

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองหาไวรัสบริสุทธิ์จากวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ ICRISAT (Reddy *et al.*, 1991b) โดยดัดแปลงในส่วนของการปั่นเหวี่ยง ความเร็ว และระยะเวลาที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยง พบว่าให้ผลไม่แตกต่างจากวิธีการของ ICRISAT กล่าวคือ ได้ไวรัสที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดี สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจง เฉพาะกับเชื้อ PBNV โดยมีการปะปนจากแอนติเจนของพืชค่อนข้างน้อย ปฏิกริยาที่เกิดจากการปนเปื้อนของแอนติเจนสามารถทำให้หมดไปได้ โดยเจือจางแอนติเซรัมจนถึงระดับที่ไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยากับน้ำคั้นของพืชปกติ หรืออาจใช้น้ำคั้นของพืชปกติผสมกับแอนติเซรัม เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาคกตะกอนกับโปรตีนของพืชปกติ (cross absorb) ก่อนนำไปหาปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส วิธีการเช่นนี้เป็นวิธีการที่ใช้กันค่อนข้างแพร่หลายเมื่อพบปัญหาการเกิดปฏิกิริยาชนิดไม่จำเพาะเจาะจง (nonspecific reaction) ระหว่างแอนติเซรัมกับน้ำคั้นพืชปกติ (Ball *et al.*, 1990) สาเหตุที่มีการปนเปื้อนของโปรตีนค่อนข้างมากในสารละลายไวรัสที่เตรียมได้นั้น น่าจะมีผลมาจากวิธีการเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ที่มีข้อจำกัด ไม่สามารถใช้สารละลายอินทรีย์ (organic solvents) เช่น chloroform, acetone, ethanol ซึ่งเป็นสารที่ช่วยตกตะกอนองค์ประกอบของเซลล์พืชได้เลย เนื่องจากสารดังกล่าวจะไปทำลายอนุภาคของ PBNV ซึ่งมี lipid membrane ห่อหุ้มอยู่ ปัญหาการปนเปื้อนของ membrane protein จากพืชจึงเป็นปัญหาคงในการหาวิธีสกัดเชื้อในกลุ่ม tospovirus (Mohamed *et al.*, 1973; Resende *et al.*, 1990)

โดยทั่วไปแล้วการเตรียมเชื้อบริสุทธิ์กระทำได้ค่อนข้างยากมากในเชื้อกลุ่ม tospovirus เนื่องจากอนุภาคของเชื้อถูกห่อหุ้มไว้ใน lipid membrane การแยกเชื้อออกจากองค์ประกอบของพืชจึงจำเป็นต้องใช้เฉพาะวิธี density gradient centrifugation ในสารละลายน้ำตาล ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากต้องหาส่วนผสมที่รอบคอบ จึงจะลดการปนเปื้อนจากโปรตีนจากพืชได้มากพอที่จะนำสารละลายอนุภาคไปใช้เป็นแอนติเจนได้ นอกจากนั้นการใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดที่ต่างออกไปจากที่มีผู้เคยรายงานไว้ ก็อาจก่อให้เกิดปัญหาเช่นเดียวกัน คือ แกนของไวรัสอาจไม่อยู่ใน

ตำแหน่งเดียวกันทั้งที่ใช้แรงหมุนเหวี่ยงเดียวกันกับที่มีผู้เคยรายงาน ทำให้ต้องตรวจหาอนุภาคไวรัสในแถบที่แสงที่เกิดขึ้นทุกแถบหลังจากนำสารละลายน้ำตาลเข้าหมุนเหวี่ยง การตรวจหาไวรัสจากแถบน้ำตาลนั้น โดยทั่วไปใช้วิธีนำไปปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ (assay host) หรือนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Resende *et al.*, 1990) แต่ในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธีตรวจสอบโดยวิธี DAC-indirect ELISA ซึ่งพบว่าเป็นวิธีที่แม่นยำและรวดเร็วกว่า อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะใช้ได้เฉพาะกับไวรัสที่มีแอนติเจนอยู่แล้วเท่านั้น และไวรัสที่ตรวจพบโดยวิธีนี้อาจเป็นไวรัสที่หมดคุณสมบัติในการทำให้เกิดโรคแล้วก็ได้ วิธีการดังกล่าวจึงเหมาะที่จะใช้กรณีที่เจนนไวรัสที่เตรียมได้ไปผลิตแอนติเจนเท่านั้น

สำหรับปริมาณไวรัสที่เตรียมได้จากวิธีการที่ใช้้น นับว่าอยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากค่า titer ของแอนติเจนที่ผลิตขึ้นได้ กล่าวคือ ได้ค่า titer สูงกว่า 1:12,800 ในการเก็บเลือดกระต่ายครั้งแรก แอนติเจนดังกล่าวได้จากการฉีดสารละลายไวรัสที่ผลิตได้จากใบพืชรวมทั้งสิ้น 300 กรัม (ทำบริสุทธิ์ครั้งละ 100 กรัม จำนวน 3 ครั้ง) การรายงานปริมาณของไวรัสในการทดลองครั้งนี้ไม่อาจจะรายงานเป็นน้ำหนักได้ เนื่องจากยังไม่ทราบค่า extinction coefficient ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$, 260 nm) เชื้อชนิดนี้ อย่างไรก็ตามได้รายงานค่า absorbance ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 nm ซึ่งเป็น peak absorbance ของสารละลายไวรัสที่ใช้ฉีดกระต่ายในแต่ละครั้ง เพื่อใช้เป็นความเข้มข้นอ้างอิงหากมีผู้ต้องการทดสอบซ้ำ

การทดสอบความต้านทานของสายพันธุ์ไวรัสในสภาพไร่ ผลปรากฏว่าอัตราการเกิดโรคในสายพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานจาก ICRISAT อยู่ในระดับเดียวกับพันธุ์ไททาน 9 แต่ต่ำกว่าพันธุ์พื้นเมืองวังน้ำเย็น ในการประเมินทั้ง 2 ช่วง แสดงให้เห็นว่าพันธุ์วังน้ำเย็นเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอมากต่อโรคยอดไหม้ ซึ่งอาจจะเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคยอดไหม้สูงมากในเขตปลูกอำเภอวังน้ำเย็นในทุกปี (โสภณ, 2536) เนื่องจากพันธุ์ที่ใช้ปลูกในแหล่งนี้เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอ สำหรับพันธุ์อื่นที่นำเข้ามาทดสอบส่วนใหญ่จะมีอัตราการเกิดโรคสูงในระดับเดียวกับพันธุ์อ่อนแอ ยกเว้นกลุ่มสายพันธุ์ต้านทานจาก ICRISAT ในบางสายพันธุ์ และบางสายพันธุ์จากกลุ่มสายพันธุ์ต้านทานเหลือให้เป็นลูกผสมของ Robut 33-1 หรือ NCAc 2232 ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้จัดเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อ PBNV ใน

สภาพไร่ในประเทศอินเดีย (Amin, 1985 quoted in Buell *et al.*, 1995b; Dwivedi *et al.*, 1995) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง NCAC 2232 ซึ่งใช้เป็นคู่ผสมในการสร้างสายพันธุ์ ICGV 86388 ที่ต้านทานต่อโรคยอดไหม้จาก ICRISAT (Dwivedi *et al.*, 1995; Buell, 1996) สายพันธุ์ดังกล่าวนี้มีอัตราการเกิดโรคต่ำสุดในการทดลองครั้งนี้ ที่ให้เห็นว่าลักษณะความต้านทานต่อการเกิดโรคยอดไหม้มีความคงตัวในสายพันธุ์ ICGV 86388

เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราการเกิดโรคที่ประเมินได้ในช่วง 30 วัน ในสายพันธุ์ส่วนใหญ่จะมีค่าสูงกว่าที่ประเมินได้ในช่วง 60 วัน เหตุที่เป็นเช่นนี้ น่าจะเนื่องมาจากปฏิกิริยาแสดงออกของตัวลิสงต่อสายพันธุ์เชื้อ PBNV ที่แพร่ระบาดอยู่ในเขตทดลอง ซึ่งจากการสังเกตอาการจัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์เชื้อที่ทำให้เกิดอาการรุนแรง (severe isolate) เชื้อที่มีลักษณะเช่นนี้มักทำให้พืชมีปฏิกิริยาต้านทานในลักษณะ hypersensitive reaction (Matthews, 1992) กล่าวคือ เชื้อจะถูกจำกัดการแพร่กระจายเนื่องจากเกิดแผลตายขึ้นบริเวณที่เชื้อเริ่มเข้าทำลาย (infection site) และในบางสายพันธุ์ใบที่เกิดแผลตายจะร่วงหล่นจากต้นก่อนที่จะมีโอกาสรักษาไปยังส่วนอื่นๆ พืชที่เกิดปฏิกิริยาลักษณะนี้มักจะรอดจากการเกิดโรค และเนื่องจากการประเมินในช่วง 30 วัน จะนับจำนวนต้นเป็นโรคทั้งหมดไม่ว่าจะแสดงอาการในลักษณะใด จำนวนต้นที่เป็นโรจึงสูงกว่าที่ประเมินได้ในช่วง 60 วัน ซึ่งในระยะนี้มีพืชบางส่วนที่เกิดปฏิกิริยา hypersensitive reaction และทั้งใบส่วนที่เชื้อเริ่มเข้าทำลาย ทำให้หายจากการเป็นโรค ตัวอย่างเช่น สายพันธุ์ Robut 33-1 x NCAC 2214 (IC10) ประเมินจำนวนต้นที่เป็นโรคได้ 6.00% ที่ 30 วัน แต่ลดลงเหลือเพียง 0.57% ที่ 60 วัน จากข้อสังเกตดังกล่าว การจัดลำดับของความต้านทานจึงใช้ปฏิกิริยาของพืชที่อายุ 60 วันเป็นหลัก ซึ่งเป็นระยะเวลาหลังจากพืชแสดงอาการในขั้นทุติยภูมิ (secondary symptom) คือ ไวรัสเริ่มแพร่กระจายทั่วทั้งต้นแล้ว

ปฏิกิริยาการเกิดโรคในลักษณะ hypersensitive ตามที่ดัดแปลงสังเกตไว้ในสภาพไร่ ได้รับการยืนยันอีกครั้งในการทดสอบความต้านทานของสายพันธุ์ตัวลิสงต่อการเข้าทำลายของเชื้อในสภาพเรือนทดลอง กล่าวคือ ตัวลิสงทั้งหมดทุกสายพันธุ์ที่นำเข้าทดสอบแสดงอาการติดเชื้อบนใบที่ได้รับการปลูกเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 1:10 อย่างไรก็ตามหลังจากที่สายพันธุ์อ่อนแอแสดงอาการในลักษณะ systemic

สายพันธุ์ที่ได้รับการประเมินว่าต้านทานในสภาพไร่ ตัวอย่างเช่น IC10 และ ICGV 86388 กลับหายจากการเป็นโรค เนื่องจากใบที่ได้รับการปลูกเชื้อซึ่งให้อาการผลตายนั้นสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อและโดยการหลุดร่วงในกรณี IC10 แต่ ICGV 86388 ไม่หลุดร่วง แต่ให้ผลในลักษณะ pin point ลักษณะเดียวกันกับปฏิกิริยาที่สังเกตพบในสภาพไร่ ปฏิกิริยาดังกล่าวเห็นได้ชัดเจนในการตอบสนองต่อเชื้อสายพันธุ์ UD และ NR ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์รุนแรงมากและรุนแรงปานกลางตามลำดับ ปฏิกิริยาดังกล่าวเห็นไม่เด่นชัดนักเมื่อปลูกเชื้อด้วยสายพันธุ์ SB ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ่อน

ในด้านผลของความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ พบว่าสายพันธุ์ถั่วลิสงตอบสนองต่อเชื้อสายพันธุ์รุนแรงปานกลาง (NR-isolate) คล้ายกันในทุก 2 ระดับความเข้มข้น กล่าวคือ อัตราการเกิดโรคอยู่ในระดับสูงในทุก 2 ระดับความเข้มข้น แต่ในเชื้อสายพันธุ์รุนแรง (UD) และสายพันธุ์อ่อน (SB) ถั่วลิสงจะมีอัตราการเกิดโรคสูงเฉพาะเมื่อได้รับการปลูกเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 1:10 โดยที่ส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการของโรคและไม่ติดเชื้อ (เมื่อตรวจด้วย ELISA) ที่ระดับความเข้มข้น 1:100 แสดงว่าการตอบสนองของสายพันธุ์พืชต่อเชื้อมีลักษณะจำเพาะเจาะจง (strain specific) ซึ่งคล้ายกับข้อสังเกตที่ Buell (1996) ได้เคยรายงานไว้ ผลของการศึกษาในส่วนนี้สนับสนุนข้อสันนิษฐานของ โสภณ (2536) ในเรื่องความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ PBNV ที่แพร่ระบาดอยู่ในประเทศไทย อย่างไรก็ตามการตอบสนองของสายพันธุ์ IC10, ICGV 86388 และ NC 1107 x (NC 2232 x NC 2214) (IC 34) ต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีลักษณะคล้ายกันทั้งหมด คือ ความต้านทานสูงมากต่อเชื้อสายพันธุ์รุนแรงมาก และต้านทานสูงต่อเชื้อสายพันธุ์รุนแรงปานกลางและสายพันธุ์อ่อน ขณะที่ถั่วลิสงพันธุ์ทดสอบอื่นที่มีอัตราการเกิดโรคค่อนข้างสูงใกล้เคียงกับพันธุ์อ่อนแอ เมื่อได้รับเชื้อสายพันธุ์รุนแรงปานกลางและสายพันธุ์อ่อน การตอบสนองของถั่วลิสงทั้ง 3 สายพันธุ์ที่กล่าวข้างต้นมีลักษณะเป็นความต้านทานแบบฐานกว้าง (horizontal resistance) คือ ไม่จำเพาะเจาะจงต่อสายพันธุ์เชื้อพันธุ์ที่ใช้สร้างลูกผสมเหล่านี้ อาทิเช่น Robut 33-1 หรือ NC 2232 ได้รับการทดลองแล้วเช่นกันว่าต้านทานต่อเชื้อ PBNV ในอินเดีย แสดงให้เห็นว่าความต้านทานมีลักษณะคงทนและไม่จำเพาะเจาะจงต่อสายพันธุ์เชื้อ ซึ่งเป็นลักษณะที่น่าสนใจนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์

จากการศึกษาชนิดของเพลี้ยไฟที่พบอยู่บนถั่วลิสง ทั้งในแปลงทดสอบที่อำเภอวังน้ำเย็น และในเขตปลูกอื่นๆ พบว่าส่วนใหญ่เป็น *S. dorsalis* ซึ่งผลการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างจำนวนประชากรกับอัตราการเกิดโรคนูนไหม้ ในการศึกษาค้างนี้ไม่พบว่ามีสหสัมพันธ์ต่อกัน แสดงว่า *S. dorsalis* ไม่น่าจะใช้พาหะของเชื้อ PBNV จากการศึกษาก่อนของ Vijaya Lakshmi และคณะ ที่ยืนยันเช่นกันว่า *S. dorsalis* ไม่ใช่พาหะของ PBNV ในประเทศอินเดีย แต่เป็น *T. palmi* (1995 quoted in Buiel, 1996) ซึ่งในการศึกษาค้างนี้พบค่อนข้างน้อยมากบนถั่วลิสง และจำนวนประชากรก็ไม่มีสหสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคเช่นกัน อย่างไรก็ตามการตรวจพืชที่เป็นโรคนูนไหม้แปลง โดยเฉพาะพืชตระกูลถั่ว พริก และโง้งเหง พบ *T. palmi* จำนวนมากอาศัยอยู่บนพืชเหล่านั้น จึงสันนิษฐานได้ว่า *T. palmi* น่าจะเป็นพาหะที่นำโรคเข้าสู่ถั่วลิสงในแปลงปลูกในระยะแรกๆก่อนที่จะทำการสุ่ม ทำให้การสุ่มตัวอย่างที่ระยะ 30 วันหลังปลูกพบ *T. palmi* ในบางสายพันธุ์ แต่เป็นปริมาณที่น้อยมาก หรืออาจจะเป็นไปได้ว่าถั่วลิสงเป็นเพียงพืชพักพิงชั่วคราวของ *T. palmi* คือ อาศัยพักดุกกินในเวลาสั้นๆ ทำให้โอกาสที่จะสุ่มพบ *T. palmi* เป็นไปได้ยาก การศึกษาของ Todd และคณะ ที่ทำกับเชื้อ TSWV ในถั่วลิสง ก็ให้ผลคล้ายกัน คือ ไม่พบว่ามีสหสัมพันธ์กันระหว่างเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคนูนไหม้กับจำนวนเพลี้ยไฟ (1995 quoted in Culbreath et al., 1996)

จากการประเมินคุณลักษณะทางเกษตรบางประการของ 13 สายพันธุ์ที่ผ่านการประเมินระดับความต้านทานต่อโรคนูนไหม้ในสภาพไร่แล้ว จะเห็นว่าพันธุ์ IC10, ICGV 86388 และ NC 1107 x (NC 2232 x NC 2214) (IC 34) นอกจากจะมีความต้านทานต่อโรคนูนไหม้สูงทั้งในสภาพไร่และสภาพเรือนทดลองแล้ว ยังมีระดับผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ไหนาน 9 และวังน้ำเย็นค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาคุณลักษณะทางเกษตรอย่างอื่นร่วมด้วยแล้ว จะเห็นว่าพันธุ์ ICGV 86388 เป็นพันธุ์ที่เด่นที่สุด เนื่องจากมีขนาดและสีของเมล็ดใกล้เคียงกับเมล็ดของพันธุ์ไหนาน 9 ขณะที่อีก 2 สายพันธุ์มีขนาดเมล็ดค่อนข้างเล็ก และเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีม่วงคล้ำ ลักษณะทั้ง 2 ประการนี้จัดเป็นลักษณะที่ไม่พึงประสงค์สำหรับตลาดถั่วลิสงในประเทศไทย ดังนั้นหากจะมีการนำสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วนี้ไปใช้ประโยชน์ พันธุ์ ICGV 86388 น่าจะเป็นพันธุ์ที่ควรได้รับการพิจารณาเป็นลำดับแรก ในประเทศอินเดียพันธุ์ ICGV 86388 ได้รับการคัดเลือกให้เป็นพันธุ์ต้านทานมาตรฐาน และมีโอกาสที่จะได้รับการรับรองและแนะนำให้เกษตรกรใช้ปลูกในรัฐที่มีปัญหาการแพร่ระบาดของโรคนูนไหม้ (ICRISAT, 1995)