บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแพสชั่นฟรุ้ต

แพสชั่นฟรุ้ต (Passionfruit) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Passiflora laurifolia* Linn มีชื่อไทยว่า เสาวรส กะทกรกยักษ์ หรือ กะทกรกฝรั่ง เป็นพืชจัดอยู่ในวงศ์ Passifloraceae อยู่ในตระกูลเดียวกับกะทกรกไทย ซึ่งเป็นวัชพืชที่ขึ้นกระจายอยู่ทั่วไป แพสชั่นฟรุ้ตมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมในประเทศเม็กซิโก บราซิล และปารากวัย ต่อมาได้แพร่กระจายไปยังประเทศออสเตรเลีย อินเดีย เคนยา นิวซีแลนด์ อาฟริกาใต้ นิวกินี มาเลเซีย และไต้หวัน แต่ได้พัฒนาเป็นพืชอุตสาหกรรมได้อย่างดีที่ประเทศออสเตรเลีย ไต้หวัน และสหรัฐอเมริกา สำหรับในประเทศไทยได้ถูกนำเข้ามาทดลองปลูกเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2498 ที่สถานีกสิกรรมแม่โจ้ ต่อมาได้ทดลองปลูกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน สถานีทดลองเกษตรที่สูง ดอยขุนช่างเคี่ยน และโครงการแม่สา จังหวัดเชียงราย และได้นำมาส่งเสริมให้เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ โดยส่งเสริมให้ปลูกแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก คือ จังหวัดระยอง จันทบุรี ซึ่งได้นำมาแปรรูปโดย บริษัทสยามอุตสาหกรรม ไปใช้ผสมกับน้ำผลไม้ชนิดอื่นเพื่อให้รสชาติดี ปัจจุบันในประเทศไทยมีการเพาะปลูกกันอย่างกว้างขวาง แหล่งที่เพาะปลูกกันมากได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน เพชรบูรณ์ ลำพูน นครราชสีมา บุรีรัมย์ ปราจีนบุรี ชลบุรี จันทบุรี ระยอง ประจวบคีรีขันธ์ และ ชุมพร (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2542)

ลักษณะของลำต้นเป็นไม้เลื้อย มีเถายาวอาจยาวถึง 15 เมตร มีอายุประมาณ 4 - 5 ปี ต้นอ่อนมีสีเขียวไม่มีขน ข้างในลำต้นกลวง เมื่อแก่ลำต้นจะกลายเป็นสีม่วงอมแดง และเริ่มมีมือเกาะเมื่อยาวประมาณ 6 - 8 ข้อ มือเกาะมีสีเขียว ม้วนขดเป็นวง ช่วยในยึดเกาะของลำต้น ลำต้นสามารถจะแตกออกเป็นกิ่ง เจริญเติบโตแผ่ปกคลุมพื้นที่ได้อย่างรวดเร็ว

ลักษณะของใบ ใบของต้นอ่อนมีรูปร่างรีเหมือนรูปไข่ ฐานใบเป็นรูปหัวใจ ขอบใบมีหยักเล็กๆ เมื่อเริ่มโตใบจะแตกออกเป็น 3 แฉก ก้านใบไม่มีขน ที่โคนใบต่อกับก้านใบจะมีต่อมเล็กๆ 2 อัน

ลักษณะของดอกเป็นดอกเดี่ยว จะเริ่มออกดอกเมื่อมีอายุประมาณ 5 เดือน ดอกออกตามตาข้าง เมื่อบานเต็มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6 - 10 เซนติเมตร มีสีสวยงามสะดุดตา มีกลิ่นหอม กลีบรองดอกมี 3 ใบ อยู่ที่ปลายของก้านดอก กลีบเลี้ยงมีฐานรองดอก 5 อัน ลักษณะรูปไข่ยาวเรียว ด้านล่างสีเขียวอมเหลือง ด้านบนสีขาว กลีบดอกมี 5 กลีบ ขนาดใหญ่กว่ากลีบเลี้ยงเล็กน้อย เป็นรูปไข่มีสีขาวแบนบาง ตรงโคนกลีบดอกมีสีม่วง มีเกสรตัวผู้ 5 อัน และอับเกสรอยู่ตรงปลาย กลางดอกมีก้านชูรังไข่ ที่ยอดรังไข่จะมีก้าน 3 อันซึ่งจะมีเกสรตัวเมียที่ปลาย

ลักษณะของผล เริ่มติดผลขณะมีอายุได้ 6 - 7 เดือน ผลอ่อนมีสีเขียว ผิวเรียบเป็นมัน รูปร่างกลมหรือรี มีจุดสีขาวกระจายอยู่ทั่วไป เมื่อโตเต็มที่ผลมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 - 7 เซนติเมตร ผล

แก่มีสีเหลืองเข้มหรือสีม่วงเข้มแล้วแต่พันธุ์ เปลือกผลชั้นนอกจะแข็งบาง ชั้นกลางมีสีเขียว สำหรับชั้นในมีสีขาวจะหนา และอ่อนนุ่มมีเมล็ดจำนวนมากติดอยู่กับผนังรังไข่ เมล็ดมีสีดำ รูปร่างแบนเหมือนใบไม้ มีถุงห่อหุ้มสีเหลือง น้ำในผลมีสีเหลืองเข้ม รสเปรี้ยว มีกลิ่นหอม

2.2 โรคไวรัสที่เข้าทำลายและความเสียหายในแพสชั่นฟรุ้ต

โรคไวรัสเป็นสาเหตุหลักสำคัญของแพสชั่นฟรุ้ต ซึ่งพบว่าโรคมีการระบาด และกระจายอยู่ทั่วไปในหลายพื้นที่ บางแห่งอาการของโรคมีความรุนแรงมากทำให้ผลผลิต และคุณภาพลดลง มีเชื้อไวรัสหลายชนิดที่สามารถเข้าทำลายแพสชั่นฟรุ้ต ได้แก่ passionfruit woodiness virus ที่ทำให้เกิดโรค passionfruit woodiness ซึ่งมีรายงานว่าพบการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในประเทศไต้หวัน บราซิล และอาฟริกาใต้ในปี 1980 (Kitajima *et al*. 1986; Brand *et al*. 1993) อาการของโรคคือใบมีอาการด่างเป็นจุดสีเหลือง ต่อมากลายเป็นจุดวงแหวน ทำให้ใบพืชบิดเบี้ยว ใบเปลี่ยนรูปร่าง ผลบิดเบี้ยว เปลือกผลแข็ง และหนา อายุการให้ผลลิตลดลง

Crestani *et al*. (1986) รายงานว่าในรัฐ Rio de janeiro ประเทศบราซิล พบแพสชั่นฟรุ้ตพันธุ์ Golden *(Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) มีอาการด่างเหลือง ใบหงิกงอ จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนโดยเทคนิค leaf dip พบว่าเกิดจากเชื้อ passionfruit yellow mosaic virus ซึ่งอนุภาคมีรูปร่างเป็นทรงกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30 นาโนเมตร

Tayler and Greber (1973) รายงานว่าเชื้อไวรัสสาเหตุของโรค passionfruit woodiness มีอนุภาครูปร่างเป็นแท่งยาวขนาด 750 x 12 นาโนเมตร และcapsid protein ของเชื้อมีน้ำหนักประมาณ 37 กิโลดาลตัน

Chang (1992) รายงานว่าพบโรค passiflora leaf mottle virus ในประเทศไต้หวัน โดยพืชแสดงอาการด่างเล็กน้อยที่ใบ รูปร่างและ ขนาดอนุภาคของเชื้อจะใกล้เคียงกับเชื้อ passionfruit woodiness virus แต่ capsid protein ของเชื้อจะมีน้ำหนักประมาณ 38 กิโลดาลตัน

โรค passionfruit srilankan mottle virus พบในประเทศศรีลังกาโดย Dassanayake and Hicks (1992) คือพบอาการเป็นจุดด่างที่ใบจำนวนมากทำให้พืชอ่อนแอลง ผลจะแข็งมาก เชื้อไวรัสมีรูปร่างเป็นแท่งยาวขนาด 841 นาโนเมตร มีน้ำหนักโมเลกุลของ polypeptide 2 ชนิดคือ 33.2 และ 28.7 กิโลดาลตัน

Brand *et al*. (1993) ได้ศึกษาโรค passionfruit woodiness virus ในประเทศแอฟริกาใต้ พบว่าแพสชั่นฟรุ้ตแสดงอาการใบด่าง ผลด่าง ผิวเปลือกไม่เรียบ และเปลือกหนากว่าปกติ ผลผลิตลดลงต่อมาสามารถจำแนกเชื้อสาเหตุได้คือเชื้อ cucumber mosaic virus, tobacco necrosis virus และ passionfruit woodiness virus

Brown *et al.* (1993) รายงานว่าพบแพสชั่นฟรุ้ตเป็นโรค passiflora leaf mottle virus เป็นครั้งแรกในประเทศเปอร์โตริโกซึ่งพืชมีอาการใบด่าง หงิกรุนแรง ใบม้วนบิดเบี้ยวทำให้ผลผลิตและคุณภาพลดลง

Bencher *et al.* (1996) รายงานโรคไวรัสของแพสชั่นฟรุ้ตในประเทศโคลัมเบียที่ทำให้เกิดอาการด่างรุนแรง ใบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และต้นตายก่อนให้ผลผลิต ซึ่งจากการจำแนกเชื้อโดยการใช้วิธี Western blot analysis เปรียบเทียบกับเชื้อในกลุ่ม potyvirus และการทดสอบชนิดของพืชอาศัย ลักษณะอาการวิทยา ลำดับของกรดอะมิโน ลำดับของนิวคลีโอไทด์และปฏิกริยาของ Dot-blot hybridization พบว่าเชื้อที่ก่อปัญหานั้นคือ soybean mosaic virus

Trindade *et al.* (1999) ได้รายงานการสำรวจเชื้อไวรัสจาก 2 พื้นที่ในประเทศบราซิล คือที่ Capitao Paco และ Igarape Acu รัฐ Para แล้วนำมาจำแนกเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคด้วยวิธี PTA-ELISAs (Plate-Trapped Antigen Enzyme Linked Immumosorbent Assays) และการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron microscopy) พบว่าสาเหตุของโรคแพสชั่นฟรุ้ตในแปลงเกิดจากเชื้อ passionfruit woodiness virus ซึ่งทำให้เกิดโรคในแปลงประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องมาจากการนำต้นกล้าที่เป็นโรคจากรัฐ Minas และ Bahia ของประเทศบราซิลเข้ามาปลูก

Barbosa *et al.* (1999) รายงานว่าใบของ passionfruit พันธุ์ Golden ในประเทศบราซิล มีอาการจุดด่าง จากการทดสอบการถ่ายทอดในพืชอาศัยและการใช้วิธี ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay) พบว่าเชื้อสาเหตุโรคคือ cucumber mosaic virus

Xu *et al.* (1999) พบว่าเชื้อไวรัสสาเหตุโรคของ *Passiflora* spp ใน Fujian ประเทศจีน เกิดจากเชื้อ cucumber mosaic virus เมื่อทำการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron microscopy) และการใช้วิธี PAS-ELISA (Protein A - sandwich Enzyme - linked Immunosorbent Assay) พบการเกิดโรค 30 – 40 เปอร์เซ็นต์ บางครั้งพบ 90 เปอร์เซ็นต์ จากการสำรวจโรคไวรัสในแปลงปลูกแพสชั่นฟรุ้ตระหว่างปี 1988 - 1995 โดยพืชแสดงอาการใบด่างเป็นจุดวงแหวน ใบม้วนงอ ปลายใบเหลือง

Novaes *et al.* (2000) รายงานว่าโรคไวรัสของแพสชั่นฟรุ้ตในประเทศบราซิลที่แพร่ระบาดและทำความเสียหายแก่แพสชั่นฟรุ้ต เกิดจากเชื้อสาเหตุหลายชนิดคือ passionfruit woodiness virus, cucumber mosaic virus, greenspot passiflora virus, passionfruit vein clearing, passion fruit yellow mosaic virus และ purple granadilla mosaic virus

Moraes *et al.* (2002) ทำการทดสอบแปลงปลูก *Passiflora nitida* ในรัฐ Sao Paulo ประเทศบราซิล เพื่อศึกษาความอ่อนแอของ *Passiflora nitida* ต่อเชื้อ passionfruit woodiness virus จากการตรวจสอบด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา และการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron microscopy) พบว่า *Passiflora nitida* แสดงความอ่อนแอ และแสดงอาการของโรค passionfruit woodiness virus

สำหรับในประเทศไทย มีการศึกษาโรคไวรัสของแพสชั่นฟรุ้ตในหลายจังหวัด ได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน เพชรบูรณ์ ชัยนาท ปราจีนบุรี ขอนแก่น ระยอง และจันทบุรี โดย ดวงใจ ชูปัญญา และ วรวรรณ ศักดิ์วงศ์ (2529ก) พบอาการใบด่าง ผิวใบไม่เรียบมีลักษณะเป็นคลื่น มีรอยบุ๋มชัดเจน เป็นจุดวงแหวน จากการทดสอบในพืชอาศัย 24 ชนิดแล้วตรวจสอบด้วยกล้อง จุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron microscope) ด้วยวิธี leaf dip พบอนุภาคเชื้อไวรัสเป็นท่อนยาวคด งอ คือเชื้อ passionfruit woodiness virus และจากการทดสอบการถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน 4 ชนิด คือ *Myzus persicae*, *Aphis craccivora*, *A. glycines* และ *A. gossypii* โดยเลือกตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ และแข็งแรงไม่มีปีกมาถ่ายทอดโรคใบด่าง โดยการนำเพลี้ยอ่อนมาอดอาหารใน petri dish เป็นเวลา 3 - 5 ชั่วโมงแล้วย้ายเพลี้ยอ่อนไปดูดกินต้นแพสชั่นฟรุ้ตที่แสดงอาการเป็นโรคนาน 24 ชั่วโมง แล้ว ย้ายเพลี้ยอ่อนไปดูดกินต้นกล้าแพสชั่นฟรุ้ตปกติ ที่มีอายุประมาณ 45 วัน นาน 24 ชั่วโมงโดยใช้ เพลี้ยอ่อน 25 ตัวต่อต้น หลังจากนั้นฉีดพ่นยาฆ่าแมลง แล้วนำต้นกล้าแพสชั่นฟรุ้ตไปเก็บในกรงกัน แมลง ติดตามตรวจอาการการติดโรค 7 - 30 วัน ซึ่งพบว่า *A. gossypii* สามารถถ่ายทอดได้ดีที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ *A. craccivora* 30 เปอร์เซ็นต์ *M. persicae* 30 เปอร์เซ็นต์ และ *A. glycines* ถ่ายทอดได้น้อยที่สุดคือ 10 เปอร์เซ็นต์

ดวงใจ ชูปัญญา และคณะ (2531) พบว่าแพสชั่นฟรุ้ตของบริษัทสยามอุตสาหกรรมที่ จังหวัดระยอง ในปี 2528 - 2529 เป็นโรคใบด่างถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบอาการใบด่าง เส้นใบใส ผลด่าง ผิวเปลือกไม่เรียบ เปลือกหนากว่าปกติ ผลบิดเบี้ยวมีขนาดเล็กลง ผลผลิตลดลงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุเกิดจากเชื้อ passionfruit woodiness virus นอกจากนี้ยังพบเชื้อ cucumber mosaic virus แพสชั่นฟรุ้ตมีอาการด่าง และด่างเหลือง ใบยอดบิดและ หงิกงอ ผิวใบไม่เรียบ ผลบิด เบี้ยว ซึ่งถ้าเกิดเชื้อทั้งสองชนิดเข้าทำลายร่วมกันจะทำให้แพสชั่นฟรุ้ตมีอาการรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น

โดยทั่วไปแล้วในธรรมชาติ พบว่าแพสชั่นฟรุ้ตมีการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสมากกว่า หนึ่งชนิด เชื้อไวรัสหลายชนิดสามารถเข้าทำลายร่วมกันบนพืชชนิดเดียวกัน ทำให้อาการของโรคมี ความรุนแรง และความเสียหายเพิ่มขึ้น ซึ่งกองโรคพืชและจุลชีววิทยา (2532) ศึกษาเชื้อไวรัสโรค ใบด่างแพสชั่นฟรุ้ตจากแหล่งปลูกต่างๆในประเทศไทยโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron microscope) พบว่าในหนึ่งอาการมีลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสอยู่ร่วมกัน 2 แบบ คืออนุภาคเป็น ท่อนยาวคดงอ และอนุภาคทรงกลม ซึ่งก็คือเชื้อ passionfruit woodiness virus และ cucumber mosaic virus

2.3 การถ่ายทอดของโรคไวรัสในแพสชั่นฟรุ้ต

เชื้อไวรัสเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ไม่สามารถเข้าสู่พืชอาศัยด้วยตัวเอง ต้องอาศัยพาหะหรือ เข้าทางบาดแผล เชื้อไวรัสบางชนิดสามารถเข้าสู่พืชได้วิธีเดียว และบางชนิดเข้าสู่พืชได้หลายวิธี ซึ่ง ลักษณะวิธีของการถ่ายทอดจะมีความสำคัญในแง่ของการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนั้นๆ การ ถ่ายทอดเชื้อโดยวิธีกล (mechanical transmission) เป็นการเข้าสู่พืชทางบาดแผล ไม่ค่อยเกิดขึ้นเอง

ตามธรรมชาติ เพราะเชื้อไวรัสส่วนใหญ่มีปริมาณไม่สูงพอในเซลล์พืชหรือไม่คงทนเมื่อแยกตัวออกจากเซลล์พืช แต่ก็มีเชื้อไวรัสบางชนิด คือ tobacco mosaic virus และ potato virus X สามารถแพร่กระจายได้โดยการปฏิบัติทางเขตกรรม เช่น การใช้มีดหรือกรรไกรตกแต่งพืช (นวลพรรณ งามยี่สุ่น. 2539)

ธีระ สูตะบุตร (2532) รายงานว่าเชื้อ cucumber mosaic virus มีพืชอาศัย (host range) กว้างมาก จากการทดสอบพืชอาศัย 46 ชนิดใน 13 วงศ์ คือวงศ์ Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Labiatae, Leguminosae, Pedaliaceae, Polemoniaceae, Solanaceae, Umbelliferae, Cruciferae, Gramineae และ Convolvulaceae โดยการถ่ายทอดผ่านทางน้ำคั้น (mechanical sap transmission) พบว่าสามารถเข้าทำลายพืชทดสอบได้จำนวน 35 ชนิดใน 10 วงศ์ ซึ่งมีเพียง 3 วงศ์เท่านั้นที่ไม่ใช่พืชอาศัย ได้แก่ วงศ์ Cruciferae, Gramineae และ Convolvulaceae

Satya *et al*. (2002) รายงานว่าเชื้อ chilli veinal mottle virus ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคไวรัสของพริก ในประเทศอินเดีย ทำให้ใบพริกมีอาการด่างสีเขียวเข้ม และใบม้วนงอ สามารถถ่ายทอดทางน้ำคั้น (mechanical sap transmission) ได้ดีลงในพืชอาศัยในวงศ์ Solanaceae และยังสามารถถ่ายทอดผ่านทางแมลงพาหะคือ เพลี้ยอ่อน *A. gossypii*, *A. craccivora* และ *M. persicae* แบบ non – persistent

การถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเมล็ด (seed transmission) เชื้อไวรัสสามารถติดไปกับส่วนของ seed coat และถ่ายทอดลงสู่ต้นกล้าเมื่อมีการนำเมล็ดไปเพาะซึ่ง Tomlinson and Carter (1970) รายงานว่าเชื้อ cucumber mosaic virus สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดของต้น *Stellaria metia* ได้ 21-40 เปอร์เซ็นต์ ถ้าต้นแม่เกิดจากเมล็ดที่เป็นโรค และCooper (1976) รายงานว่าเชื้อ cherry leaf roll virus สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเชื้อเข้าทำลายต้นยาสูบ *N. rustica* ซึ่งปลูกที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สำหรับในแพสชั่นฟรุ้ต ปัจจุบันยังไม่พบว่ามีการรายงานการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเมล็ดพันธุ์ (seed transmission) ซึ่งการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในแพสชั่นฟรุ้ตที่สำคัญ ได้แก่ การถ่ายทอดทางน้ำคั้น (mechanical sap transmission) การทาบกิ่ง (transmission by grafting) และทางแมลงพาหะ (insect transmission) (Taylor and Greber. 1973)

การถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยการทาบกิ่ง (transmission by grafting) วิธีนี้สามารถเกิดขึ้นได้เมื่อมีการใช้ต้น stock หรือ scion ที่เป็นโรคในการทาบกิ่ง การถ่ายทอดเชื้อไวรัสจะประสบความสำเร็จมากขึ้น ถ้าการทาบกิ่งใช้ส่วนของ stock และ scion ของพืชที่อยู่ใน species เดียวกันหรือใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดโดยติดไปกับท่อนพันธุ์ (transmission by vegetative propagation) ซึ่งวิธีนี้จะเกิดกับพืชที่ใช้การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือการขยายพันธุ์แบบ การปักชำ การตอน การใช้ไหล และการใช้หัวปลูก

การถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่สำคัญที่สุดในการแพร่ระบาดของโรคคือ การถ่ายทอดทางแมลงพาหะ ซึ่งแมลงพาหะส่วนใหญ่จะอยู่ใน Order Homoptera ประกอบไปด้วยวงศ์ Aphididae คือ

เพลี้ยอ่อนชนิดต่างๆ วงศ์ Cicadellidae คือ เพลี้ยจั๊กจั่น วงศ์ Delphacidae คือ เพลี้ยกระโดด วงศ์ Aleyrodidae คือ แมลงหวี่ขาวและ วงศ์ Pseudoococcidae คือ เพลี้ยแป้งนอกจากนี้ยังมี Order Coleoptera คือ พวกด้วงชนิดต่างๆ Order Thysamoptera คือ เพลี้ยไฟ และ Order Acarina คือ พวกไร ซึ่ง Jayashree *et al*. (1999) รายงานว่าเชื้อ pumpkin yellow vein mosaic virus เข้าทำลายต้นฟักทองอย่างกว้างขวางได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต ซึ่งพาหะนำโรคคือแมลงหวี่ขาว *Bemisia tabaci* และพบว่าการถ่ายทอดเชื้อทำให้เกิดโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อให้แมลงอดอาหารเป็นเวลา 6 ชั่วโมงแล้วนำมาปล่อยให้ดูดกินพืชที่ปกตินาน 3 ชั่วโมงในอัตรา 15 ตัวต่อต้น

Doomar *et al*. (1999) รายงานว่าเชื้อ cucumber mosaic virus ที่เข้าทำลายต้น marigold (*Tagetes erecta* L) ทำให้เกิดอาการใบด่าง และใบหงิก ในประเทศอินเดีย สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้ทางน้ำคั้น (mechanical sap transmission) และ แมลงพาหะ (insect transmission) คือพวกเพลี้ยอ่อน 3 ชนิด ได้แก่ *A.gossypii*, *A. Craccivora* และ *M. persicae*

Redinbaugh *et al*. (2002) รายงานว่าเชื้อ maize fine streak virus ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Rhabdovirus ทำให้ข้าวโพดเกิดอาการใบด่างเป็นขีดๆ สามารถถ่ายทอดผ่านทางแมลงพาหะคือเพลี้ยอ่อน *Rhopa losiphum padi* และ *M. persicae*

การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางแมลงพาหะ (insect transmission) ของแพสชั่นฟรุ้ต พบว่า Passiflora leaf mottle virus ในประเทศเปอร์โตริโก สามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางแมลงหวี่ขาว *Bemisia tabaci* จากต้นแพสชั่นฟรุ้ตที่เป็นโรคไปยังต้นถั่วจากการตรวจสอบด้วยวิธี Dot blot และSouthern hybridization. (Brown *et al*. 1993)

Rubies *et al*. (1996) เก็บตัวอย่างใบ *Passiflora* sp นำมาตรวจสอบหาโรคไวรัส พบว่าโรคมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง ซึ่งส่วนใหญ่เชื้อถูกถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อนได้แก่ เชื้อไวรัสในกลุ่ม Cucumovirus, Potyvirus, Carlavirus และ Alfamovirus

Iwai *et al*. (1996) ศึกษาแพสชั่นฟรุ้ตพันธุ์ Ohdama ซึ่งมีอาการด่างแบบ systemic ที่ใบและมีรูปร่างผิดปกติอย่างรุนแรง พบว่าสาเหตุโรคเกิดจากเชื้อ passionfruit woodiness virus สามารถถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน *M. persicae*

Chagas *et al*. (2001) รายงานว่าเชื้อไวรัสในกลุ่ม Rhabdovirus หรือ Rhabdovirus-like ได้แก่เชื้อ greenspot passiflora virus ในแพสชั่นฟรุ้ต สามารถถ่ายทอดโดยไรในวงศ์ Brevipalpus คือ *Brevipalpus phoenicis*, *B. obovatus* และ *B. californicus* ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับแพสชั่นฟรุ้ตในประเทศบราซิล

2.4 วิธีการจัดการโรคไวรัสในแพสชั่นฟรุ้ต

วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (Intergrated Pest Management) เป็นการใช้วิธีจัดการศัตรูพืชร่วมกันตั้งแต่ 2 วิธีขึ้นไป เพื่อลดการใช้สารเคมีหรือใช้ให้น้อยที่สุดในการป้องกันกำจัด

ศัตรูพืชไม่ให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ ลดปัญหาสารพิษตกค้าง และรักษาสภาพแวดล้อม สำหรับการควบคุมโรคไวรัสโดยวิธีผสมผสาน การจัดการแมลงพาหะมีความสำคัญในการควบคุมโรคไวรัส ซึ่งนอกจากการใช้สารเคมีแล้วยังมีวิธีที่สามารถจัดการกับแมลงได้หลายวิธี

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ และคณะ (2536) ใช้วิธีเขตกรรม วิธีกลและการฉีดพ่นสารเคมีทางใบป้องกันกำจัดโรคไวรัสของแตงร้าน พบว่าการใช้แผ่นพลาสติกสีเงินสะท้อนแสงคลุมแปลงร่วมกับการฉีดพ่นสารกำจัดแมลงพาหะของเชื้อไวรัสทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 39.90 เปอร์เซ็นต์ จากแปลงเปรียบเทียบ ปริมาณเพลี้ยอ่อน และแมลงหวี่ขาวลดลง 79.30 และ 69.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อัตราการเกิดโรคใบด่างลดลง 82.66 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไวรัสใบด่างแตง (cucumber mosaic virus) ไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ (papaya ringspot virus) และไวรัสใบด่างเหลืองซุกินี (zucchini yellow mosaic virus) ลดลง 100, 100 และ 86.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Takada (1995) ศึกษาการใช้วิธีการผสมผสานในการควบคุมเพลี้ยอ่อนซึ่งเป็นพาหะนำโรคไวรัส ประกอบด้วย การใช้สารเคมีโดยใช้สารขับไล่ สารลดการกินอาหาร และสารเคมีฆ่าแมลง การควบคุมทางกายภาพโดยการคลุม การใช้ตาข่าย และการควบคุมโดยชีววิธีโดยใช้แมลงเบียนและแมลงห้ำ พบว่าวิธีการใดวิธีการหนึ่งไม่สามารถควบคุมโรคไวรัสได้อย่างสมบูรณ์ ควรใช้หลายหลายวิธีร่วมกันในการควบคุม

Hernandez *et al*. (2000) ศึกษาการเกิดโรค และความรุนแรงของโรค papaya ringspot virus โดยจัดการใน 3 ระบบคือ ระบบที่ 1 เป็น Integrated management (IPM) ระบบที่ 2 เป็น Integrated management ที่ไม่มี citroline (เป็น mineral oil ที่ได้มาจากปิโตรเลียม) (IPM-SC) และระบบที่3 เป็นแปลงปลูกตามธรรมชาติ พบว่าการใช้ระบบที่1 และระบบที่ 2 (IPM และ IPM-SC) เกิดโรคไวรัส 85 และ 88 เปอร์เซ็นต์ แต่ในระบบที่ 3 (แปลงธรรมชาติ) พบ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับด้านผลผลิตระบบที่2 (IPM-SC) ให้ความสูงของต้น จำนวนผลผลิตต่อต้นสูงที่สุดคือ 33741.3 กิโลกรัม/เฮกแตร์ ระบบที่1 (IPM) 31330.60 กิโลกรัม/เฮกแตร์ และระบบที่3 (แปลงธรรมชาติ) 17055.80 กิโลกรัม/เฮกแตร์

สารเคมี imidacloprid เป็นสารกำจัดแมลงชนิดดูดซึม มีฤทธิ์ตกค้างในธรรมชาติน้อย สามารถกำจัดแมลงที่อยู่ในดิน เมล็ด และที่ใบของพืชได้ ใช้กำจัดแมลงที่มีปากแบบดูดกินคือ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ และแมลงหวี่ขาวได้ดี โดยปกตินิยมใช้ป้องกันกำจัดแมลงกับพืชประเภท ข้าว ธัญพืช ข้าวโพด มันฝรั่ง ผัก และผลไม้ ซึ่ง Ahmed *et al*. (2001) รายงานการเปรียบเทียบการใช้สารเคมี imidacloprid กับ cypermetrin ที่อัตราที่ใช้เท่ากันคือ 47.6, 71.4, 95.2 และ 119 g a.i./ha ฉีดพ่นลงดินทุกๆ 10 วัน นาน 6 สัปดาห์ หลังจากปลูกเมล็ดมะเขือเทศในการควบคุมแมลงหวี่ขาว *B. tabaci* ซึ่งเป็นแมลงพาหะในการถ่ายทอดเชื้อ tomato yellow leaf curl virus พบว่าการใช้สารเคมี imidacloprid สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค tomato yellow leaf curl virus ได้ดีกว่าการใช้

สารเคมี cypermetrin ในทุกอัตราที่ใช้ และการใช้สารเคมี imidacloprid สามารถป้องกันการเกิดโรคไวรัสของต้นกล้ามะเขือเทศได้นานถึง 12 สัปดาห์

ศรีสุดา โท้ทอง และปิยรัตน์ เขียนมีสุข (2541) รายงานการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟในกล้วยไม้หวายลูกผสม (นิววันนี) ในแปลงเกษตรกรของพุทธมณฑลสาย 3 แขวงทวีพัฒนา จังหวัดกรุงเทพมหานคร พ่นสารทุก 4 วันด้วยเครื่องพ่นสารแบบแรงดันน้ำสูง และตรวจนับจำนวนเพลี้ยไฟ 11 ครั้งโดยการเปรียบเทียบใน 14 กรรมวิธี คือ 1) fipronil (Ascend 5 เปอร์เซ็นต์ SC) อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 2) carbosulfan (Posse 20 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 50 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 3) cypermetrin + phosalone (Parzon 28.75 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 40 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 4) imidacloprid (Cofidor 10 เปอร์เซ็นต์ SL) อัตรา 10 มิลลิตร/น้ำ 20ลิตร 5) imidacloprid(Cofidor 10 เปอร์เซ็นต์ SL) อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 6) betacyfluthrin (Folitec 2.5 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 7) abamectin (Vertimec 1.8 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 10 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 8) abamectin (Jacket 1.8 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 9) acetamiprid (Molan 20 เปอร์เซ็นต์ SP) อัตรา 5 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 10) fometanate (Dicazol 25 เปอร์เซ็นต์ SP) อัตรา 30 มิลลิตร/น้ำ 20ลิตร 11) pyriproxyfen (Admiral 10 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 12) deltametrin (Decis 3 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 15 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 13) 10 ppm aza Neem Sed Kernel Extract (NSKE) อัตรา 50+100 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร + 0.5 เปอร์เซ็นต์ Neem Oil (NO) และ 14) ไม่ใช้สารฆ่าแมลง พบว่าการใช้ imidacloprid อัตรา 10-20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร abamectin อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร acetamiprid อัตรา 5 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร และ fipronil อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟได้ดีที่สุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีชนิดอื่นๆ

การใช้น้ำมันปิโตรเลียมในการจัดการศัตรูพืช เป็นวิธีที่นำมาใช้ทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งในประเทศออสเตรเลีย และประเทศจีน ประสบความสำเร็จในการนำน้ำมันปิโตรเลียมเข้าสู่ระบบการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน (Integreated Pest Management) ในการจัดการแมลงศัตรูส้ม ซึ่ง รุจน์ มรกต (2541) และ วิทย์ นามเรืองศรี (2543) รายงานว่าน้ำมันปิโตรเลียม มีระดับความเป็นพิษน้อย ส่วนมากจะอุดตันรูหายใจหรือช่องผ่านของอากาศในตัวแมลง นอกจากนี้ทำให้แมลงลดการวางไข่ และการกินอาหาร วิธีนี้สามารถป้องกันกำจัด เพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย เพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง เพลี้ยไก่แจ้ส้ม แมลงหวี่ขาว และไรได้ดี สำหรับวิธีอื่นคือ การใช้กับดัก ซึ่งพบว่ากับดักกาวเหนียวสีเหลืองเป็นสีที่ดึงดูดแมลง เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว หมัดตัวด้วง และผีเสื้อบางชนิดได้ดี มีประสิทธิภาพในการประเมินความหนาแน่นของประชากรแมลง สามารถใช้เป็นตัววัดในการควบคุมแมลงเหล่านี้ได้ ซึ่งศรีสุดา โท้ทอง และปิยรัตน์ เขียนมีสุข (2543) ศึกษาสีของกับดักกาวเหนียว

ที่ใช้ดักจับเพลี้ยไฟในสวนกล้วยไม้พบว่า สำหรับเพลี้ยไฟ กับดักสีเหลือง สีฟ้า สีขาว และสีน้ำเงิน ดักจับเพลี้ยไฟได้มาก กว่ากับดักแผ่นสีใส ส่วนสีเขียว และส้ม ดักจับแมลงได้น้อย พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับดักแผ่นสีใส

นอกจากนี้ยังมีการนำวิธี Cross-protection คือการปลูกเชื้อไวรัสชนิดไม่รุนแรงมาใช้ในการป้องกันโรคไวรัส ซึ่งดวงใจ ชูปัญญา (2534) รายงานว่าการปลูกเชื้อไวรัสชนิดอ่อนลงในต้นกล้าแพสชั่นฟรุ้ต สามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงได้ โดยการคัดเลือกเชื้อไวรัสใบด่างชนิดอ่อน (mild strain) ที่พบในธรรมชาติมาทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสชนิดรุนแรง (severe strain) ในสภาพไร่ที่จังหวัดระยองโดยเปรียบเทียบระหว่างต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (control) ต้นที่ปลูกเชื้อชนิดอ่อน ต้นที่ปลูกเชื้อชนิดรุนแรง และต้นที่ปลูกเชื้อชนิดอ่อนก่อน 2 สัปดาห์ แล้วปลูกเชื้อชนิดรุนแรงซ้ำลงไป พบว่าต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (control) เป็นโรครุนแรง 86 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ปลูกเชื้อไวรัสชนิดอ่อน (mild strain) แสดงอาการของโรค 43 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่ปลูกเชื้อชนิดอ่อนก่อนแล้วปลูกเชื้อชนิดรุนแรงลงไปพบว่าแสดงอาการเป็นโรค 44 เปอร์เซ็นต์

2.5 วิธีการวินิจฉัยเชื้อด้วยเทคนิคต่างๆ

2.5.1 พืชอาศัย (Host range)

ข้อมูลของชนิดพืชทดสอบที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย รวมทั้งอาการของโรคที่ปรากฏมีความสำคัญมากทั้งสำหรับเชื้อไวรัสที่มีการศึกษาแล้ว และเชื้อไวรัสที่ยังไม่มีการศึกษามาก่อน ซึ่งใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการวินิจฉัยเชื้อ แต่อย่างไรก็ดีข้อมูลชนิดของพืชอาศัยที่นำมาทดสอบที่พืชแสดงอาการออกมา ไม่สามารถใช้เป็นข้อมูลเดียวในการสรุปชนิดของเชื้อไวรัสได้ นอกจากนี้ชนิดของพืชทดสอบ ยังมีประโยชน์ในการคัดเลือกพืชที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัส (นวลพรรณ งามยี่สุ่น. 2539)

2.5.2 การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscopy)

การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถตรวจสอบตัวอย่างที่ได้จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษารายละเอียดของอนุภาคหรือการตรวจสอบน้ำคั้นจากพืชที่เป็นโรคได้ในเวลาที่รวดเร็ว ซึ่งการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบที่นิยมใช้คือวิธี quick leaf dip โดยการใช้หยดของน้ำคั้นจากใบพืชที่เป็นโรคหรือวิธี epidermis strip โดยการลอก epidermis ของใบพืชที่เป็นโรคมาวางบนหยด stain ที่ใช้ (Hictchborn and Hill. 1965) สำหรับเทคนิคที่ใช้ในระยะแรกคือ เทคนิค metal shadowing ซึ่งใช้ดูรูปร่าง และขนาดของอนุภาคเชื้อไวรัสแต่จะไม่เห็นรายละเอียดต่างๆ ภายในอนุภาค วิธีนี้ใช้กับตัวอย่างที่ได้จากการแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ที่สะอาดมากๆ แทบไม่มีสิ่งเจือปน โดยการสเปรย์ตัวอย่างลงบนกริด (copper grid ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร และ

เคลือบด้วย formvar หรือ collodion) เมื่อตัวอย่างแห้งก็พ่นด้วยไอโลหะหนักคือ ทอง platinum หรือ uranium ภายใต้ระบบสูญญากาศ ทำให้ไอโลหะหนักมาเคลือบอยู่บนตัวอย่าง ทำให้เกิดเงาที่ตัวอย่าง ได้ภาพตัวอย่างเป็น 3 มิติ เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนอนุภาคของตัวอย่างจะเป็นสีขาวเมื่อบันทึกลงบนฟิล์มจะเป็นสีดำและ ต่อมาพัฒนาใช้เทคนิค negative contrast staining ซึ่งปัจจุบันเป็นวิธีที่นิยมใช้กันแพร่หลาย โดยการเตรียมตัวอย่างค่อนข้างง่ายและรวดเร็ว สามารถตรวจสอบจากตัวอย่างน้ำคั้นของพืชที่เป็นโรคได้โดยไม่จำเป็นต้องเป็นตัวอย่างที่บริสุทธิ์ การย้อมสีแบบ negative staining สีจะจับรอบๆ อนุภาค ทำให้ได้ภาพของอนุภาคที่เป็นสีขาวรอบๆ ซึ่งสีที่ใช้ย้อมเป็นพวกโลหะหนักคือ sodium phosphotungstate 2 เปอร์เซ็นต์ uranyl acetate หรือ ammonium molybdate ที่อิเล็กตรอนผ่านไม่ได้หรือผ่านได้ยาก (นวลพรรณ งามยี่สุ่น. 2539)

2.5.3 การตรวจสอบ dsRNA ของเชื้อ (dsRNA detection)

การนำเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคแบบ RNA สายคู่ (dsRNA extraction) มาใช้ในการตรวจสอบ และวินิจฉัยเชื้อไวรัส ซึ่งส่วนใหญ่ไวรัสมีหน่วยพันธุกรรมเป็น RNA การเข้าทำลายของเชื้อไวรัสจะมีช่วงการทวีจำนวนของเชื้อ (multiplication) จะมีการเกิด double stranded RNA (dsRNA) จึงทำการแยกสกัด RNA ออกมา ซึ่งวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสกันอย่างแพร่หลาย และมีการดัดแปลงนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสหลายชนิด

Rezaian *et al*. (1991) รายงานการตรวจ dsRNA ของเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดใบม้วนงอในต้นองุ่น หลายพันธุ์ที่นิยมใช้ผลิตไวน์ โดยการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อ และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี CF11 cellulose chromatography แล้วตรวจสอบ dsRNA ด้วย gel eletrophoresis พบว่าขนาดของ dsRNA มีความแตกต่างกัน ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปตามของพันธุ์ขององุ่น และพบว่าเชื้อไวรัสมีความเข้มข้นสูงในเนื้อเยื่อส่วนลำต้นมากกว่าในใบของต้นองุ่น นอกจากนี้ นวลพรรณ งามยี่สุ่น และกีรติกุล ชีกว้าง (2546) รายงานว่าการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อจากใบมะลิที่แสดงอาการเป็นโรคจากสภาพธรรมชาติ และมะลิที่แสดงอาการใบด่างจากการถ่ายทอดเชื้อโดย *Myzus persicae* โดยใช้ Rneasy Plant Mini Kit (QIAGEN) โดยมี บริษัท ธีระเทรดดิ้ง เป็นตัวแทนจำหน่าย พบว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อ cucumber mosaic virus

2.5.4 การตรวจสอบโดยเทคนิค Reverse Transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

ปัจจุบันเทคนิค PCR หรือ Polymerase Chain Reaction ได้ถูกพัฒนา และนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสต่างๆ โดยประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1. การแยกสกัด DNA หรือ RNA (nucleic acid extraction)

เป็นการแยกสกัดเอาสารพันธุกรรมออกจากสิ่งส่งตรวจ ก่อนที่จะนำสารพันธุกรรมที่ได้ไปทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคต่างๆทางด้านชีวโมเลกุล

2. การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Thermal Cycling)

หลักการทั่วไปของเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของ DNA ในหลอดทดลอง การเพิ่มขยายปริมาณ DNA จำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้คือ DNA แม่พิมพ์ (template DNA) thermostable, DNA polymerase, deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), oligonucleotide primers และ Buffer ที่เหมาะสม

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ ในแต่ละรอบ (Cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่1. Denaturation

เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90 - 95 องศาเซลเซียส ถ้าใช้อุณหภูมิต่ำหรือสั้นเกินไป จะทำให้การแยกสายแม่พิมพ์ไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้ประสิทธิภาพการทำ PCR ลดลง โดยทั่วไปการ denature ที่ 94 – 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ก็เพียงพอสำหรับการแยกสายแม่พิมพ์อย่างสมบูรณ์ แต่ในทางปฏิบัติจริงๆ เวลาที่ใช้อาจปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสม ขึ้นกับลักษณะความซับซ้อน (complexity) ของแม่พิมพ์ ลักษณะ และขนาดของหลอด PCR ปริมาตรของปฏิกิริยา PCR ชนิดของเครื่อง thermocycler ที่ใช้ ในกรณีแม่พิมพ์ที่มี GC content สูงอาจต้องใช้เวลา denature นานขึ้น หรือใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น การเติม glycerol ลงไปเพื่อกันการระเหยของน้ำ พยายามหลีกเลี่ยงการใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปหรือนานเกินไป เนื่องจากจะทำให้ activity ของ polymerase ลดลง

ขั้นตอนที่2. Annealing

เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50 – 55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม ขั้นตอนนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพ และความจำเพาะในการทำ PCR โดยทั่วๆ ไปสามารถทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยการหาค่า Tm ของ Primer โดยการใช้ software หรือสูตรคำนวณ ได้ดังนี้ Tm = 4 (G + C) + 2 (A+T) ซึ่งจะได้ค่า Tm อย่างหยาบๆ จากนั้นเปรียบเทียบการทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ต่างกันประมาณ 2 องศาเซลเซียส หลายๆอุณหภูมิ โดยใช้ค่า Tm – 5 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิหลัก การใช้อุณหภูมิต่ำเกินไปทำให้การ annealing อย่างไม่จำเพาะเกิดขึ้นอย่างมากมาย แต่ถ้าใช้อุณหภูมิสูงเกินไป การ annealing จะเกิดขึ้นน้อยหรือไม่มีเลย

ขั้นตอนที่3. Primer extension

เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก Primer ในทิศทาง 5’ ไป 3’ อุณหภูมิขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70 – 75 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาที่ใช้ขึ้นกับความยาว และความเข้มข้น

ของสายแม่พิมพ์ รวมทั้งอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาด้วย การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20 – 30 รอบ ทำให้ได้ PCR product หรือ amplified product เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก

3. การแยกผลผลิตดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าและการบันทึกผล (Detection)

หลังจากปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเสร็จสมบูรณ์แล้ว นำผลผลิตที่ได้ คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน เนื่องจากมีจำนวนซ้ำของลำดับเบสแกนไม่เท่ากัน มาแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้าโดยใช้ตัวกลางชนิดอะกาโรส (agarose gel) ที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 180 โวลต์ โดยใช้เวลาประมาณ 30 - 40 นาที ชิ้นดีเอ็นเอซึ่งมีประจุเป็นลบจะเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก โดยชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ เมื่อชิ้นดีเอ็นเอแยกโดยสมบูรณ์ แล้วจึงนำ agarose gel มาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และนำไปตรวจสอบผลภายใต้กล่องแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อดูลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นซึ่ง Faten *et al.* (1999) รายงานการจำแนกเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirus คือ potato virus Y และ pepper veinal mottle virus ของ pepper *(Capsicum annuum* L.) ในประเทศตูนีเซีย ในช่วงปี 1995 - 1997 โดยการใช้วิธี RT-PCR พบว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อกลุ่ม potyvirus สูง ซึ่งเชื้อ potato virus Y พบว่ามีรายงานการแพร่ระบาดมานานแล้ว แต่สำหรับเชื้อ pepper veinal mottle virus เป็นการสำรวจพบเป็นครั้งแรกในประเทศตูนีเซีย

Kundu *et al*. (2003) รายงานการใช้เทคนิค RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) และ DAS- ELISA (Double antibody sandwich-enzyme linked immono-sorbent assay) ในการตรวจสอบเชื้อ apple stem grooving virus (ASPV) ซึ่งพบเชื้อไวรัสในทุกเนื้อเยื่อที่มาตรวจสอบคือ ส่วนเปลือก ตา กลีบดอก และใบของต้นแอปเปิ้ลที่เก็บตัวอย่างมาตรวจในช่วงเวลาที่แตกต่างกันใน 1 ปี

Marinho *et al*. (2003) ใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบเชื้อ apple stem grooving virus (ASPV) ในเนื้อเยื่อทุกส่วนของต้นแอปเปิ้ล โดยใช้ primer ASGV4F (5'- GTTCACTGAGGCA AAAGCTGTC - 3') - ASGV4R (5' – CTTCCGTACCTCTTCCACAGGAC - 3') ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ ASPV ในการ replicase gene ด้วยระบบ Titan RT-PCR โดยนำน้ำคั้นของใบหรือเปลือกของต้นแอปเปิ้ลมาเป็น first strand จากนั้นตรวจสอบการเกิดสีหลังจากการทำ PCR ด้วย sandwich hybridisation 2 ชนิด คือ biotin-labelled capture probe และ digoxigenin (DIG) – labelled detection probe ซึ่งพบว่าการใช้ primer ASGV4F - ASGV4R สามารถตรวจพบเชื้อ ASPV ได้แม้มีปริมาณตัวอย่างในปริมาณเล็กน้อย

Miroslawa (2004) รายงานการใช้เทคนิค RT-PCR ตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ strawberry mottle virus ในพืช *Fragaria virginiana* UC-11 ซึ่งเป็นพืชที่มี polysaccharides และ phenolic compound มาก ทดลองเปรียบเทียบการสกัด RNA ของเชื้อไวรัสใน 2 วิธีคือ วิธี lithium

method (ทำการบดตัวอย่างใน lithium chloride buffer) และวิธี silica capture method ตรวจสอบ RNA 1 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 5 dilutions คือ 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 และ 1:800 พบว่าวิธี lithium method ดีกว่าวิธี silica capture method เพราะว่าจากการตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis แล้วย้อมสีด้วย ethidium bromide วิธี lithium method สามารถเห็น band RNA ที่ความเข้มข้น 1:50, 1:100, 1:200 และ 1:400 แต่สำหรับวิธี silica capture method ไม่สามารถเห็น band RNA ที่ความเข้มข้นทั้ง 5 เลย

Cigdem and Filiz (2005) รายงานการสำรวจโรค apple chlorotic leaf spot ในประเทศตุรกี จำนวน 369 ตัวอย่างจากพืชพวก stone fruit คือ cherry peach nectarine apricot และ plum โดยนำตัวอย่างที่มีอาการที่น่าจะเกิดจากเชื้อ ACLSV มาตรวจด้วยเทคนิค DAS-ELISA และ RT-PCR พบว่าการใช้ ELISA พบ 13 ตัวอย่างมีเชื้อ ACLSV ในขณะที่การใช้ PCR พบ 51 ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก พืชพวก apricot พบเชื้อมากที่สุดรองลงมาคือ peach cherry และ plum