บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

เสาวรส (Passion fruit) เป็นพันธุ์ไม้เลื้อยที่จัดอยู่ในตระกูล *Passifloraceae* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาต่อมาได้แพร่กระจายไปสู่ประเทศต่าง ๆ ในเขตร้อนและกึ่งร้อนทั่วโลก พบว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในออสเตรเลีย รัฐฮาวาย (สหรัฐอเมริกา) อเมริกาใต้ และบราซิล (Knight and Sauls, 1994) ในประเทศไทย มีผู้นำเมล็ดเสาวรสนี้เข้ามาปลูกในประเทศไทยครั้งแรกในปี พ.ศ. 2507 จึงได้นำมาปลูกที่มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์บางเขน และได้ขยายไปปลูกที่สถานีทดลองเกษตรที่สูง ดอยขุนช่างเคี่ยน จ.เชียงใหม่ ต่อมาได้มีผู้นำเมล็ดลูกผสมระหว่าง *Passiflora edulis* x *Passiflora flavicarpa* จากประเทศออสเตรเลียมาปลูกที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (อุทัย และ นิธิยา, 2525)

เสาวรสมีชื่อเรียกในภาษาไทยหลายชื่อ เช่น กะทกรกฝรั่ง ลูกร้อยรส ผลสิเหน่หา และสมเด็จพระเทพพระรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พระราชทาน นามว่า " กระทกรกยักษ์" (สมาน, 2528) เสาวรสที่นิยมปลูกกันมากในประเทศไทยมีอยู่ 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ผลสีม่วง (*Passiflora edulis* Sims.), พันธุ์ผลสีเหลืองทอง (*Passiflora flavicarpa* Deg.) และพันธุ์ลูกผสม F1 Hybrid (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) ซึ่งพันธุ์ลูกผสมนี้มีสีของผลหลายอย่าง เช่น สีม่วงแดง แสด เหลืองทอง และเหลือง (เอี่ยน, 2536) โดยพันธุ์ผลสีม่วงเมื่อผลสุกจะมีสีม่วงเข้มผิวเป็นมัน น้ำคั้นจากพันธุ์ผลสีม่วง มีรสชาติดีกว่าพันธุ์ผลสีเหลือง มีกรดต่ำ สีสวยและหวาน จึงเหมาะสำหรับรับประทานผลสด ข้อเสียของพันธุ์นี้คือ ค่อนข้างจะอ่อนแอต่อโรค พันธุ์ผลสีเหลืองเมื่อผลสุกจะมีสีเหลืองขมิ้น ผิวเป็นมัน น้ำคั้นของพันธุ์นี้มีกรดสูง ซึ่งมี pH ต่ำกว่า 3 เหมาะสำหรับส่งเข้าโรงงานเพื่อแปรรูปมากกว่าการรับประทานผลสด ข้อดีของพันธุ์นี้คือ ให้ผลดก และมีความต้านทานโรคและแมลงสูงกว่าพันธุ์ผลสีม่วง พันธุ์ลูกผสมเป็นพันธุ์ที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์ผลสีม่วงกับพันธุ์ผลสีเหลือง เพื่อคัดเลือกต้นพันธุ์ใหม่ที่รวมลักษณะผลที่เด่นของแต่ละพันธุ์ไว้ ทำให้มีลักษณะผลใหญ่ ให้ผลดก มีรกห่อหุ้ม เมล็ดมาก เปลือกบาง ต้านทานโรค และมีช่วงเวลาในการให้ผลที่ยาวนาน ให้ทั้งผลที่มีสีม่วงและผลสีเหลือง มีกลิ่นหอมกว่าพันธุ์อื่น ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับปลูกเพื่ออุตสาหกรรมการทำน้ำเสาวรส เพราะสามารถเก็บผลผลิตป้อนเข้าโรงงานได้ตลอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทั้งปี (วิภาพรรณ, 2547) เสาวรสเป็นผลไม้ชนิดใหม่ในประเทศไทย เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากเป็นผลไม้ที่มีรสเปรี้ยวและมีกลิ่นหอม น้ำที่สกัดได้จากผลมีความเป็นกรดสูงมาก จึงนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มที่มีคาร์บอเนตโดยนำมาเจือจางหรือผสมกับน้ำผลไม้อื่น ๆ เพื่อให้ได้รสชาติกลมกล่อมมากขึ้น (ธงชัย, 2533) เช่น พบว่าในอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง ใช้น้ำคั้นจากผลของเสาวรสประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ไปผสมปรุงแต่งรสชาติของสับปะรดบรรจุกระป๋อง หรือน้ำคั้นจากผลของเสาวรสเพียงอย่างเดียวบรรจุกระป๋องส่งไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา และกลุ่มประเทศประชาคมเศรษฐกิจยุโรป (เอี่ยน, 2536) เสาวรสยังสามารถที่จะนำเอามาแปรรูปเป็นแยม เยลลี่ เค้ก ไวน์ ไอศกรีม หรือรับประทานผลสด (ธงชัย, 2533) งานวิจัยของกรมวิชาการเกษตร ที่กำลังส่งเสริมให้ประชาชนปลูกและบริโภคเสาวรสกันมากขึ้นนั้นแนะนำอีกว่า เสาวรสเป็นผลไม้เพื่อสุขภาพ มีคุณค่าทางอาหารสูง คือ ส่วนเนื้อเสาวรสจำนวน 100 กรัม ประกอบด้วยแคลอรี่ 80-100 หน่วย, โปรตีน 2.25-2.50 กรัม, คาร์โบไฮเดรต 15-20 กรัม, ไขมัน 0.75-1.50 กรัม, แร่ธาตุ ต่าง ๆ 1.5-2.5 หน่วย, วิตามินเอ 500 หน่วยสากล, วิตามินบีรวม 1.5 มิลลิกรัม และวิตามินซี 20-30 มิลลิกรัม (สรัสวดี, 2532) เนื่องจากมีวิตามินเอและสารแคโรทีนอยด์ ช่วยการมองเห็น แก้โรคนอนไม่หลับ รักษาโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ ช่วยการทำงานของตับและไต (วิภาพรรณ, 2547) สรรพคุณของเสาวรสยังพบอีกว่าน้ำเสาวรสใช้ทาใบหน้าก่อนนอนทำให้ใบหน้าตึง ลดรอยเหี่ยวย่น มีวิตามินซีสูงช่วยป้องกันโรคหวัด โรคเลือดออกตามไรฟัน เปลือกของเสาวรส นำไปหมักเป็นปุ๋ยหมัก และใช้เลี้ยงสัตว์ นอกจากนี้ยอดเสาวรสนำไปแกงหรือจิ้มน้ำพริกได้ เมล็ดสกัดทำน้ำมันพืช ใช้ประโยชน์ในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น การผลิตน้ำมันพืช เครื่องสำอาง และทำเนยเทียม เสาวรสปลูกกันมากในหลายจังหวัดทางภาคเหนือ เพชรบูรณ์ ปราจีนบุรี จันทบุรี และระยอง (ธงชัย, 2533)

การปลูกเสาวรสเพื่อการค้า หรือส่งโรงงานส่วนใหญ่ปลูกโดยการใช้เมล็ด ซึ่งเป็นเมล็ดที่เหลือจากการผลิตน้ำผลไม้ เมล็ดที่นำไปเพาะจะงอกภายในระยะเวลา 2 - 4 สัปดาห์ หากเก็บไว้นานความงอกจะลดลง เมื่อนำไปปลูกในแปลง 4 - 5 เดือน เสาวรสจะเริ่มออกดอกและติดผล ระยะจากการออกดอกและติดผล จนเก็บเกี่ยว ใช้เวลาประมาณ 50 - 70 วัน การขยายพันธุ์โดยการปักชำและเสียบยอดจะทำให้ได้ต้นพืชที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์และให้ผลผลิตเร็วกว่าการปลูกโดยใช้เมล็ด การเสียบยอดนิยมใช้กับพันธุ์สีม่วงโดยใช้พันธุ์สีเหลืองเป็นต้นตอ (สำนักงานเกษตรจังหวัดชุมพร, 2547)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัจจุบันเสาวรสกำลังเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เนื่องจากเป็นผลไม้ที่มีประโยชน์ค่อนข้างสูง และใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง และยังเป็นพืชที่ปลูกได้ง่าย ให้ผลผลิตต่อไร่สูง ประกอบกับตลาดต่างประเทศมีความต้องการสูง สามารถทำรายได้ให้แก่เกษตรกรได้ดี ภาครัฐบาลและเอกชนจึงควรทำการส่งเสริมการปลูก การแปรรูปผลิตภัณฑ์ให้เป็นไม้ผลเศรษฐกิจ (วิภาพรรณ, 2547) สำหรับมูลนิธิโครงการหลวง เสาวรสเป็นพืชที่ได้รับการส่งเสริมให้มีการปลูกในหลายสถานีเพื่อส่งให้โรงงานอุตสาหกรรมและสำหรับรับประทานผลสด (เครือข่ายกาญจนาภิเษก, 2547) ซึ่งต้นพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกและส่งเสริมให้ปลูก มักจะประสบปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิต เนื่องจากเกิดโรคไวรัสเข้าทำลายต้นพืชและสามารถติดไปกับท่อนพันธุ์ทุกครั้งที่มีการขยายพันธุ์โดยการติดตา เสียบยอด หรือปักชำ (ดวงใจและคณะ, 2531)

โรคของเสาวรสสาเหตุจากเชื้อไวรัส

โรคของเสาวรสที่เกิดจากไวรัสที่สำคัญและรุนแรง คือ โรควูดิเนส (woodiness disease) ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่ม *Potyvirus* คือ Passionfruit woodiness virus (PWV) ทำให้เกิดอาการใบด่าง เส้นใบใส จุดด่างเหลือง จุดวงแหวน ใบเรียวยาว ลำต้นด่าง (Smith, 1972; Taylor and Kimble, 1964; Teakle and Wildermuth, 1967) ใบบิดหงิกงอคล้ายหนังสัตว์ (สรัสวดี, 2532) ผลด่าง เนื้อผลไม่เรียบ บิดเบี้ยว ผลขนาดเล็กกว่าปกติ เปลือกของผลจะหนา แข็งคล้ายเนื้อไม้ (woody) และผลผลิตลดลง (Taylor and Kimble, 1964) เชื้อสาเหตุของโรคนี้ถ่ายทอดโดยวิธีกล การทาบกิ่ง และโดยแมลงพาหะ *Aphis fabae, Aphis gossypii* (Taylor and Greber, 1973) *Myzus persicae* (Graca, 1975) ไม่ถ่ายทอดทางเมล็ด (Koizumi, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เชื้อ Cucumber mosaic virus (CMV) ในกลุ่ม *Cucumovirus* ทำให้เกิดโรควูดิเนส ซึ่งเชื้อไวรัสมีลักษณะอนุภาคกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 นาโนเมตร ทำให้เกิดอาการใบด่าง ใบด่างเหลือง ใบยอดบิดและหงิกงอ ผิวใบไม่เรียบ ผลบิดเบี้ยว ขนาดของผลเล็กลง เนื้อผลไม่เรียบ เชื้อ CMV นี้ถ่ายทอดโดยวิธีกล การทาบกิ่ง และแมลงพาหะ *Myzus persicae* (Smith, 1972) อาการของโรควูดิเนสนี้ ยังมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อ PWV ร่วมกับเชื้อ CMV ด้วย (Taylor and Kimble, 1964) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบเชื้อไวรัสชนิดอื่นในเสาวรส คือ Passiflora virus Y (*Potyvirus*) (Parry *et al*., 2004), Puerto Rican passionfruit virus (*Potyvirus*) (Niblett *et al*., 1991), Passionfruit leaf mottle (*geminivirus*) (Brown *et al*., 1993), Sri Lanka passionfruit mottle virus (*Potyvirus*) (Dassanayake and Hicks, 1992), Passionfruit

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

mottle virus (*Potyvirus*) (Chang, 1992), Passiflora ringspot virus (*Potyvirus*) (De Wijs, 1974), Passionfruit yellow mosaic virus (*Tymovirus*) (Crestani *et al*., 1986), Tomato ringspot virus (*Nepovirus*) (Koenig and Fribourg, 1986), Passionfruit vein-clearing (*Rhabdovirus*) (Kitajima and Crestani, 1985), Passionfruit nucleorhabdovirus (*Rhabdovirus*) (Brunt *et al*., 1996), Maracuja mosaic virus (*Tobamovirus*) และ Purple granadilla mosaic virus (*Tymovirus*) (Chagas *et al.*, 1984)

Niblett *et al*. (1991) รายงานว่าผลิตผลของเสาวรสใน Puerto Rico ลดลงมากเนื่องจากโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส สันนิษฐานว่าเชื้อสาเหตุคือ Puerto rican passionfruit virus (PRPV) ถ่ายทอดโดยวิธีกลและผ่านทางเพลี้ยอ่อน PRPV ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *Potyvirus* โดยอาศัย cytoplasmic inclusion bodies, ความยาวของอนุภาคและปฏิกิริยาการตอบสนองทางซีรัม ซึ่งต่างจาก PWV และ passionfruit mottle virus ในไต้หวัน จากปฏิกิริยาการตอบสนองของพืชอาศัย การตอบสนองทางซีรัม และโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค แสดงให้เห็นว่าเชื้อ PRPV อาจเป็นสายพันธุ์ของเชื้อ Watermelon mosaic virus 2 (WMV-2)

เชื้อไวรัส Passionfruit leaf mottle (PLM) จัดเป็นเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Geminivirus* พบครั้งแรกที่ Puerto Rico ในปี ค.ศ. 1991 ทำให้เสาวรสแสดงอาการเถาม้วนงอ รูปร่างผิดปกติ ใบและผลด่าง ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง เชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาว *Bemisia tabaci* (Gennadius) และการทาบกิ่ง แต่ไม่สามารถถ่ายทอดด้วยเพลี้ยอ่อน และพบว่าไวรัสชนิดนี้ไม่สามารถถ่ายทอดโดยการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่แตกต่างจากไวรัสกลุ่มอื่น (Brown *et al*., 1993)

Sri Lanka passionfruit mottle virus (SLPFMV) พบในเสาวรสสีเหลืองที่ใบแสดงอาการด่างแบบไม่มีขอบเขตชัดเจนและเปลี่ยนรูปไป พืชอาศัยที่แสดงอาการแบบเฉพาะแห่ง (local lesion) คือ *Chenopodium amaranticolor* และพืชอาศัยที่แสดงอาการแบบกระจายทั่วทั้งต้น (systemic infection) คือ *Passiflora foetida, Cassia occidentalis, Crotalaria usaramoensis* และ *Nicotiana clevelandii* พบว่า SLPFMV ถ่ายทอดโดย *Myzus persicae, Aphis gossypii, A. craccivora* และ *A. spiraecola* ความสัมพันธ์แบบไม่ถาวร (non-persistent) ถ่ายทอดโดยการทาบกิ่ง และการปลูกเชื้อโดยวิธีกล คุณสมบัติทางกายภาพพบว่า ช่วงอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อไวรัสเสื่อมคุณสมบัติ (Thermal inactivation Point, TIP) 70-75 องศาเซลเซียส (10 นาที), การเจือจางเพื่อหา Dilution end-point (DEP) 10^{-5}-10^{-6}, และความคงทนของเชื้อไวรัสในน้ำคั้นที่เก็บไว้ในระดับอุณหภูมิห้อง (longevity *in vitro*, LIV) 6-7 วัน (20-23 องศา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลเซียส) ภายในไซโตพลาสซึมพบ crystalline cylindrical inclusion ความยาวอนุภาคประมาณ 841 นาโนเมตร กว้าง 13.1 นาโนเมตร (Dassanayake *et al*., 1992)

เชื้อไวรัส Passionfruit mottle virus ทำให้เสาวรสสีเหลืองแสดงอาการใบด่างแบบมีขอบเขตชัดเจน (mosaic) และจุดเนื้อเยื่อตาย *P. foetida* แสดงอาการด่างแบบไม่ชัดเจน (mottle) *N. benthamiana* แสดงอาการใบด่างแบบมีขอบเขตชัดเจน พืชที่อ่อนแอคือ common bean *(Phaseolus vulgaris* L. Sutter pink [Sp]) แสดงอาการใบด่างแบบมีขอบเขตชัดเจน (Chang, 1992)

Passiflora ringspot virus พบใน *P. edulis* f. *flavicarpa* จาก Ivory Coast ที่ใบแสดงอาการด่างแบบมีขอบเขตชัดเจน ใบมีลักษณะผิดรูปไป และพบอาการจุดวงแหวน ถ่ายทอดโดยแมลงพาหะคือ *A. gossypii, A. spiraecola* โดยมีความสัมพันธ์แบบไม่ถาวร มีการปลูกเชื้อแบบวิธีกล ไม่พบว่ามีการถ่ายทอดทางเมล็ด พืชอาศัยที่แสดงอาการแผลเฉพาะแห่ง คือ *C. amaranticolor* พืชอาศัยที่แสดงอาการแบบกระจายทั่วทั้งต้น คือ *Cassia occidentalis* คุณสมบัติทางกายภาพ LIV 12 วัน DEP 10^{-3}- 10^{-4} มีอนุภาคลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous) ความยาวประมาณ 810 นาโนเมตร กว้าง 15 นาโนเมตร (Brunt *et al*., 1996)

เชื้อ Passionfruit yellow mosaic virus เข้าทำลายเสาวรสพันธุ์สีเหลืองในประเทศบราซิลทำให้แสดงอาการ blight yellow mosaic และมีอาการใบย่น หงิกงอ เชื้อสามารถถ่ายทอดโดยวิธีกล พืชที่อ่อนแอต่อเชื้อนี้คือพืชตระกูล *Passiflora* ได้แก่ *P. edulis, P. edulis* f. *flavicarpa, P. coerulea, P. serrato-digitata* และ *Passiflora* spp. แมลงพาหะคือ *Diabrotica speciosa* ความสัมพันธ์แบบไม่ถาวร คุณสมบัติทางกายภาพ TIP 50-55 องศาเซลเซียส (10 นาที) DEP 10^{-3}-10^{-4} LIV 8 วัน (ที่อุณหภูมิห้อง) อนุภาคมีรูปร่างแบบ isometric เส้นผ่านศูนย์กลาง 25-30 นาโนเมตร (Crestani *et al*., 1986) พบอนุภาคไวรัสในทุกส่วนของพืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย (Brunt *et al*., 1996)

เชื้อ Tomato ringspot virus เข้าทำลายเสาวรสพันธุ์สีม่วง (*P. edulis* Sims: Spanich: maracuya') ที่ปลูกทางตอนเหนือของประเทศเปรูทำให้แสดงอาการใบจุดวงแหวนและใบด่างแบบมีขอบเขตชัดเจน การปลูกเชื้อโดยวิธีกล พืชที่แสดงอาการแบบกระจายทั่วทั้งต้นคือ *Gomphrena globosa L., Impatiens balsamina* L., *C. amaranticolor, C. murale* L., *C. quinoa, Helianthus annuus* L., *Helichrysum bracteatum* Andr., *Zinnia elegans* Jacq., *Cucumis sativus* L., *Cyclanthera pedata* Schrad., *Salvia splendens* Ker-Gawl, *P. edulis* Sims., *Sesamum indicum* L., *N. benthamiana, N. tabacum* L. *Samsun* และ *Physalis floridana* Rybd. (Koenig and Fribourg, 1986)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

พืชที่แสดงอาการแบบจุดเนื้อเยื่อตายเฉพาะแห่ง ตามด้วยอาการปลายยอดแห้งตาย (top necrosis) หลังการปลูกเชื้อโดยวิธีกล คือ *C. amaranticolor* และ *C. quinoa* พืชที่แสดงอาการจุดเนื้อเยื่อตายแบบทั่วทั้งต้น และจุดวงแหวนกระจายทั่วทั้งต้น คือ *Cucumis sativus* พืชที่แสดงอาการจุดเนื้อเยื่อตายแบบแผลเฉพาะแห่งและกระจายทั่วทั้งต้นคือ *Phaseolus vulgaris* Monroe ส่วนพืชที่แสดงอาการเฉพาะแห่งคือ *Cucurbita maxima* Duch., *C. pepo* L., *Lagenaria siceraria* (Molina) Stard 1., *Luffa acutangular* Roxb., *P. vulgaris* L. Pinto, *Datura* metal L., *Lycopersicon pimpinellifolium* (Jusl.) Mill., *N. glutinosa* L. และ *Solanum tuberosum* subsp. *tubeerosum* x subsp. *Andigena* Mariva, Tomasa Condemayta และ Yungay คุณสมบัติทางกายภาพ TIP 55-60 องศาเซลเซียส DEP 10^{-4}- 10^{-5} และ LIV 7-9 วัน (22 องศาเซลเซียส) อนุภาคแบบ isometric เส้นผ่านศูนย์กลาง 25-30 นาโนเมตร (Koenig and Fribourg, 1986)

Passionfruit vein-clearing พบในเสาวรสสีเหลือง ประเทศบราซิล พบว่าเมื่อเชื้อเข้าทำลายเสาวรส จะแสดงอาการเส้นกลางใบใสและเส้นใบมีสีซีดจาง ผลมีลักษณะเปลี่ยนรูป บางครั้งพบอาการเปลือกหนาและแข็งคล้ายเนื้อไม้ ผลผลิตลดลง ส่วน Passionfruit nucleorhabdovirus พบใน *P. edulis* จากออสเตรเลีย ทำให้แสดงอาการใบด่างแบบมีขอบเขตชัดเจน ใบหงิกงอ และเปลี่ยนรูปไป พบการเข้าทำลายร่วมกับ PWV ถ่ายทอดโดยการทาบกิ่งอนุภาคแบบ bullet-shape ความยาว 250 นาโนเมตร ความกว้าง 68 นาโนเมตร พบอนุภาคในมีโซฟิลล์ ไซโตพลาสซึม และนิวเคลียส สำหรับเชื้อ Maracuja mosaic virus พบใน *P. edulis* จากประเทศเปรู ที่แสดงอาการใบด่างแบบมีขอบเขตชัดเจน และใบบิดม้วน ย่น และหงิกงอ ถ่ายทอดโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล พืชอาศัยที่แสดงอาการเฉพาะแห่งคือ *C. amaranticolor, C. quinoa, N. tabacum* และ *Cucumis sativus* พืชอาศัยที่แสดงอาการแบบกระจายทั่วทั้งต้นคือ *N. benthamiana* คุณสมบัติทางกายภาพ TIP 90 องศาเซลเซียส LIV 9 วัน และ DEP 10^{-10} (ใน *C. quinoa*) รูปร่างอนุภาคแบบแท่ง ความยาว 304 นาโนเมตร กว้าง 18 นาโนเมตร พบอนุภาคไวรัสในมีโซฟิลล์ เยื่อบุผิวชั้นนอก ท่อลำเลียงชั้นพาเรงไคมา และท่อลำเลียงน้ำ (Brunt *et al*., 1996)

Purple granadilla mosaic virus พบใน *P. edulis* Sims ที่แสดงอาการ cyclically ในประเทศบราซิล ถ่ายทอดโดยแมลงพาหะคือ *Diabrotica speciosa* ความสัมพันธ์แบบไม่ถาวร ถ่ายทอดโดยวิธีกลและการทาบกิ่ง คุณสมบัติทางกายภาพ TIP 60-65 องศาเซลเซียส LIV 7 วัน และ DEP 10^{-5} อนุภาคแบบ isometric เส้นผ่านศูนย์กลาง 30 นาโนเมตร อนุภาคมีกรดนิวคลีอิก 15 เปอร์เซ็นต์ พบอนุภาคไวรัสในทุกส่วนของพืชอาศัย (Brunt *et al*., 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คุณสมบัติของ *Potyvirus*

ไวรัสกลุ่ม *Potyvirus* จัดอยู่ในวงศ์ *Potyviridae* โดยไวรัสกลุ่มนี้ส่วนใหญ่คือสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดความเสียหายในพืช (DPVWeb Home Page, 2005) มีจีโนมเป็นแบบ monopartite มีกรดนิวคลีอิกเป็นแบบสายบวก เส้นเดี่ยว (single-stranded positive sense RNA) ไม่มีเยื่อหุ้ม (non-enveloped) จีโนมทั้งหมดขนาดประมาณ 9700 นิวคลีโอไทด์ กำหนดการสังเคราะห์โพลี่โปรตีนเพียงชนิดเดียว (single polyprotein) ซึ่งกำหนดการสังเคราะห์ผลผลิตอย่างน้อย 8 ชนิด บางครั้งพบมีการสังเคราะห์ได้ถึง 10 ชนิดที่ตำแหน่งปลาย 3' ของโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (coat protein) โดยมีการจัดชนิดของจีโนมดังนี้ (ICTVdB Descriptions, 2003)

ชนิดของจีโนม	**ขนาด (kDa)**	**หน้าที่**
P1 Protein	32.4	ไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน
HC-Pro	51.9	helper component (insect transmission)
P3 Protein	41.5	ไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน
6K1	6.0	ไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน
CI	71.4	กำหนดการสังเคราะห์โปรตีน cylindrical inclusion ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายโครงสร้างอาร์เอ็นเอจากเซลล์สู่เซลล์ (cell to cell movement)
6K2	5.5	ไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน
VPg	21.7	Genome – linked protein
NIa-pro	27.7	กำหนดการสังเคราะห์ Nuclear Inclusion Proteinase
NIb	59.8	กำหนดการสังเคราะห์ Nuclear Inclusion Polymerase
CP	29.8	กำหนดการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

PWV เป็นเชื้อไวรัสสาเหตุหลักที่เข้าทำลายเสาวรสจัดอยู่ในกลุ่ม *Potyvirus* มีรายงานพบครั้งแรกที่รัฐควีนแลนด์ นิวเซาท์เวลส์ และออสเตรเลียตะวันตก ประเทศออสเตรเลีย (Taylor and Kimble, 1964) ส่วนในประเทศไทย ดวงใจและคณะ (2529) ได้ศึกษาและสำรวจโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสของเสาวรสที่บริษัทสยามอุตสาหกรรม จ.ระยอง ในปี 2528-2529 พบลักษณะอาการใบด่างถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และทำให้ผลผลิตลดลงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าเชื้อสาเหตุของโรคคือ PWV

คุณสมบัติของ PWV

ลักษณะทางสัณฐาน

อนุภาค PWV มีรูปร่างแบบท่อนยาวคด ไม่มีเยื่อหุ้ม ขนาดยาวประมาณ 670-745 นาโนเมตร กว้าง 12 นาโนเมตร (Taylor and Greber, 1973)

คุณสมบัติทางกายภาพ

ในประเทศญี่ปุ่น Iwai *et al*. (1996) ทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของ PWV isolate AO พบว่า ช่วงอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อไวรัสเสื่อมคุณสมบัติ (TIP) 55- 60 องศาเซลเซียส การเจือจางเพื่อหา Dilution end-point (DEP) อยู่ในช่วง 10^{-4}-10^{-5} และความคงทนของเชื้อไวรัสในน้ำคั้นที่เก็บไว้ในระดับอุณหภูมิห้อง (LIV) 2-3 วัน ในขณะที่ประเทศไทย วันทนีย์ (2545) ทำการศึกษาคุณสมบัติของ PWV จากตัวอย่างเสาวรสในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่า TIP เท่ากับ 55- 60 องศาเซลเซียส DEP อยู่ในช่วง 10^{-4}-10^{-5} และ LIV 3-4 วัน

พืชอาศัยและลักษณะอาการ

PWV สามารถเข้าทำลายพืชใบเลี้ยงคู่ได้ทั้งหมด 44 ชนิด ใน 5 วงศ์ (Taylor and Kimble, 1964; Teakle and Wildermuth, 1967) สำหรับพืชอาศัยประกอบด้วยพืชในกลุ่ม *Passiflora* จำนวน 10 ชนิด และ *Leguminosae* จำนวน 18 ชนิด (ICTVdB Descriptions, 2003)

การทดสอบพืชอาศัยนั้นพบว่า PWV สายพันธุ์จากไต้หวัน เมื่อปลูกเชื้อด้วยวิธีกล ทำให้เกิดอาการแบบแผลเฉพาะแห่งใน *C. amaranticolor*, *C. quinoa* และ French bean บางพันธุ์ ซึ่ง *C. amaranticolor* และ *C. quinoa* แสดงอาการจุดเนื้อเยื่อตายบนใบบริเวณที่ปลูกเชื้อหลังจากปลูกเชื้อ 4-7 วัน French bean 13 พันธุ์ (Black Wax Pencil Pod, Bountiful, Dwarf Green Stringless, Golden Wax Improved, Jalo, Kentucky Wonder Bush, Pinto 111, Rosinha, Round Pod kidney Wax, Rico 23, Scarlet Runner, Stringless Green Pod,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Sujinashi Edogaxa) แสดงอาการจุดเนื้อเยื่อตายบนใบหลังจากปลูกเชื้อโดยวิธีกล 5-14 วัน ส่วน French bean พันธุ์อื่น ๆ อีก 8 พันธุ์คือ Black Turtle Soup, Blue Lake Pole, Pea Green, Romano, Royal Burgundy, Snow Crop Nerine, Tendergreen Stringless, Top Crop ไม่พบแสดงอาการ สำหรับมะเขือม่วง (*Solanum melongena* L.) cv. Kurume Ohnaga แสดงอาการเล็กน้อย แต่มีเชื้อไวรัสบนใบที่ปลูกเชื้อ การปลูกเชื้อ PWV สายพันธุ์นี้ด้วยวิธีกล ทำให้เกิดการเข้าทำลายแบบกระจายทั่วทั้งต้นใน passion-flower (*Passiflora caerulea* L.) แสดงอาการใบด่างแบบมีขอบเขตชัดเจน 40-60 วันหลังจากปลูกเชื้อ และ *Passiflora foetida* แสดงอาการใบด่างแบบไม่มีขอบเขตชัดเจน 10-14 วันหลังจากปลูกเชื้อ (Iwai *et al*., 1996)

โปรตีน

พบโครงสร้างโปรตีนของไวรัสเพียงชนิดเดียวโดยโปรตีนที่พบนั้นมีขนาด 33000 Da เมื่อทำการศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์พืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย (cytopathology) พบอนุภาคไวรัสอยู่ในมีโซฟิลล์ และท่อลำเลียงพาเรงไคมาในไซโตพลาสซึม (ICTVdB Index of Viruses, 2003) และภายในเซลล์ที่ถูกไวรัสเข้าทำลายยังพบ inclusion body 2 แบบ คือ pinwheel inclusion และ scroll inclusion พบในไซโตพลาสซึมของใบเสาวรสที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย (Iwai *et al*., 1996)

คุณสมบัติทางซีรัมวิทยา

พบว่า PWV มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาใกล้เคียงกับอนุภาค passiflora ringspot virus, bean common mosaic virus และ potato Y viruses (ICTVdB Index of Viruses, 2003)

Iwai *et al.* (1996) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทางซีรัมวิทยาระหว่างไอโซเลท Passionfruit woodiness virus Amani Ohshima (PWV-AO) กับแอนติซีรัมต่อไอโซเลท PWV-Brazilian (PWV-B), Soybean mosaic virus (SbMV) และ Watermelon mosaic virus-2 (WMV-2) จากผลการศึกษาพบว่า PWV-AO มีคุณสมบัติทางซีรัมวิทยาคล้ายกันกับ PWV-B มากที่สุด แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับ SbMV และ WMV-2 แสดงว่ามีความสัมพันธ์แตกต่างกันทางซีรัมวิทยา

การตรวจหาไวรัสในพืชมีความสำคัญมากในการป้องกันโรคระบาดที่เกิดขึ้นกับพืชเศรษฐกิจ เนื่องจากวิธีการป้องกันโรคระบาดไวรัสที่ดีที่สุด คือ การกำจัดพืชที่เป็นโรคออกจากแปลงเพาะปลูกโดยเร็วที่สุดก่อนที่พืชนั้นจะกลายเป็นแหล่งแพร่ไวรัสต่อไป วิธีการป้องกันอีกวิธีหนึ่งที่สามารถทำได้ คือ การผลิตพืชปลอดไวรัส ดังนั้นการตรวจสอบไวรัสในพืชก่อนที่จะนำไปปลูกในแปลงปลูกใหม่จึงมีความสำคัญมาก

ปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านอณูชีวโมเลกุลเข้ามามีบทบาทในการศึกษาทางด้านโรคพืชมากขึ้นโดยพบว่าเทคนิค PCR ถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคพืชและโรคแมลงที่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ความสำคัญทางเศรษฐกิจ การศึกษารูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) แบบต่าง ๆ ของเชื้อสาเหตุโรคต่าง ๆ เพื่อให้ทราบถึงลักษณะทางพันธุกรรม ใช้ประโยชน์ทั้งด้านการจัดจำแนกอนุกรมวิธาน และศึกษาวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) ซึ่งนำไปสู่การวิเคราะห์ศึกษาด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช เป็นต้น (เพชรรัตน์, 2545)

เทคนิค PCR

PCR เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมาจากบางส่วนของสายดีเอ็นเอขนาดยาวที่ใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) โดยใช้ระยะเวลาอันสั้น ซึ่งกระบวนการต่าง ๆ เลียนแบบการจำลองตัวเองของสายดีเอ็นเอในสภาพธรรมชาติ (*in vivo* DNA replication) จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนในการทำงานและการใช้เวลาน้อย ต่อมาได้มีการพัฒนาปรับปรุงในหลาย ๆ ด้านเพื่อให้วิธีการปฏิบัติงานง่ายขึ้น แม้แต่การจำแนกและเพิ่มปริมาณลำดับเบสของอาร์เอ็นเอก็สามารถทำได้โดยการใช้ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ Reverse Transcriptase เปลี่ยนให้เป็นต้นแบบ cDNA ก่อน ซึ่งเรียกว่า RT-PCR (เพชรรัตน์, 2545)

เทคนิค RT-PCR

เทคนิค RT-PCR เป็นการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR อีกวิธีหนึ่ง ซึ่งสามารถสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการจากอาร์เอ็นเอต้นแบบ ทำให้มีการพัฒนาวิธีดังกล่าวเพื่อตรวจสอบไวรัสที่มีกรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอ ทั้งในเนื้อเยื่อพืชและแมลงพาหะ (ปรียพรรณ, 2543) การตรวจสอบไวรัสด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพสูง สามารถตรวจไวรัสที่มีปริมาณน้อยได้ดีกว่าวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ถึง 10,000 เท่า ในไวรัสบางชนิด เช่น potato leaf roll virus (PLRV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Nepovirus* (Van den Heuvel and Peters, 1989; Rowhani *et al*., 1995) พัฒนาเทคนิค RT-PCR เพื่อตรวจสอบไวรัสของไม้เนื้อแข็งในกลุ่ม *Nepovirus* เช่น cherry leaf roll virus (CLRV) และในกลุ่ม *Ilarvirus* เช่น Apple mosaic virus (ApMV) เป็นต้น สามารถตรวจพบไวรัสได้ในระดับเฟมโตกรัมและมีความไวกว่าวิธี ELISA 10-100 เท่า สำหรับ *Potyvirus* พบว่า Nagata *et al*. (2001) ใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบ Sweet Potato feathery mottle virus (SPFMV) ในมันเทศ

Mekuria *et al*. (2003) รายงานว่าวิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคพืชที่น่าเชื่อถือ มีความไวสูงและมีความจำเพาะเจาะจงนั้น พบว่า RT-PCR มีความไวสูงในการตรวจสอบ Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) และ Prune dwarf virus (PDV) ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แอลมอนด์ ประเทศออสเตรเลีย เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ซึ่งทั้ง PNRSV และ PDV จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันคือ *Ilarvirus* ซึ่งเชื้อทั้งสองชนิดเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อแอลมอนด์สายพันธุ์ที่ใช้ปลูกเป็นการค้าในประเทศออสเตรเลีย โดยพบว่าไม่สามารถตรวจพบ PDV ในแอลมอนด์ที่ปลูกในออสเตรเลียโดยวิธี ELISA ได้ เนื่องจากเกิด graft compatibility ในการทดลองเมื่อใช้การตรวจสอบ PDV ด้วยวิธี Multiplex RT-PCR พบว่าให้ผลลบ แต่เมื่อใช้วิธี RT-PCR ร่วมกับ nested PCR แล้วสามารถตรวจพบ PDV ได้ถึง 96 เปอร์เซนต์จากตัวอย่างแอลมอนด์ทั้งหมด 175 ตัวอย่าง จากผลการทดลองเห็นได้ชัดว่าการตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในพืชด้วยการใช้วิธี nested RT-PCR มีความไวสูงกว่าวิธี ELISA โดยสามารถตรวจพบไวรัสในพืชได้อย่างแม่นยำ

Rowhani *et al*. (1993) พัฒนาวิธีตรวจสอบ Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) อยู่ในกลุ่ม *Nepovirus* ด้วยวิธีพีซีอาร์ในเนื้อเยื่ออ่อนที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อ GFLV โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ 4 วิธี (วิธีที่หนึ่ง ใช้ SDS-phenol เป็นองค์ประกอบของ extraction buffer แล้วใช้ ethanol ในขั้นตอนการตกตะกอนอาร์เอ็นเอ วิธีที่สอง ใช้ SDS-phenol เป็นองค์ประกอบของ extraction buffer เช่นเดียวกัน แต่ใช้ LiCl ในการตกตะกอนอาร์เอ็นเอ วิธีที่สาม ใช้ polyvinyl polypyrrolidone [PVPP] เป็นองค์ประกอบของ extraction buffer แล้วตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย ethanol และวิธีที่สี่ ใช้ polyvinyl pyrrolidone [PVP 10] เป็นองค์ประกอบของ extraction bufferโดยใช้ sodium acetate ในขั้นตอนของการตกตะกอนอาร์เอ็นเอ) ในการสกัดตัวอย่างพืช คือ *Gomphrena globosa* ที่ปลูกเชื้อ GFLV แล้วจึงนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละวิธีไปทำปฏิกิริยา RT-PCR พบว่าวิธีที่หนึ่ง สอง และสาม ให้ผลเป็นลบ มีวิธีที่สี่เพียงวิธีเดียวเท่านั้นที่ให้ผลเป็นบวก ซึ่งจะนำไปใช้ในการตรวจสอบ GFLV ในเนื้อเยื่ออ่อน และเมื่อทำการเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างใบที่เป็นโรคกับใบปกติที่ค่าความเข้มข้น 1:200 ไม่สามารถตรวจพบ GFLV ได้ ส่วนการสกัดจากต้นอ่อนที่ปกติโดยเปรียบเทียบกับวิธีที่หนึ่งถึงวิธีที่สาม ผลที่ได้คือไม่สามารถตรวจพบ Genomic RNA ของเชื้อด้วยวิธี PCR แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดสามารถยับยั้งปฏิกิริยา reverse transcriptase หรือขั้นตอนการทำ PCR ได้ แต่การสกัดด้วยวิธีที่สี่ สามารถตรวจสอบ GFLV ในอ่อนได้ทุกพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ และสามารถตรวจพบได้ในเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายได้หลายชนิด เช่น จากใบ ยอด รากและเปลือกไม้ โดยการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์สามารถตรวจสอบได้ดีแม้ว่าจะมีอาร์เอ็นเอของไวรัสอยู่เพียง 128 เฟมโตกรัม

Dovas and Katis (2003) ทำการพัฒนาเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ ในการตรวจสอบ *Vitivirus* และ *Foveavirus* ในอ่อนเพื่อให้มีความไวและรวดเร็วในการตรวจสอบมากขึ้น ซึ่งในการทดลองใช้วิธี อาร์ที-พีซีอาร์แบบขั้นตอนเดียว (one-step RT-PCR) โดยใช้ degenerate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

deoxyinosine-substituted primers เพื่อเพิ่มปริมาณในตำแหน่ง RNA depended RNA polymerase (RdRp) region ของเชื้อสาเหตุไวรัสทั้งสองกลุ่ม จากนั้นจึงนำผลผลิตของ RT-PCR มาทำปฏิกิริยา nested-PCR เพื่อให้ได้ผลผลิตที่จำเพาะและมีความไวในการตรวจสอบมากขึ้น วิธีนี้ให้ผลที่เชื่อถือได้ในการตรวจสอบไวรัสทั้งสองชนิดในอุ่นและยังเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ประหยัด เหมาะกับการนำไปใช้ในการวิเคราะห์ที่มีจำนวนตัวอย่างปริมาณมาก

Jawdah (2002) ได้ทำการพัฒนาเทคนิคที่ให้ผลเชื่อถือได้และรวดเร็วในการตรวจสอบ Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Crinivirus* วงศ์ *Closteroviridae* มีรายงานว่าพบไวรัสชนิดนี้ในยุโรป (Celix *et al.*, 1996) ต่อมา Rubio *et al.* (2001) ทำการศึกษาไวรัสชนิดนี้จำนวน 71 ไอโซเลท จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคในประเทศจอร์แดน เลบานอน ซาอุดิอาระเบีย สเปน ตุรกี และ อเมริกาเหนือ พบว่าเชื้อไวรัสไอโซเลทเหล่านี้ แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยลักษณะอาการเริ่มจากเส้นใบด่างบริเวณส่วนกลางของใบ และอาการที่เป็นลักษณะใบเหลือง และมีอาการของโรครุนแรงมากขึ้น ในส่วนของผลมีลักษณะเหมือนปกติ แต่พบว่าสูญเสียมูลค่าของผลผลิตลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบพืชตระกูลแตง คือ แตงกวา น้ำเต้า และแตงไทย ที่แสดงอาการของโรคแล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยา RT-PCR ซึ่งผลการทดลองพบว่าเทคนิค RT-PCR สามารถตรวจสอบ CYSDV ในพืชทดสอบที่แสดงอาการใบเหลืองได้ และเป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็ว เชื่อถือได้ และง่ายต่อการตรวจสอบ นำไปสู่แนวทางในการป้องกันการระบาดของโรคต่อไป

สำหรับการศึกษาเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Potyvirus* มีรายงานว่าการศึกษาของ Nagata *et al.* (2001) ได้พัฒนาเทคนิคในการตรวจหาเชื้อ SPFMV สาเหตุของโรค Russet crack ในมันเทศ โดยเปรียบเทียบวิธีสกัดอาร์เอ็นเอของไวรัส 3 วิธี คือ ใช้ Guanidine thiocyanate-phenol (ISOGEN^{TM}), SDS-phenol หรือ CF-11 cellulose column พบว่าวิธีแรกให้ปริมาณของอาร์เอ็นเอทั้งหมดสูงสุด (39.0 ไมโครกรัม จากตัวอย่างพืช 0.1 กรัม) และใช้เวลาในการสกัดน้อยที่สุด ซึ่งทำให้เกิดประสิทธิภาพสูงในการสังเคราะห์ cDNA จากปฏิกิริยา reverse transcription จากการทดลองพบว่า การใช้เอนไซม์ AMV reverse transcriptase จากนั้นทำ PCR ด้วยการใช้เอนไซม์ r*Taq* DNA polymerase เป็นวิธีที่ให้ความไวสูง และสามารถตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอได้ ซึ่งวิธีนี้สามารถตรวจสอบไวรัสในตัวอย่างพืชได้ แม้จะมีปริมาณเพียง 0.2 พิโคกรัมจาก total RNA

ในการตรวจสอบเชื้อ Plum pox potyvirus (PPV) สาเหตุของโรค Sharka ในพืชกลุ่ม *Prunus* spp. (เช่น ท้อ พลัม และ บ๊วย) จากด่านกักกันพืช Australian Quarantine and Inspection Service (AQIS) ที่สนามบินนานาชาติซิดนีย์ ประเทศออสเตรเลีย โดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Davis *et al*. (2002) สามารถตรวจสอบ PPV ในตัวอย่างพืชจากส่วนใบ (leaf tissue) เปลือกไม้ (bark tissue) และ ส่วนผล (fruit peduncle) โดยใช้เทคนิค ELISA, RT-PCR และการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ให้ผลบวก เฉพาะตัวอย่างพืชที่ได้จากส่วนใบและเปลือกไม้ส่วนตัวอย่างที่ได้จากผลให้ผลเป็นลบ

สำหรับการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR ในส่วนของ Reverse transcription ใช้ Superscript Reverse Transcriptase (Gibco BRL) จากนั้นใช้ cDNA เป็นแม่แบบ สำหรับการทำ PCR เมื่อได้ผลผลิตของ PCR แล้ว นำไปตรวจสอบด้วยการทำอิเลคโตรโฟรีซิส (electrophoresis) พบแถบของดีเอ็นเอขนาด 243 คู่เบส (bp) โดยผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบ PPV ในตัวอย่างพืชจากส่วนผลด้วยวิธี RT-PCR แต่ไม่สามารถตรวจพบด้วยวิธี ELISA จากตัวอย่างดังกล่าว ซึ่งวิธี RT-PCR เป็นการตรวจสอบยืนยันในการตรวจหา PPV ของ AQIS ณ สนามบินนานาชาติซิดนีย์ ดังนั้นการตรวจหา PPV ในตัวอย่างพืชที่ได้จากส่วนของผลด้วยวิธี RT-PCR น่าจะเหมาะสมกว่าวิธีอื่น

Niimi *et al*. (2003) ทำการศึกษาเกี่ยวกับไวรัสที่พบในลิลลี่แต่ละชนิด (*Lilium* species) โดยทำการตรวจสอบเชื้อ CMV, lily symptomless virus (LSV) และ lily mottle virus (LMoV) ด้วยวิธี RT-PCR จากผลการศึกษาพบว่าเทคนิค RT-PCR นั้นมีความไวสูงกว่าวิธี ELISA ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสในลิลลี่ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองจากงานวิจัยอื่น ๆ พบว่าการตรวจสอบไวรัสด้วย RT-PCR มีความไวในการตรวจสอบสูงกว่าวิธี ELISA เช่นเดียวกัน (Rowhani *et al*., 1995; Franck *et al*., 1997; Hung *et al*., 2000) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเทคนิค RT-PCRให้ผลที่น่าเชื่อถือในการตรวจสอบไวรัสในลิลลี่มากกว่าวิธี ELISA

ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ยังพบอีกว่าไพรเมอร์คือส่วนสำคัญในการทำให้เกิดผลสำเร็จของปฏิกิริยาโดยต้องออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสที่ทราบชนิดแล้ว ในการศึกษานี้ใช้ degenerate primers ซึ่งออกแบบจากลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequences) ที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มของ CMV, LSV และ LMoV เปรียบเทียบจากหลาย ๆ สายพันธุ์ ในพืชชนิดต่าง ๆ โดยสามารถใช้ตรวจสอบไวรัสเหล่านี้แบบเฉพาะเจาะจงได้ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหาไวรัส (Routh *et al*., 1998) วิธีนี้ไม่เพียงแต่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจหาไวรัสชนิดอื่นในลิลลี่ แต่ยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบไวรัสในพืชชนิดอื่นได้เช่นกัน

การศึกษาไวรัสในเสาวรสพบว่า PWV ในประเทศไต้หวัน คือสาเหตุที่ก่อให้เกิดความเสียหายเป็นอย่างมากต่อผลผลิตเสาวรส การขาดความต้านทานโรคเป็นปัญหาที่ยากจะแก้ไข ดังนั้นวิธีการป้องกันโดยการใช้โปรตีนห่อหุ้ม (coat protein(CP)- mediated protection) เป็นวิธีที่ใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้ผลสำหรับใช้ควบคุม PWV โดยการศึกษาของ Yeh and Chu (1996) ได้แยก PWV สายพันธุ์จากไต้หวัน จากนั้นทำการโคลนยีนและหาลำดับเบสที่ตำแหน่งปลาย 3' (3'- terminal region) โคลนของ cDNA ประกอบด้วย 1623 นิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นส่วนของ NIb gene, entire CP gene และ complete 3'- noncoding region (Chen, 1992) จากการทดลองดังกล่าวลำดับเบสที่แปลรหัสเป็นโปรตีนห่อหุ้มของ PWV ถูกพัฒนาให้มี initiation codon และ leader sequence สำหรับการแปลรหัส (translation) ซึ่งถูกวิเคราะห์โดยวิธี *in vitro* transcription, *in vitro* translation และ immunoprecipitation โดยสามารถพัฒนาวิธีที่ทำให้เกิดยีนห่อหุ้มโปรตีนของ PWV อย่างถูกต้อง และมีผลต่อการแสดงออกของยีนคือ โปรตีนขนาด 36 kDa ซึ่งทำปฏิกิริยาต่อแอนติซีรัม (CP antiserum) ของ PWV ในการทดลองทำการถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มของ PWV เข้าไปในต้นยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) โดยกระบวนการ transformation ดังกล่าวใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ การวิเคราะห์พืชตัดแต่งพันธุกรรมที่ได้ใช้วิธี PCR ควบคู่กับ southern blotting พบแถบของดีเอ็นเอขนาด 0.7 กิโลเบส (kb) ซึ่งทำปฏิกิริยากับตัวตรวจ (probe) อย่างจำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มของ PWV ส่วนวิธี western blotting และ northern blotting ใช้ในการตรวจสอบ การแสดงออก (expression) ของยีนโปรตีนห่อหุ้มของ PWV

สำหรับต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายทอดยีนห่อหุ้มโปรตีนของ PWV นั้นพบว่า line w-6, 9, 10, 12, 14, 15 และ 16 เมื่อถูกปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นไวรัสจากพืชที่แสดงอาการของโรคที่มีความรุนแรงแตกต่างกัน พบว่าทุกต้นใน lines w-9, 10, 14 และ 15 ยังคงไม่แสดงอาการหลังจากปลูกเชื้อ 6 สัปดาห์ ส่วนใน line w-6 พบว่าบางต้นมีระยะที่แสดงพัฒนาการของโรคเกิดขึ้นภายใน 3-10 วัน ส่วน line w-12 พบว่าทุกต้นแสดงอาการเช่นเดียวกับชุดควบคุม สำหรับพืช lines w-9, 10, 14 และ 15 ถูกนำไปทดสอบโดยวิธี ELISA และวิธี bioassays เพื่อทดสอบอาการเฉพาะแห่งบนพืชอาศัย คือ *Chenopodium quinoa* และทดสอบอาการแบบทั่วทั้งต้นบน *N. benthamiana* โดยผลการทดสอบให้ผลลบคือ ไม่พบอาการทั้งสองแบบ แสดงให้เห็นว่าเป็นลักษณะของความต้านทานแบบสมบูรณ์ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ PWV จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มของ PWV สามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของ PWV ได้ ซึ่งเป็นต้นแบบ (model) สำหรับการสร้างต้นเสาวรสที่ได้รับการถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มเพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมโรควูดิเนสของเสาวรสต่อไป

นอกเหนือจากการผลิตต้นที่ต้านทานโรคแล้ว การผลิตต้นปลอดโรคก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจหาไวรัสในพืชด้วยวิธี RT-PCR เป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูง ซึ่งทำให้สามารถตรวจพบไวรัสได้แม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น เป็นทางเลือกใหม่ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การควบคุมโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส ลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเกษตรกรจากการระบาดของโรคได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved