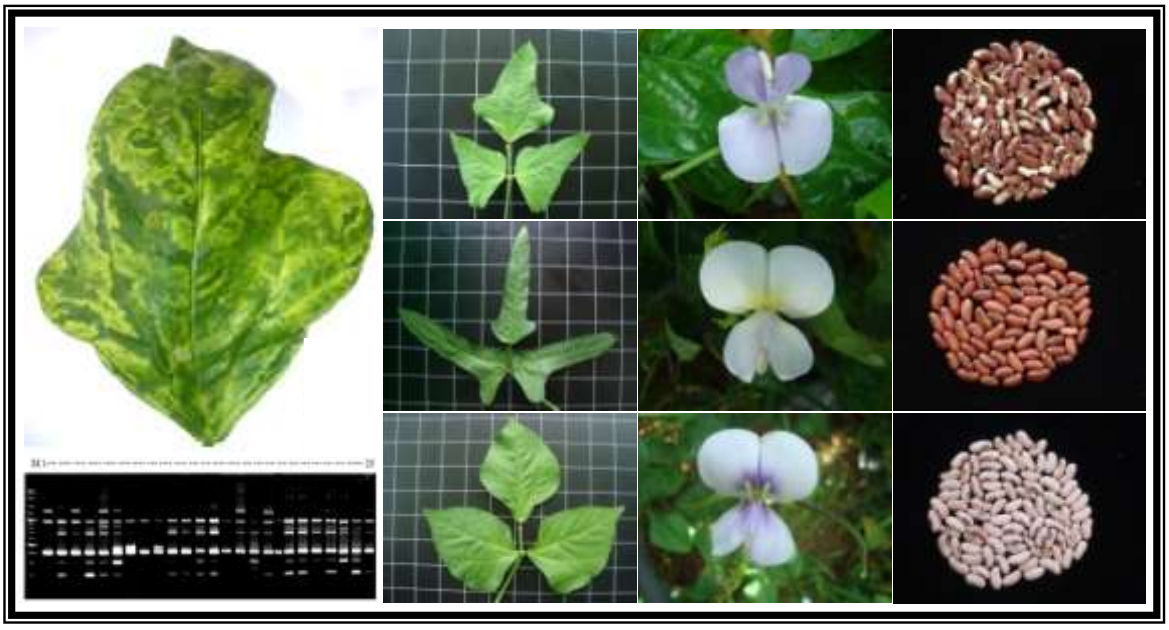
รายงานฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Vigna unguiculata* และการประเมินการต้านทานโรคใบด่างเหลือง BICMV



โดย

รศ.ดร. จรัสศรี นวลศรี

ดร. มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม

คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2556

Abstract

Yardlong bean and cowpea suffer from a wide range of harmful organisms, especially aphids such as cowpea aphid (*Aphis craccivora* Koch), which transmit many viral diseases, particularly *Blackeye Cowpea Mosaic Virus* (BICMV) and *Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus* (CAMBV). The objectives of this study were to analyse of qualitative and quantitative characteristics and screening for BICMV resistance of yardlong bean and cowpea accessions mostly collected from southern part of Thailand. In this study, we made analysis of qualitative and quantitative characterictics of 50 collected accessions. Qualitative characteristics were: growth habit, plant pigmentation, seed shape, eye color, flower color, terminal leaflet shape, pod curvature, immature pod pigmentation and mature pod pigmentation. The highest variability was found in immature and mature pod pigmentation. The eight following quantitative characteristics were recorded: days to flowering, terminal leaflet length, terminal leaflet width, pod length, pod weight, seed length and seed width. Results showed high significant differences in all quantitative characteristics. High variability was observed on important agronomic traits such as days to flowering, pod length and pod weight. Random Amplified Polymorphic DNA markers were further evaluated for relatedness among accessions. Based on banding pattern from 8 RAPD primers used, the RAPD markers have separated 50 accessions into 5 different clusters. Pairwise similarity index value ranged from 0.50-0.98. To develop serological diagnostic tools for the detection and screening of this crop species resistance to BICMV, the production of antibody is a necessity. The coat protein gene (*CP* gene) of BICMV was amplified and cloned into a bacterial expression vector (pQE-80L). The recombinant BICMV-CP was expressed as a fusion proteins containing a fragment of 6x His-tagged protein. Antiserum which gave highest antibody titer was chosen to investigate its ability to detect BICMV infected yardlong bean by indirect ELISA. The produced antiserum demonstrated specifically with BICMV infected plant without cross reaction with other virus species tested, including *Cucumber mosaic virus* (subgroup I and II) and *Cowpea mosaic virus*. Hence, antiserum against BICMV-CP recombinant protein can be used to detect the presence of virus in cowpea and yardlong bean breeding programs. Evaluation for BICMV resistance was carried out by visual symptoms and confirmed by indirect ELISA method. Results indicated that out of 50 accessions studied, only two accessions; Trang 1 and Taitor were resistant to BICMV and these accessions will be used in yardlong bean breeding program.

Keywords: *Vigna unguiculata,* Yardlong bean, cowpea, BIVCMV, resistant variety, Indirect ELISA, antiserum

บทคัดย่อ

การปลูกถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม มีแมลงศัตรูสำคัญ คือ เพลี้ยอ่อนถั่วซึ่งสามารถถ่ายทอดโรคที่เกิดจากไวรัสได้โดยเฉพาะ Blackeye Cowpea Mosaic Virus (BICMV) และ Cowpea Aphid-borne Mosaic Virus (CAMV) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อวิเคราะห์ลักษณะคุณภาพ ลักษณะปริมาณ พันธุกรรม และความต้านทานต่อการเข้าทำลายของ Blackeye Cowpea Mosaic Virus ในถั่วพุ่มและถั่วฝักยาวจำนวน 50 สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ในภาคใต้เป็นส่วนใหญ่ ลักษณะคุณภาพที่ศึกษาประกอบด้วย การเจริญเติบโตแบบเลื้อยหรือแบบพุ่ม สีลำต้น สีฝักขณะเก็บเกี่ยวและฝักแก่ สีดอก รูปร่างใบกลาง ลักษณะฝัก สีฝักขณะเก็บเกี่ยวและฝักแก่ ซึ่งพบว่าลักษณะที่มีความผันแปรสูงที่สุด คือ สีฝักขณะเก็บเกี่ยวและฝักแก่ ส่วนลักษณะปริมาณที่ศึกษามี 8 ลักษณะ ได้แก่ วันออกดอก ความยาวและความกว้างของใบกลาง ความยาวฝัก น้ำหนักฝัก ความกว้างและความยาวของเมล็ด ซึ่งพบว่าทุกลักษณะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ใกล้ชิดของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA) พบว่า จาก 8 ไพรเมอร์ที่ทดสอบ สามารถแบ่งกลุ่มพืชได้เป็น 5 กลุ่ม โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่าง 0.50-0.98 ในการศึกษาความต้านทานของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มต่อ BICMV มีความจำเป็นต้องทำการเพิ่มปริมาณและโคลนยีนเปลือกหุ้มโปรตีน (*CP* gene) ของ BICMV-CP ไปยังแบคทีเรียพาหะ (pQE-80L) และทำการวิเคราะห์การสังเคราะห์ BICMV-CP fusion proteins ที่ประกอบด้วยชิ้นส่วน 6X His-tagged protein ทำการผลิตแอนติบอดี ตรวจหาค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมด้วยวิธี Indirect ELISA เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบ ผลที่ได้พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความจำเพาะกับเชื้อ BICMV ในต้นพืชที่ศึกษาโดยไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ผลิตได้กับเชื้อไวรัสที่อยู่ในจีนัส *Cucumovirus* (sub group I และ II) และ Cowpea virus ดังนั้นจึงสามารถนำแอนติซีรัมนี้ มาใช้ในการตรวจสอบ BICMV สำหรับโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม ผลการตรวจสอบความต้านทานเชื้อ BICMV ในถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม 50 สายพันธุ์โดยใช้วิธี Indirect ELISA พบว่า มีถั่วฝักยาวเพียงสองสายพันธุ์เท่านั้นที่ต้านทาน BICMV คือ สายพันธุ์ตรัง 2 และท้ายต่อ ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วฝักยาวต่อไป

คำหลัก: *Vigna unguiculata* ถั่วฝักยาว ถั่วพุ่ม BIVCMV พันธุ์ต้านทาน Indirect ELISA แอนติซีรัม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
สารบัญ	ค
รายการตาราง	ง
รายการภาพ	จ
บทนำ	1
ตรวจเอกสาร	1
วิธีการดำเนินงาน	5
ผลและวิจารณ์การทดลอง	15
สรุป	59
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย	61
ภาคผนวก	64

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	พันธุ์และแหล่งตัวอย่างถั่วพุ่มและถั่วฝักยาวที่ใช้ในการศึกษา	15
2	ลักษณะคุณภาพของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม 50 พันธุ์	18
3	ลักษณะสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยางและถั่วพุ่มที่เก็บรวบรวมและใช้ในการศึกษา	35
4	ชนิดของไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอเหมือนกันและจำนวนดีเอ็นเอที่ต่างกัน จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวนทั้งหมด 50 สายพันธุ์	42
5	เชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มเป็นโรคที่เก็บจากแปลงปลูกและตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ anti-BICMV monoclonal antibody และ anti-CMV polyclonal Antibody	50
6	ผลการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อไวรัส ที่เข้าทำลายถั่วพุ่มด้วยวิธี indirect ELISA	55
7	ผลการประเมินความต้านทานเชื้อ BICMV ในถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์จากลักษณะอาการของโรคใบด่างเหลืองและทดสอบโดยใช้เทคนิค ELISA	57

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อาการของโรคที่เกิดจากไวรัสที่มักพบในแปลงปลูกถั่วฝักยาว	3
2	แสดงการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ BICMV-CP ขนาด 864 คู่เบส ในพลาสมิด pQE-80L expression vector	11
3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์	23
4	การกระจายตัวของลักษณะรูปแบบการเจริญเติบโตของต้น ในประชากรจำนวน 50 สายพันธุ์ของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่ทำการศึกษา	30
5	การกระจายตัวของลักษณะ terminal leaflet ในประชากรจำนวน 50 สายพันธุ์ของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่ทำการศึกษา	31
6	การกระจายตัวของลักษณะสีดอก ในประชากรจำนวน 50 สายพันธุ์ของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่ทำการศึกษา	31
7	การกระจายตัวของลักษณะสีฝัก ในประชากรจำนวน 50 สายพันธุ์ของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่ทำการศึกษา	32
8	การกระจายตัวของลักษณะรูปร่างเมล็ด ในประชากรจำนวน 50 สายพันธุ์ของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่ทำการศึกษา	33
9	การกระจายตัวของลักษณะสีเมล็ดในประชากรจำนวน 50 สายพันธุ์ของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่ทำการศึกษา	34
10	ระยะเวลาวันออกดอกของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์	35
11	ความยาวและความกว้างของใบกลาง (terminal leaflet) ถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ (A) ความยาวใบ (B) ความกว้างใบ	38
12	ความยาวฝักของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์	39
13	น้ำหนักฝักเฉลี่ยของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์	40
14	ความยาวเฉลี่ยของเมล็ดถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์	40
15	ความกว้างเฉลี่ยของเมล็ดถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์	41
16	ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPZ-08	43
17	ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPC-06	43
18	ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPR-09	44
19	ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPR-04	44
20	ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPR-03	45

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPR-12	45
22	ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPZ-13	46
23	ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPT-1	46
24	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม50 สายพันธุ์	47
25	ลักษณะอาการของพืชที่ติดเชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* ในสภาพแปลงและให้ผลเป็นบวกเมื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ anti-BICMV monoclonal antibody	49
26	ใบคีโนโปเดียม (*C. amaranticolor*) แสดงอาการแผลจุดสีเหลือง (chlorotic local lesion) บนใบที่ปลูกเชื้อด้วย *Blackeye cowpea mosaic virus* เป็นเวลา 7 วัน (ก); ใบยอดของต้นถั่วฝักยาวแสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อนและใบผิดรูปร่าง หลังจากได้รับเชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* เป็นเวลา 30 วัน	51
27	ผลผลิตดีเอ็นเอเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* ขนาดประมาณ 864 คู่เบส จากปฏิกิริยา RT- PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CACP1 และ CACP2**;** M คือ DNA marker (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas); ต้นถั่วพุ่มติดเชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* ในสภาพแปลงปลูก (ช่องที่ 1) และต้นถั่วฝักยาวติดเชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* ไอโซเลท PSU1 ที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ (ช่องที่ 2) ตามลำดับ	52
28	ลำดับกรดอะมิโนเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* (BICMV-CP)ไอโซเลท PSU1 ที่ศึกษาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโน BICMV-CP ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank ได้แก่ accession numbers AY575773, AF395678, AJ312438, AJ312437, AH004380 และ S66253 ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignmentด้วยโปรแกรม DNAMAN Sequence Analysis Software	52
29	การตรวจสอบการแสดงออกและการแยกสกัด BICMV-CP fusion proteins ที่สังเคราะห์ได้ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE ดังนี้ BICMV-CP fusion proteins ใน lysis buffer (ช่องที่ 1), BICMV-CP fusion proteins ที่แยกสกัดบริสุทธิ์ (ช่องที่ 2) และ M คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, Hanover, USA) (ก); การตรวจสอบ BICMV-CP fusion proteins โดยใช้ anti-BICMV MAb ด้วยวิธี indirect ELISA เปรียบเทียบกับต้นถั่วฝักยาวติดเชื้อ BICMV ไอโซเลท PSU1 หลุมที่มีสีเหลืองแสดงว่ามีอิพิโทปที่ anti-BICMV MAb สามารถทำปฏิกิริยาได้ (ข)	54
30	แสดงค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อ BICMV-CP fusion proteins ที่เก็บได้ในแต่ละครั้งจากเลือดกระต่าย	54

บทนำ

ในการปลูกถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม มักมีการเข้าทำลายของแมลงโดยเฉพาะเพลี้ยอ่อน ที่พบในทุกพื้นที่ปลูกนอกเหนือจากผลกระทบโดยตรงจากการทำลายของเพลี้ยอ่อนแล้ว เพลี้ยอ่อนยังเป็นแมลงพาหะของไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น Cowpea Aphid-borne Mosaic Virus (CABMV), Blackeye Cowpea Mosaic Virus (BICMV) และ Cucumber Mosaic Virus (CMV) เป็นต้น ไวรัสเหล่านี้ก่อให้เกิดโรคที่มีผลกระทบอย่างมากต่อผลผลิตของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม การระบาดอาจเกิดจากไวรัสชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดร่วมกัน ซึ่งมีผลให้เกิดความเสียหายมากขึ้น จากรายงานของ Taiwo และคณะ (2007) กล่าวว่า ถั่วพุ่มที่มีการเข้าทำลายของไวรัส ทำให้ผลผลิตลดลงตั้งแต่ 10-100% สำหรับในประเทศไทยพบว่าถั่วฝักยาวมีผลผลิตลดลง13-83% จากการเข้าทำลายของไวรัส BICMV และ CABMV (ธีระ, 2532) การควบคุมโรคทำได้ค่อนข้างยาก นอกจากนี้ไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคดังกล่าวยังสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้อีกด้วย จึงทำให้เป็นอุปสรรคสำคัญในการผลิตถั่วพุ่มและถั่วฝักยาว การใช้พันธุ์ต้านทานน่าจะเป็นวิธีการที่ดีที่สุดและมีประสิทธิภาพที่สุดสำหรับการลดความเสียหายจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส

ในต่างประเทศมีรายงานการต้านทานโรคที่เกิดจากไวรัสในถั่วพุ่มบางสายพันธุ์ ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มพันธุ์ท้องถิ่นจากแหล่งปลูกในภาคใต้ และนำมาศึกษาศักยภาพในการต้านทานการเข้าทำลายของไวรัส เปรียบกับพันธุ์อื่นๆ ที่มีอยู่แล้วจำนวนหนึ่ง จึงเป็นแนวทางของการใช้ประโยชน์จากแหล่งทรัพยากรที่มีความหลากหลายและนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มให้มีคุณสมบัติตามต้องการ คือ ผลผลิตสูง มีคุณภาพในการบริโภคและสามารถต้านทานโรคที่เกิดจากไวรัส

ตรวจเอกสาร

1. ข้อมูลทั่วไปของ Vigna unguiculata

Vigna unguiculata เป็นพืชในวงศ์ Leguminosae มีแหล่งกำเนิดในประเทศแถบแอฟริกาตะวันตก (Fery, 1985) ซึ่งต่อมามีการปลูกอย่างแพร่หลายในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีรายงานว่าศูนย์กลางความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *V. unguiculata* อยู่ทางตอนใต้และทางตะวันออกของทวีปแอฟริกา ปัจจุบันพบกระจายทั่วไปในประเทศเขตร้อน (Purseglove, 1977)

Purseglove (1977) แบ่งพืชในกลุ่ม *V. unguiculata* ได้เป็น 3 ชนิดดังนี้

1) ถั่วพุ่ม (*V. unguiculata* spp. *unguiculata*) เดิมคือ *V. sinensis* (L) Savi ex Skeels ลักษณะสำคัญ คือ มีการเจริญเติบโตเป็นแบบพุ่ม (determinate) มีฝักยาวปานกลาง ฝักแขวนห้อยลง เมล็ดรูปไต มีการปลูกถั่วพุ่มกระจายทั่วไป 60 ประเทศทั่วโลก ผลผลิตถั่วพุ่มมีประมาณ 3.6 ล้านตันในพื้นที่ปลูก 11.3 ล้านเฮกตาร์และประมาณ 80% ของพื้นที่การผลิต อยู่ในประเทศแถบแอฟริกา (Singh, 2003) ถั่วพุ่มเป็นพืชที่มีการบริโภคและใช้ประโยชน์ในหลายลักษณะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้เป็นแหล่งโปรตีนราคาถูก เพื่อทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ เนื่องจากถั่วพุ่มมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบถึง 24.80 เปอร์เซ็นต์ (Giami, 2005)

2) ถั่วฝักยาว *V. unguiculata* spp. *sesquipedalis* ถั่วฝักยาวมีลำต้นเถาเลื้อยพันตามค้างที่ปักตรงขึ้นไป ความสูงประมาณ 2-4 เมตร ฝักยาวประมาณ 30-40 เซนติเมตร บางพันธุ์อาจยาวถึง 1 เมตร ถั่วฝักยาวจะปลูกมากในเขตร้อนของทวีปอเมริกาและบริเวณแคริบเบียน (Tindall, 1983) ตอนกลาง

และตะวันออกของทวีปแอฟริกา (Singh *et al*., 1997 อ้างโดย Coulibaly *et al*., 2002) บางประเทศของทวีปเอเชีย เช่น ประเทศฟิลิปปินส์ ไต้หวัน จีน ไทย เป็นต้น (Splittstoesser, 1979) ถั่วฝักยาวนับเป็นพืชผักชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญของประเทศไทย

3) *Vigna unguiculata* spp. *catjang* มีฝักสั้นและตั้งตรง เมล็ดรูปกลมรีมีขนาดเล็ก ชนิดนี้ไม่ค่อยมีความสำคัญมากนัก

อย่างไรก็ตามจากหลักฐานลักษณะสัณฐานและการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ทำให้การแบ่งแยกชนิดของพืชกลุ่มนี้แตกต่างออกไป โดย Maxted และคณะ (2004) และ Pasquet (1996b) รายงานว่า *V. unguiculata* ประกอบด้วย 11 subspecies เป็นพันธุ์ป่าที่มีวัฏจักรแบบข้ามปี (perennial) 10 และมี 1 subspecies มีวัฏจักรเป็นพืชปีเดียว คือ subspecies *unguiculata* พืชใน subspecies *unguiculata* ยังประกอบด้วยกลุ่มพืชปลูก (var. *unguiculata*) และกลุ่มที่ยังเป็นพันธุ์ป่าอยู่ (var. *spontanea*) *V. unguiculata* ssp. *unguiculata* ยังสามารถแบ่งย่อยได้เป็น 5 กลุ่มย่อย ดังนี้ (Fang *et al*., 2007; Pasquet, 1996a).

- cultivar-group (cv-gr.) *Unguiculata* กลุ่มนี้ได้แก่ถั่วพุ่ม และ black-eye cowpea ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่สุดในกลุ่ม ส่วนใหญ่ใช้ประโยชน์จากการบริโภคเมล็ด หรือรับประทานเป็นผัก
- cultivar-group *Melanophthalmus* กลุ่มนี้ถูกแยกย่อยออกมาเนื่องจาก มีลักษณะของเปลือกเมล็ดบางและย่น ส่วนใหญ่มีการปลูกบริเวณทางตะวันตกของทวีปแอฟริกา
- cultivar-group *Biflora*: (catjang cowpea) ปลูกส่วนใหญ่แถบเอเชียใต้เช่น อินเดียและศรีลังกา ใช้ประโยชน์โดยบริโภคเมล็ด และทำพืชอาหารสัตว์โดยเฉพาะทำแห้ง และหมัก รวมทั้งใช้เป็นปุ๋ยพืชสด
- cultivar-group *Sesquipedalis*: ถั่วฝักยาว ความแตกต่างที่ชัดเจน คือ ฝักยาว และมีการเจริญเติบโตเป็นแบบเลื้อย บริโภคเป็นฝักสด
- cultivar-group *Textilis:* กลุ่มนี้ปลูกเพื่อใช้ประโยชน์เพื่อผลิตเส้นใยที่แยกมาจากก้านดอกที่ค่อนข้างยาว (Pasquet, 1998)

สำหรับประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ถั่วฝักยาวเป็นพืชในกลุ่ม *V. unguiculata* ที่มีความสำคัญที่สุด ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกถั่วฝักยาว 130,836.50 ไร่ ให้ผลผลิต 124,002.73 ตัน จังหวัดที่มีการปลูกถั่วฝักยาวมากที่สุด คือ จังหวัดราชบุรี มีพื้นที่ปลูก 18,996 ไร่ ให้ผลผลิต 26,584.65 ตัน รองลงมา คือ จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครราชสีมา มีพื้นที่ปลูก 7,517 และ 3,067 ไร่ และให้ผลผลิต 4,625 และ 3,067 ตัน ตามลำดับ สำหรับภาคใต้มีพื้นที่ปลูกถั่วฝักยาวทั้งสิ้น 31,319 ไร่ จังหวัดที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุดคือ จังหวัดนครศรีธรรมราช มีพื้นที่ปลูก 2,758 ไร่ รองลงมาคือ จังหวัดสุราษฎร์ธานี มีพื้นที่ปลูก 2,605 ไร่ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2550)

หนึ่งในข้อจำกัดของการปลูกถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มในประเทศ คือ การเข้าทำลายโดยโรคที่เกิดจากไวรัส ไวรัสที่ทำให้เกิดโรคของถั่วพุ่มมีประมาณ 20 ชนิดเท่าที่มีรายงานทั่วโลก (Thottappilly and Rossel, 1985) แต่ชนิดที่ร้ายแรงและเป็นปัญหาใหญ่ในการผลิตถั่วพุ่ม คือ Black eye cowpea mosaic virus (BICMV) และ cowpea aphid-borne mosaic virus (CBMV) (Bashir และ Hampton, 1996) ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค 2 ชนิดนี้สามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ดได้ (seed transmission virus) โดยมีเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะ

สำหรับประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคที่เกิดจากไวรัสทั้งสองชนิดในถั่วฝักยาวมาเป็นเวลานาน (Tsuchizaki *et al*., 1984)

2. โรคสำคัญจากไวรัสที่พบในถั่วพุ่มและถั่วฝักยาว

โรคที่สำคัญของการปลูกถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มส่วนใหญ่เกิดจากไวรัส (ภาพที่ 1) ซึ่งทำความเสียหายค่อนข้างมาก โรคจากไวรัสที่สำคัญมีดังนี้

- Cowpea yellow mosaic หรือโรคใบด่างเหลืองเป็นโรคที่ร้ายแรงมากโรคหนึ่งใน *Vigna unguiculata* โดยเฉพาะอย่างยิ่งถั่วฝักยาว ทำให้ผลผลิตลดลงถึง 13-83% โรคนี้เกิดจาก CABMV จัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus มีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexulous rod) มีความยาวเฉลี่ย 757 นาโนเมตร มีกรดนิวคลีอิคเป็นแบบดีเอ็นเอสายเดี่ยว ขนาดประมาณ 10 กิโลเบส อาการของโรค คือ ใบด่างเหลือง ใบอ่อนที่มีอาการรุนแรงจะมีใบสีเหลืองจนแทบไม่มีสีเขียวปน ใบม้วนงอ (ภาพที่ 1) ผลผลิตลดลงกว่าปกติมาก ไวรัสชนิดนี้สามารถถ่ายทอดทางเมล็ดได้ประมาณ 13% และสามารถถ่ายทอดผ่านแมลงโดยเฉพาะเพลี้ยอ่อนได้ถึง 27-63% (ธีระ, 2532)

- Blackeye cowpea mosaic ลักษณะอาการจะคล้ายคลึงกับ CABMV มีรายงานพบ BICMV ประเทศไทยประมาณ ปี 1980 (Tsuchizaki *et al*., 1984) BCMV เป็นกลุ่ม Potyviruses มีน้ำหนักโมเลกุลของ capsid protein ประมาณ 35 KDal การแพร่กระจายอาจผ่านทางเมล็ดหรือโดยแมลงพาหะเช่น เพลี้ยอ่อน เช่นกัน

- Cucumber mosaic โรคนี้ระบาดหนักในพืชตระกูลแตง แต่สามารถเข้าทำลายพืชได้ค่อนข้างกว้างขวาง พบไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคได้ในเมล็ดพันธุ์ถั่วพุ่มและสามารถติดต่อได้โดยมีแมลงเช่น เพลี้ยอ่อน เป็นพาหะ โดยทั่วไปนับว่าไม่เกิดโรครุนแรงในถั่วพุ่ม ยกเว้นพันธุ์ที่อ่อนแอจริงๆ เท่านั้น หรืออาจมีความรุนแรงหากมีไวรัสตัวอื่นเข้าทำลายร่วมกันเช่น BICMV (Anderson *et al*., 1994)

ภาพที่ 1 อาการของโรคที่เกิดจากไวรัสที่มักพบในแปลงปลูกถั่วฝักยาว

3. การตรวจสอบเชื้อไวรัส

วิธีการในการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่นิยมในปัจจุบัน ได้แก่ การตรวจสอบด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยาโดยใช้วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เนื่องจากเป็นวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ทำได้ง่ายและสามารถตรวจสอบพืชตัวอย่างได้คราวละมากๆ ให้ผลตรวจที่รวดเร็วและแม่นยำ (อโนมา และคณะ, 2551; Katoch และคณะ, 2003) และวิธีการตรวจสอบดังกล่าวสามารถใช้ได้ทั้งโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส (Porta และคณะ, 1989; Wahyuni *et al.,* 1992; Hsu *et al*., 2000; Haggag *et al*., 2009) โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสสูงกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี อย่างไรก็ตามโพลีโคลนอลแอนติบอดีก็ยังเป็นที่นิยมและมักถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสอยู่เสมอ เช่น CMV (Wahyuni *et al*., 1992) เนื่องจากเชื้อ CMV เป็นไวรัสที่สามารถเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่ายในสภาพแวดล้อม ซึ่งการกลายพันธุ์ดังกล่าวอาจมีผลโดยตรงต่ออีพิโทปบนผิวของไวรัส การใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีมีข้อดีตรงที่มีแอนติบอดีอยู่หลายชนิดในซีรัม ทำให้สามารถจับกับอีพิโทปที่อยู่บนผิวของไวรัสได้หลายรูปแบบ แม้จะต่างสายพันธุ์ ต่างพื้นที่และต่างพืชอาศัยก็ตาม เพราะไวรัสชนิดเดียวกันแม้จะมีความแตกต่างกันแต่ก็จะมีบางอีพิโทปที่เหมือนกัน (Roossinck, 2002)

4. การต้านทานของ *Vigna unguiculata* ต่อไวรัส

Singh และ Hughes (1999) รายงานว่ามีถั่วพุ่มหลายสายพันธุ์ที่ต้านทานโรค cowpea yellow mosaic, blackeye cowpea mosaic และ cowpea aphid borne mosaic เช่น ถั่วพุ่ม IT96D-659, IT96D-660, IT97K-1068-7 และ IT95K-52-34 Bashir และคณะ (1995) ทดสอบการต้านทานไวรัสของถั่วพุ่มหลายพันธุ์และพบว่าถั่วพุ่มพันธุ์ IT86F 2089-5, IT90K-284-2 และ IT90K-76 ค่อนข้างต้านทานต่อ blackeye cowpea mosaic Van-Boxtel และคณะ (2000) ทำการทดสอบถั่วพุ่ม 14 พันธุ์เพื่อตรวจสอบความต้านทานต่อไวรัส BCMV 3 strain และ CABMV 10 strain โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะหาสายพันธุ์ถั่วพุ่มที่สามารถต้านทานต่อไวรัสหลายชนิด ในพันธุ์เดียวกัน พบว่า สายพันธุ์ IT86D-880 และ IT86D-1010 สามารถต้านทาน BCMV ทั้ง 3 strain และยังต้านทาน CABMV อีก 5 strain

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ *Vigna unguiculata* อันได้แก่ ถั่วฝักยาว และถั่วพุ่ม พันธุ์ท้องถิ่นของภาคใต้ พันธุ์จากบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ และพันธุ์ที่เก็บรวบรวมจา ศูนย์วิจัยพืชผักแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ และทดสอบการต้านทานโรคใบด่างเหลืองที่เกิดจากไวรัส
2. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างพืชที่เก็บรวบรวมโดยใช้เครื่องหมาย RAPD
3. ผลิตโพลีโคลนแอนติซีรัมต่อเชื้อ BICMV
4. คัดเลือกพันธุ์ต้านทานเพื่อใช้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ถั่วฝักยาวเพื่อต้านทานโรคใบด่างเหลืองที่เกิดจาก BICMV
5. เพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรม *Vigna unguiculata* เป็นแหล่งความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อปรับปรุงพันธุ์ถั่วฝักยาว

วิธีการดำเนินงาน

1. การรวบรวมพันธุ์และการศึกษาลักษณะประจำพันธุ์

สำรวจแหล่งปลูกถั่วฝักยาวและ/หรือถั่วพุ่มในจังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ทั้งพันธุ์ปลูกและพันธุ์พื้นเมือง บันทึกแหล่งที่มาของพันธุ์ นอกเหนือจากพันธุ์เหล่านี้ยังรวมไปถึงเมล็ดพันธุ์อีก 24 พันธุ์จากหน่วยงานราชการที่รวบรวมพันธุ์ถั่วพุ่มและถั่วฝักยาว เช่น ศูนย์วิจัยพืชผักเมืองร้อนแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี และโครงการพระราชดำริเขาหินซ้อน อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา

นำเมล็ดพันธุ์ที่เก็บรวบรวม ปลูกเพื่อบันทึกลักษณะประจำพันธุ์ โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวนประมาณ 50 พันธุ์ 3 ซ้ำๆละ 1 แปลงๆละ 20 ต้น และเก็บบันทึกลักษณะทางเกษตรที่สำคัญ

2. ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย RAPD

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยใช้สารละลาย CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide) ซึ่งดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1990) โดยใช้ใบสดจากแต่ละต้นจำนวนประมาณ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักสด บดใน CTAB buffer (PVP-40, NaCl, EDTA 0.5 M pH 8.0, CTAB 2%) ร่วมกับ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2% ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในโกร่งให้ละเอียด จากนั้นใส่ในหลอดแอฟเพนดอร์ฟ เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก 10 นาที เติม isoamyl: chloroform (1:24) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดแอฟเพนดอร์ฟใหม่ เติม isoamyl: chloroform (1:24) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร อีกครั้ง ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดแอฟเพนดอร์ฟใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 750 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล ความเข้มข้น 70% ที่ผ่านการแช่เย็น 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 70 ไมโครลิตร [Tris-HCl (pH 7.5) 10 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA (pH 7.0) 1 มิลลิโมลาร์] ที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ ดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรส (LE Agarose; Promega, USA) เข้มข้น 0.7% แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Glacial acetic acid, EDTA 0.5 M, pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบ ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD ไพรเมอร์ ใช้ไพรเมอร์ 10 ไพรเมอร์ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ สภาพที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ใช้ความเข้มข้นของสารละลายต่างๆ ดังนี้ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ เอ็นไซม์ *Taq* polymerase เข้มข้น 1.5 ยูนิต 10X *Taq* บัฟเฟอร์ 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2.5 มิลลิ-โมลาร์ dNTP เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ตั้งอุณหภูมิเป็น 3 ระดับ คือ อุณหภูมิที่ใช้เริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 37 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวนทั้งสิ้น 41 รอบ และรอบสุดท้ายตามด้วย 72 องศา-

เซลเซียส อีก 5 นาที หลังทำพีซีอาร์ นำสารละลายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว จำนวน 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้น LE อะกาโรส ที่มีความเข้มข้น 1.5% ละลายใน TBE buffer (Tris Base, Boric acid, Na_2EDTA 0.5 โมลาร์; pH 8.0) ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ 60 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างน้ำ 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation ศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้ วิเคราะห์ผล แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ

3. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ BICMV

3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเชื้อ BICMV จากต้นถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) และต้นถั่วฝักยาว (*V. unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) จากแปลงปลูกในพื้นที่อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ลักษณะอาการของต้นถั่วพุ่มที่เก็บมาทำการศึกษา คือ อาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน เส้นใบเหลือง ใบม้วนงอผิดรูปร่าง และลำต้นแคระแกร็น สำหรับลักษณะอาการของต้นถั่วฝักยาวที่เก็บมาทำการศึกษา คือ อาการใบด่างสีเหลืองและสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบด่างเป็นแถบบริเวณเส้นใบและใบม้วนงอ

3.2 การตรวจสอบเชื้อ BICMV ในเบื้องต้นด้วยวิธี indirect ELISA

ตรวจสอบเชื้อ BICMV รวมทั้งการปนเปื้อนของเชื้อ CMV จากตัวอย่างพืชที่เก็บมาในเบื้องต้นด้วยวิธี indirect ELISA ดัดแปลงจากวิธีการของ Clark และ Adam (1977) โดยใช้ anti-BICMV monoclonal antibody (anti-BICMV MAb) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

การตรวจสอบเชื้อ BICMV เริ่มจากบดตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการของโรคใน phosphate buffer saline (1xPBS, pH 7.4; 8 มิลลิโมลาร์ Na_2HPO_4, 1.8 มิลลิโมลาร์ KH_2PO_4, 2.7 มิลลิโมลาร์ KCl และ 136.8 มิลลิโมลาร์ NaCl) อัตราส่วนใบพืช 1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร จากนั้นใส่น้ำคั้นพืชที่เตรียมได้ลงในหลุม ELISA plate (Costar Cat. No. 3590, Corning Inc., New York, USA) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้าง ELISA plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBS ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์ Tween 20 ผสมอยู่ (PBST) ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดรมาซึ่งผลิต anti-BICMV MAb ที่เจือจางใน blocking buffer (PBS ที่ผสม 3 เปอร์เซ็นต์ skim milk) อัตราส่วน 1:2 ลงในหลุม ELISA plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่ม ELISA plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้างหลุม ELISA plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBST 3 ครั้ง ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น เติม goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) ที่เจือจางใน blocking buffer อัตราส่วน 1:10,000 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้างหลุม ELISA plate ด้วย บัฟเฟอร์ PBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ตรวจดูปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายสับสเตรทที่มี *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP, 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 3N NaOH ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านผลของปฏิกิริยาที่

ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader กำหนด ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่เป็นบวก คือค่าที่มากกว่าค่าที่อ่านได้จากใบถั่วฝักยาวปกติ 2 เท่า ซึ่งใช้เป็น negative control

3.3 การแยกเชื้อ BICMV ให้เป็นสายพันธุ์เดี่ยว (single isolation) และการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส

นำตัวอย่างพืชที่ตรวจสอบแล้วให้ผลบวกกับ anti-BICMV MAb มาทำการแยกเชื้อ BICMV ให้เป็นสายพันธุ์เดี่ยวโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล ดัดแปลงจากวิธีการของ Lima และคณะ (1979) เริ่มจากบดตัวอย่างใบพืชกับ 0.01 โมลาร์ phosphate buffer อัตราส่วนใบพืช 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร ในโกร่งแช่เย็น ผสมผงซีไลท์ (celite) และทาน้ำคั้นพืชลงบนใบ *Chenopodium amaranticolor* (Coste & A. Reyn.) ซึ่งจะแสดงอาการแผลจุดสีเหลือง (chlorotic local lesion) เฉพาะใบที่ทำการปลูกเชื้อภายในระยะเวลา 6-7 วัน จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณเชื้อ BICMV ลงในต้นถั่วฝักยาว ซึ่งเป็นพืชอาศัยที่แสดงอาการแบบแพร่กระจายทั่วต้น (Huguenot *et al*. 1993) โดยตัดจุดแผลแต่ละจุดแยกบดใน 0.01 โมลาร์ phosphate buffer 1 จุดแผลต่อบัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร บดบนแผ่นสไลด์แก้ว ผสมผงซีไลท์และปลูกเชื้อ BICMV แต่ละจุดลงบนใบจริงคู่แรก (cotyledon) ของต้นถั่วฝักยาว อายุ 7 วัน (1 จุดแผลต่อต้นถั่วฝักยาว 1 ต้น) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ล้างใบถั่วฝักยาวด้วยน้ำกลั่น เก็บต้นถั่วฝักยาวที่ปลูกเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น positive control ในขั้นตอนของการตรวจสอบเชื้อ BICMV ด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ และใช้เป็นแหล่งเชื้อเพื่อคัดเลือกพันธุ์ถั่วพุ่มที่ต้านทานต่อเชื้อ BICMV ต่อไป

4. การสังเคราะห์ BICMV-CP recombinant protein

4.1 การออกแบบชุดไพรเมอร์

ชุดไพรเมอร์ (CACP1 และ CACP2) ที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BICMV (BICMV-CP) ในขั้นตอน Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BICMV ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยดัดแปลงให้ทางปลาย 5’ ของไพรเมอร์ CACP1 มีนิวคลีโอไทด์ซึ่งสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และทางปลาย 3’ ของไพรเมอร์ CACP2 มีนิวคลีโอไทด์ซึ่งสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII

4.2 การสกัด total RNA และการเพิ่มปริมาณยีนเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (*CP* gene)

สกัด total RNA ของเชื้อ BICMV จากใบถั่วฝักยาวที่เพิ่มปริมาณได้ในข้อ 4.3 โดยใช้ Total RNA Mini Kit (Plant) (Geneaid, Taipei, Taiwan) ทำการเพิ่มปริมาณ *CP* gene ของเชื้อ BICMV ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ Qiagen®OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) เริ่มจากแบ่ง total RNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด PCR ใหม่ ขนาดปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายดังต่อไปนี้ลงในหลอด PCR ได้แก่

บัฟเฟอร์ 5x QIAGEN OneStep RT-PCR	10.0	ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์ 5x Q-Solution	10.0	ไมโครลิตร
10 มิลลิโมลาร์ dNTP	2.0	ไมโครลิตร
100 พิโคโมลาร์ ไพรเมอร์ CACP1	1.0	ไมโครลิตร
100 พิโคโมลาร์ ไพรเมอร์ CACP2	1.0	ไมโครลิตร
QIAGEN OneStep RT-PCR enzyme mix	2.0	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	23.0	ไมโครลิตร

จะได้ปฏิกิริยา PCR รวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี จากนั้นใส่ลงในเครื่อง Thermal cycler (Biometra GmbH, Goettingen, Germany) ที่ตั้งโปรแกรมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ แยกขนาดผลผลิตดีเอ็นเอด้วย 1.2 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 35 นาที จากนั้นนำเจลไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide นาน 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอของเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BICMV ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation แยกสกัดแถบดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid, Taipei, Taiwan)

4.3 การโคลนยีนเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค

เชื่อมต่อ *CP* gene ของเชื้อ BICMV ที่แยกสกัดได้จากข้อ 5.2 กับพลาสมิด pGEMT-Easy (Promega, Madison, USA) โดยใช้ T4 DNA ligase (Promega, Madison, USA) ทั้งนี้ในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ (ligation) ปริมาตรหลอดละ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

CP gene ของเชื้อ BICMV	3.0	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase buffer	5.0	ไมโครลิตร
pGEM-T easy vector (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1.0	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1.0	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10.0	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อ *CP* gene ของเชื้อ BICMV กับพลาสมิด pGEMT-Easy นี้เรียกว่า pGEM-T/BICMV จากนั้นเคลื่อนย้ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ competent cell ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α (Qiagen, Hilden, Germany) ด้วยวิธี heat shock โดยแช่หลอดปฏิกิริยาในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เมื่อครบเวลานำสารละลายเซลล์แบคทีเรียแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลว 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (2xYT+Amp) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเซลล์แบคทีเรีย นำไปเขย่าต่อด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มี พลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี blue-white selection โดยดูดสารละลายเซลล์แบคทีเรีย ปริมาตร 300 ไมโครลิตร spread บนอาหารแข็ง 2xYT+Amp ที่

เติม IPTG (Isopropyl-ß-D Thiogalactopyranoside) (Fermentas, Hanover, USA) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ และ X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactoside) (Fermentas, Hanover, USA) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ตรวจสอบเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม pGEM-T/BICMV โดยใช้คู่ไพรเมอร์ T7 และ SP6 ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นเลือกเซลล์ของแบคทีเรียที่ให้ผลเป็นบวกมาจำนวน 1 โคลน ทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วย High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taipei, Taiwan) นำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งตรวจเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป

4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ *CP* gene ของเชื้อ BICMV ที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา RT-PCR กับลำดับนิวคลีโอไทด์ *CP* gene ของเชื้อ BICMV ที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/Blast) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ *CP* gene ของเชื้อ BICMV ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป DNAMAN Sequence Analysis Software (Lynnon Corporation, Vaudreuil, Quebec, Canada)

4.5 การเชื่อมต่อ *CP* gene ของเชื้อ BICMV เข้าสู่พลาสมิด pQE30 expression vector

ทำการตัด *CP* gene ของเชื้อ BICMV และ พลาสมิด pQE-80L expression vector (Qiagen, Hilden, Germany) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ด้วยวิธี double digestion ทั้งนี้การตัด gene แต่ละชนิดจะทำแยกหลอดกัน ดังนี้

4.5.1 การตัด *CP* gene ของเชื้อ BICMV ออกจากพลาสมิด pGEMT-Easy

ในปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

พลาสมิดลูกผสม pGEM-T/BICMV สกัดบริสุทธิ์	10.0	ไมโครลิตร
10xNEBuffer 2	2.0	ไมโครลิตร
*Bam*HI (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1.0	ไมโครลิตร
*Hind*III (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1.0	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	6.0	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บสารละลายแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส

4.5.2 การตัดพลาสมิด pQE-80L expression vector

ในปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

พลาสมิด pQE-80L expression vector สกัดบริสุทธิ์	16.0	ไมโครลิตร
10xNEBuffer 2	2.0	ไมโครลิตร
*Bam*HI (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1.0	ไมโครลิตร
*Hind*III (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1.0	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเก็บสารละลายแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส

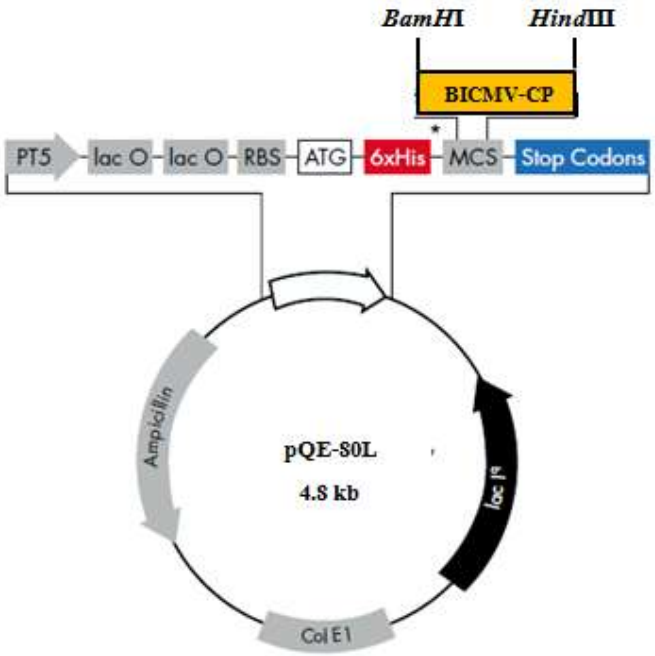
แยก *CP* gene และ พลาสมิด pQE-80L expression vector ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 35 นาที จากนั้นนำเจลไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide นาน 10 นาที ตัดแถบดีเอ็นเอเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BICMV (BICMV-CP) และ พลาสมิด pQE-80L expression vector ภายใต้แสง UV ก่อนแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid, Taipei, Taiwan) เก็บดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่แยกสกัดได้แช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

4.5.3 การเชื่อมต่อ *CP* gene เข้าสู่พลาสมิด pQE-80L expression vector

เชื่อมต่อดีเอ็นเอของ BICMV-CP กับพลาสมิด pQE-80L expression vector โดยใช้ T4 DNA ligase โดยในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ (ligation) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

พลาสมิด pQE-80L (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1.0	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอของ BICMV-CP (75 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2.0	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase buffer	5.0	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1.0	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	1.0	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอของ BICMV-CP กับพลาสมิด pQE-80L นี้เรียกว่า pQE-80L/BICMV-CP ทำการเคลื่อนย้ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ competent cell ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock และทำการคัดเลือกโคลนของแบคทีเรียที่ได้รับ พลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี blue-white selection ตามวิธีการในข้อ 5.3 ตรวจสอบโคลนของแบคทีเรียที่มียีน BICMV-CP ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CACP1 และ CACP2 ตามวิธีการในข้อ 5.2 เลือกโคลนของแบคทีเรียที่ตรวจพบยีน BICMV-CP มาจำนวน 1 โคลน เพื่อนำไปชักนำการสังเคราะห์ recombinant coat protein (rCP) หรือ BICMV-CP fusion proteins ในขั้นตอนต่อไป ทั้งนี้เมื่อมีการชักนำการสังเคราะห์ rCP ที่เชื่อมต่อใน pQE-80L expression vector แล้ว ทางด้าน N-terminal ของโมเลกุล rCP จะมีโมเลกุลของ polyhistidine-tagged (6xHis) จำนวน 6 โมเลกุลติดมาด้วย (ภาพที่ 2) ซึ่ง 6xHis-Tag นี้จะมีประโยชน์ใช้สำหรับการแยก fusion proteins ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity purification column



ภาพที่ 2 แสดงการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ BICMV-CP ขนาด 864 คู่เบส ในพลาสมิด pQE-80L expression vector

4.6 การสังเคราะห์และการแยกสกัด fusion proteins

เลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม pQE-80L/BICMV-CP จำนวน 1 โคลน ในอาหารเหลว 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (2xYT+Amp) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อใช้เป็น starter จากนั้นดูดสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แบ่งใส่ลงใน flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ใหม่ จำนวน 2 flask ที่มีอาหารเหลว 2xYT+Amp อยู่ปริมาตร flask ละ 500 มิลลิลิตร อัตราส่วนของสารละลายเซลล์แบคทีเรียต่ออาหารเหลว 2xYT+Amp เท่ากับ 1:50 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อโดยนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ชักนำเชื้อแบคทีเรียให้สังเคราะห์ rCP ด้วยการเติม IPTG ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียต่อโดยการนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย lysis buffer (8 โมลาร์ Urea buffer; 100 มิลลิโมลาร์ NaH_2PO_4, 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, 8 โมลาร์ urea; pH 8.0) ในปริมาตร 8 มิลลิลิตรต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* น้ำหนัก 1 กรัม นำเซลล์แบคทีเรียมาทำให้แตกโดยแช่เย็นที่ -70 องศาเซลเซียส จนสารละลายแข็งตัว จากนั้นนำมาตั้งที่อุณหภูมิห้องจนสารละลาย (freeze-thaw) ทำซ้ำอีก 2 รอบ ปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำใส (supernatant) มาผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Ni-NTA resin (Qiagen, Valencia, USA) ล้างคอลัมน์ ด้วย 8 โมลาร์ Urea buffer, pH 6.3 (100 มิลลิโมลาร์ NaH_2PO_4, 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, 8 โมลาร์ urea; pH

6.3) ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ (column volumn) แยก rCP ของเชื้อ BICMV ที่มี 6xHis (rCP BICMV-CP-6xHis; BICMV-CP fusion proteins) ออกจากเจลด้วย 8 โมลาร์ Urea buffer, pH 4.5 (100 มิลลิโมลาร์ NaH_2PO_4, 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, 8 โมลาร์ urea; pH 4.5) เก็บแต่ละ fraction ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ใหม่ ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย 2 โมลาร์ Tris buffer (pH 8.0) ใส่อยู่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ปริมาตรหลอดละ 10 ไมโครลิตร เพื่อปรับค่า pH ของสารละลาย fusion protein ที่แยกสกัดได้ให้เป็นกลาง วิเคราะห์ความเข้มข้นของ fusion proteins ที่แยกสกัดได้โดยวิธีของ Bradford (Bradford, 1976) ที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น ที่ใช้คือ Bovine serum albumin (BSA)

4.7 การตรวจวิเคราะห์น้ำหนักมวลโมเลกุลและความบริสุทธิ์ของ BICMV-CP fusion protein

โดยใช้วิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) อัตราส่วน 6 เปอร์เซ็นต์ stacking gel และ 10 เปอร์เซ็นต์ running gel (Laemmli, 1970) เริ่มจากนำตัวอย่างสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่ละลายใน lysis buffer (8 โมลาร์ Urea buffer, pH 8.0) และ fusion proteins ที่แยกสกัดบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA resin ปริมาตรอย่างละ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 2X loading buffer (0.1 เปอร์เซ็นต์ bromophenol blue, 4 เปอร์เซ็นต์ SDS, 5 เปอร์เซ็นต์ ß-mercaptoeethanol, 10 เปอร์เซ็นต์ glycerol และ 0.5 โมลาร์ Tris-HCl; pH 6.8) อัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งทันที หยอดตัวอย่างสารละลายลงในหลุมเจล ปริมาตรหลุมละ 10 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ 40 นาที สำหรับส่วน stacking gel และ 100 โวลต์ 150 นาที สำหรับ running gel ย้อมสีเจลด้วย staining solution (0.2 เปอร์เซ็นต์ Coomassie Brilliant Blue R-250 ที่ละลายใน 50 เปอร์เซ็นต์ methanol และ 7 เปอร์เซ็นต์ acetic acid) นาน 10 นาที แล้วล้างเจลด้วย destaining solution (25 เปอร์เซ็นต์ methanol และ 7 เปอร์เซ็นต์ acetic acid) 2-3 ครั้ง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน เปรียบเทียบขนาดของแถบ fusion proteins ที่พบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, Hanover, USA)

5. การผลิตโพลีโคลนแอนติซีรัมต่อเชื้อ BICMV

5.1 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัม

ทำตามวิธีการของ รัชนี (2549) โดยเก็บเลือดที่หูของกระต่ายก่อนที่จะฉีดกระตุ้นด้วย BICMV-CP fusion proteins เพื่อเป็น normal serum ซึ่งใช้เป็น negative control สำหรับแอนติซีรัมที่ผลิตได้ จากนั้นผสม BICMV-CP fusion protein ที่สกัดบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม กับ Freund's complete adjuvant อัตราส่วน 1:1 ฉีดกระตุ้นกระต่ายพันธุ์ White New Zealand อายุ 2 เดือน จำนวน 1 ตัว เข้าทางใต้ผิวหนัง จากนั้นสัปดาห์ที่ 2-4 หลังจากการฉีดในครั้งที่ 1 จะฉีดกระตุ้นกระต่ายอีกด้วย fusion protein ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant อัตราส่วน 1:1 เข้าทางใต้ผิวหนัง อีกสัปดาห์ละ 1 ครั้ง รวมการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วย fusion proteins ทั้งหมด 4 ครั้ง จากนั้นเริ่มเก็บเลือดจากเส้นเลือดบริเวณหูกระต่ายตั้งแต่สัปดาห์ที่ 5 หลังการฉีดครั้งแรก และเก็บต่อไปทุกสัปดาห์จนครบ 3

เดือน กำหนดสัญลักษณ์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่เก็บได้ครั้งที่ 1-8 เป็น #S1-#S8 ตามลำดับ เก็บแอนติซีรัมที่เก็บได้ในแต่ละครั้งแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

5.2 การตรวจหาค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัม

ตรวจหาค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่เก็บได้ครั้งที่ 1-8 (#S1-#S8) ด้วยเทคนิค indirect ELISA ดัดแปลงจากวิธีการของ Clark และ Adam (1977) โดยเคลือบหลุม ELISA plate (Costar Cat.NO.3590) ด้วย BICMV-CP fusion protein ที่แยกสกัดบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางใน carbonate coating buffer, pH 9.6 (34 มิลลิ-โมลาร์ $NaHCO_3$, 15 มิลลิโมลาร์ Na_2CO_3) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำ ELISA plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบเวลาล้าง ELISA plate ด้วย PBST ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นเติมโพลี-โคลนอลแอนติซีรัมที่เจือจางใน blocking solution (PBS ผสม 5 เปอร์เซ็นต์ skim milk) แบบ 2-fold dilution เริ่มจาก 1:50 จนถึง 1:409,600 ลงในหลุม ELISA plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่ม ELISA plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้างหลุม ELISA plate ด้วย PBST 3 ครั้ง ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น เติม goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) ที่เจือจางใน blocking solution อัตราส่วน 1:10,000 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำ ELISA plate ไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง ELISA plate ด้วย PBST 3 ครั้ง ตรวจดูปฏิกิริยาโดยเติม substrate buffer ที่มี *p*-nitrophenyl phosphate (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 3N NaOH ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านผลของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader กำหนด negative control ที่ใช้ในการทดลองคือ fusion protein ที่ใช้เคลือบหลุม ELISA plate ทำปฏิกิริยากับ normal serum ที่เจือจางใน blocking solution อัตราส่วน 1:200 ค่าการดูดกลืนแสงของ antiserum dilution ที่เป็นบวกคือค่าที่มากกว่าค่าที่อ่านได้จาก negative control 2 เท่า

5.3 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติซีรัม

ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัสที่มีรายงานก่อโรคในถั่วพุ่มหรือในถั่วฝักยาวด้วยวิธี indirect ELISA ตามวิธีการในข้อ 6.2 เชื้อไวรัสที่นำมาใช้ในการทดลอง ได้แก่ เชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) subgroup I และ II (จีนัส *Cucumovirus*) เชื้อ *Cowpea mosaic virus* (CPMV; จีนัส *Comovirus*) เชื้อ *Bean common mosaic virus* (BCMV; จีนัส *Potyvirus*) ซึ่งซื้อมาจากบริษัท Agdia (Elkhart, Indiana, USA) กำหนดให้ BICMV-CP fusion proteins ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่ผลิตได้เป็น positive control และน้ำคั้นจากใบถั่วฝักยาวปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเป็น negative control

6. ประเมินการต้านทานโรคใบด่างเหลืองที่เกิดจากไวรัส

นำเมล็ดถั่วมาเพาะ เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 15 วัน ทำการตรวจสอบการต้านทานต่อโรคใบด่างเหลืองโดยทำการเพาะเมล็ดแต่ละพันธุ์ประมาณ 10 เมล็ด/พันธุ์ ในกระถางพลาสติกที่บรรจุดินผสม 2 กระถางต่อพันธุ์ หนึ่งสัปดาห์หลังเมล็ดงอกเมื่อต้นมีใบจริง (ระยะใบเพสลาด) จึงทำการปลูกเชื้อ สำหรับเชื้อที่

ต้องจำแนกให้ชัดเจนว่าเป็น BICMV เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากไวรัสชนิดอื่นโดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (รายละเอียดในหัวข้อ 3-5) ใช้ผง grit carborundum ทำให้เกิดแผลบนใบของต้นพืช และใช้น้ำคั้นของใบที่เป็นโรค ป้ายบนใบ 3 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อครั้งแรก ทำการปลูกเชื้ออีกครั้งบนต้นที่ไม่แสดงอาการ เก็บต้นที่ปลูกเชื้อไว้ในโรงเรือนตาข่ายเพื่อป้องกันแมลงพาหะของเชื้อไวรัส (Bashir *et al*., 2002) หลังจากนั้นจึงให้คะแนนการเกิดโรคในช่วง 2 สัปดาห์ โดยให้คะแนน 1-5 (Bashir, 2002) ดังนี้

คะแนน 0 ไม่ปรากฏอาการใดๆ
คะแนน 1 แสดงอาการของโรคเล็กน้อย
คะแนน 2 แสดงอาการของโรคระดับปานกลาง
คะแนน 3 แสดงอาการของโรคมาก
คะแนน 4 แสดงอาการของโรคมากที่สุด

ขณะเดียวกัน ทำการตรวจสอบ BICMV โดยใช้วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ทำการเก็บตัวอย่างใบจากต้นที่ไม่แสดงอาการของโรค จำนวนใบที่ใช้ 3 ใบต่อต้น คือ ใบล่าง ใบบริเวณกลางๆ และใบบน (ตามรายละเอียดในหัวข้อ 3.2) ในระยะเวลา 1 เดือนหลังจากการปลูกเชื้อครั้งแรก คัดเลือกเฉพาะต้นที่ไม่แสดงอาการ ทดสอบหาไวรัส โดยใช้วิธี ELISA อีกครั้ง

สำหรับการประเมินผลโดยใช้วิธี ELISA ตัวอย่างที่เป็นบวกคือค่าที่มากกว่าค่าที่อ่านได้จากใบถั่วฝักยาวปกติ 2 เท่า ซึ่งใช้เป็น negative control ส่วนการประเมินผลการต้านทานใช้ลการประเมินร่วมกันระหว่างอาการของโรคที่ประเมินจากการให้คะแนนด้วยสายตา และผลจากการใช้เทคนิค ELISA ดังนี้ (ประยุกต์จาก Ouattara and Chambliss, 1991)

PS – ต้นแสดงอาการของโรคและ ELISA ให้ผลเป็นบวก
NS – ต้นแสดงอาการแต่ ELISA ให้ผลเป็นลบ
P - ต้นไม่แสดงอาการของโรคแต่ ELISA ให้ผลเป็นบวก
N - ต้นไม่แสดงอาการของโรคและ ELISA ให้ผลเป็นลบ

สถานที่ทดลอง

แปลงปลูกถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มในจังหวัดต่างๆ ทางภาคใต้ของประเทศไทย แปลงทดลองและห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชศาสตร์ และภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

ผลและวิจารณ์การทดลอง

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้และประเมินการต้านทานโรคใบด่างเหลืองที่เกิดจากไวรัส BICMV

1.1 การเก็บรวบรวมพันธุ์ถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มพื้นเมืองภาคใต้

ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมพันธุ์ถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มพื้นเมือง ที่ชาวบ้านปลูกอยู่ทั่วไป ยกเว้นพันธุ์ที่ทราบชัดเจนว่าซื้อเมล็ดพันธุ์มาจากบริษัท พื้นที่เก็บรวบรวมพันธุ์ได้แก่จังหวัดสงขลา พัทลุง ชุมพร นครศรีธรรมราช ตรัง พังงา และปัตตานี ดังแสดงในตารางที่ 1 (พันธุ์ส่วนใหญ่ได้จากพื้นที่อำเภอต่างๆ ในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีการปลูกถั่วฝักยาวมากที่สุดในภาคใต้)

ตารางที่ 1 พันธุ์และแหล่งตัวอย่างถั่วพุ่มและถั่วฝักยาวที่ใช้ในการศึกษา

Common name	Code	Variety	Source
Yardlong bean	*No. 1*	Samchook (สามชุก)	Commercial Variety
Yardlong bean	*No. 2*	KU-20 (ม.ก. 20)	Kasetsart University, Nakornpathom
Yardlong bean	*No. 3*	Selected –PSU (คัด ม.อ.)	Prince of Songkla University, Songkhla
Cowpea	*No. 4*	Cowpea (เจียไต๋)	Chia Tai Co., Ltd.
Cowpea	*No. 5a*	IT82E-9 (determinate)	AVRDC, Kamphengsaen, Nakornpathom
Cowpea	*No. 5b*	IT82E-9 (indeterminate)	AVRDC, Kamphengsaen, Nakornpathom
Cowpea	*No. 6*	IT82E-16	AVRDC, Kamphengsaen, Nakornpathom
Yardlong bean	*No. 7*	Thahanpran (ทหารพราน)	Pattani
Yardlong bean	*No. 8*	Malay 308 (มาเลเซีย 308)	Malaysia
Yardlong bean	*No. 9*	Kaohinson (เขาหินซ้อน)	Panomsarakam, Chachengsao
Yardlong bean	*No. 10*	Yumi (ถั่วยูมิ)	Phathalung
Yardlong bean	*No. 11*	-	-
Yardlong bean	*No. 12*	Suranaree-1 (สุรนารี 1)	Nakorn Rachasima
Yardlong bean	*No. 13*	cameron	Malaysia
Cowpea	*No. 14*	VIG 009	Serbia
Yardlong bean	*No. 15*	Unknown	-

ตารางที่ 1 (ต่อ) พันธุ์และแหล่งตัวอย่างถั่วพุ่มและถั่วฝักยาวที่ใช้ในการศึกษา

Common name	Code	Variety	Source
Yardlong bean	*No. 16*	Trang1	Trang
Cowpea	*No. 17*	SR 863	AVRDC, Kamphengsaen, Nakornpathom
Yardlong bean	*No. 18*	Unknown	Lansaka, Thammarat
Yardlong bean	*No. 19*	Unknown	Nopphitam, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 20*	Thau-faosai (ถั่วเฝ้าใส)	Na Rang, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 21*	Thau-teenman (ถั่วตีนม่าน)	Na Rang, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 22*	Tao-oo-sho (ถั่ว อ.ส.)	Na Rang, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 23*	Unknown	Tha Sa la, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 24*	Lebmee (ถั่วเล็บหมี)	Cha-uat, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 25*	Unknown	Na Yong, Trang
Yardlong bean	*No. 26*	Thao-dang (ถั่วแดง)	Bang Rak , Trang
Yardlong bean	*No. 27*	Unknown	Khuan Pring, Trang
Cowpea	*No. 28*	Thau-laishua (ถั่วลายเสือ)	Wang Wiset, Trang
Yardlong bean	*No. 29*	Unknown	Naphala, Trang
Yardlong bean	*No. 30*	Unknown	Naphala, Trang
Yardlong bean	*No. 31*	Thau-gampong (ถั่วแก้มพอง)	Si Chon, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 32*	Thau-faosai (ถั่วเฝ้าใส (แดง))	Si Chon, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 33*	Unknown	Si Chon, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 34*	Unknown	Si Chon, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 35*	Unknown	Si Chon, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 36*	Unknown	Tha Sa La, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 37*	Thau-thaidang (ถั่วท้ายแดง)	Thung Lan , Khlong Hoi Khong, Songkhla
Yardlong bean	*No. 38*	Unknown	Thung Lan , Khlong Hoi Khong, Songkhla
Yardlong bean	*No. 39*	Thau-lai (ถั่วลาย)	PSU, Hat Yai, Songkla
Yardlong bean	*No. 40*	Thau-pran (ถั่วพราน)	Wang Phai, Chumphon
Yardlong bean	*No. 41*	Unknown	Ban Ko, Phrom Khiri, Nakhon Si Thammarat

ตารางที่ 1 (ต่อ) พันธุ์และแหล่งตัวอย่างถั่วพุ่มและถั่วฝักยาวที่ใช้ในการศึกษา

Common name	Code	Variety	Source
Yardlong bean	*No. 42*	Thau-taito (ถั่วท้ายต่อ)	Ban Ko, Phrom Khiri, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 43*	Unknown	Ban Ko, Phrom Khiri, Nakhon Si Thammarat
Yardlong bean	*No. 44*	Thau-dang (ถั่วแดง)	Ko Yao Yai, Ko Yao, Phang Nga
Yardlong bean	*No. 45*	Unknown	Thung Lan , Khlong Hoi Khong, Songkhla
Yardlong bean	*No. 46*	Unknown	Mai Kaen, Mai Kaen, Pattani
Yardlong bean	*No. 47*	Ranong	Pattani
Yardlong bean	*No. 48*	Pattani 1	Pattani
Yardlong bean	*No. 49*	Pattani 2	Pattani
Yardlong bean	*No. 50*	Pattani 3	Pattani

1.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มพื้นเมืองที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ภาคใต้

นำเมล็ดถั่วทั้ง 50 สายพันธุ์มาปลูกทดสอบ เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 นิ้ว วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD: Completely Randomized Design) จำนวน 3 ซ้ำๆละ 1 กระถางๆละ 2 ต้น ทำการเก็บข้อมูลต่างๆ ดังนี้

ข้อมูลลักษณะทางคุณภาพ

- ลักษณะการเจริญเติบโต (determinate หรือ indeterminate growth habit)
- สีดอก
- รูปร่างใบ
- สีฝัก
- รูปร่างเมล็ด
- สีเมล็ด

จากผลการบันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐานดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 3 โดยมีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 2 ลักษณะคุณภาพของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม 50 พันธุ์

Access. no.	Growth habit	Plant pigmentation	Seed shape	Eye color	Flower color	Terminal Leaflet shape	Pod curvature	Immature pod pigmentation	Mature pod color
1	Indeterminate	0	Kidney	Black	Violet	Ovate	Straight	None	Pale tan
2	Indeterminate	1	Kidney	Black	Violet	Ovate	Straight	Uniformly pigmented	Dark purple
3	Indeterminate	0	Kidney	Black	White	Ovate	Straight	None	Pale tan
4	Indeterminate	0	Kidney	Black	Violet	Ovate	Curved	None	Pale tan
5 a*	Determinate	0	Rhomboid	Black	Violet	Sub-hastate	Straight	None	Pale tan
5 b*	Indeterminate	0	Rhomboid	Black	Violet	Hastate	Slightly curved	Uniformly pigmented	Pale tan/purple
6	Determinate	0	Rhomboid	Brown	Violet	Hastate	Slightly curved	None	Pale tan
7	Indeterminate	0	Ovoid	Black	White/Violet splashes	Ovate	Straight	Pigmented valves	Pale tan with purple valves
8	Indeterminate	0	Kidney	Brown	Violet	Sub-hastate	Straight	None	Dark tan
9	Indeterminate	0	Kidney	Black	Violet	Ovate	Slightly curved	None	Pale tan
10	Indeterminate	0	Globose	Black	Violet	Ovate	Straight	None	Pale tan

ตารางที่ 2 (ต่อ) ลักษณะคุณภาพของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม 50 พันธุ์

Access. no.	Growth habit	Plant pigmentation	Seed shape	Eye color	Flower color	Terminal Leaflet shape	Pod curvature	Immature pod pigmentation	Mature pod color
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Indeterminate	0	Kidney	Black	Violet	Ovate	Straight	None	Pale tan
13	Indeterminate	0	Kidney	Black	Violet	Sub-hastate	Slightly curved	None	Pale tan
14	Determinate	0	Rhomboid	Tan brown	Violet	Ovate	Slightly curved	None	Pale tan
15	Indeterminate	0	Kidney	Brown	White	Ovate	Straight	None	Pale tan
16	Indeterminate	0	Kidney	Black	White/Violet splashes	Ovate	Straight	None	Dark tan
17	Indeterminate	0	Kidney	Brown	Violet	Sub-hastate	Straight	None	Pale tan
18	Indeterminate	0	Ovoid	Brown	Violet	Ovate	Straight	Splashes of pigments	Dark tan
19	Indeterminate	1	Kidney	Brown	Violet	Sub-ovate	Straight	Uniformly pigmented	Black or dark purple
20	Indeterminate	0	Ovoid	Tan brown	Violet	Sub-ovate	Straight	None	Pale tan

ตารางที่ 2 (ต่อ) ลักษณะคุณภาพของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม 50 พันธุ์

Access. no.	Growth habit	Plant pigmentation	Seed shape	Eye color	Flower color	Terminal Leaflet shape	Pod curvature	Immature pod pigmentation	Mature pod color
21	Indeterminate	0	Ovoid	Brown	Violet	Sub-ovate	Straight	Splashes of pigments	Dark tan
22	Indeterminate	0	Ovoid	Black	Violet	Ovate	Straight	Pigmented valves	Pale tan/ purple straps
23	Indeterminate	1	Kidney	Brown	Violet	Ovate	Straight	Uniformly pigmented	Black or dark purple
24	Indeterminate	0	Kidney	Black	Violet	Sub-ovate	Slightly curved	None	Dark tan
25**	Indeterminate	0	---	---	---	Sub-ovate	---	---	---
26	Indeterminate	1	Kidney	Brown	Violet	Sub-ovate	Slightly curved	Uniformly pigmented	Dark brown/purple
27	Indeterminate	0	Kidney	Black	Violet	Sub-ovate	Slightly curved	None	Dark tan
28	Determinate	0	Ovoid	Black	Violet	Ovate	Slightly curved	Pigmented valves	Pale tan
29	Indeterminate	0	Ovoid	Black	White/Violet splashes	Ovate	Straight	Pigmented valves	Pale tan/ purple straps
30	Indeterminate	0	Ovoid	Black	Violet	Ovate	Straight	None	Pale tan

ตารางที่ 2 (ต่อ) ลักษณะคุณภาพของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม 50 พันธุ์

Access. no.	Growth habit	Plant pigmentation	Seed shape	Eye color	Flower color	Terminal Leaflet shape	Pod curvature	Immature pod pigmentation	Mature pod color
31	Indeterminate	0	Ovoid	Tan brown	Violet	Sub-ovate	Straight	None	Pale tan
32	Indeterminate	1	Kidney	Brown	White/Violet splashes	Sub-ovate	Straight	Uniformly pigmented	Dark brown
33	Indeterminate	0	Ovoid	Brown	Violet	Ovate	Slightly curved	None	Pale tan
34	Indeterminate	1	Kidney	Brown	Violet	Sub-ovate	Curved	Uniformly pigmented	Black or dark purple
35	Indeterminate	0	Ovoid	Tan brown	Violet	Sub-ovate	Slightly curved	None	Dark tan
36	Indeterminate	0	Ovoid	Black	Violet	Sub-ovate	Straight	Pigmented tips	Pale tan/ pigmented tips
37	Indeterminate	0	Kidney	Black	Violet	Sub-ovate	Straight	None	Pale tan
38	Indeterminate	1	Kidney	Brown	Violet	Sub-ovate	Slightly curved	Pigmented tips	Dark tan
39	Indeterminate	0	Kidney	Black	Violet	Sub-hatate	Slightly curved	Pigmented sutures	Pale tan/purple Lines
40	Indeterminate	0	Kidney	Black	Violet	Ovate	Slightly	Pigmented valves	Pale tan/purple Lines

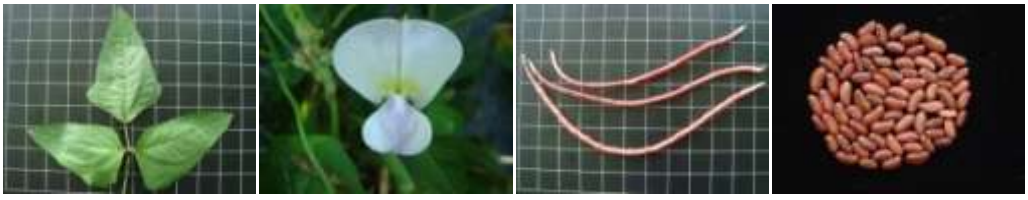
ตารางที่ 2 (ต่อ) ลักษณะคุณภาพของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม 50 พันธุ์

Access. no.	Growth habit	Plant pigmentation	Seed shape	Eye color	Flower color	Terminal Leaflet shape	Pod curvature	Immature pod pigmentation	Mature pod color
41**	Indeterminate	0	---	---	Violet	Ovate	---	---	---
42	Indeterminate	0	Kidney	Black	Violet	Sub-ovate	Slightly curved	None	Pale tan
43	Indeterminate	1	Kidney	Brown	Violet	Sub-ovate	Straight	Uniformly pigmented	Black or dark purple
44	Indeterminate	0	Ovoid	Brown	Violet	Sub-ovate	Straight	Splashes of pigment	Dark brown
45	Indeterminate	2	Kidney	Brown	Violet	Sub-ovate	Slightly curved	Uniformly pigmented	Black or dark purple
46	Indeterminate	0	Kidney	Black	Violet	Ovate	Straight	None	Dark tan
47	Indeterminate	0	Kidney	Brown	White/Violet splashes	Sub-ovate	Straight	Splashes of pigment	Dark brown
48	Indeterminate	0	Kidney	Black	Violet	Sub-ovate	Slightly curved	None	Dark brown
49	Indeterminate	0	Kidney	Brown	Violet	Sub-ovate	Straight	None	Pale tan
50	Indeterminate	1	Kidney	Brown	White/Violet	Ovate	Straight	Splashes of pigment	Dark brown

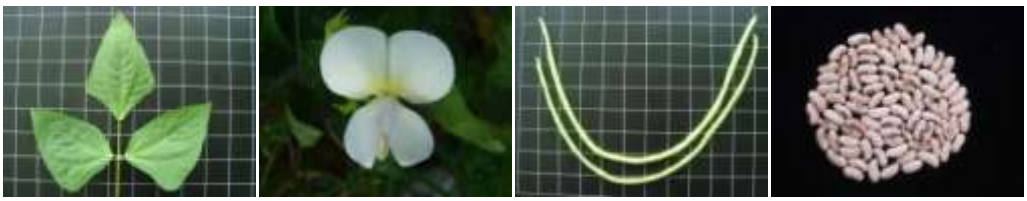
*Plants in accession 5 has been mixed as determinate and indeterminate growth habit and from this reason accession was divided in 5a and 5b.

**Accession no.25 have no flower and pod, ** accession no.41 produced no pod.

Accession 1



Accession 2

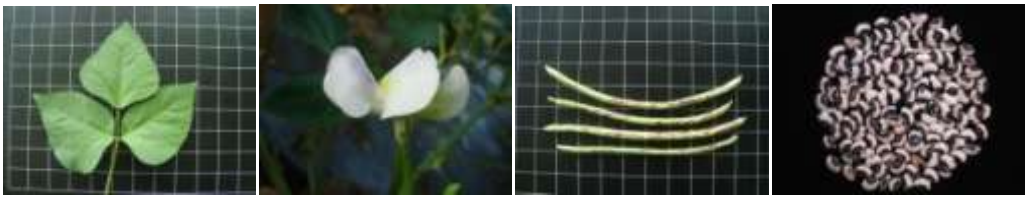


Accession 3

Accession 4

Accession 5a, 5b

Accession 6



Accession 7

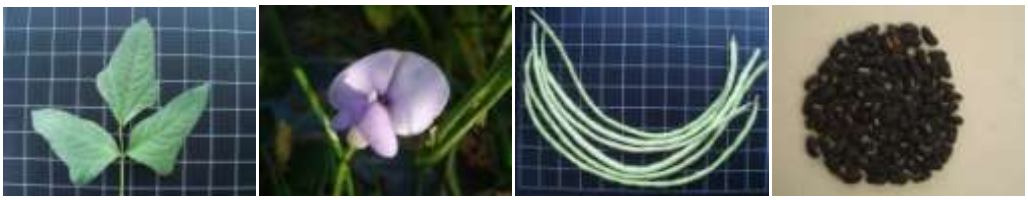
ภาพที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์

Accession 8

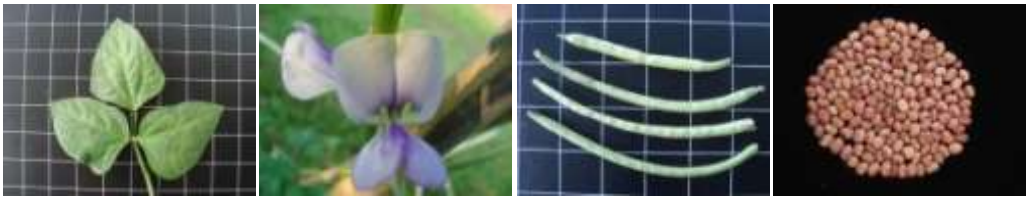
Accession 9

Accession 10

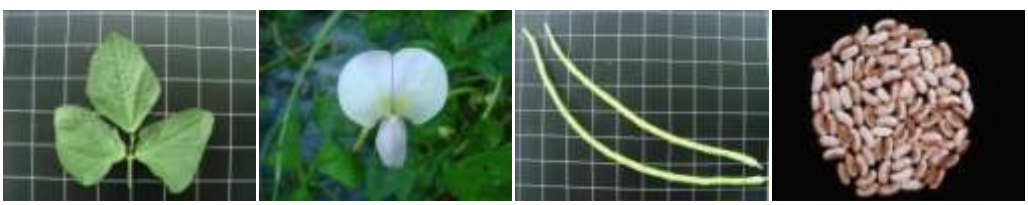
Accession 12



Accession 13



Accession 14



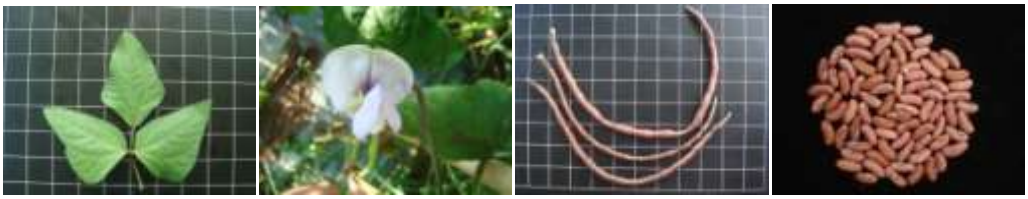
Accession 15

ภาพที่ 3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์

Accession 16

Accession 17

Accession 18



Accession 19

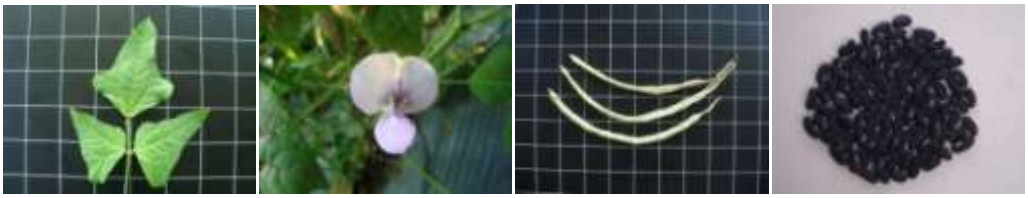
Accession 20

Accession 21

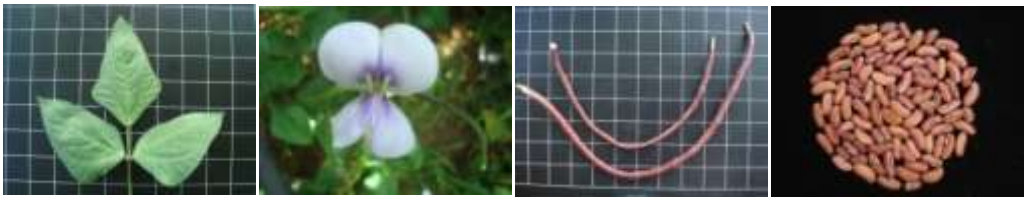
Accession 22

ภาพที่ 3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์

Accession 23



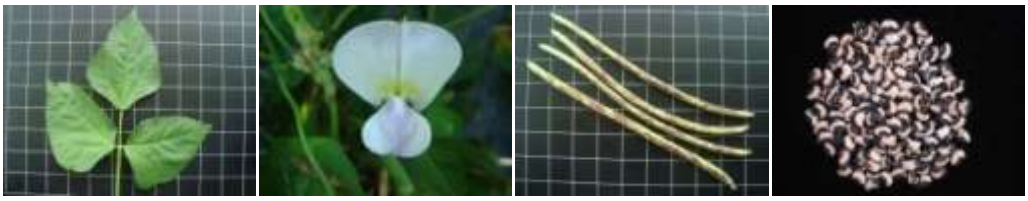
Accession 24



Accession 26

Accession 27

Accession 28

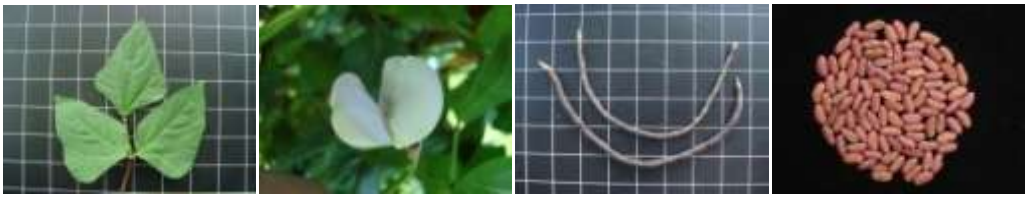


Accession 29

Accession 30

ภาพที่ 3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์

Accession 31



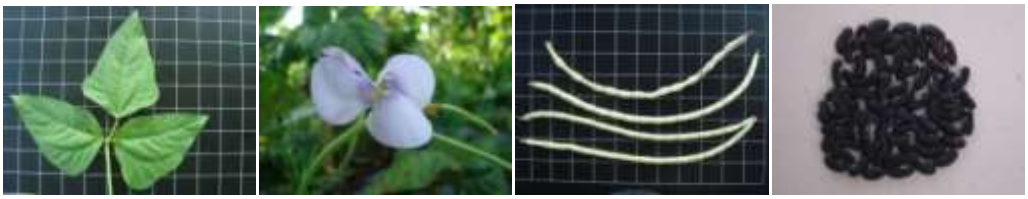
Accession 32

Accession 33

Accession 34

Accession 35

Accession 36

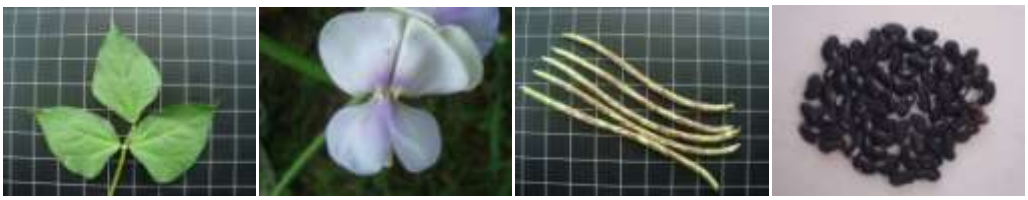


Accession 37

ภาพที่ 3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์

Accession 38

Accession 39



Accession 40

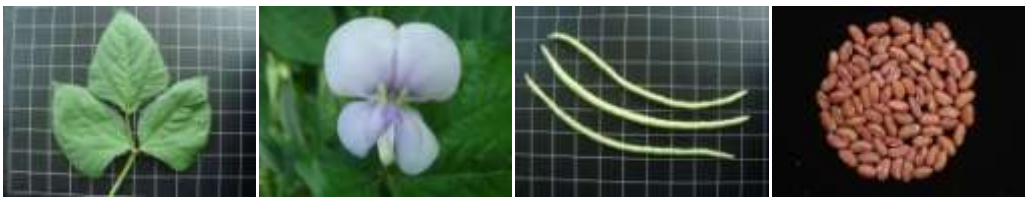
Accession 42

Accession 43

Accession 44

Accession 45

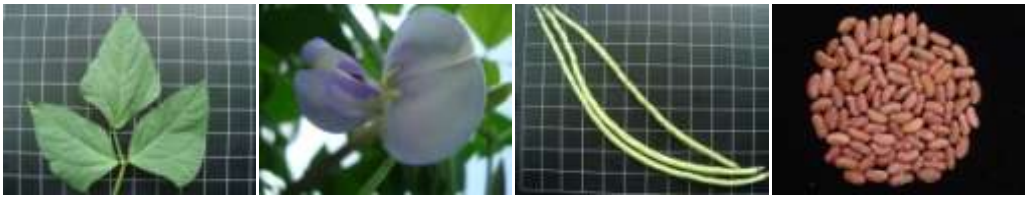
ภาพที่ 3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์



Accession 46

Accession 47

Accession 48



Accession 49

Accession 50

Accession 25

Accession 41

ภาพที่ 3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์

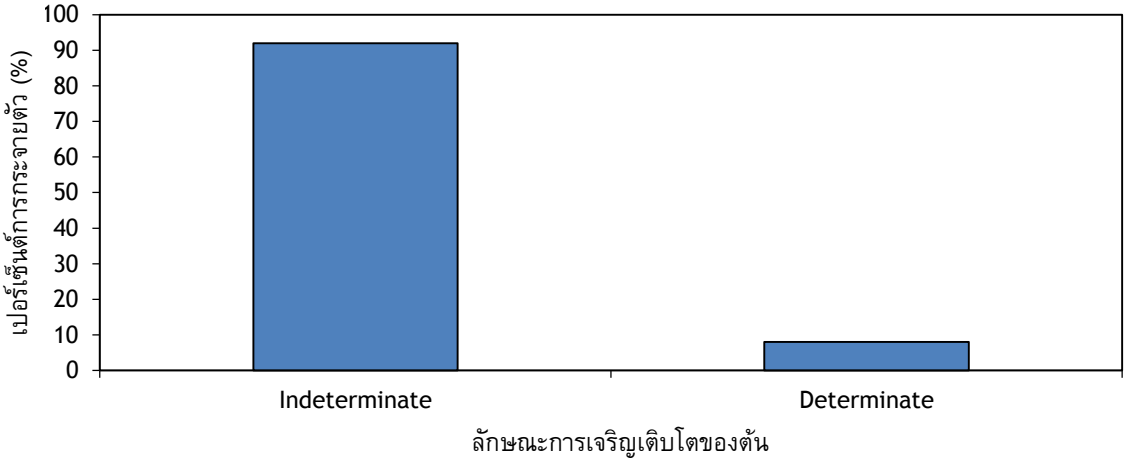
1. ลักษณะการเจริญเติบโต

ลักษณะการเจริญเติบโตของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวม พบว่าส่วนใหญ่การเจริญเติบโตของถั่วที่ทำการศึกษาเป็นแบบขึ้นค้างหรือแบบเลื้อยและกึ่งเลื้อย (indeterminate) คือ จำนวน 46 สายพันธุ์ และแบบไม่ขึ้นค้างหรือเป็นแบบพุ่ม (determinate) จำนวน 4 สายพันธุ์ คิดเป็น 92 และ 8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 4) พันธุ์ที่เจริญเติบโตแบบไม่ขึ้นค้างเป็นถั่วพุ่มทั้งหมดคือ พันธุ์หมายเลข 5a, 6 (IT82E-16), 14 (VIG 009) และหมายเลข 28 (ลายเสือ)

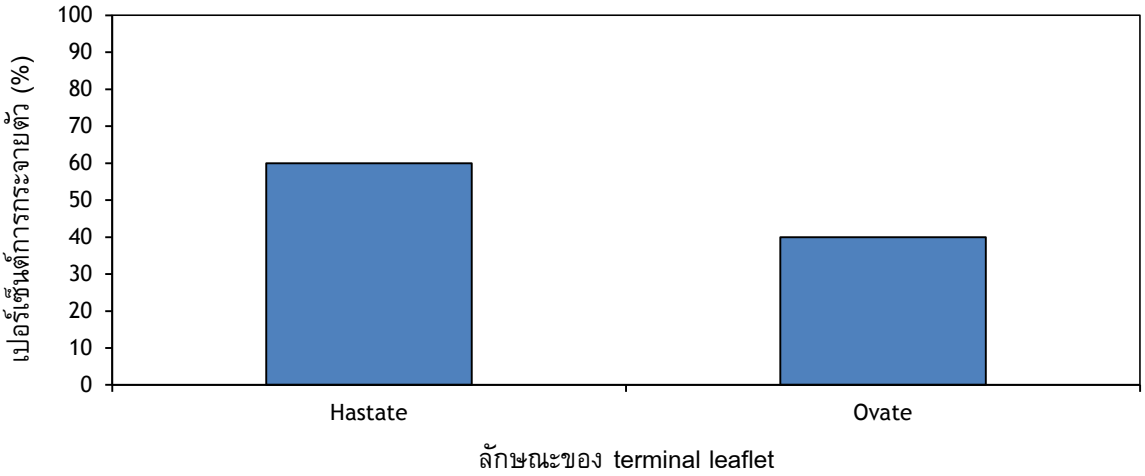
2. ลักษณะรูปร่างใบกลาง (terminal leaflet)

ลักษณะ terminal leaflet มีความแตกต่างกัน โดยสามารถแยกได้เป็น 4 แบบคือ Hastate ใบแคบ ฐานใบกลางเว้า, Ovate ใบมนคล้ายรูปไข่, Sub hastate ใบค่อนข้างแคบ ฐานใบกลางเว้า, Sub ovate ใบกว้างฐานใบกลางเว้าเล็กน้อย จากการศึกษา พบว่า รูปร่างใบส่วนใหญ่จะเป็นแบบ Ovate และ Sub ovate คิดเป็น 46 และ 44% ตามลำดับ terminal leaflet ที่มีรูปร่างแบบ Hastate และ Sub hastate มีเพียง 1 และ 4 สายพันธุ์ คิดเป็น 2 และ 8% ตามลำดับ (ภาพที่ 5)

ลักษณะรูปร่างใบ เป็นลักษณะที่นำมาใช้ประโยชน์ ในแง่ของการจำแนกพันธุ์ของถั่วพุ่มและถั่วฝักยาวได้ Potorff และคณะ (2012) รายงานว่าถั่วพุ่มพันธุ์ป่ามักมีใบเป็นแบบ hastate ในขณะที่พันธุ์ปลูกหรือพันธุ์การค้า ส่วนใหญ่มีรูปร่างใบกว้างแบบ ovate หรือ sub globose



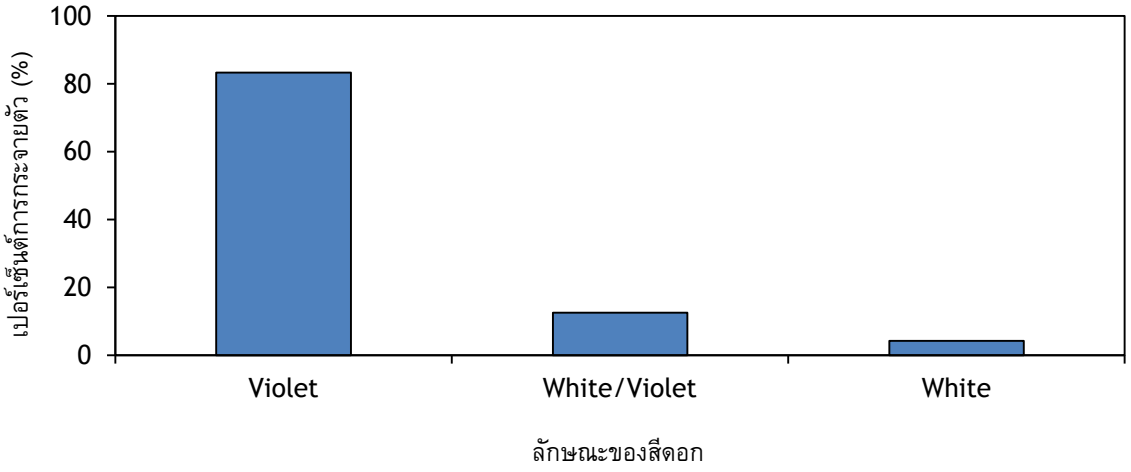
ภาพที่ 4 การกระจายตัวของลักษณะรูปแบบการเจริญเติบโตของต้น ในประชากรจำนวน 50 สายพันธุ์ของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่ทำการศึกษา



ภาพที่ 5 การกระจายตัวของลักษณะ terminal leaflet ในประชากรจำนวน 50 สายพันธุ์ของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่ทำการศึกษา

3. ลักษณะสีดอก

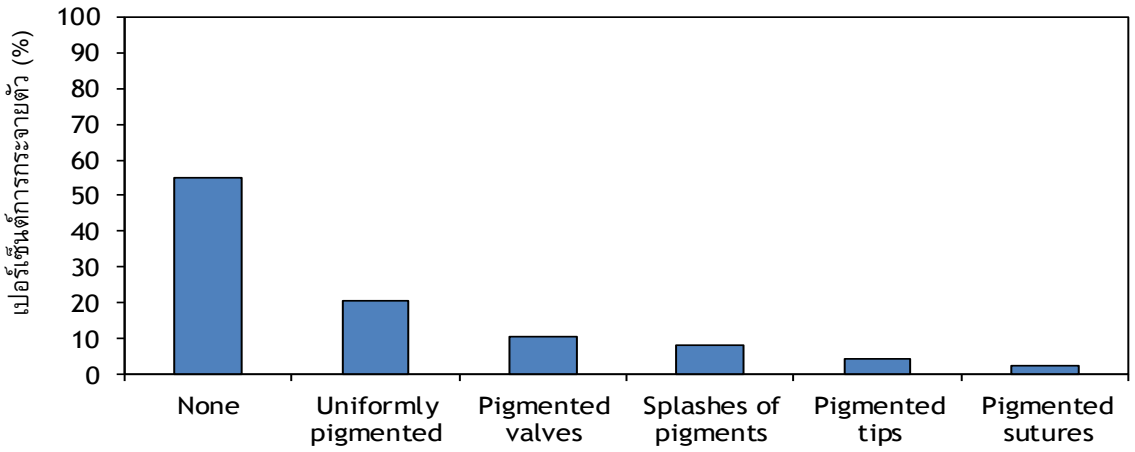
สีดอกของถั่วพุ่มและถั่วฝักยาวจำนวน 50 สายพันธุ์มีความแตกต่างกันโดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ สีม่วง สีขาวปนม่วงและสีขาว พบว่าส่วนใหญ่ถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่ศึกษามีดอกสีม่วง (42 สายพันธุ์) คิดเป็น 83.3% ของประชากรทั้งหมด มีจำนวนสายพันธุ์ที่ให้ดอกสีขาวปนม่วงจำนวน 6 สายพันธุ์(12.5 %) ดอกสีม่วง และมีเพียง 2 สายพันธุ์หรือ 4.2% ที่ให้ดอกสีขาว คือ ถั่วฝักยาวพันธุ์คัด ม.อ. และพันธุ์ที่ไม่ทราบชื่อ (ตัวอย่างหมายเลข 15) สำหรับพันธุ์หมายเลข 25 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บจากอำเภอนาโยง จังหวัดตรัง ไม่สามารถเก็บข้อมูลในครั้งนี้ได้เนื่องจากต้นถูกโรคเข้าทำลายและตายก่อนออกดอก (ภาพที่ 6) สำหรับลักษณะสีดอก มีรายงานว่าสีม่วงเป็นลักษณะข่ม (Sangwan, 1998) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ เนื่องจากสีดอกส่วนใหญ่ในถั่วพุ่มและถั่วฝักยาวเป็นสีม่วง และขาวปนม่วง Aggbicodo (2009) กล่าวถึงลักษณะสีดอกในถั่วพุ่มและถั่วฝักยาวว่าสีดอกมีความหลากหลาย คือ มีตั้งแต่สีขาว ครีม ชมพู น้ำเงินอ่อน และสีม่วง ในขณะที่ Singh และคณะ (1997) รายงานว่าสีดอกของพืชสกุล *Vigna* มีสีขาว ครีม เหลืองและม่วง



ภาพที่ 6 การกระจายตัวของลักษณะสีดอก ในประชากรจำนวน 50 สายพันธุ์ของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่ทำการศึกษา

4. ลักษณะสีฝัก

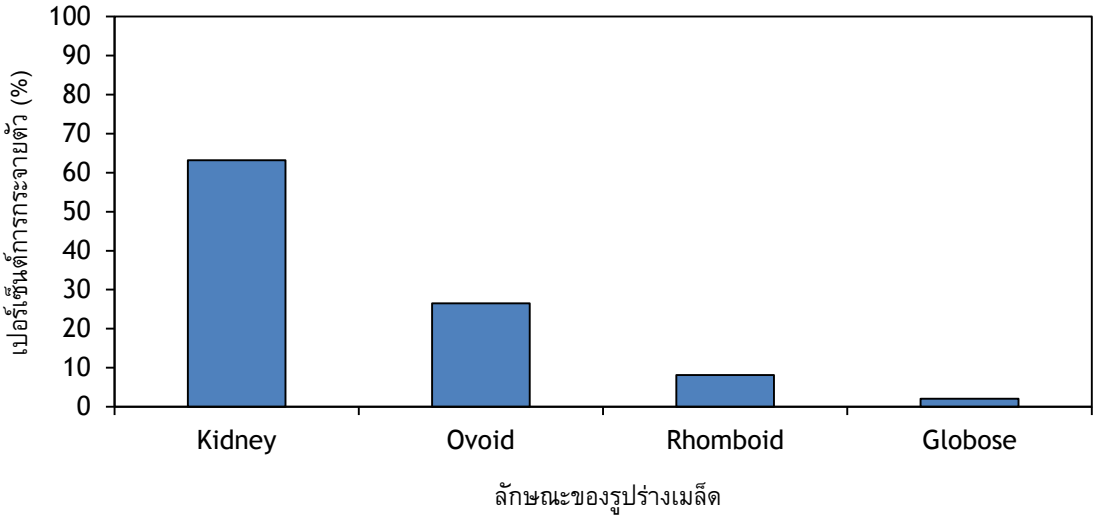
สีฝักของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม 48 สายพันธุ์ (สองสายพันธุ์ไม่สามารถให้ฝักได้) พบว่า มีความหลากหลายค่อนข้างสูง โดยแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ สีเขียว (non pigment) สีม่วง (uniformly pigmented) สีเขียวมีลายพาดสีม่วง (pigmented valves) สีเขียวมีลายประม่วง (splash of pigmented) สีเขียวปลายฝักมีสีม่วง (pigmented tip) สีเขียวมีสีม่วงบริเวณรอยต่อ.(pigmented sutures) จาก 48 สายพันธุ์ที่สามารถบันทึกสีฝักได้ 28 สายพันธุ์ (58.3%) ให้ฝักสีเขียว 8 สายพันธุ์หรือ 21% ให้ฝักสีม่วง 5 สายพันธุ์ (10.4%) มีฝักสีเขียวลายพาดสีม่วง 4 สายพันธุ์ (8.3%) มีฝักสีเขียวประม่วง, 4 สายพันธุ์ (8.3%) มีฝักสีเขียวปลายฝักสีม่วง และมี 1 สายพันธุ์ที่ฝักสีเขียวและมีสีม่วงบริเวณรอยต่อ (ภาพที่ 7) Sangwan และ Lodhi (1998) ศึกษาอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะสีฝัก และรายงานว่ายีนที่ควบคุมสีฝักเป็นยีนคู่เดียวและฝักที่มีสีม่วงจะข่มฝักสีเขียวเพียงบางส่วน (partial dominance)



ภาพที่ 7 การกระจายตัวของลักษณะสีฝัก ในประชากรจำนวน 50 สายพันธุ์ของถั่วฝักยาวและ ถั่วพุ่มที่ทำการศึกษา

5. ลักษณะรูปร่างเมล็ด

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า รูปร่างเมล็ดของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มส่วนใหญ่จะมีรูปร่างแบบรูปไต (kidney) จากภาพที่ 8 พบว่า เมล็ดของถั่วฝักยาว 29 สายพันธุ์จากทั้งหมด 48 สายพันธุ์ที่ให้ฝักและเมล็ดหรือคิดเป็น 64.4% มีเมล็ดลักษณะรูปไต 15 สายพันธุ์ (31.2%) มีรูปร่างเมล็ดแบบ ovoid และตัวอย่างสายพันธุ์ถั่ว 4 สายพันธุ์ (8.3%) มีรูปร่างเมล็ดแบบ rhomboid จากเอกสารการจำแนกลักษณะต่างๆของถั่วพุ่ม พบว่า ถั่วพุ่มมีลักษณะรูปร่างเมล็ดเป็นแบบต่างๆ 5 แบบดังนี้ Kidney, Ovoid, Crower, Globose และ rhomboid (IBPGR, 1983) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ พบรูปร่างเมล็ดเพียง 3 ลักษณะเท่านั้น

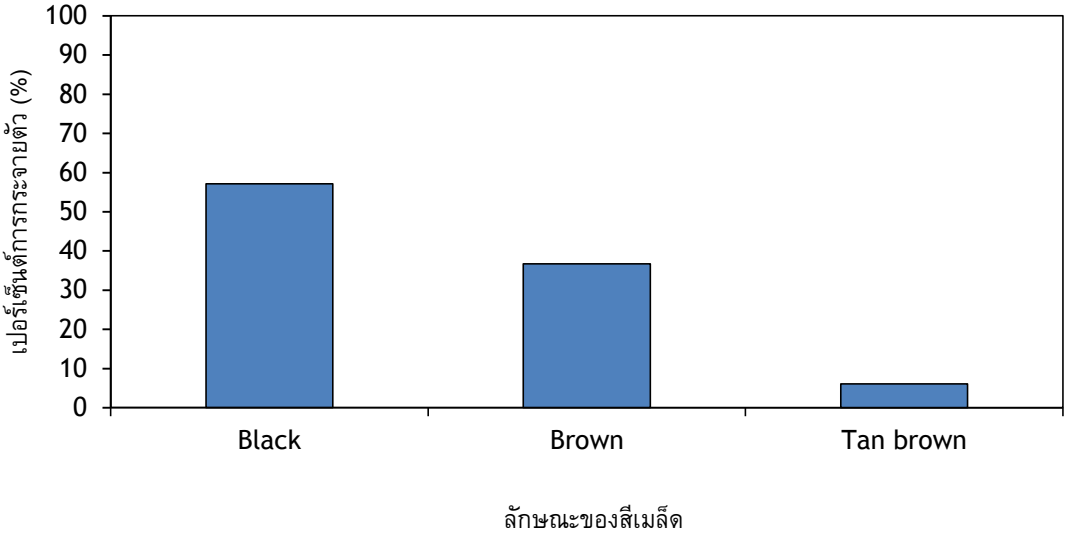


ภาพที่ 8 การกระจายตัวของลักษณะรูปร่างเมล็ด ในประชากรจำนวน 50 สายพันธุ์ของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่ทำการศึกษา

6. สีเมล็ด

สีเมล็ดเป็นอีกหนึ่งลักษณะที่มีความแปรปรวนสูงจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มสีเมล็ดได้เป็น 7 กลุ่มด้วยกัน คือ สีน้ำตาล สีดำ สีขาว สีน้ำตาลลายขาว สีขาวลายดำ สีครีม และสีน้ำตาลเข้ม โดยพบว่าส่วนใหญ่เมล็ดมีสีน้ำตาลคือ 22 สายพันธุ์คิดเป็น 45.83% ถัดมา คือ เมล็ดสีดำจำนวน13 สายพันธุ์ (27.08%) เมล็ดสีขาวและสีน้ำตาลลายขาว อย่างละ 4 สายพันธุ์ (8.3%) สีขาวลายดำและสีครีม อย่างละ 2 สายพันธุ์ (4.16%) และสีน้ำตาลเข้มเพียง 1 สายพันธุ์ (2.08%)(ภาพที่ 9)

ลักษณะสีเมล็ดถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม แม้จะเป็นลักษณะคุณภาพแต่พบว่า มียีนที่เกี่ยวข้องหลายคู่ Drabo และคณะ (1988) ศึกษาในถั่วพุ่ม และสรุปว่ายีนที่ควบคุมสีเปลือกหุ้มเมล็ดของถั่วพุ่มมีทั้งหมด 5 คู่ ในขณะที่ Biradar และคณะ (1997) รายงานว่าสีเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วพุ่มเกี่ยวข้องกับการทำงานของยีน 3 คู่ จากการศึกษาของ Nzaramba และคณะ (2005) รายงานผลที่สอดคล้องกับ Drabo และคณะ (1988) คือสรุปว่ายีนที่ควบคุมการสร้างสีเปลือกหุ้มเมล็ดในถั่วพุ่ม 5 คู่ และการทำงานของยีนยังมีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาในการสร้างสาร antioxidant บริเวณเปลือกหุ้มเมล็ดอีกด้วย



ภาพที่ 9 การกระจายตัวของลักษณะสีเมล็ดในประชากรจำนวน 50 สายพันธุ์ของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่ทำการศึกษา

ข้อมูลลักษณะทางปริมาณ

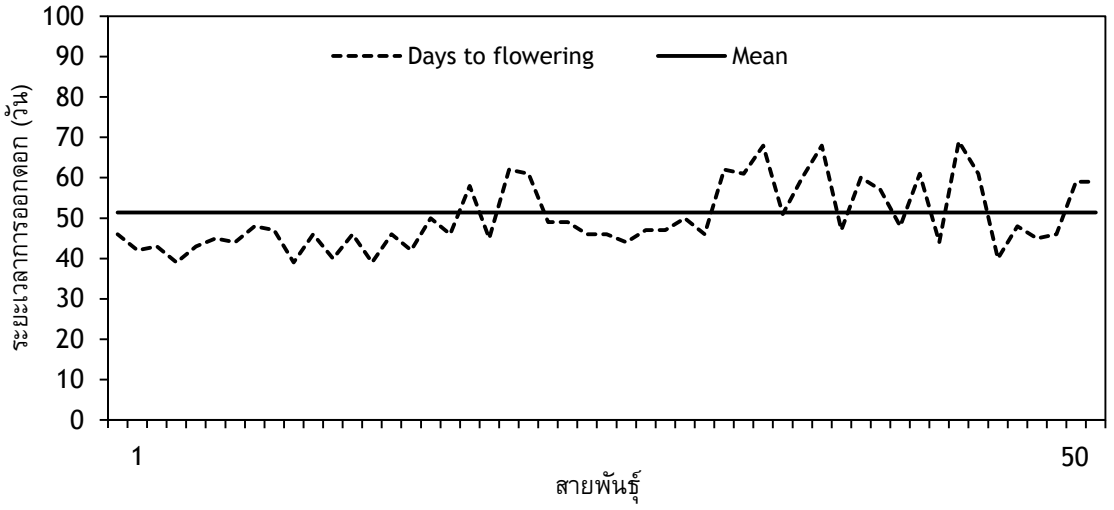
ลักษณะปริมาณที่ทำการเก็บข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่

- วันออกดอก
- ขนาดใบ (termination leaflet length and width)
- ความยาวฝัก
- น้ำหนักฝัก
- ขนาดเมล็ด (seed legth and seed width)

1. วันออกดอก

วันออกดอกนับจากวันดอกแรกบานในแต่ละต้น ซึ่งพบว่าความแปรปรวนค่อนข้างสูงโดยช่วงวันออกดอกมีค่าตั้งแต่ 39 วันในสายพันธุ์ เขาหินซ้อน และหมายเลข 13 สายพันธุ์คาเมอรอน ส่วนสายพันธุ์ที่ออกดอกช้าที่สุดคือสายพันธุ์ตรัง 2 ใช้เวลา 69 วัน ซึ่งมีความแตกต่างกันถึง 30 วัน โดยมีค่าเฉลี่ยวันออกดอก 51.4 วัน พบว่ามีอยู่ 13 สายพันธุ์ที่ออกดอกเร็วกว่าค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ 13สายพันธุ์ที่ออกดอกช้า แตกต่างจากค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (ตารางที่ 3, ภาพที่ 10)

วันออกดอกเป็นลักษณะสำคัญที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชให้ความสนใจเพื่อสร้างสายพันธุ์ใหม่ ให้สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้รวดเร็วขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่มีความแปรปรวนของสภาพอากาศค่อนข้างสูง (Ishiyaku *et al*., 2005) Negri และคณะ (2000) รายงานว่าวันออกดอกมีความสัมพันธ์เชิงลบกับวันเก็บเกี่ยวโดยมีค่าสหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.52 ลักษณะนี้มีอิทธิพลของยีนที่ควบคุมและสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องมาก โดยเฉพาะ photoperiod (Adeyanju และ Ishiyaku, 2007; Uarrota, 2010)



ภาพที่ 10 ระยะเวลาวันออกดอกของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์

ตารางที่ 3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่เก็บรวบรวมและใช้ในการศึกษา

Accession No.	Days to flowering (days)	Terminal leaflet length (mm)	Terminal leaflet width (mm)	Pod lenght (cm)	Pod weight (g)	Seed length (mm)	Seed width (mm)
1	46	137.3	67.0	63.2**+	29.2**+	7.02**-	5.87
2	42**-	152.0	74.0	37.8**+	12.2	11.45**+	5.87
3	43**-	127.6	68.3	50.6**+	18.8**+	11.21	5.56
4	39**-	99.0	69.0	25.0	8.0**-	9.37**-	4.70
5a	43**-	134.0	44.6**-	20.6**-	8.8**-	8.37**-	6.99**
5b	45**-	100.3	61.3	12.2**-	3.4**-	7.65**-	5.93
6	44**-	115.0	23.0**-	19.0**-	7.2**-	7.02**-	6.29**+
7	48	132.6	99.6**+	26.2	12.4	8.35**-	5.21
8	47	133.0	59.6	51.2**+	20.6**+	12.25**+	6.01
9	39**-	117.3	69.2	28.0	11.4	12.42**+	5.23
10	46	101.6	68.0	18.0**-	6.4**-	6.78**-	5.61
11	--	--	--	--	--	--	---
12	46	125.0	87.6**+	23.6**-	8.0**-	9.92	5.26
13	39**-	96.0**-	45.6**-	47.2**+	17.0**+	11.23	5.92
14	46	94.6**-	50.0**-	18.8**-	7.2**-	7.19**-	6.01
15	42**-	101.3	73.0	37.8**+	13.4	11.74**+	5.69
16	50	137.0	84.0	38.6**+	15.6	11.35**+	5.85
17	46	107.0	42.6**-	28.4	10.2	10.36	5.71

ตารางที่ 3 (ต่อ) ลักษณะสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่เก็บรวบรวมและใช้ในการศึกษา

Accession No.	Days to flowering (days)	Terminal leaflet length (mm)	Terminal leaflet width (mm)	Pod lenght (cm)	Pod weight (g)	Seed length (mm)	Seed width (mm)
18	58**+	117.0	69.3	25.8	10.6	8.25**-	5.60
19	45**-	116.3	55.3	44.6**+	18.2**+	12.62**+	5.66
20	62**+	122.6	71.3	18.0**-	5.8**-	8.14**-	5.76
21	61**+	107.0	51.0	19.2**-	7.2**-	8.54**-	5.71
22	49	122.3	72.3	24.4**-	12.8	9.96	5.77
23	49	108.6	66.0	37.6**+	15.2	11.5	5.20**-
24	46	126.3	58.6	35.8	12.4	10.49	5.87
25	---	112.3	78.3	---	---	---	---
26	44**-	125.6	52.3	51.4**+	28.4**+	12.26**+	5.76
27	47	121.0	78.3	32.6	13.8	11.25**+	5.71
28	47	132.6	86.0	25.6	11.0	10.57	6.21
30	56	116.3	71.6	27.8	9.6	9.03**-	5.27**-
31	62**+	123.0	67.6	22.2**-	11.6	10.94	6.30**+
32	61**+	118.3	63.0	30.6	11.8	9.97	4.88**-
33	68**+	137.3	79.3	34.4	21.4**+	10.45	5.36**-
34	51	121.0	68.6	32.8	11.6	10.89	5.29**-
35	60**+	117.3	63.6	25.4	12.0	10.22	6.51**+
36	68**+	129.6	86.3**+	22.4**-	8.2**-	8.56**-	4.64**-
37	47	114.0	69.0	31.0	15.2	12.03**+	5.63
38	60**+	123.0	74.3	26.2	10.6	9.87**-	6.41**+
39	57	126.3	44.3	25.2	8.4**-	10.63	5.58
40	48	129.0	74.6	24.8	9.0**-	10.24	5.59
41	61**+	106.0	71.3	---	---	---	---
42	44**-	116.1	60.3	28.8	9.8	10.50	5.45
43	69**+	126.3	65.6	51.2**+	25.6**+	12.62**+	5.67
44	61**+	118.3	59.3	22.2**-	7.6**-	9.62**-	5.43**-
45	40**-	124.6	63.6	43.0**+	15.0	12.14**+	5.73
46	48	144.0	89.0**+	29.2	11.8	11.47**+	6.17
47	45**-	127.0	66.3	47.2**+	13.66	12.41**+	6.23
48	46	122.6	79.6	31.0	11.8	11.88**+	5.83
49	59**+	152.6**+	81.0	42.6**+	16.8**+	11.94**+	6.31**+
50	59**+	132.6	76.6	33.0	17.0**+	12.20**+	5.87
48	46	122.6	79.6	31.0	11.8	11.88**+	5.83
49	59**+	152.6**+	81.0	42.6**+	16.8**+	11.94**+	6.31**+

ตารางที่ 3 (ต่อ) ลักษณะสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มที่เก็บรวบรวมและใช้ในการศึกษา

Accession No.	Days to flowering (days)	Terminal leaflet length (mm)	Terminal leaflet width (mm)	Pod lenght (cm)	Pod weight (g)	Seed length (mm)	Seed width (mm)
50	59**+	132.6	76.6	33.0	17.0**+	2.20**+	5.87
F-test	**	**	**	**	**	**	**
LSD 0.01	5.95	26.51	18.09	5.60	3.52	0.67	0.41
C.V. (%)	5.25	10.19	12.48	9.77	16.84	5.58	6.19

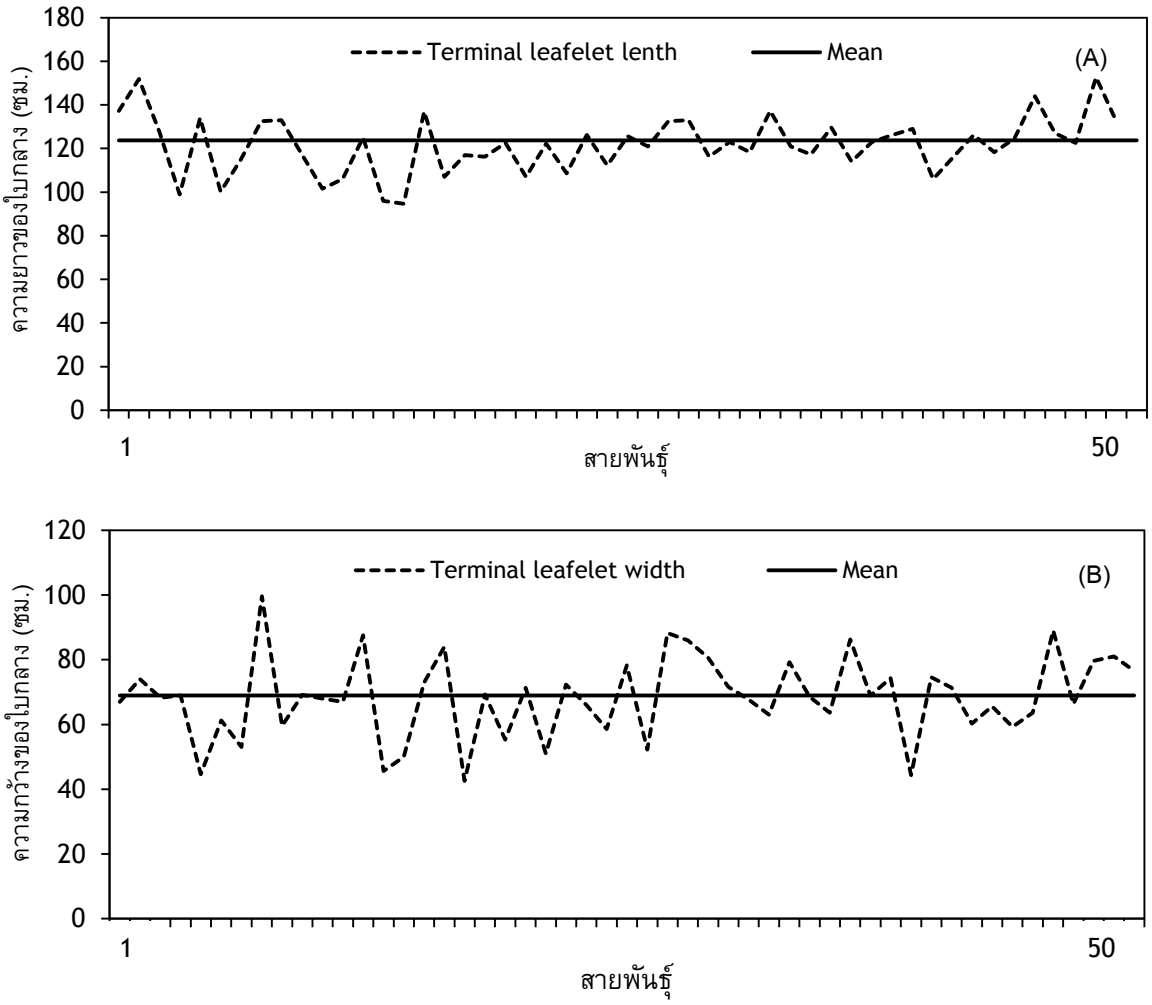
Note : **+ - positively significant difference from mean valu, **- - negatively significant difference from mean value

2. ขนาดใบ (ความยาวและความกว้างของ Terminal leaflet length)

จากการบันทึกความยาวของใบกลาง พบว่าสายพันธุ์ที่มีขนาดใบสั้นที่สุดคือ หมายเลข 14 (ถั่วพุ่มจากประเทศเซอร์เบีย) มีความยาวของใบเฉลี่ย 94.6 มม. ในขณะที่สายพันธุ์หมายเลข 49 (ปัตตานี 2) มีความยาวของใบมากที่สุด (152.6 มม.) ส่วนใหญ่เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ย (123.27 มม.) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นสายพันธุ์หมายเลข 49ที่มีค่ามากกว่าความยาวเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และอีก 2 สายพันธุ์ที่มีค่าน้อยกว่าความยาวเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ สายพันธุ์คาเมอรอน และ VIG 009 (หมายเลข 14 จากประเทศเซอร์เบีย)

ขนาดความกว้างของใบ พบว่ามีความแปรปรวนเช่นกัน โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของความกว้างใบ terminal leaflet อยู่ที่ 68.9 มม. สายพันธุ์ที่มีขนาดใบกว้างที่สุดคือ หมายเลข 7 ทหารพราน มีความยาวของใบเฉลี่ย 99.6 มม. และสายพันธุ์หมายเลข 5a (IT82E-9 พุ่ม) มีความกว้างของใบน้อยที่สุด (42.6 มม.) มีเพียง 3 สายพันธุ์ที่มีความกว้างของใบมากกว่าค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ทหารพราน สุรนารี และสายพันธุ์หมายเลข 46 และมี 6 สายพันธุ์ที่ใบมีความกว้างน้อยกว่าค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ IT82E-9 -7 ขี้นค้าง, IT82T-16, คาเมอรอน, VIG 009, SR863 และถั่วลาย (ตารางที่ 3, ภาพที่ 11)

ขนาดใบ terminal leaflet เป็นอีกหนึ่งลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับการให้ผลผลิตของถั่วพุ่มและถั่วฝักยาว Peksen และคณะ (2005) กล่าวว่าขนาดของใบมีความสำคัญโดยตรงต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง ปกติลักษณะใบของพืชตระกูลถั่วเป็นใบประกอบประเภท pinnate ที่เรียกว่า trifoliage leaves คือใบประกอบด้วยสามใบย่อย และใบกลางจะมีขนาดใหญ่ที่สุด (Davis *et al*., 1991)



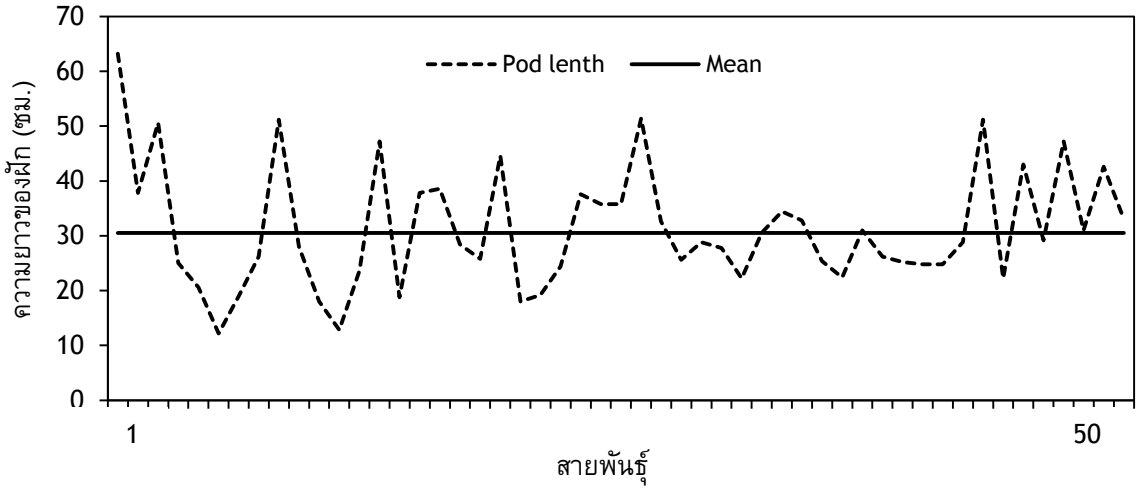
ภาพที่ 11 ความยาวและความกว้างของใบกลาง (terminal leaflet) ถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ (A) ความยาวใบ (B) ความกว้างใบ

3. ความยาวฝัก

โดยปกติลักษณะความยาวฝัก ถั่วพุ่มจะมีความยาวของฝักน้อยกว่าถั่วฝักยาวมาก ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วยถั่วพุ่ม และถั่วฝักยาว พบความแปรปรวนของความยาวฝักสูงมาก ดังแสดงใน Figure สายพันธุ์ที่มีความยาวฝักน้อยที่สุดคือถั่วพุ่ม IT82E-9 พันธุ์ขี้นค้าง (หมายเลข 5b) มีความยาวฝักเฉลี่ยเพียง 12.2 ซม. ส่วนพันธุ์ที่มีฝักยาวที่สุดคือถั่วฝักยาวพันธุ์สามชุก มีความยาวฝักเฉลี่ย 63.2 ซม. ส่วนใหญ่ถั่วฝักยาวที่นำมาศึกษาครั้งนี้จะมีความยาวฝักใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ย ยกเว้น 8 สายพันธุ์ที่มีความยาวฝักน้อยกว่าค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 12)

ลักษณะความยาวฝักเป็นหนึ่งในองค์ประกอบผลผลิตของถั่วฝักยาว เป็นลักษณะที่มีความสำคัญ แม้จะเป็นลักษณะประจำพันธุ์ Negri *et al*. (2000) ศึกษาในถั่วฝักยาว 24 สายพันธุ์ พบว่า สองลักษณะสำคัญที่มีผลต่อผลผลิตถั่งฝักยาวคือ ความยาวฝัก และจำนวนฝักต่อต้น โดยมีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.59 และ 0.70 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามความยาวฝักของทั้งถั่วพุ่มและถั่วฝักยาวอาจเปลี่ยนแปลงได้ใน

สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น จากงานทดลองของ Sarutayophat และคณะ (2007) รายงานว่าความยาวฝักของถั่วฝักยาวพันธุ์คัด ม.อ. มีความยาวเฉลี่ย 57.1 ซม. แต่ค่าเฉลี่ยของพันธุ์เดียวกันในการศึกษาครั้งนี้มีค่า 50.6 ซม. ต่างกันเกือบ 10 ซม. ในขณะที่ Benchasri และ Bairaman (2010) ปลูกทดสอบพันธุ์คัด ม.อ. และพบว่ามีความยาวประมาณ 53 ซม. แต่จากการศึกษาของ Addo-Quaye และคณะ (2011) พบว่าถั่วพุ่มที่ปลูกในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ให้ความยาวของฝักใกล้เคียงกัน Fery (1985) รายงานว่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะความยาวฝักของถั่วพุ่มมีค่า 75.2 % แสดงว่าอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่มีต่อความยาวฝักถั่วพุ่มค่อนข้างต่ำ

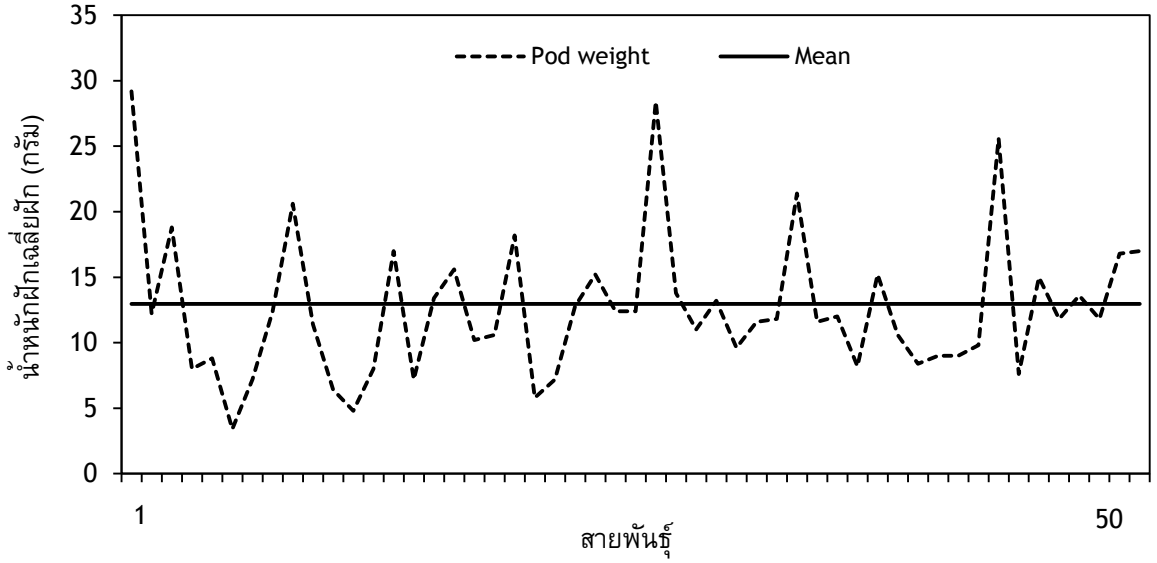


ภาพที่ 12 ความยาวฝักของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์

4. ลักษณะน้ำหนักฝัก

จากการบันทึกข้อมูลน้ำหนักฝัก พบว่าพันธุ์สามชุกเป็นพันธุ์ที่ให้น้ำหนักเฉลี่ยต่อฝักมากที่สุด (29.2 กรัม) ในขณะที่ถั่วพุ่มพันธุ์ IT82E-9 –เลื้อย (หมายเลข 5b) ให้น้ำหนักเฉลี่ยต่อฝักน้อยที่สุด (3.4 กรัม) ค่าเฉลี่ยของทุกสายพันธุ์เท่ากับ 12.95 กรัม จากทั้งหมด 50 สายพันธุ์ มี 11 สายพันธุ์ที่มีน้ำหนักฝักมากกว่าค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และ 12 สายพันธุ์ที่มีน้ำหนักฝักน้อยกว่าค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เหลือมีน้ำหนักฝักไม่แตกต่างจากค่าเฉลี่ย

นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำหนักฝักเฉลี่ยของพันธุ์ที่ศึกษาจำนวน 50 สายพันธุ์ มีความแปรปรวนค่อนข้างสูง (ภาพที่ 13) ลักษณะสำคัญที่เกี่ยวข้องโดยตรง เป็นองค์ประกอบสำคัญของผลผลิตในถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มคือจำนวนฝักต่อต้นและน้ำหนักฝัก (Sobha, 1994; Resmi, 1998) ดังนั้นการคัดเลือกพันธุ์ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ถั่วฝักยาวให้มีผลผลิตสูง ควรใช้ลักษณะทั้งสองลักษณะเป็นหลัก (Vidya และ Oommen, 2000)

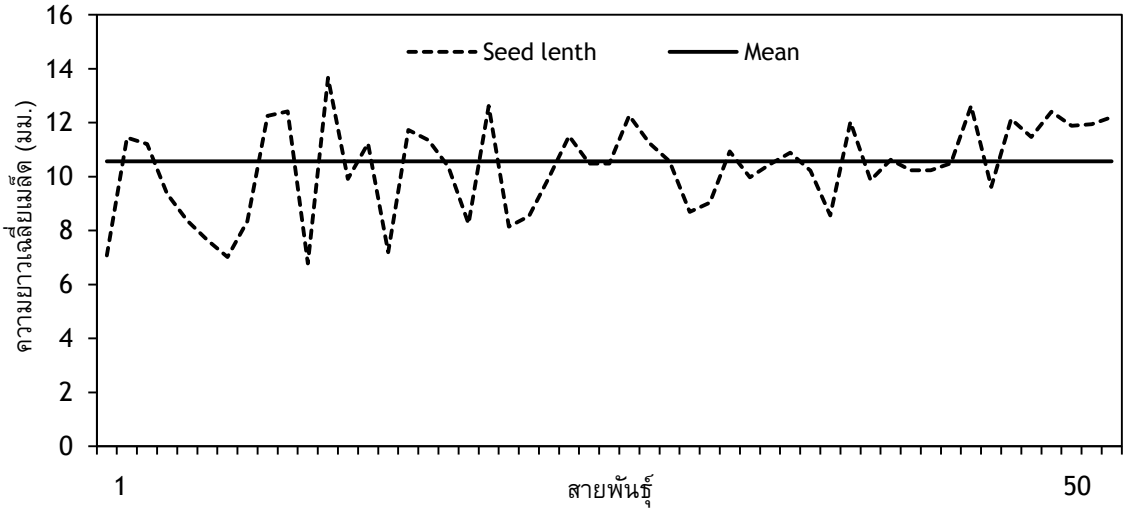


ภาพที่ 13 น้ำหนักฝักเฉลี่ยของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์

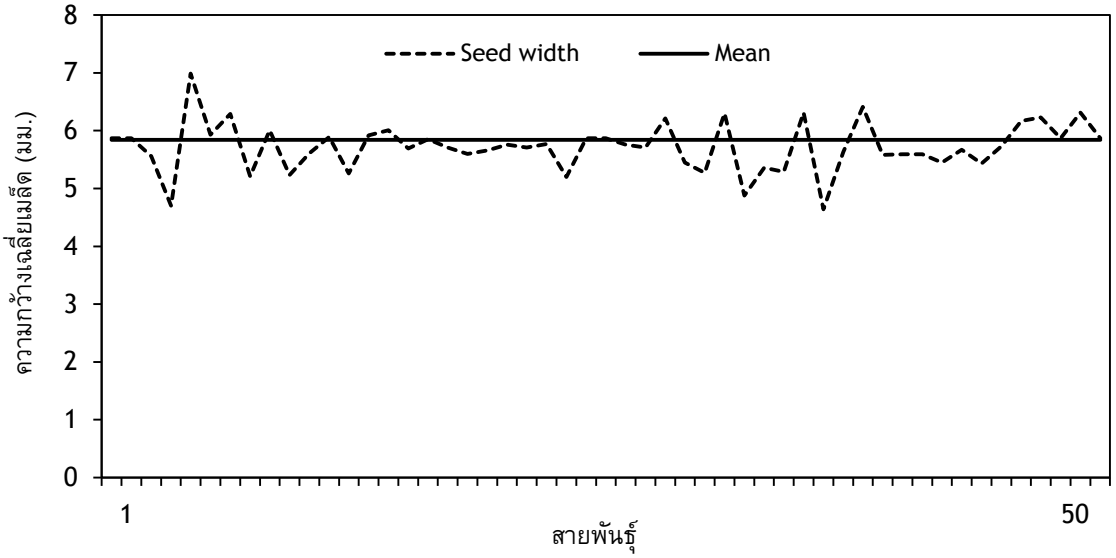
5. ขนาดเมล็ด

ขนาดเมล็ดวัดจากความกว้างและความยาวของเมล็ด สำหรับความยาวของเมล็ดพบว่ามีความแปรปรวนค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับความกว้างของเมล็ด (ภาพที่ 14) โดยพบว่า สายพันธุ์ที่มีขนาดเมล็ดสั้นที่สุด คือ สายพันธุ์สามชุก มีความยาวของเมล็ดเพียง 7.08 มม. ส่วนสายพันธุ์ที่มีความยาวของเมล็ดมากที่สุดคือสายพันธุ์ตรัง 3 และสายพันธุ์ไม่ทราบชื่อจากจังหวัดนครศรีธรรมราช มีความเมล็ดเท่ากับ 12.62 มม.

สำหรับความกว้างของเมล็ดพบว่าเมล็ดที่มีความกว้างมากที่สุดคือสายพันธุ์ IT82E ไม่ขึ้นค้าง และที่มีความกว้างน้อยที่สุดคือสายพันธุ์ไม่ทราบชื่อจากอำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช (หมายเลข36) ขนาดของเมล็ดมีความสัมพันธ์กับรูปร่างเมล็ด เมล็ดที่มีลักษณะรูปไต จะมีความยาวของเมล็ดมากกว่ากลุ่มเมล็ดที่มีรูปร่างชนิด ovoid และ rhomboid ขนาดเมล็ดมีความสำคัญต่อผลผลิตในถั่วพุ่ม แต่สำหรับถั่วฝักยาว ขนาดเมล็ดอาจไม่มีผลมากเท่าน้ำหนักฝักและจำนวนฝักต่อต้น (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 14 ความยาวเฉลี่ยของเมล็ดถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์



ภาพที่ 15 ความกว้างเฉลี่ยของเมล็ดถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์

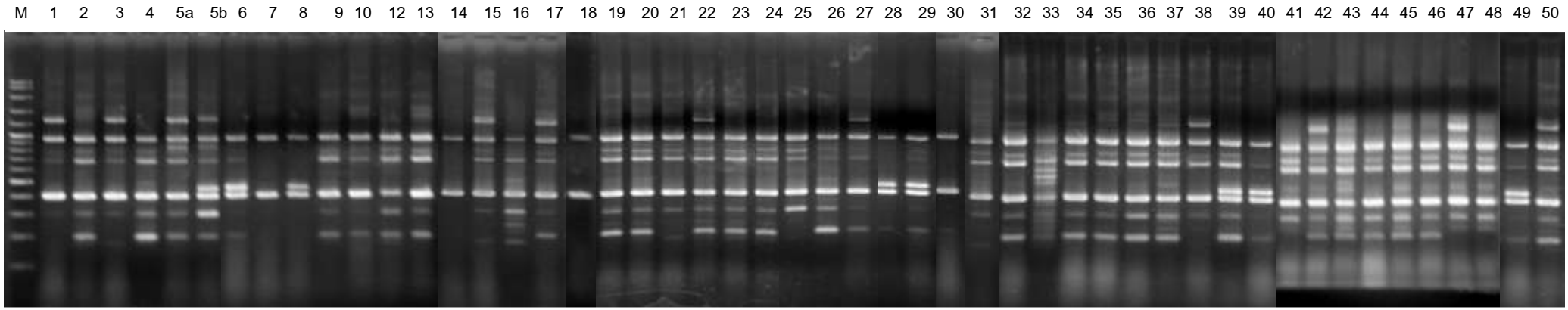
1.3 ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย RAPD

ทำการศึกษาพันธุกรรมของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม 50 สายพันธุ์ โดยการคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับเทคนิค RAPD พบว่า ไพรเมอร์ที่ให้ผลดีที่สุด จำนวน 8 ไพรเมอร์ คือ OPC-06, OPT-12, OPR-04, OPR-09, OPR-12, OPZ-03, OPZ-08, OPZ-13 (ตารางที่ 4) นำมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชทั้งหมด 81 แถบ เฉลี่ย 10 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 73 แถบ (90.12%) และอีก 8 แถบ (9.88%) เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกัน ไพรเมอร์ OPZ-03 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด จำนวน 12 แถบ รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอาร์เอพีดี – พีซีอาร์ แต่ละไพรเมอร์ดังแสดงในภาพที่ 16-23

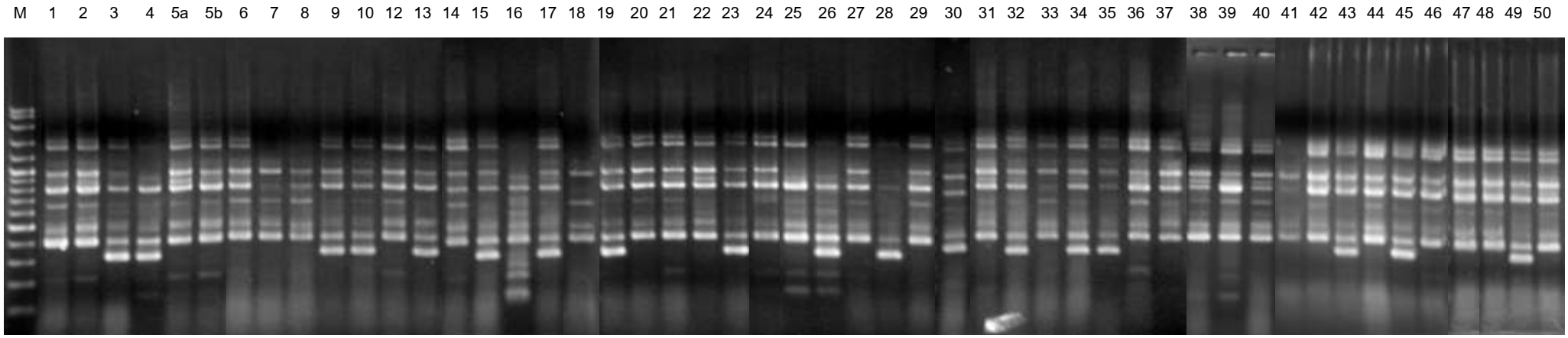
จากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ดังแสดงในภาพที่ 16-23 นำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) cluster analysis หาค่า Similarity coefficient ตามวิธีของ Jaccard (1908) ด้วยโปรแกรม Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version-2.1 (NTSYS Version 2.1) (Rohlf, 2002) พบว่า ตัวอย่างพืช ดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.50-0.98 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.785

ตารางที่ 4 ชนิดของไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน และจำนวนดีเอ็นเอที่ต่างกัน จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม จำนวนทั้งหมด 50 สายพันธุ์

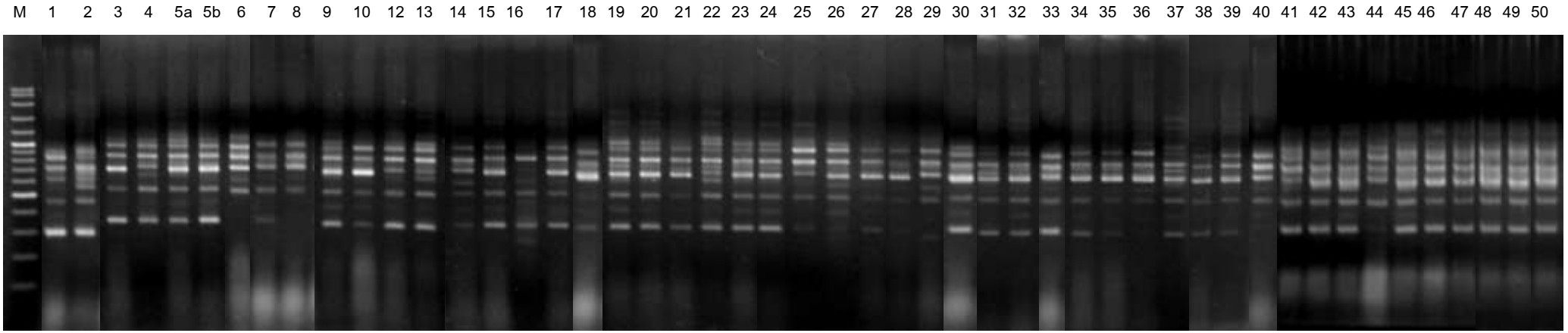
Primer	Sequence (5' → 3')	Amplified fragments	Monomorphic fragments	Polymorphic fragments
OPC-06	CAG GCC CTT C	10	0	9
OPT-12	GAA ACG GGT G	10	0	8
OPR-04	GTG ATC GCA G	9	1	7
OPR-09	ACC CCC GAA G	9	0	11
OPR-12	GGA CCC TTA C	11	0	8
OPZ-03	GAC GGA TCA G	12	0	9
OPZ-08	CAC ACT CCA G	11	0	6
OPZ-13	CTC TGG AGA C	9	2	4
Total		**81**	**8**	**73**
Polymorphic (%)		**-**	**-**	**90.12**



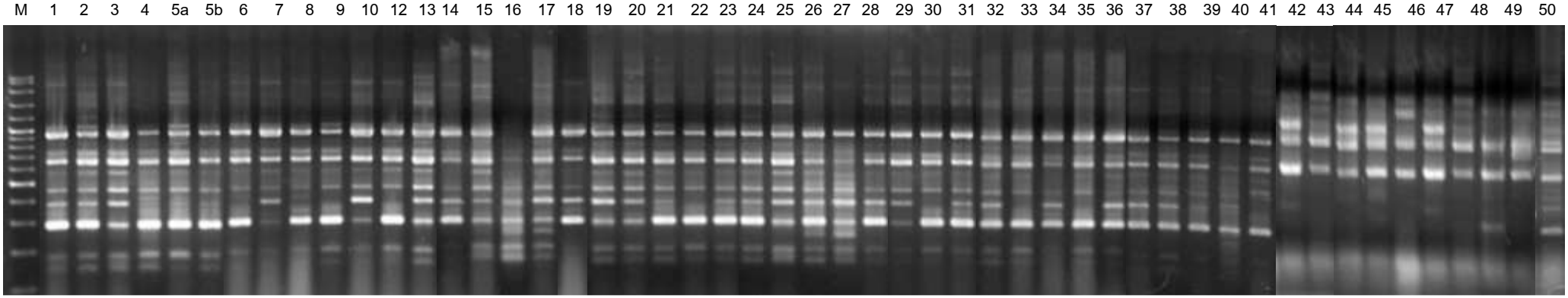
ภาพที่ 16 ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPZ-08



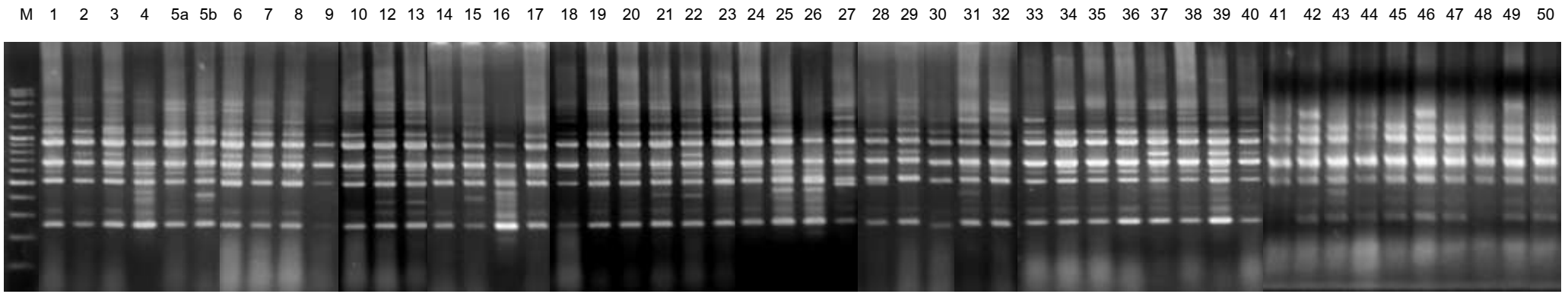
ภาพที่ 17 ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPC-06



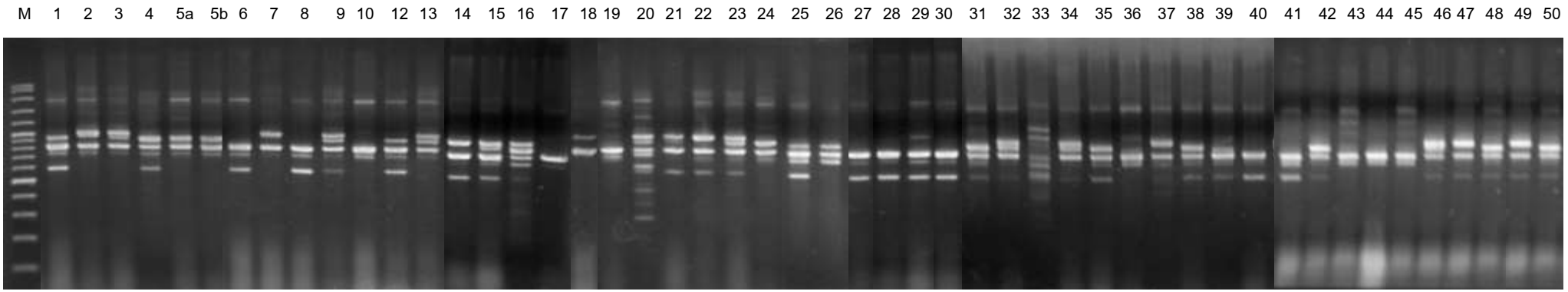
ภาพที่ 18 ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPR-09



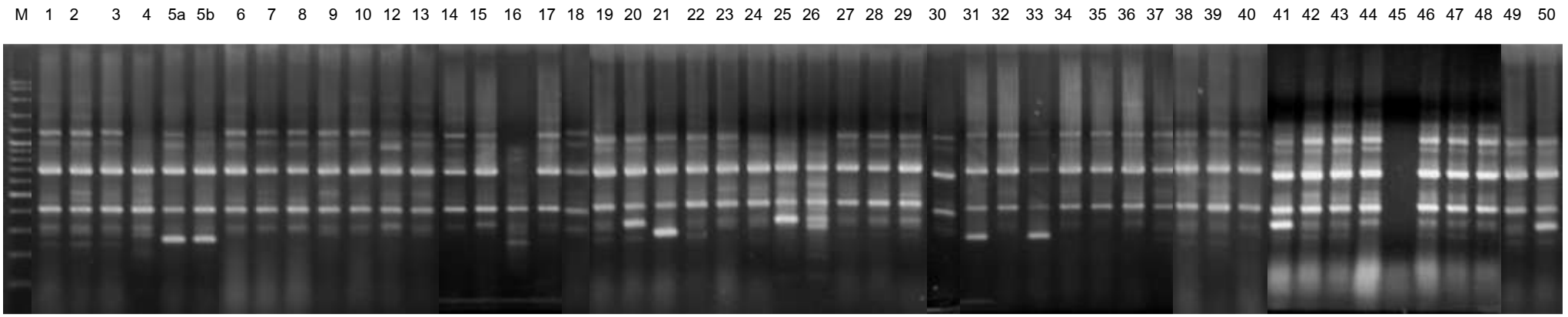
ภาพที่ 19 ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPR-04



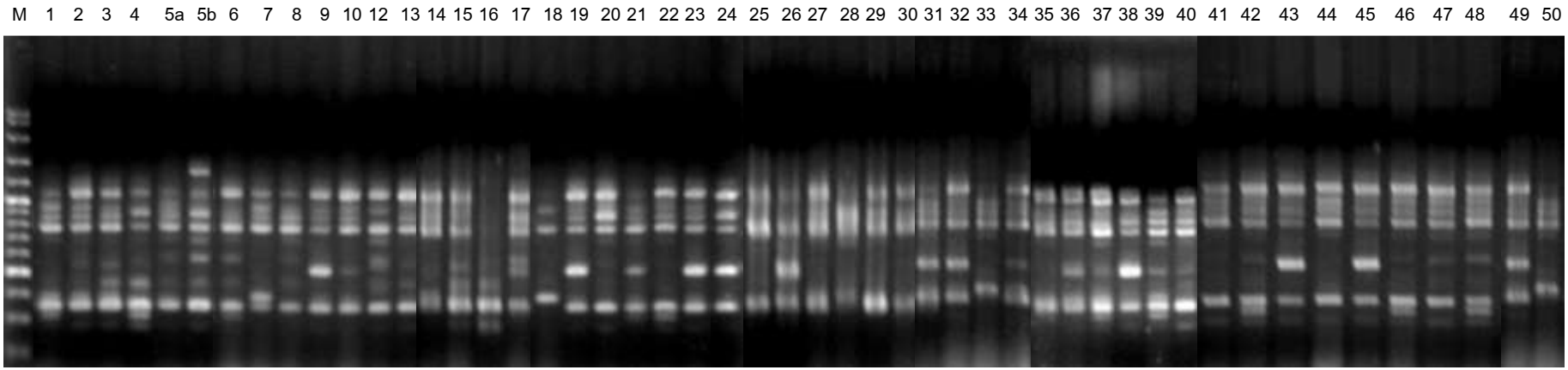
ภาพที่ 20 ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPR-03



ภาพที่ 21 ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPR-12



ภาพที่ 22 ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPZ-13



ภาพที่ 23 ภาพแบบของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพเมอร์ OPT-12

และผลจากเดนโดรแกรมสามารถแบ่งกลุ่มพืชที่ศึกษาได้เป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 16) ดังนี้

- กลุ่มที่ I ประกอบด้วย 4 สายพันธุ์ คือ พันธุ์สามชุก, มาเลเซีย 308, สายพันธุ์ไม่ทราบชื่อจากนครศรีธรรมราชและตรัง (หมายเลข 18 และ 30)

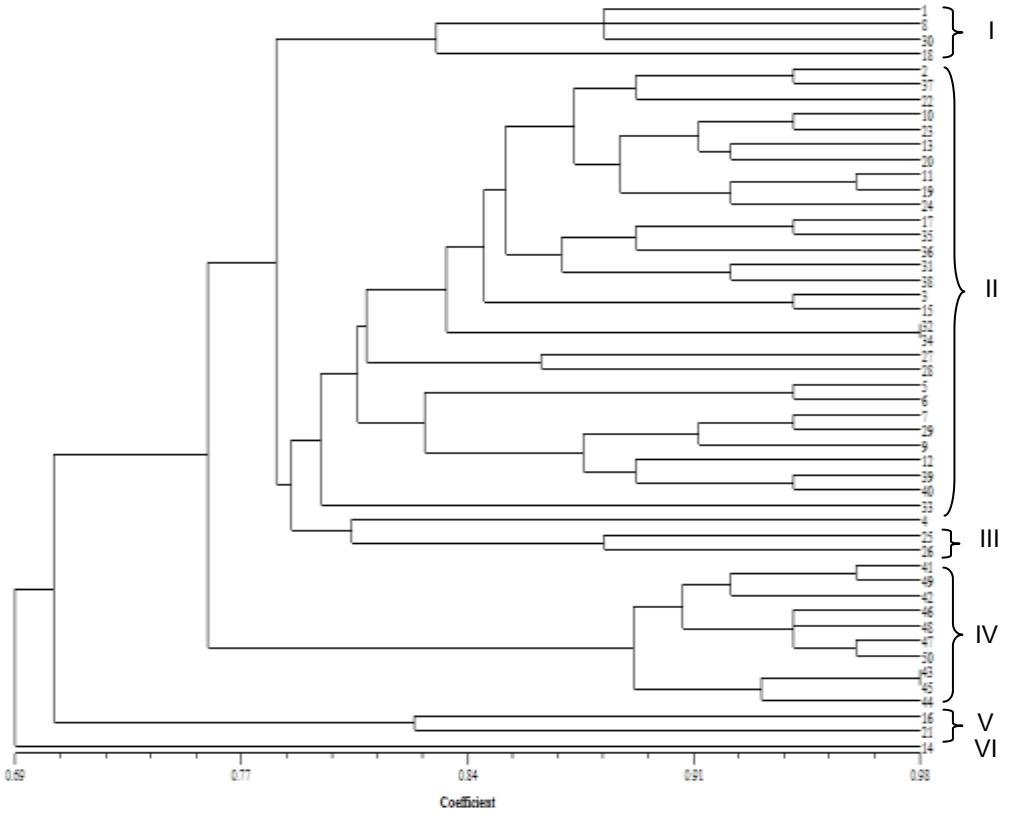
- กลุ่มที่ II ประกอบด้วย 30 สายพันธุ์ คือ ม.ก. 20, คัด ม.อ., IT82E-9 (เลื้อยและไม่เลื้อย), IT82T-16,ทหารพราน, เขาหินซ้อน, ยูมิ, สุรนารี 1, คาเมอรอน, SR 863, ถั่วเฝ้าใส, ถั่ว อ.ส., ถั่วเล็บหมี, ลายเสือ, แก้มพอง, ถั่วเฝ้าใสแดง, ท้ายแดง, ถั่วลาย, ถั่วพราน และสายพันธุ์ไม่ทราบชื่ออีก 10 สายพันธุ์ (หมายเลข 15, 19, 23, 27, 29, 33, 34, 35, 36, 38)

- กลุ่มที่ III ประกอบด้วย 3 สายพันธุ์ คือ ถั่วพุ่มเจียไต๋, ถั่วแดงจากจังหวัดตรัง และถั่วไม่ทราบชื่อจากตรังเช่นกัน (หมายเลข 26)

- กลุ่มที่ IV ประกอบด้วย 10 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ตรัง 2, ท้ายต่อ, ตรัง 3, ระนอง, ถั่วแดงจากจังหวัดพังงา, ปัตตานี 1, 2, 3 และสายพันธุ์ไม่ทราบชื่อจากอำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา และจังหวัดปัตตานี (หมายเลข 45 และ 46 ตามลำดับ)

- กลุ่มที่ V ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ คือ ตรัง 1 และ ถั่วตีนม่าน

- กลุ่มที่ VI ประกอบด้วย 1 สายพันธุ์ คือ VIG 009 ถั่วพุ่มจากประเทศเซอร์เบีย



ภาพที่ 24 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม 50 สายพันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบจากค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่า มีสองคู่ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ ตัวอย่างหมายเลข 32 (ถั่วเฝ้าใส) และ 34 (สายพันธุ์ไม่ทราบชื่อจากจังหวัดนครศรีธรรมราช) ทั้งสองสายพันธุ์นี้ได้มาจากสถานที่เดียวกัน คืออำเภอสิชล แต่เป็นตัวอย่างคนละแปลง ส่วนอีกคู่เป็นถั่วฝักยาวสายพันธุ์ตรัง 3 และถั่วฝักยาวไม่ทราบชื่อจากอำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา (หมายเลข 43 และ 45) ทั้งสองคู่มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.980 ส่วนคู่ที่มีความห่างไกลทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ ถั่วพุ่มจากประเทศเซอร์เบีย (VIG 009) และ ถั่วฝักยาวตรัง 3 มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.500 จะเห็นได้จากเดนโดรแกรมว่าถั่วพุ่ม VIG 009 ถูกแยกออกจากพันธุ์อื่นๆ อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้เทคนิค RAPD ทั้งนี้คงเป็นเพราะความแตกต่างของสภาพภูมิศาสตร์ (geographical isolation) ซึ่งมีอิทธิพลต่อการส่งถ่ายยีนของพืช ทำให้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงกว่าพืชที่ขึ้นอยู่ในสภาพภูมิศาสตร์ที่ใกล้เคียงกัน (Pfeifer and Ietschke, 2006) สำหรับสายพันธุ์ IT82E-16 พันธุ์พุ่มและพันธุ์เลื้อย เมื่ออาศัยการศึกษาโดยใช้เครื่องหมาย RAPD พบว่ามีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.940 ความแตกต่างที่เกิดขึ้น อาจเนื่องจากเกิดการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์เดิมซึ่งมีการเจริญแบบพุ่ม กับสายพันธุ์อื่นที่มีการเจริญแบบเลื้อย ทำให้ลูกผสมมีการเจริญแบบเลื้อยหรือกึ่งเลื้อย และเมื่อมีการเก็บเมล็ดในชั่วต่อมาจึงทำให้รุ่นลูกมีการเจริญแบบเลื้อยและแบบพุ่มปะปนกัน สรพงค์ (2554) รายงานว่า การเจริญเติบโตแบบเลื้อยเป็นลักษณะข่มพันธุ์ที่มีการเจริญแบบพุ่ม ส่วนลักษณะอื่นๆ ไม่ว่าจะเป็นลักษณะใบ ดอก และฝักจะเหมือนกันหมด

3. การเก็บตัวอย่างและการตรวจสอบเชื้อ BICMV

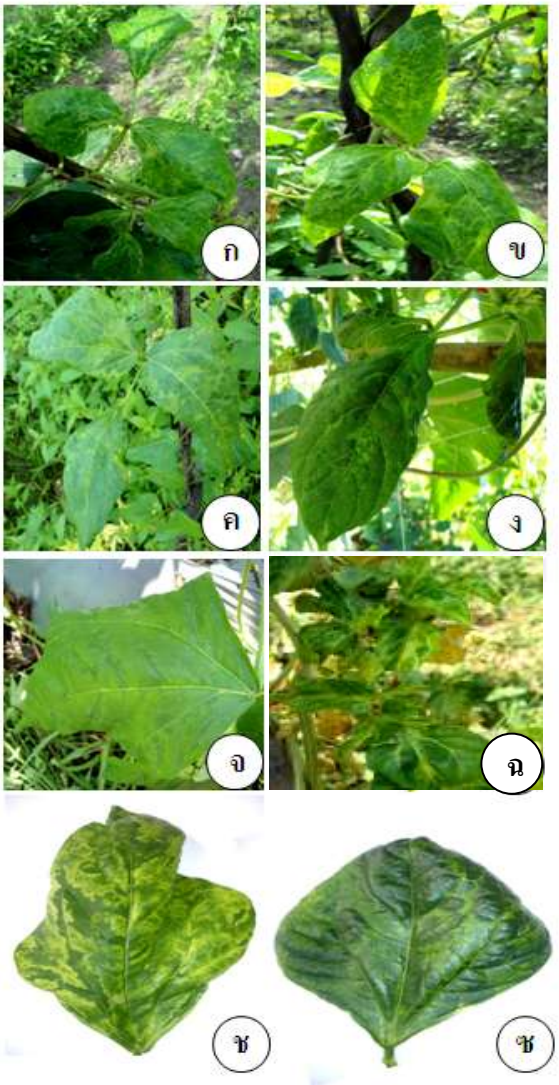
เก็บตัวอย่างเชื้อ BICMV จากแปลงปลูกถั่วฝักยาวที่แสดงในตำบลท่าข้าม ตำบลบางเหลียง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 21 ตัวอย่าง และแปลงปลูกถั่วพุ่มในแปลงฝึกงานวิชาพืชผักสวนครัว ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 10 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งสิ้นจำนวน 31 ตัวอย่าง ลักษณะอาการของพืชที่เก็บมาศึกษาคือ อาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน เส้นใบเหลือง ใบม้วนงอผิดรูปร่าง และลำต้นแคระแกร็น

จากการทดสอบในเบื้องต้นด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ anti-BICMV MAb และ anti-CMV PAb ที่สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ CMV ได้ทั้ง subgroup I และ subgroup II ซึ่งผลิตได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ anti-BICMV MAb ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง จากตำบลท่าข้าม 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 8,9 และ 12 (ภาพที่ 25 ก-ค) ตำบลบางเหลียง 2 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 20 และ 21 (ภาพที่ 24 ง-จ) และแปลงฝึกงานวิชาพืชผักสวนครัว ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 22, 29 และ 30 (ภาพที่ 25 ฉ-ซ) ทั้งนี้ตัวอย่างต้นถั่วที่เก็บมาทั้งหมดไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อ CMV ทั้ง 2 subgroup (ตารางที่ 5)

5. การแยกเชื้อให้เป็นสายพันธุ์เดี่ยวและการเพิ่มปริมาณเชื้อ BICMV

ภายหลังนำตัวอย่างใบถั่วพุ่มที่ติดเชื้อ BICMV (ตัวอย่างที่ 22) ซึ่งเก็บได้จากคณะทรัพยากร-ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขต หาดใหญ่ มาแยกให้เป็นสายพันธุ์เดี่ยว โดยการปลูกเชื้อลงบนใบ *C. amaranticolor* ซึ่งจะแสดงอาการแผลจุดสีเหลือง เฉพาะใบที่ทำการปลูกเชื้อภายในระยะเวลา 6-7

วัน และเมื่อทำการตัดแผลจุดสีเหลือง (ภาพที่ 26ก) ไปปลูกเชื้อลงบนใบจริงคู่แรกของถั่วฝักยาวอายุประมาณ 7 วัน แล้ว พบว่า ต้นถั่วฝักยาวจะเริ่มแสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนให้เห็นที่บริเวณใบยอด (ภาพที่ 26ข) หลังจากปลูกเชื้อไปแล้ว 30 วัน จากนั้นจะสังเกตเห็นใบถั่วฝักยาวมีรูปร่างผิดไปจากปกติ เนื้อใบหดย่น ทั้งนี้ในการทดลองกำหนดให้เชื้อ BICMV ที่แยกได้นี้เป็นไอโซเลท PSU1 เก็บต้นถั่วฝักยาวที่ปลูกเชื้อด้วย BICMV ไอโซเลท PSU1 ไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น positive control ในขั้นตอนของการตรวจสอบเชื้อ BICMV ด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ และใช้เป็นแหล่งเชื้อเพื่อคัดเลือกพันธุ์ถั่วพุ่มที่ต้านทานต่อเชื้อ BICMV ต่อไป



ภาพที่ 25 ลักษณะอาการของพืชที่ติดเชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* ในสภาพแปลงและให้ผลเป็นบวกเมื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ anti-BICMV monoclonal antibody

ตารางที่ 5 เชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มเป็นโรคที่เก็บจากแปลงปลูกและตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ anti-BICMV monoclonal antibody และ anti-CMV polyclonal antibody

พืชอาศัย/ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ	สถานที่เก็บ	Indirect ELISA		ลักษณะอาการ
		anti-BICMV MAb	anti-CMV PAb	
ถั่วฝักยาว/ 8	ต. ท่าข้าม อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	+	-	ใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อนและใบม้วนงอ
ถั่วฝักยาว/ 9	ต. ท่าข้าม อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	+	-	ใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อนและใบม้วนงอ
ถั่วฝักยาว/ 12	ต. ท่าข้าม อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	+	-	ใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อนและใบม้วนงอ
ถั่วฝักยาว/ 20	ต. บางเหลียง อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	+	-	ใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบม้วนงอและมีรูปร่างผิดไปจากปกติ
ถั่วฝักยาว/ 21	ต. บางเหลียง อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	+	-	อาการใบด่างเป็นแถบบริเวณเส้น
ถั่วพุ่ม/ 22	คณะทรัพยากรธรรมชาติ มอ. หาดใหญ่	+	-	อาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบม้วนงอ มีรูปร่างผิดไปจากปกติ เส้นใบเหลือง เส้นใบเหลืองและลำต้นแคระแกร็น
ถั่วพุ่ม/ 29	คณะทรัพยากรธรรมชาติ มอ. หาดใหญ่	+	-	อาการใบด่างสีเหลืองสลับสีเขียวอ่อน ใบด่างเป็นแถบบริเวณเส้นใบ ใบม้วนงอ และผิดรูปร่างไปจากปกติ
ถั่วพุ่ม/ 30	คณะทรัพยากรธรรมชาติ มอ. หาดใหญ่	+	-	อาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบด่างเป็นแถบบริเวณเส้นใบ ใบม้วนงอและมีรูปร่างผิดไปจากปกติ

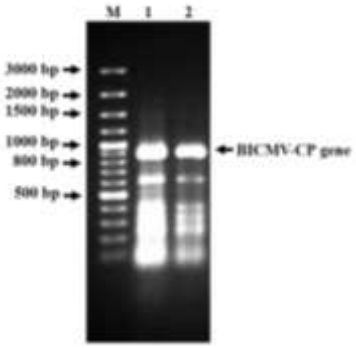
(ก) (ข)

ภาพที่ 26 ใบคีโนโปเดียม (*C. amaranticolor*) แสดงอาการแผลจุดสีเหลือง (chlorotic local lesion) บนใบที่ปลูกเชื้อด้วย *Blackeye cowpea mosaic virus* เป็นเวลา 7 วัน (ก); ใบยอดของต้นถั่วฝักยาวแสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อนและใบผิดรูปร่าง หลังจากได้รับเชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* เป็นเวลา 30 วัน

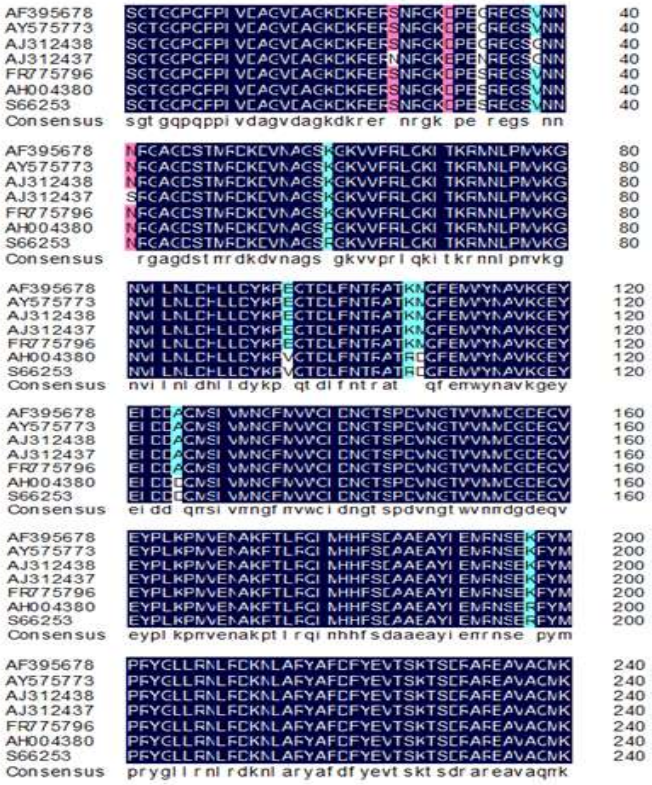
6. การเพิ่มปริมาณ *CP* gene ของเชื้อ BICMV และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การสังเคราะห์ *CP* gene จากอาร์เอ็นเอของเชื้อ BICMV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CACP1 และ CACP2 พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 864 คู่เบส (ภาพที่ 27) ซึ่งเป็นขนาดดีเอ็นเอของเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ BICMV ตามที่คาดหวังไว้ ตรวจสอบความถูกต้องของขนาดดีเอ็นเอที่ได้ว่าเป็น *CP* gene ของเชื้อ BICMV ด้วยการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิด pGEM-T Easy ภายหลังส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ผลที่ได้ไม่เพียงแต่จะยืนยันว่ายีนที่เพิ่มปริมาณได้ขนาดดังกล่าวเป็น *CP* gene ของ BICMV แล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ยังสามารถเพิ่มปริมาณ *CP* gene ที่ปลายทั้งสองข้างมีตำแหน่งที่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งได้ออกแบบไว้ในขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณ *CP* gene ได้อย่างถูกต้องอีกด้วย

ทั้งนี้เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน *CP* gene ของเชื้อ BICMV ไอโซเลท PSU1 ที่เพิ่มปริมาณได้ในการศึกษานี้ ไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ *CP* gene ของเชื้อ BICMV ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ได้แก่ AY575773, AF395678, AJ312438, AJ312437, AH004380 และ S66253 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป DNAMAN Sequence Analysis Software แล้วพบว่ามีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 98 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ *CP* gene ทั้งหมดมาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Translate Tool (http://expasy.org/tools/dna.html) แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม DNAMAN Sequence Analysis Software พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนในส่วนของเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคคล้ายคลึงกัน 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 28) ทั้งนี้ได้รายงาน *CP* gene ของเชื้อ BICMV ไอโซเลท PSU1 เข้าสู่ฐานข้อมูลของ GenBank และได้รับ accession numbers คือ FR775796



ภาพที่ 27 ผลผลิตดีเอ็นเอเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* ขนาดประมาณ 864 คู่เบส จากปฏิกิริยา RT- PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CACP1 และ CACP2; M คือ DNA marker (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas); ต้นถั่วพุ่มติดเชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* ในสภาพแปลงปลูก (ช่องที่ 1) และ ต้นถั่วฝักยาวติดเชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* ไอโซเลท PSU1 ที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ (ช่องที่ 2) ตามลำดับ



ภาพที่ 28 ลำดับกรดอะมิโนเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Blackeye cowpea mosaic virus* (BICMV-CP) ไอโซเลท PSU1 ที่ศึกษาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโน BICMV-CP ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank ได้แก่ accession numbers AY575773, AF395678, AJ312438, AJ312437, AH004380 และ S66253 ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignmentด้วยโปรแกรม DNAMAN Sequence Analysis Software

7. การสังเคราะห์และการแยกสกัด fusion proteins

ทำการคำนวนน้ำหนักมวลโมเลกุล rCP หรือ BICMV-CP fusion proteins จาก *CP* gene ขนาด 864 คู่เบส ที่คาดว่าแบคทีเรียจะสังเคราะห์ได้ในเบื้องต้น ด้วยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BICMV-CP มาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Translate Tool (http://expasy.org/tools/dna.html) จากนั้นคำนวนน้ำหนักมวลโมเลกุลของโปรตีนด้วยโปรแกรม Compute pI/Mw (http://expasy.org/tools/dna.html) ผลจากการคำนวณน้ำหนักมวลโมเลกุล rCP ของ BICMV-CP จะมีน้ำหนักประมาณ 32.0 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Huguenot และคณะ (1994) อย่างไรก็ตามดังได้กล่าวในเบื้องต้นว่าโมเลกุลของ rCP ที่สังเคราะห์ได้จะมีโมเลกุลของ polyhistidine-tagged (6xHis) ติดอยู่จำนวน 6 โมเลกุล ทางด้านปลาย N-Terminal ซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 0.84 kDa ดังนั้นทำให้สามารถคาดการณ์ได้ว่า rCP ของ BICMV-CP ที่มี 6xHis (BICMV-CP fusion proteins) จะมีน้ำหนักมวลโมเลกุล 32.84 กิโลดาลตัน หรือประมาณ 33.0 กิโลดาลตัน

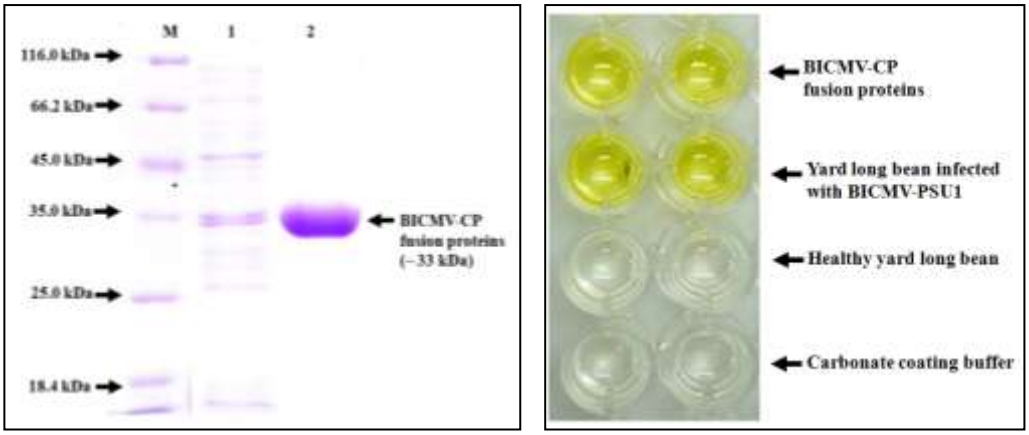
การวิเคราะห์การสังเคราะห์ BICMV-CP fusion proteins ด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE จากเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม pQE-80L/BICMV-CP ภายหลังการชักนำด้วยสารละลาย 1 มิลลิโมลาร์ IPTG เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลที่ได้พบแถบโปรตีนน้ำหนักมวลโมเลกุลประมาณ 33.0 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับการคาดการณ์น้ำหนักมวลโมเลกุลของ fusion proteins ที่ได้ในเบื้องต้น อย่างไรก็ตามพบว่าการสังเคราะห์ fusion proteins ในเซลล์แบคทีเรียมีปริมาณค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจมีปัจจัยสืบเนื่องซึ่งเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ rCP ได้แก่ ชนิดของพลาสมิดที่ใช้เป็น expression vector สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์ rCP ไม่มีความเหมาะสม ตลอดจน rCP ที่เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ได้อาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรีย (Gulati-Sakhuja *et al*., 2009) ซึ่งปัจจัยดังกล่าวจำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ rCP ให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ fusion proteins จากเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร 2xYT+Amp ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ชักนำให้สังเคราะห์โปรตีนนาน 6 ชั่วโมง ภายหลังจากทำการแยกสกัดโปรตีนด้วย Ni-NTA Agarose และผ่านการ dialysis ในบัฟเฟอร์ PBS แล้ว ได้ fusion proteins ที่มีความบริสุทธิ์มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 29 ก) และสามารถแยกสกัด fusion proteins ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งหมด 6 มิลลิกรัม ซึ่งโปรตีนที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์และความเข้มข้นเพียงพอต่อการนำไปใช้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

8. การตรวจสอบ BICMV-CP fusion proteins ด้วยวิธี indirect ELISA

ตรวจสอบความเป็นไปได้ของ BICMV-CP fusion proteins ที่สังเคราะห์ได้ในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ BICMV ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ anti-BICMV MAb ผลที่ได้พบว่า anti-BICMV MAb สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้ง BICMV-CP fusion proteins (A_{405nm} =1.75) และ ต้นถั่วฝักยาวที่ติดเชื้อ BICMV ไอโซเลท PSU1 (A_{405nm} = 2.10) (ภาพที่ 29ข) การทดลองดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่าโปรตีนที่สังเคราะห์ได้มีอีพิโทปที่เหมือนกันกับอิพิโทปที่อยู่บนเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BICMV ในสภาพธรรมชาติ (Helias *et al*. 2003) และสามารถนำไปใช้ในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ BICMV ได้

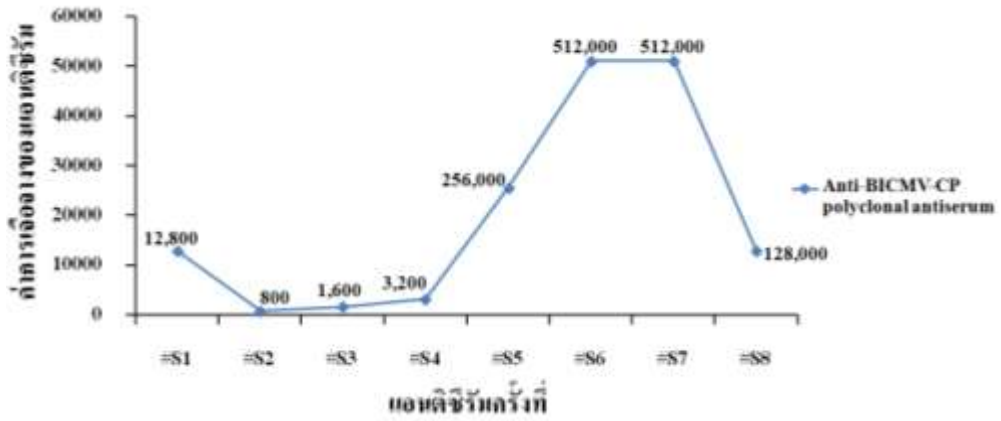
(ก) (ข)



ภาพที่ 29 การตรวจสอบการแสดงออกและการแยกสกัด BICMV-CP fusion proteins ที่สังเคราะห์ได้ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE ดังนี้ BICMV-CP fusion proteins ใน lysis buffer (ช่องที่ 1), BICMV-CP fusion proteins ที่แยกสกัดบริสุทธิ์ (ช่องที่ 2) และ M คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, Hanover, USA) (ก); การตรวจสอบ BICMV-CP fusion proteins โดยใช้ anti-BICMV MAb ด้วยวิธี indirect ELISA เปรียบเทียบกับต้นถั่วฝักยาวติดเชื้อ BICMV ไอโซเลท PSU1 หลุมที่มีสีเหลืองแสดงว่ามีอิพิโทปที่ anti-BICMV MAb สามารถทำปฏิกิริยาได้ (ข)

9. การตรวจหาค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมด้วยวิธี indirect ELISA

ตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่เก็บได้ในแต่ละครั้งต่อ BICMV-CP fusion proteins ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่เก็บได้ในแต่ละครั้งมีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 800-51,200 (ภาพที่ 30) โดยแอนติซีรัมครั้งที่ 6 และ7 จะมีค่าไตเตอร์สูงสุดคือ 51,200 ในขณะที่แอนติซีรัมครั้งที่ 2 จะมีค่าไตเตอร์ต่ำที่สุดคือ 800



ภาพที่ 30 แสดงค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อ BICMV-CP fusion proteins ที่เก็บได้ในแต่ละครั้งจากเลือดกระต่าย

10. การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีแอนติซีรัมต่อเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช

การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัสที่มีรายงานเข้าทำลายถั่วพุ่มทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ *Cucumber mosaic virus* (CMV) subgroup I และ II จีนัส *Cucumovirus*, *Cowpea mosaic virus* (CPMV) จีนัส *Comovirus* และ *Bean common mosaic virus* (BCMV) ซึ่งอยู่ในจีนัส *Potyvirus* ภายหลังทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติซีรัมครั้งที่ 7 เจือจางใน blocking solution อัตราส่วน 1: 200 ผลที่ได้พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งกับ BICMV-CP fusion proteins และ น้ำคั้นใบถั่วฝักยาวที่ติดเชื้อ BICMV ไอโซเลท PSU1 ซึ่งสามารถอ่านค่า $O.D._{405}$ ได้เท่ากับ 1.56 และ 2.05 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ทั้งนี้ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ผลิตได้กับเชื้อไวรัสที่อยู่ในจีนัส *Cucumovirus* และ จีนัส *Comovirus* แต่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามอย่างอ่อนกับเชื้อ BCMV ซึ่งอยู่ในจีนัส *Potyvirus* เช่นเดียวกันกับเชื้อ BICMV ซึ่งสามารถอ่านค่า $O.D._{405}$ ได้เท่ากับ 0.69 ผลที่เกิดขึ้นสามารถคาดการณ์ได้ว่าอาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากเชื้อไวรัสทั้ง 2 มีความสัมพันธ์กันทางซีรัมวิทยา ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้กับเชื้อไวรัสที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือสายพันธุ์ใกล้ชิดกันซึ่งมีอิพิโทปบนเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคที่เหมือนหรือคล้ายกัน (Zettler and Evans, 1972) อย่างไรก็ตามผลการเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีที่ผลิตได้สอดคล้องกับการรายงานของ Taiwo และ Gonsalves (1982) ที่ได้ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ BICMV ไอโซเลท Fla2 และ Flo ตามลำดับ โดยใช้เชื้อ BICMV ที่แยกสกัดบริสุทธิ์ภายหลังจากการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมทั้ง 2 ชุดที่ผลิตได้ แล้วพบว่าแอนติซีรัมดังกล่าวเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ BCMV เช่นเดียวกับในการทดลอง

แม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ BICMV ที่ผลิตได้จาก BICMV-CP recombinant protein จะเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ BCMV ซึ่งเป็นไวรัสที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน อย่างไรก็ตามแอนติซีรัมดังกล่าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในตรวจสอบเพื่อคัดเลือกพันธุ์ถั่วที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายถั่วพุ่มด้วยวิธี indirect ELISA

ตัวอย่างไวรัส	จีนัส	โพลีโคลนอลแอนติซีรัม
BICMV-CP fusion proteins แยกสกัดบริสุทธิ์	-	1.56
น้ำคั้นใบถั่วฝักยาวติดเชื้อ BICMV ไอโซเลท PSU1	*Potyvirus*	2.05
เชื้อ BCMV	*Potyvirus*	0.69
เชื้อ CAMV	*Comovirus*	0.14
เชื้อ CMV subgroup I	*Cucumovirus*	0.09
เชื้อ CMV subgroup II	*Cucumovirus*	0.12
น้ำคั้นใบถั่วฝักยาวปกติ (ค่า $O.D._{405}$ เฉลี่ย 2 เท่า)	-	0.239

หมายเหตุ negative control คือโพลีโคลนอลแอนติซีรัมเจือจาง 1:200 ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบถั่วฝักยาวปกติ

11. การทดสอบความต้านทาน *Blackeye Cowpea Mosaic Virus* (BICMV) ในถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม

ทำการทดสอบการต้านทาน BICMV ในถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม 50 สายพันธุ์ โดยการปลูกเชื้อลงบนใบจริงคู่แรกของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม อายุประมาณ 7 วัน หลังจากนั้นทำการให้คะแนน โดยการสังเกตอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นกับใบพืช และทำการทดสอบการเข้าทำลายของเชื้ออีกครั้งโดยใช้เทคนิค ELISA ตามวิธีของ Clark และ Adams (1977) ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่เป็นบวก (P) คือค่าที่มากกว่าค่าที่อ่านได้จากใบถั่วฝักยาวปกติ 2 เท่า ซึ่งใช้เป็น negative control แล้วนำผลจากการเกิดโรคบริเวณใบ และผลการตรวจสอบด้วย ELISA มาประกอบการพิจารณาประเมินความต้านทานหรืออ่อนแอต่อ BICMV โดยประยุกต์จากวิธีของ Ouattara และ Chambliss (1991) ดังนี้

PS – พืชแสดงอาการใบด่างเหลืองและผลจาก ELISA เป็นบวก
NS - พืชแสดงอาการใบด่างเหลืองแต่ผลจาก ELISA เป็นลบ
P - พืชไม่มีอาการผิดปกติบนใบพืช แต่ผลจาก ELISA เป็นบวก
N - พืชไม่มีอาการผิดปกติบนใบพืช และผลจาก ELISA เป็นลบ

ซึ่งผลจากการประเมิน ดังแสดงในตารางที่ 7 และจากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 48 สายพันธุ์มีความอ่อนแอต่อ BICMV มีเพียงสองสายพันธุ์เท่านั้นที่ต้านทานต่อ BICMV คือสายพันธุ์ตรัง1 (หมายเลข 16) และ ท้ายต่อ (หมายเลข 42) ในจำนวน 48 สายพันธุ์มี 17 สายพันธุ์อ่อนแอต่อ BICMV ค่อนข้างมากได้แก่สายพันธุ์ต่อไปนี้ IT82T-16 (หมายเลข 6) มาเลเซีย 308 (หมายเลข 8) VIG 009 (หมายเลข 14) ตีนม่าน (หมายเลข 21) แก้มพอง (หมายเลข 31) ท้ายแดง (หมายเลข 37) ถั่วลาย (หมายเลข 39) ถั่วพราน (หมายเลข 40) ตรัง 3 (หมายเลข 43) ถั่วแดง (หมายเลข 44) ปัตตานี 1 (หมายเลข 48) ปัตตานี 3 (หมายเลข 50) และสายพันธุ์ที่ไม่ทราบชื่ออีก 5สายพันธุ์ (หมายเลข 19, 20, 34, 36, 46) และมี 4 สายพันธุ์ที่หลังจากปลูกเชื้อแล้ว ไม่แสดงอาการของโรค แต่เมื่อตรวจสอบด้วย ELISA พบว่าผลเป็นบวกคือ สายพันธุ์เขาหินซ้อน (หมายเลข 9) คาเมรอน (หมายเลข 13) ถั่วแดง (หมายเลข 26) และ สายพันธุ์ไม่ทราบชื่อ (หมายเลข 33) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า ต้นชุดควบคุมของเกือบทุกสายพันธุ์ยกเว้นสองสายพันธุ์ที่ต้านทาน ก็แสดงอาการของโรค และผลการตรวจด้วย ELISA ให้ผลเป็นบวกทั้งๆที่ไม่ได้มีการปลูกเชื้อ สาเหตุอาจเป็นเพราะแม้การทดลองครั้งนี้จะทำภายใต้สภาพเรือนตาข่าย แต่พบว่ามีเพลี้ยอ่อนสามารถแทรกตัวเข้าไปได้ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นไปได้ว่า การที่พืชชุดควบคุมแสดงอาการของโรคเนื่องจากการแพร่กระจายจากเพลี้ยอ่อน เนื่องจากมีรายงานว่าเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะของไวรัสหลายชนิด อีกทั้ง BICMV ยังสามารถติดต่อผ่านเมล็ดพันธุ์ได้อีกด้วย (Atiri *et al*., 1986) หากต้นแม่เป็น h โรคก็สามารถติดไปกับเมล็ด และเมื่อนำเมล็ดไปปลูก ต้นใหม่ที่ได้ก็จะแสดงอาการของโรคได้เช่นกัน Wall และคณะ (1996) รายงานว่า BICMV สามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ดได้ประมาณ 37 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 7 ผลการประเมินความต้านทานเชื้อ BICMV ในถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์จากลักษณะอาการของโรค ใบด่างเหลืองและทดสอบโดยใช้เทคนิค ELISA

Accessions number	Average absorbency value	ELISA test/symptom
1	0.4955	PS
2	0.4818	PS
3	0.3246	PS
4	0.2685	P
5a	0.4388	PS
5b	0.3822	PS
6	0.5611	PS
7	0.3469	PS
8	0.2962	PS
9	0.1620	P
10	0.2639	PS
11	*	*
12	0.6934	PS
13	0.5167	P
14	0.8393	PS
15	0.3540	PS
16	0.1470	N
17	0.3407	PS
18	0.3435	P
19	0.4333	PS
20	0.6125	PS
21	0.6800	PS
22	0.2498	PS
23	0.3390	PS
24	0.2084	PS
25	*	*
26	0.5340	P
27	0.2277	PS
28	0.5007	PS
29	0.3008	PS
30	0.3835	P
31	1.2798	PS
32	0.4659	PS
33	0.4346	P
34	0.4192	PS

ตารางที่ 7 (ต่อ) ผลการประเมินความต้านทานเชื้อ BICMV ในถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ จากลักษณะอาการของโรคใบด่างเหลืองและทดสอบโดยใช้เทคนิค ELISA

35	0.3810	PS
36	0.4763	PS
37	0.5367	PS
38	0.2855	P
39	0.4712	PS
40	0.8083	PS
41	*	*
42	0.1960	N
43	0.3135	PS
44	0.6638	PS
45	0.6385	PS
46	0.4238	PS
47	0.4128	PS
48	0.6237	PS
49	0.6674	PS
50	0.8826	PS

* not determined, P- plant showed no symptom but positive for ELISA test,

N- plant showed no symptom and negative for ELISA test,

PS- plant showed symptom and positive for ELISA test

จากผลการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่ามีเพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่มีความต้านทานต่อ BICMV และสามารถใช้สองสายพันธุ์นี้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วพุ่มหรือถั่วฝักยาวให้ต้านทานต่อโรคใบด่างเหลืองที่เกิดจาก BICMV Bashir และ Hampton (1996) ถั่วพุ่ม 5 สายพันธุ์คือ IT 80S 2049, Big Boy, Corona, Serido, and Tennessee Cream #8 มีความต้านทานต่อ BICMV จากการศึกษาโดย Wall และคณะ (1996) พบว่าจากจำนวนถั่วฝักยาว 11สายพันธุ์ที่ทำการทดสอบที่เกาะ Mariana ไม่มีพันธุ์ใดเลยที่ต้านทานต่อ BICMV มีเพียงพันธุ์ green arrow เท่านั้นที่แสดงอาการของโรคน้อย และยังคงสามารถให้ผลผลิตฝักดี Bashir และคณะ (2002) ทำการประเมินสายพันธุ์ถั่วพุ่มทั้งพันธุ์ท้องถิ่น และพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 134 สายพันธุ์ และพบว่า มี 2 สายพันธุ์ที่ต้านทาน BICMV

สรุป

1.การรวบรวมสายพันธุ์และศึกษาสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม

ทำการเก็บตัวอย่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มเน้นพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ ได้ทั้งหมด 50 สายพันธุ์ แยกเป็นพื้นเมืองในภาคใต้จำนวน 37 สายพันธุ์ พันธุ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด 5 สายพันธุ์ พันธุ์จากศูนย์วิจัยและหน่วยราชการจำนวน 5 สายพันธุ์ จากประเทศมาเลเซีย 2 สายพันธุ์ และประเทศเซอร์เบีย 1 สายพันธุ์ ทำปลูกทดสอบเพื่อบันทึกลักษณะสัณฐาน ทั้งลักษณะคุณภาพและลักษณะปริมาณ

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย RAPD

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50สายพันธุโดยใช้เครื่องหมาย RAPD พบว่ากลุ่มถั่วที่ศึกษามีพันธุกรรมกว้างระดับปานกลางโดยมีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.50-0.94 จาก 50 สายพันธุ์สามารถแบ่งกลุ่มตามความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ศึกษาจาก 8 ไพรเมอร์ได้เป็น 6 กลุ่ม

3. ตัวอย่างเชื้อ BICMV

เก็บตัวอย่างเชื้อ BICMV จากแปลงปลูกถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มได้จำนวนทั้งสิ้น 8 ตัวอย่าง ลักษณะอาการของพืชที่เก็บมาศึกษาคือ อาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน เส้นใบเหลือง ใบม้วนงอผิดรูปร่างและลำต้นแคระแกร็น เมื่อนำตัวอย่างต้นถั่วพุ่มที่ติดเชื้อ BICMV มาแยกเชื้อไวรัสให้เป็นสายพันธุ์เดี่ยวโดยการปลูกเชื้อไวรัสลงบนใบ *C. amaranticolor* ซึ่งเป็นพืชอาศัยของเชื้อ BICMV ที่แสดงอาการแผลจุดเหลือง แล้วตัดแผลจุดแต่ละจุดมาปลูกเชื้อลงบนต้นถั่วฝักยาวซึ่งเป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสที่แสดงอาการแบบแพร่กระจายทั่วต้น ในการทดลองสามารถแยกเชื้อไวรัสได้ 1 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท PSU1

2. การเพิ่มปริมาณ *CP* gene ของเชื้อ BICMV

การสังเคราะห์ *CP* gene ของเชื้อ BICMV ไอโซเลท PSU1 ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CACP1 และ CACP2 พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 864 คู่เบส ภายหลังทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน *CP* gene ของเชื้อ BICMV ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป DNAMAN Sequence Analysis Software พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน 98 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้ได้รายงาน *CP* gene ของเชื้อ BICMV ไอโซเลท PSU1 เข้าสู่ฐานข้อมูลของ GenBank และได้รับ accession numbers คือ FR775796

3. การสังเคราะห์ BICMV-CP fusion proteins

การวิเคราะห์การสังเคราะห์ BICMV-CP fusion proteins ด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE จากเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม pQE-80L/BICMV-CP พบว่าได้แถบโปรตีนน้ำหนักมวลโมเลกุลประมาณ 33.0 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับการคาดการณ์น้ำหนักมวลโมเลกุลของ fusion proteins ที่ได้โดยใช้โปรแกรม Compute pI/Mw ภายหลังตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ fusion proteins ที่แยกได้จากเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ด้วย Ni-NTA Agarose พบว่าได้ fusion proteins ที่มีความบริสุทธิ์มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถแยกสกัด fusion proteins ได้ความเข้มข้น 1

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งหมด 6 มิลลิกรัม และเมื่อทำการตรวจสอบ BICMV-CP recombinant protein ที่สังเคราะห์ได้ด้วย anti-BICMV-MAb โดยวิธี indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยากับ fusion proteins ได้เช่นเดียวกันกับเชื้อ BICMV ไอโซเลท PSU1 แสดงว่าโปรตีนที่สังเคราะห์ได้มีอีพิโทปที่เหมือนกันกับอิพิโทปที่อยู่บนเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BICMV ในสภาพธรรมชาติ

4. การตรวจหาค่าไตเตอร์และความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติซีรัม

ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่เก็บได้ในแต่ละครั้งอยู่ในช่วง 800-51,200 โดยแอนติซีรัมครั้งที่ 6 และ7 จะมีค่าไตเตอร์สูงสุดคือ 51,200 และแอนติซีรัมครั้งที่ 2 จะมีค่าไตเตอร์ต่ำที่สุดคือ 800 เมื่อนำแอนติซีรัมครั้งที่ 7 มาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรัสที่พบเข้าทำลายถั่วพุ่มหรือถั่วฝักยาว ได้แก่ *Cucumber mosaic virus* (CMV) subgroup I และ II จีนัส *Cucumovirus*, *Cowpea mosaic virus* (CPMV) จีนัส *Comovirus* และ *Bean common mosaic virus* (BCMV) ซึ่งอยู่ในจีนัส *Potyvirus* พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ BCMV ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อ BICMV อย่างไรก็ตามไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมกับเชื้อไวรัสในจีนัสอื่นที่นำมาทดสอบ

5. การประเมินความต้านทาน BICMV ในถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม 50 สายพันธุ์

จากการประเมินความต้านทานโรคใบด่างเหลือง BICMV โดยใช้วิธีปลูกเชื้อและประเมินจากอาการของโรคบนใบพืช ร่วมกับเทคนิค ELISA พบว่าจากสายพันธุ์ถั่วฝักยาวและถั่วพุ่มจำนวน 50 สายพันธุ์ มีเพียงสองสายพันธุ์เท่านั้นที่ต้านทานต่อโรค คือ สายพันธุ์ตรัง 1 จากจังหวัดตรัง และสายพันธุ์ท้ายต่อจากจังหวัดนครศรีธรรมราช

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2550. เอกสารรายงานสถิติการผลิตการเกษตรตามชนิดพืชเลือกตามกลุ่มพืชผักปีเพาะปลูก 2548/2549 ทั้งประเทศ. กรุงเทพมหานคร : กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ธีระ สูตะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่พับลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ หน้า 107-113.

รัชนี ฮงประยูร. 2549. บทปฏิบัติการซีรัมวิทยาทางด้านโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. หน้า 9-14.

สรพงค์ เบญจศรี. 2554. การศึกษาความดีเด่นของลูกผสมระหว่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม. ว.พระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 21(2): 329-336.

สุพัฒน์ อรรถธรรม พิสสวรรณ เจียมสมบัติ นุชนาถ แซ่อึ้ง อดิศักดิ์ เจียมพิริยะกุล และ อิจิโร อุเอดะ. 2535. โครงสร้างยีนของไวรัสใบด่างเหลืองถั่วฝักยาว. การประชุมวิชาการครั้งที่ 10 เรื่อง เทคนิคของวิธีการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ วันที่ 18-20 พฤศจิกายน 2535. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม. หน้า 74.

อโนมา ดงแสนสุข เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล กมล เลิศรัตน์ และ ธีระยุทธ นาคแดง. 2551. การผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ *Sugacane mosaic virus* (SCMV) สาเหตุโรคใบด่างในข้าวโพด. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 39: 371-375.

Anderson, E.J., Kline, A.S., Kim, K.S., Goeke, S.C. and Albritton, C.W. 1994. Identification of cowpea stunt disease in south central Arkansas. Farm Res. 43:14-15.

Atiri, G.I., Thottappilly, G. and Ligon, D. 1987. Effects of cypermethrin and deltamethrin on the feeding behavior of *Aphis craccivora* and transmission of cowpea aphid-borne mosaic virus. Annals of Applied Biology 110 (3): 455–461.

Bashir, M. 1992. Serological and biological characterization of isolates of blackeye cowpea mosaic and cowpea aphid borne masaic potyvirus seed borne in *Vigna unguiculata* (L) Walp. PhD. Thesis, Oregon State University, USA.

Bashir, M., Ahmad, Z. and Ghafoor, A. 2002. Cowpea germplasm evaluation for virus resistance under greenhouse conditions. Asian Journal of Plant Sciences 1 : 585 – 587.

Bashir, M., Ahamad, Z, Zafar, R. and Malik, S.A. 1995. Sources of immunity in cowpea against blackeye cowpea mosaic potyvirus. Pak.J. Phytopathol. 7:94-97.

Bashir, M, and Hampton, R.O. 1996a. Sources of genetic resistance in cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) to cowpea aphid-borne mosaic potyviruses. European Journal of Plant pathology 102:411-419.

Bashir, M. and Hampton, R.O. 1996b. Identification of cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars and lines immune to variants of blackeye cowpea mosaic potyvirus. Plant Pathology 45:984-989.

Biradar, B.D. Goud, J.U. and Patil, S.S.1997. Differential expression of pleiotropicgenes for pigmentation in cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). crop Research 14(2): 233-242.

Bock, K. R. 1973. East African strains of *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. Ann. Appl. Biol 74:75–83.

Bos, L. 1970. The identification of three news viruses isolated from Wisteria and Pisum in The Netherlands and the problem of variation with in potato virus Y group. Neth. J. Pl. Path. 76: 8-46.

Clark, M.F. and A. N. Adam. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J.Gen.Virol. 34: 475-483.

Coulibaly, S., Pasquet and Gepts, P. 2002. AFLP analysis of the phonetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. Reveals extensive gene flow between wild and domestic types. Theor. Appl. Genet. 104:358-366.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12 : 13 – 15.

Drabo, I., Ladeinde, T. A. O. , Smithson, J. B. , Redden , R. 1988. Inheritance of Eye Pattern and Seed Coat Colour in Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) Plant Breeding 100:119-123.

Fery, R.L. 1985. The genetics of cowpeas: a review of the world literature. *In* Cowpea Research, Production and Utilization. p 25-62. (eds. Singh, S.R. and Rachie, K.O.) Chichester: John Wiley and Sons.

Giami, S. Y. 2005. Compositional and nutritional properties of selected newly developed lines of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). Journal of Food Composition and Analysis 18 : 665 – 673.

Haggag, S. Z., J. A. T. Silva and K. Miyatake. 2009. Antigenic properties of the coat of *Cucumber mosaic virus* using monoclonal antibodies**.** J. Virol. Meth**.** 162: 223-230.

Hsu, H. T., L. Barzuna, Y. H. Hsu, W. Bliss and K. L. Perry. 2000. Identification and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* with mouse monoclonal antibody. Phytopathology 90: 615-620.

Jaccard, P. 1908. Nouvellers recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles 44: 223-270.

Katoch, M., M.Z. Abdin, R. Ram and A.A. Zaidi. 2003. An overview of diagnostics for viruses infecting gladiolus. Crop Prot. 22: 153-156.

Ouattara, S. and Chambliss, O.L. 1991. Inheritance of resistance to blackeye cowpea mosaic virus in white Acre-BUR cowpea. HortSxcience 26:194-196.

Pfeifer, M.and Ietschke, G. 2006. Influence of geographical isolation on genetic diversity of *Himantoglossum hircinum* (Orchidaceae).Folia Geobotanica 41: 3-20.

Porta, C., J. C. Devergne, L. Cardin, J. P. Briand and M. H. V. Van Regenmortel. 1989. Serotype specificity of monoclonal antibodies to *Cucumber mosaic virus*. Arch. Virol. 104: 271-285.

Purseglove, J.W. 1977. Tropical Crops : Dicotyledons. London: Longman Group Ltd.

Roossinck, M. J. 2002. Evolution history of *Cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses. J. Virol. 76: 3382-3387.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual.2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 545 p.

Sangwan, R.S. and Lodhi, G.P.1998. Inheritance of flower and seed pod color in cowpea (*Vigna unguiculata* [L] Walp.). Euphytica 102(2): 191-193.

Singh, B.B. and Hughes, J. 1999. Sources of multiple virus resistance. IITA Annual Report 1999. 30 P.

Splittstoesser, W.E. 1979. Vegetable Growing handbook. Connecticutt:AVI Publising.

Taiwo, V.A., Kareen, K.T , Asa, I.Y. and Hughes, J.D. 2007. Cowpea Viruses: effect of single and multiple infection on symptomatology and virus concentration. Virology Journal 4:95

Thottappilly, G., Rossel, H.W. 1985. World-wide occurrence and distribution of virus dieases. *In* Cowpea research, production and utilization (eds. Singh, S.R. and Rachie, K.O.) pp155-171. Chichester: John Wiley and Sons.

Tindall, H.D. 1983. Vegetables in the Tropics. Hongkong: MacMillan Ltd. 533 P.

Tsuchizaki, T., Senbobu, T., Twaki, M., Pholauporn, S., Srithongchi, W., Deena, N. and Ong, C.A. 1984. Blackeye cowpea mosaic virus from asparagus bean (*Vigna sesquipeladis*) in Thailand and Malaysia and their relationships to a Japanese isolate. Ann. Phytopath. Soc. Japan 50: 461-468.

Van Boxtel, J.; Singh, B. B.; Thottappilly, G.; Maule, A. J. 2000. Resistance of (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) breeding lines to blackeye cowpea mosaic and cowpea aphid borne mosaic poty virus isolates under experimental conditions. Journal of Plant Disease and Protection 107:197-204.

Wahyuni, W. S., R. G. Dietzgen, K. Hanada and R. I. B. Francki. 1992. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of *Cucumber mosaic virus*. Plant Pathol. 41: 282-297.

Wall, G.C.; Kimmons, C.A.; Wiecko, A.T.; Richardson, J. 1996. Blackeye cowpea mosaic virus (BICMV) in yard-long bean in the Mariana Islands. [Online] Available: http://www.kit.nl/library/query.ashx?RecordID=572522

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์จากงานวิจัย

ผลงานตีพิมพ์จากงานวิจัย

Milosevic, D., Jansod, J., Koohapitagtam, M. and Nulasri, C. 2012. Morphological and Molecular Characterization of yardlong bean and cowpea collected from Southern Thailand. Agricultural Sci. J. 43 (2)(Suppl.): 333-336.

Koohapitagtam, M. and Nualsri, C. 2013. Production of polyclonal antibodies specific to the recombinant coat protein of *Blackeye cowpea mosaic virus* and its use in disease detection. Kasetsart J. (Natural Science) 47(4): 603-613.