

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสกับการแพร่ระบาดของโรคในแปลงปลูก แตงกวาสลับกับถั่วฝักยาวภายหลังการทำนา
นักศึกษา	นายคมสร แสงจินดา
รหัสประจำตัว	44066307
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
พ.ศ.	2549
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. นวลพรรณ งามยี่สุ่น

บทคัดย่อ

ความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสกับการแพร่ระบาดของโรคในแปลงปลูกแตงกวาสลับกับถั่วฝักยาว ภายหลังการทำนาในเขตพื้นที่อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี ศึกษาโดยการสำรวจอาการของโรคไวรัสทั้งในถั่วฝักยาว แตงกวา วัชพืชและพืชข้างเคียง รวมทั้งแมลงในแปลงปลูกตลอดปี ลักษณะการถ่ายทอดเชื้อและการวินิจฉัยชนิดของเชื้อที่เข้าทำลายเพื่อผลในการควบคุมโรคไวรัสอย่างมีประสิทธิภาพ

การสำรวจอาการโรคไวรัสใน ถั่วฝักยาว แตงกวา วัชพืช และพืชข้างเคียง ในแปลงปลูกพืช สลับภายหลังการทำนา พบอาการของโรคไวรัสในถั่วฝักยาวแตกต่างกัน 7 อาการดังนี้ 1) สีเขียวเข้มตามเส้นใบ พื้นใบเขียวอ่อน แผลทอง ใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง 2) ใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง สีใบเขียวเข้ม ใบพอง พื้นใบบางส่วนสีเหลืองแทรกอยู่ตามเส้นใบ 3) เส้นใบมีสีเขียวเข้ม ทั้งแนวกลางใบและเส้นใบ พื้นใบสีเขียวอ่อน 4) ใบ ค้างสีเหลืองอ่อนกระจายทั่วใบและเขียวเข้มตามเส้นใบ ลำต้น แครกแกร็น 5) ใบเรียวยาว ผิดรูปร่าง 6) ค้างเขียวตามเส้นใบและขอบใบโค้งลง 7) ยอดแตกพุ่ม แฉ่ ในแตงกวาพบอาการของโรคไวรัส 3 ลักษณะอาการ ได้แก่ 1) ค้างเหลืองกระจายทั่วใบ 2) เส้นใบและพื้นใบเป็นสีเหลือง 3) จุดพองสีเขียวกระจายทั่วใบ พื้นใบมีสีเขียวอ่อน เชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดด้วยวิธี Mechanical sap transmission จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวอาการที่ 1-6 และจากใบแตงกวาทั้ง 3 อาการ แต่อาการในแตงกวาที่ถูกถ่ายทอดมีอาการค้างเขียวแตกต่างกับอาการที่ได้จากการสำรวจ นอกจากนี้ยังถ่ายทอดสู่ *Chenopodium amaranticolor*

ส่วนวัชพืชและพืชข้างเคียงที่ทำการสำรวจ ได้แก่ ฤๅษีผืนแสดงอาการค้างเขียวเป็นร่างแห ผักขมหนามแสดงอาการค้างเป็นจุดเหลืองอ่อน หญ้าหาง แสดงอาการค้างสีเขียวเข้มตามแนวเส้น ใบ ผักเสี้ยนแสดงอาการค้างเหลืองอ่อนใบบิดเบี้ยว ผักแคแสดแสดงอาการค้างสีเขียวตามเส้นใบ ครอบจักรวาลแสดงอาการใบลิบเล็ก ในพืชข้างเคียง โหระพาและแมงลักแสดงอาการค้างเหลืองใบ บิดเบี้ยว กระเพราแสดงอาการค้างเหลืองกระจายทั่วใบ มะเขือพวงแสดงอาการค้างเขียวอ่อนใบ

ฝักรูปเล็กน้อย มะเขือเทศแสดงอาการค้างเขียวเข้มใบเป็นคลื่น พริกแสดงอาการค้างเขียวอ่อนใบมีขนาดเล็ก ใบฝักรูป

จากการสำรวจแมลงในแปลงปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวาที่ปลูกสลับกันในพื้นที่เดียวกัน และบริเวณรอบๆ แปลงปลูกในทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี พบแมลงได้แก่ แมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis gossypii*) เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ (*Myzus persicae*) เพลี้ยจักจั่นสีเขียว (*Nephotettix virescens*) เพลี้ยกระโดด (*Nilaparvata lugens*) ตั๊กแตน (*Cyrtacanthacris tatarica* L.) ค้างคาว (*Micraspis* sp.)

การตรวจสอบการถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์โดยนำเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวและแตงกวาที่มีจำหน่ายในท้องตลาดอำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรีอย่างละ 5 พันธุ์ดังนี้ พันธุ์ถั่วฝักยาว ได้แก่ พันธุ์ขุนศึก No.7 พันธุ์สมบุญโชค No.99 พันธุ์ไผ่ขวาง 005 พันธุ์ถั่วน้ำจืด พันธุ์BIG 1 และ พันธุ์แตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์มีชัย พันธุ์เมฆอน พันธุ์อะดอม พันธุ์อมตะ 765 พันธุ์เทมมี พบว่าในระยะเวลา 2 สัปดาห์ ถั่วฝักยาวเริ่มแสดงอาการของโรคไวรัส และในเวลา 4 สัปดาห์ อาการที่ปรากฏมีความแตกต่างกัน 4 ลักษณะอาการ ได้แก่ อาการใบค้างเป็นปื้นเล็กๆตามด้วยอาการเหี่ยวทั้งใบก่อนที่จะหลุดร่วง อาการค้างเขียวเป็นร่างแหตามเส้นใบ อาการแผลจุดสีเขียวอ่อนกระจายบนใบ ซึ่งอาการทั้ง 3 ลักษณะนี้พบบนใบแก่ก่อน ส่วนอาการจุดเหี่ยวบนใบ เส้นใบหักทำให้ใบบิดเบี้ยว พบปรากฏบนใบ trifoliate คู่แรกเท่านั้น พบเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้ออยู่ที่ 1-10.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสบนแตงกวาพันธุ์ต่างๆ ไม่พบการถ่ายทอดเชื้อทางดิน

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสสาเหตุโรคในถั่วฝักยาวและแตงกวา ใช้วิธีทางชุดวิธี ELISA พบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Geminivirus ในแตงกวาทุกตัวอย่าง แต่ไม่พบในตัวอย่างถั่วฝักยาว การตรวจสอบเชื้อ cucumber mosaic virus ในถั่วฝักยาวและแตงกวาที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชสลับ ที่ทำการเก็บตัวอย่างทุกฤดู ตลอดทั้งปี พบว่ามีเชื้อ cucumber mosaic virus ในทุกตัวอย่างของ ถั่วฝักยาวและแตงกวา ในขณะที่ผลการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบอนุภาคแบบ flexuous ขนาดประมาณ 600- 650 นาโนเมตร และลักษณะอนุภาคแบบ isometric ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30.38 นาโนเมตร

การตรวจสอบเชื้อไวรัส โดยวิธีการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อ และการใช้วิธี RT – PCR และ realtime PCR พบว่าในเกือบทุกตัวอย่างที่ทำการสำรวจมีเชื้อ CMV เข้าทำลาย ทั้งตัวอย่าง ถั่วฝักยาว แตงกวา วัชพืช และพืชข้างเคียงยกเว้นผักแคระ และพบไวรัสในกลุ่ม potyvirus group 3 ชนิด ในตัวอย่างถั่วฝักยาวโดย PCR product ที่ได้ band ที่ 1 มีขนาด 1182 bp band ที่ 2 มีขนาด 1219 bp band ที่ 3 มีขนาด 1259 bp และจากการเปรียบเทียบขนาดของ PCR product กับ จำนวนและลำดับ nucleotide base ของสมาชิกในกลุ่ม potyvirus group และอาการบน *Chenopodium amaranticolor* ทำให้สรุปได้ว่าเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายถั่วฝักยาวในแปลงปลูกเป็น

การเข้าทำลายร่วมของเชื้อ CMV และสมาชิกของเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirusgroup ซึ่ง 2 ใน 3 ของเชื้อดังกล่าวคือเชื้อ bean yellow mosaic virus (BYMV) ซึ่งมีขนาด 1209 bp และ blackeye cowpea mosaic virus (BLCMV) ซึ่งมีขนาด 1242 bp ในขณะที่แตงกวาถูกเข้าทำลายโดยเชื้อ cucumber mosaic virus และเชื้อในกลุ่ม geminivirusgroup

จากการศึกษาพบว่าเชื้อ CMV จัดเป็นเชื้อปัญหาหลักพบอยู่ในตัวอย่างใบพืชที่ตรวจสอบเกือบทุกชนิดและมีการติดมากับเมล็ดถั่วฝักยาวที่ใช้ทำพันธุ์ เชื้อนี้สามารถเข้าทำลายทั้งในลักษณะเชื้อเดี่ยวหรือเข้าทำลายร่วม ซึ่งในกรณีหลังทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงขึ้นพบทั้งในแตงกวาที่เชื้อนี้เข้าทำลายร่วมกับเชื้อในกลุ่ม geminivirusgroup และในถั่วฝักยาวในแปลงปลูกซึ่งเป็นการเข้าทำลายร่วมของเชื้อ CMV และสมาชิกของเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirusgroup คือเชื้อ BYMV และ BLCMV การสำรวจพบชนิดของเพลี้ยอ่อน 2 ชนิด คือ *A. gossypii* และ *M. persicae* ซึ่งจัดเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อ CMV ในลักษณะ non - persistent และชนิดของวัชพืชและพืชข้างเคียง ซึ่งเป็นทั้งพืชอาหารของเพลี้ยอ่อนและพืชอาศัยของเชื้อ การแพร่ระบาดของเชื้อ CMV โดยตรงในกรณีของถั่วฝักยาวมาจากการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด ส่วนการเข้าทำลายของเชื้อในช่วงปลูกจะอาศัยเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะหลัก โดยดูดกินอาหารจากวัชพืช และพืชข้างเคียง ซึ่งเป็นแหล่งสะสมเชื้อข้ามฤดูปลูกทำให้เชื้อ CMV สามารถแพร่ระบาด อย่างต่อเนื่องและรุนแรง ในขณะที่เดียวกันเพลี้ยอ่อน 2 ชนิดนี้ยังเป็นแมลงพาหะของเชื้อ BYMV และ BLCMV และแมลงห้ำหิวพาหะของเชื้อไวรัสในกลุ่ม geminivirusgroup ซึ่งเข้าทำลายได้ทั้งถั่วฝักยาวและแตงกวาในแปลงปลูกพืชสลับของอำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรีที่มีพืชเหล่านี้ปลูกเหลื่อมเวลาคดกปี

Thesis Title	RELATIONSHIP OF VIRUSES AND DISEASE EPIDEMIC IN ALTERNATE CUCUMBER WITH YARD LONG BEAN CROP AFTER RICE
Student	Mr. Komsorn Sangjinda
Student ID	44066307
Degree	Master of Science
Programme	Pest Management
Year	2006
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Nualpan Ngamyeesoon

ABSTRACT

Relationship of viruses on disease epidemic in alternate cucumber and yard long bean crop after rice in Banlard district; Petchaburi province was demonstrated by survey of virus diseases and insects on yard long bean, cucumber, weeds and adjacent plants throughout the year; mode of disease transmission and diagnosis for efficient methods of disease control. Survey of virus diseases on yard long bean, cucumber, weeds and adjacent plants in field after rice growing season were conducted. Seven different virus symptoms were found as follow ; 1) dark green banding along the veins with slightly blisters on leaves and leaf malformation, 2) dark green blisters and yellow mosaic with severe leaf distortion, 3) dark green vein netting, 4) yellow leaves with green mosaic along the vein with stunting growth, 5) malformation of leaves with narrow leaf and shoes-string like, 6) vein banding with rolling of leaves, 7) witches broom symptom. Whereas, on cucumber leaves three different symptoms revealed 1) yellow chlorosis with mosaic 2) slightly yellow leaves with green blisters and mosaic 3) yellow leaves with green blisters along the vein. Mechanical sap transmission of all diseased leaves to original plants was successful in yard long bean symptoms No.1- 6 of long yard bean, while in cucumber only mosaic symptom on leaves was tranferred. Moreover, transmission to *Chenopodium amaranticolor* was studied.

Virus-like symptoms found on weeds were vein netting on *Typhonium trilobatum*, yellow mosaic on *Amaranthus spinosus*, vein banding on *Euphorbia heterophylla*, yellow mosaic with leaf distortion on *Cleome gynandra*, mosaic on *Synedrella nodiflora* and stunted leaves on *Abutilon indicum*. On adjacent plants showed yellow mosaic and leaf distortion on *Ocimum basillicum* and *Solanum torvum*, yellow chlorosis mottle on *O. sanctum*, green mosaic

with crinkling of leaf on *Lycopersicon esculentum* and light green mosaic with leaf malformation on *Capsicum frutescens*. Moreover, the insects found throughout the year were white fly (*Bemisia tabaci*), aphids (*Aphis gossypii* and *Myzus persicae*), (*Nephotettix virescens*, *Nilaparvata lugens*, *Cyrtacanthacris tatarica* and *Micraspis* sp.

Study of virus transmission through seeds were demonstrated on 5 varieties of both yard long bean seeds and cucumber seeds named Kunsuk No. 7, Somboon Chok No.99, Phai Kwang 005, Lum Num Chee and Big 1 for yard long bean seeds and Mechai, Amazon, Atom, Amata 765 and Tammy for cucumber seeds. At 4 week age, there were 4 different virus symptoms detected on yard long bean seedlings. On primary leaves, light green patches with yellow leaves and leaf falling, vein netting and light green mottle were found, while on the first trifoliate leaves, yellow chlorosis with vein shrinking and leaf distortion was detected. Seed transmission percentage on yard long bean seeds was at 1-10.5%. On the contrary, no seed transmission was found on cucumber seeds.

Serological tests of virus infected cucumber and yard long bean leaves using ELISA technique with antiserum against geminivirus group and cucumber mosaic virus (CMV) were studied. The result showed that virus member belongs to geminivirus group infected all cucumber leaves, but not yard long bean leaves. While, CMV was found in all leaf samples tested. Electron microscopy study using leaf dip technique on infected yard long bean leaves got 2 types of virus particles. One was flexuous rods with 600-650 nm. in length and another was isometric with 30.38 nm. in diameter.

Molecular study and nucleic acid analysis using dsRNA detection and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with CMV primers, degenerate potyvirus group primers and cowpea aphid-borne mosaic virus primers were conducted. Detection of virus on all diseased plants included cucumbers, yard long beans, weeds, adjacent plants and virus transmission through seeds was performed by extraction and analysis of viral dsRNA. Confirmation of CMV was done by RT-PCR. The results showed that all diseased plants were infected by CMV except *Synedrella nodiflora*. Moreover realtime PCR study of infected long yard bean leaves with degenerate poty-group primers, revealed 3 specific bands amplified the variable 5'-terminal region of coat protein cistron together with the 3'-terminal region of the nuclear inclusion b protein cistron of potyviruses, suggesting the presence of 3 member of potyvirus. The RT-PCR product of these 3 bands were 1182 bp, 1219 bp and 1259 bp respectively, which closely corresponded to

bean yellow mosaic virus (BYMV) at 1209 bp. (band 2) and blackeye cowpea mosaic virus at 1242 bp. (BLCMV) (band 3).

The results, together with symptom on *Chenopodium amranticolor*, lead to conclude that yard long bean leaves were mix - infected with CMV and 3 virus members of potyvirus group, that 2 in 3 of these were BYMV and BLCMV. Whereas, cucumber leaves were dual-infected by CMV and virus member of geminivirus group.

The study pointed out that CMV was the major virus infected yard long beans, cucumber, weeds, adjacent plants and transmitted through seed. The virus could infect solely or mix infect with others, which cause more severe symptom. CMV was detected in both yard long beans with BYMV or/and BLCMV and cucumbers with geminivirusgroup. *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* were CMV vector in non-persistent manner, while infected weeds and adjacent plants were their host. The virus spreaded directly through yard long beans by infected seeds, whereas field infection was responsible by aphids, fed by weeds and adjacent plants which also were disease reservoir. That caused CMV spreading continuously and severely. Moreover, these 2 aphids also transmit BYMV and BLCMV, on the other hands white fly (*Bemisia tabaci*) transmit geminivirusgroup to both yard long beans and cucumbers. This is prolonged problem in Banlard district; Petchaburi province as long as farmers carry on growing yard long beans, cucumber and rice as alternate crops overlapping all year round.