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ ดร.โสภณ วงศ์แก้ว ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อสำหรับการปลูกเชื้อโดยวิธีกล (mechanical inoculation) เพื่อทดสอบความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อในสายพันธุ์ถั่วลิสงที่ผ่านการคัดเลือกแล้วในสภาพไร่

3.2 การศึกษาปฏิกิริยาของสายพันธุ์ถั่วลิสงต่อการเข้าทำลายของเชื้อ PBNV

ทดสอบความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ โดยการปลูกเชื้อ 3 ไอโซเลต ที่แยกไว้จากพื้นที่ปลูกต่างกัน คือ UD-isolate, NR-isolate และ SB-isolate ที่ 2 ระดับความเข้มข้น คือ 1:10 และ 1:100 ด้วยวิธีกลตามวิธีของ Buiel (1993) ในสภาพเรือนทดลอง ทำการทดลองกับถั่วลิสง 13 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการทดสอบใน

สภาพไร่ โดยใช้พันธุ์ JL 24, ไหนาน 9 และวังน้ำเย็น เป็นพันธุ์อ่อนแอเปรียบเทียบ (susceptible control) การเตรียมน้ำคั้นพืชกระทำโดยบดตัวอย่างใน inoculating buffer (ภาคผนวก) ตามอัตราส่วนความเข้มข้นที่กำหนด (พืชเป็นโรค (ก.)/inoculating buffer (มล.)) จากนั้นกรองเอาเฉพาะน้ำคั้นทิ้งส่วนที่เป็นเศษพืช แช่ภาชนะที่ใส่น้ำคั้นที่มีไวรัสในน้ำแข็งตลอดเวลาที่ทำการปลูกเชื้อ ปลูกเชื้อแต่ละไอโซเลตลงบนพืชอายุ 8-10 วัน จำนวน 8-10 ต้นต่อพันธุ์ต่อความเข้มข้น แยกแต่ละพันธุ์ไว้ 1 ต้น เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ หลังจากปลูกเชื้อแล้วเก็บพืชไว้ในกรงกันแมลง และฉีดพ่นสารเคมีควบคุมแมลง monocrotophos ทุกๆ 10 วัน

3.2.1 การบันทึกข้อมูล

ทำการประเมินความต้านทานของถั่วลิสงต่อการเข้าทำลายของเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งแรกโดยการนับจำนวนต้นพืชที่แสดงอาการของโรค (localized infection) และบันทึกความรุนแรงของอาการที่แสดงออกหลังจากปลูกเชื้อ 5-10 วัน ครั้งที่ 2 ยืนยันสภาพการติดเชื้อโดยวิธี DAC- indirect ELISA หลังจากปลูกเชื้อ 30 วัน โดยการเด็ดใบยอดของลำต้นหลักจากทุกต้นมาทำเป็นแอนติเจน และครั้งสุดท้ายทำการนับจำนวนต้นพืชที่แสดงอาการของโรคแบบลุกลามทั้งต้น (systemic) หลังจากปลูกเชื้อ 60 วัน

3.2.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบระดับความต้านทานของถั่วลิสงต่อการเข้าทำลายของเชื้อ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อแบบลุกลามทั้งต้น (systemic) ในลักษณะกราฟแท่ง และวิเคราะห์ร่วมกับปฏิกิริยาของพืชที่แสดงออก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อแบบลุกลามทั้งต้น (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นที่แสดงอาการแบบลุกลามทั้งต้น}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

4. การศึกษาลักษณะทางเกษตร (agronomic traits) บางประการ

นำสายพันธุ์ที่ผ่านมาคัดเลือกในสภาพไร่ ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีแนวโน้มที่จะต้านทานต่อโรคยอดไหม้และเพลี้ยไฟ โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าพันธุ์เปรียบเทียบ และจำนวนเพลี้ยไฟ (ตัว/10 ยอด) ต่ำกว่าพันธุ์เปรียบเทียบตามลำดับ มาทำการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน 2 ซ้ำ ปลูกสายพันธุ์ละ 4 แถวต่อซ้ำ ระยะปลูก 25 x 30 ซม. จำนวน 20 หลุมต่อแถว หยอดเมล็ดจำนวน 2 เมล็ดต่อหลุม

4.1 การบันทึกข้อมูล (สุ่มตัวอย่างจาก 2 แถวกลางของแต่ละซ้ำ)

- ขนาดเมล็ด (กรัม/100 เมล็ด)
- น้ำหนักฝักแห้งต่อต้น (กรัม)
- น้ำหนักเมล็ดต่อต้น (กรัม)
- ผลผลิตฝักแห้ง (กิโลกรัม/ไร่)

$$\text{- เปอร์เซ็นต์กะเทาะ (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักเมล็ด}}{\text{น้ำหนักฝัก}} \times 100$$

4.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ในแต่ละลักษณะทางเกษตร โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลอง (analysis of variance) แบบ RCBD และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละสายพันธุ์โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนทุกลักษณะ