ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus*

กับชนิดของเพลี้ยแป้งในการก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในสับปะรด

Relationships between Strains of *Pineapple mealybug wilt-associated virus* and Mealybug Species in Causing Pineapple Wilt Disease

เพ็ญ ศรีทองชัย ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ กาญจนา วาระวิชะนี

บทคัดย่อ

สำรวจและเก็บเพลี้ยแป้งสีชมพูและเพลี้ยแป้งสีเทาจากแปลงที่จากจังหวัดเพชรบุรีและราชบุรี มาเลี้ยงให้ปลอดไวรัสในกรงกันแมลง จากนั้นนำหน่อสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมาตรวจสอบว่าปลอดไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรด PMWaV-๑ และ PMWaV-๒ โดยเทคนิคอณูชีววิทยา ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจไวรัส PMWaV-๑ ได้แก่ Pa๒๒๒-F๑ (๕′-ACAGGAAGGACAACACTCAC-๓′) และ Pa๒๒๓-R (๕′-CGCACAAACTTCAAGCAATC-๓′) จะให้แถบของดีเอ็นเอ ขนาด ๕๘๙ คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจไวรัส PMWaV-๒ คือ Pa๒๒๔-F๒ (๕′-CATACGAACTAGACT CATACG-๓′) และ Pa๒๒๕-R๒ (๕′-CCATCCACCAATTTTACTAC-๓′) ให้แถบของดีเอ็นเอ ขนาด ๖๐๙ คู่เบส มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นย้ายปลูกลงดิน จนมีอายุประมาณ ๔-๕ เดือน จึงนำมาถ่ายทอดโรคโดยใช้เพลี้ยแป้งแต่ละชนิดจำนวน ๑๐ ตัว/ต้น ทดสอบกับสับปะรด ๕ ต้น/ชนิดไวรัส มีระยะเวลาในการรับเชื้อและถ่ายทอดเชื้อ ๓ และ ๕ วัน ตามลำดับ เก็บใบสับปะรดมาตรวจหาไวรัสโดยเทคนิค RT-PCR พบว่า ต้นสับปะรดที่รับเชื้อไวรัส PMWaV-๒ และ PMWaV-๑ + PMWaV-๒ เริ่มตรวจพบ แถบดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV-๒ ขนาด ๖๐๙ คู่เบส หลังการถ่ายทอดโรคแล้ว ๒ เดือน แต่ต้นสับปะรดเริ่มแสดงอาการใบอ่อนนิ่ม สีเหลืองซีด และ ลู่ลง หลังจากถ่ายทอดเชื้อแล้ว ๔ เดือน สำหรับไวรัส PMWaV-๑ เริ่มตรวจพบแถบของดีเอ็นเอ หลังการถ่ายทอดโรคแล้ว ๔ เดือน และแสดงอาการเหี่ยวไม่รุนแรงเท่ากับต้นที่มีไวรัส PMWaV-๑ + PMWaV-๒ อยู่ร่วมกัน และเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดโรคของไวรัสทั้ง ๒ strain ค่อนข้างสูงประมาณ ๘๐-๑๐๐% แสดงว่าเพลี้ยแป้งสีชมพูเป็นพาหะที่สำคัญในการถ่ายทอดโรคเหี่ยวสับปะรด สำหรับการถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยใช้เพลี้ยแป้งสีเทาเป็นพาหะ พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดโรคค่อนข้างต่ำ ประมาณ ๒๐ % และสับปะรดไม่แสดงอาการของโรคหลังจากการถ่ายทอดไวรัสแล้ว ๕ เดือน

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

คำนำ

สับปะรด [*Ananas comosus* (L.) Merr.] อยู่ในวงศ์ Bromeliaceae มีถิ่นกำเนิดในประเทศบราซิลและปารากวัย เริ่มมีการนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยโดยชาวโปรตุเกสตั้งแต่ปี พ.ศ. ๒๒๒๓ และปลูกกระจายไปทั่วทุกภาคของประเทศ ตามความเหมาะสมของพื้นที่และชนิดพันธุ์ สับปะรดจัดเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย สามารถปลูกและเก็บผลผลิตได้ตลอดปี เพื่อใช้บริโภคสดภายในประเทศและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น สับปะรดกระป๋อง น้ำสับปะรด สับปะรดกวน สับปะรดแช่แข็งและสับปะรดอบแห้ง มีมูลค่าส่งออกประมาณปีละ ๑๓,๐๐๐-๑๕,๐๐๐ ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, ๒๕๔๕) โดยประเทศไทยครองความเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกสับปะรดเป็นอันดับหนึ่งของโลก เป็นเวลานานกว่า ๑๐ ปีจนถึงปัจจุบัน โดยมีตลาดผู้นำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐประชาชนจีน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, ๒๕๔๗)

ศัตรูพืชเป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกสับปะรด ทำให้ผลผลิตและคุณภาพสับปะรดเสียหายอย่างรุนแรง จนบางครั้งไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ศัตรูสำคัญที่สุดที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญต่อการปลูกสับปะรดของไทยในปัจจุบัน คือ “โรคเหี่ยว” ซึ่งพบระบาดเป็นครั้งแรกในรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อต้นปี พ.ศ. ๒๔๔๓ และปัจจุบันโรคนี้แพร่ระบาดทั่วไปในประเทศที่มีการปลูกสับปะรดเป็นการค้า เช่น ออสเตรเลีย ไทย และคิวบา เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่าพบการระบาดของโรคเหี่ยวในแหล่งปลูกสับปะรดของจังหวัดชลบุรีตั้งแต่ปี พ.ศ. ๒๕๓๒ และทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตอย่างสูง (Dilokkunanant *et al.*, ๑๙๙๖) ด้วยเหตุที่เกษตรกรมีการนำหน่อพันธุ์จากแหล่งที่มีโรคระบาด ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส PiWV (Pineapple wilt virus)ไปปลูก จึงทำให้โรคเหี่ยวแพร่ระบาดมายังภาคตะวันตก ในปี พ.ศ. ๒๕๔๖ โรคนี้ระบาดรุนแรงในแปลงปลูกสับปะรดของภาคตะวันตกบริเวณจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และเพชรบุรี ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสำคัญของประเทศ โดยมีพื้นที่ปลูกสับปะรดเป็นอันดับ ๑ และ ๓ ของประเทศ คือ ๔๙๒,๐๕๘ และ ๕๖,๑๙๒ ไร่ ตามลำดับ จากพื้นที่ปลูกทั้งประเทศ ๙๖๒,๖๙๓ ไร่ โดยพบการแพร่ระบาดของโรคสูงถึง ๙๐% ของพื้นที่ในเขต ตำบลหนองพลับ อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พันธุ์ที่พบว่ามีการระบาดของโรคเหี่ยว คือ พันธุ์ปัตตาเวีย หรือรู้จักแพร่หลายในนามสับปะรดศรีราชา เป็นพันธุ์ที่ปลูกมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ ๗๐ ของผลผลิตรวมของสับปะรด จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ Smooth Cayenne เป็นพันธุ์ที่นอกจากนิยมปลูกเพื่ออุตสาหกรรมแปรรูปแล้ว ยังเป็นพันธุ์หลักเพียงพันธุ์เดียวมาโดยตลอด นอกจากนี้ยังเป็นพันธุ์ที่นิยมใช้บริโภคผลสดอีกด้วย (วันเพ็ญ, ๒๕๔๖)

โรคเหี่ยว เกิดจากไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaVs ได้แก่ PMWaV-๑ และ PMWaV-๒) ซึ่งมีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ ๑,๒๐๐ X ๑๒ นาโนเมตร จัดอยู่ในสกุล คลอสเตอโรไวรัส (*Closterovirus*) กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหารของพืช (Van Regenmortel, ๒๐๐๐; Sether *et al.,* ๒๐๐๑) โดยมีเพลี้ยแป้ง [pink pineapple mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ gray pineapple mealybug, *D. neobrevipes* (Beardsley)] เป็นพาหะ โดยทั่วไปพบเพลี้ยแป้งสีชมพูในแทบทุกแห่งที่มีการปลูกสับปะรดรวมทั้งประเทศไทย มักอาศัยอยู่ใต้โคนกาบใบระดับดินหรือบริเวณรากของสับปะรด ลำต้นใต้ดินและรากของพืชจำพวกหญ้าและอ้อย ซึ่งแตกต่างจากเพลี้ยแป้งสีเทา ที่ชอบอาศัยอยู่บนส่วนของพืชบริเวณเหนือดิน เช่น ใบ ลำต้น รากอากาศ ดอกและผล แต่ไม่พบในหญ้า มักพบทั่วไปในเกาะใหญ่ๆของฮาวาย และมีเพียงบางรายงานว่าพบในเขตกึ่งร้อนชื้น (subtropical location) เช่น ประเทศฟิลิปปินส์ ฟิจิ ไทย และเม็กซิโก เป็นต้น และมีมด ได้แก่ มดคันไฟ (*Solenopsis* sp.) และมดหัวโต (*Pheidole* sp.) เป็นตัวพาเพลี้ยแป้งให้กระจายจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง (ชำนาญ พิทักษ์ และคณะ, ๒๕๔๐; Beardsley, ๑๙๙๓) ทั้งยังมีวัชพืชชนิดต่างๆเป็นแหล่งหลบซ่อนของมดและเพลี้ยแป้ง ลักษณะอาการของโรคที่

เด่นชัด คือใบเริ่มแสดงอาการอ่อนนิ่ม มีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง ปลายใบแห้งตายเป็นสีน้ำตาลหรือสีแดงลามเข้าสู่โคนใบ (die back) ใบลู่ลงและแผ่แบนไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ ต่อมาต้นเหี่ยวและแห้งตายในที่สุด รากมีขนาดสั้นและแตกแขนงน้อยมาก ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ง่าย ซึ่งตรงข้ามกับต้นปกติที่มีรากจำนวนมากยึดเกาะดินแน่น ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ยาก ผลมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ และโรคนี้ไม่สามารถถ่ายทอดโดยวิธีกล (mechanical inoculation) (German *et al.*, ๑๙๙๒; สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, ๒๕๔๖)

ปัจจัยสำคัญในการแพร่ระบาดของโรคเหี่ยวในแปลงปลูกคือ เพลี้ยแป้ง ซึ่งในประเทศไทยพบว่า มีเพลี้ยแป้งสีชมพูในแปลงปลูกสับปะรดทั่วไป และเพลี้ยแป้งสีเทาในพื้นที่ปลูกบางแหล่ง ฉะนั้นจึงเห็นควรมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* กับชนิดของเพลี้ยแป้งในการก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในสับปะรด เกี่ยวกับ เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

๔. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

๑. ต้นสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยว
๒. หน่อพันธุ์สับปะรดที่ปลอดโรค
๓. เพลี้ยแป้งสีชมพูและเพลี้ยแป้งสีเทา
๔. โรงเรือนทดลอง และกรงกันแมลง
๕. ดินและกระถางสำหรับปลูกสับปะรด
๖. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิคอณูชีววิทยา

- วิธีการ

๑. เพลี้ยแป้งที่ใช้เป็นพาหะในการทดสอบ

สำรวจและเก็บเพลี้ยแป้งทั้งสีชมพูและสีเทาจากแปลงปลูกสับปะรดใน จ. เพชรบุรี และ จ. ราชบุรี มาเลี้ยงให้ปลอดจากไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดบนผลฟักทองในกล่องกันแมลง โดยย้ายเพลี้ยแป้งไปบนฟักทองผลใหม่ทุกเดือน อย่างน้อย ๓ รุ่น (generation) เพื่อให้เพลี้ยแป้งปลอดไวรัส ก่อนจะนำไปใช้เป็นพาหะในการถ่ายทอดโรค

๒. การเตรียมแหล่งของไวรัส

นำต้นสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวจากแปลงปลูกมาตรวจสอบว่าเป็นไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* ๑ (PMWaV-๑) หรือ ๒ (PMWaV-๒) โดยเทคนิคอณูชีววิทยา และเก็บไว้ในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นแหล่งของไวรัส

๒.๑การแยกสกัดอาร์เอ็นเอของของไวรัสจากใบสับปะรด
โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (MasterPure™RNA Purification Kit ของบริษัท EPICENTRE)

๑. เก็บตัวอย่างพืช ๑ – ๕ มิลลิกรัม ใช้ทำได้ทันที หรือจะแช่เก็บที่ – ๗๐ °ซ
๒. ดูด Proteinase K (๕๐ ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ๑ ไมโครลิตร ทำให้เจือจางใน ๓๐๐ ไมโครลิตรของ Tissue and Cell Lysis Solution (๑ ตัวอย่าง) ใส่ ๕ ไมโครลิตร ในหลอด ๑.๕ มิลลิลิตร
๓. บดตัวอย่างพืชใน ไนโตรเจนเหลว และเก็บใส่หลอดขนาด ๑.๕ มิลลิลิตร
๔. เติมสารละลาย Tissue and Cell Lysis Solution ซึ่งผสมกับ Proteinase K แล้ว (ข้อ ๒) ๓๐๐ ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน

๕. นำไปบ่มที่ ๖๕ °ซ นาน ๑๕ นาที (ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex ทุกๆ ๕ นาที)
นำสารละลายเซลล์พืชที่ได้มาแช่ในน้ำแข็ง นาน ๓ – ๕ นาที

๖. เติม MPC Protein Precipitation Reagent ๑๗๕ ไมโครลิตร. ในสารละลายของ RNA ของเซลล์พืช ๓๐๐ ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex นาน ๑๐ วินาที

๗. นำมาปั่นที่ ๑๐,๐๐๐ รอบ/นาที นาน ๑๐ นาที

๘. ทิ้งตะกอน และเก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่

๙. เติม Isopropanal ๕๐๐ ไมโครลิตร โดยต้องเย็นจัดโดยแช่ที่ -๒๐ °ซ แล้วพลิกหลอดขึ้นลง ๓๐-๔๐ ครั้ง

๑๐. นำสารละลายข้อ ๙ มาปั่น ๑๐,๐๐๐ รอบ/นาที ที่ ๔°ซ นาน ๑๐ นาที

๑๑. ล้างตะกอนด้วย ๗๕ % ethanol ๕๐๐ ไมโครลิตร แล้ว quick spin (ล้าง ๒ ครั้ง)

๑๒. dry ตะกอนใน ๓๗°ซ นานประมาณ ๒ ชั่วโมง

๑๓. ละลายตะกอนของ RNA ที่ได้ใน TE buffer ๑๕-๒๐ ไมโครลิตร

๒..๒ การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัด มาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะกับไวรัส PMWaV แต่ละ strain (Sether and Hu, ๒๐๐๒) ได้แก่

Pa๒๒๒-F๑	๕′-ACAGGAAGGACAACACTCAC-๓′	PMWaV-๑
Pa๒๒๓-R๑	๕′-CGCACAAACTTCAAGCAATC-๓′	
Pa๒๒๔-F๒	๕′-CATACGAACTAGACTCATACG-๓′	PMWaV-๒
Pa๒๒๕-R๒	๕′-CCATCCACCAATTTTACTAC-๓′	

โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

RT-PCR Profile

<u>๒๐ ul. Reaction</u> (ใช้ชุดของ Bioneer)

dH_2O	๖ ไมโครลิตร
Primer R (๑๐๐ พิโคโมล)	๑ ไมโครลิตร
RNA template	๕ ไมโครลิตร
บ่มที่ ๙๕ °ซ ๓ นาที แล้วแช่บนน้ำแข็ง.อีก ๕ นาที จากนั้นเติม	
๕X RT buffer	๔ ไมโครลิตร
๑๐ mM dNTP	๑ ไมโครลิตร
DTT	๒ ไมโครลิตร
บ่มที่ ๓๗ °ซ ๑๐ นาที แล้วเติม	
M-MLV Reverse Transcriptase	๑ ไมโครลิตร
บ่มที่ ๔๕ °ซ ๕๐ นาที	

PCR Profile

๒๐ ul. Reaction

GoTaq®Green Master Mix (Promega)	๑๐.๐ ไมโครลิตร
Primer R (๑๐๐ พิโคโมล)	๐.๕ ไมโครลิตร
Primer F (๑๐๐ พิโคโมล)	๐.๕ ไมโครลิตร
dH_2O	๖.๐ ไมโครลิตร
Template (ที่ได้จาก RT-PCR)	๓.๐ ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ cDNA ตาม program ดังนี้

๙๔ °ซ	๕ นาที	
๙๔ °ซ	๑.๓๐ นาที	๓๕ รอบ
๕๕ °ซ	๑.๓๐ นาที	
๗๒ °ซ	๑.๓๐ นาที.	
๗๒ °ซ	๑๐ นาที	

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย ๒ % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า ๑๐๐ โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา ๓๐ นาที

๓. การเตรียมหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดไวรัส

นำต้นอ่อนสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ปลอดโรค มานำมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA ๑ ppm) (สถาบันวิจัยพืชสวน, ๒๕๔๖) กอ และย้ายอาหารทุก ๑-๒ เดือน จากนั้นจึงย้ายเป็นต้นเดี่ยวลงเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก (MS+IBA ๐.๕ ppm) เมื่อนำมาเก็บรักษาในโรงเรือนกันแมลง และใส่ปุ๋ยบำรุงต้นให้มีอายุประมาณ ๔-๕ เดือน ก่อนจะนำไปใช้เป็นพืชทดลองในการทดสอบการถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยเพลี้ยแป้ง

๔. การถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยเพลี้ยแป้งสีชมพู

นำตัวอ่อนเพลี้ยแป้งแต่ละชนิด (instar ที่ ๒-๓) ที่ปราศจากไวรัส มาปล่อยบนใบสับปะรดจากต้นที่เป็นโรคซึ่งตรวจสอบแล้วว่ามีไวรัสเดี่ยว (PMWaV-๑ หรือ PMWaV-๒) และ ต้นที่มีไวรัสทั้ง ๒ strain (PMWaV-๑+ PMWaV-๒) โดยเก็บในกล่องชั้นเพื่อรับเชื้อไวรัส PMWaV-๑, PMWaV-๒ และ PMWaV-๑+ PMWaV-๒ เป็นเวลา ๓ วัน จากนั้นจึงนำไปปล่อยบนหน่อสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียปกติ นาน ๕ วัน โดยใช้เพลี้ยแป้ง ๑๐ ตัว/ต้น (Dilokkunanant *et al*., ๑๙๙๖) จำนวน ๕ ต้น/ชนิดของไวรัส/ชนิดเพลี้ยแป้ง จากนั้นเก็บต้นสับปะรดไว้ในกรงกันแมลง เพื่อสังเกตอาการของโรค ใส่ปุ๋ยและฉีดยาป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้งบนต้นสับปะรดทุก ๒ สัปดาห์

ตรวจหาไวรัสในหน่อสับปะรดหลังจากได้รับเชื้อไวรัสจากเพลี้ยแป้ง ทุก ๓๐ วันหลังการถ่ายทอดโรคแล้ว โดยใช้เทคนิคอณูชีววิทยา (RT-PCR)

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม ๒๕๕๓ - กันยายน ๒๕๕๕

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

๕. ผลการทดลองและวิจารณ์

๑. เพลี้ยแป้งที่ใช้เป็นพาหะในการทดสอบ

เพลี้ยแป้งทั้งสีชมพูจากแปลงปลูกสับปะรด สามารถขยายพันธุ์ได้ดีบนผลฟักทอง (ชมัยพร และคณะ, ๒๕๕๕) และถ้าให้เพลี้ยแป้งอยู่ในที่มืด โดยนำกล่องกระดาษมาครอบกล่องเลี้ยงอีกชั้นหนึ่ง เพลี้ยแป้งจะขยายพันธุ์ได้ดีกว่าการเลี้ยงในที่สว่าง ทั้งนี้เพราะในธรรมชาติเพลี้ยแป้งสีชมพูมักอาศัยอยู่ตามซอกกาบใบโคนต้น หรือบริเวณรากสับปะรด สำหรับเพลี้ยแป้งสีเทาสามารถเจริญเติบโตในที่มีแสงสว่าง (วันเพ็ญ, ๒๕๔๖; สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, ๒๕๔๖)

๒. การเตรียมแหล่งของไวรัส

นำหน่อสับปะรดที่แสดงอาการเหี่ยวจากแหล่งปลูก มาตรวจสอบว่าเกิดจากไวรัสเดี่ยว ได้แก่ PMWaV-๑ หรือPMWaV-๒ และต้นที่มีไวรัสทั้ง ๒ strain อยู่ร่วมกัน โดยเทคนิค RT-PCR จากนั้นนำมาปลูกในกระถางอย่างละ ๓ กระถาง และเก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง เพื่อใช้เป็นแหล่งของไวรัสในการทดลองต่อไป

๓. การเตรียมหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดไวรัส

หน่อสับปะรดปลอดโรคที่ได้จากต้นอ่อนในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน ๔๐ หน่อ ได้นำมาปลูกในกระถาง ดูแลใส่ปุ๋ย พ่นยากำจัดแมลงและเก็บไว้ในกรงกันแมลง พบว่า หน่อสับปะรดมีการเจริญเติบโตดี ฉะนั้นเมื่อต้นสับปะรดอายุ ประมาณ ๕ เดือน จึงเหมาะที่จะนำไปทดสอบการถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยเพลี้ยแป้งสีชมพู

๔. การถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยเพลี้ยแป้งสีชมพู

หลังจากถ่ายทอดโรคเหี่ยวที่เกิดจากไวรัส PMWaV-๑, PMWaV-๒และ PMWaV-๑ + PMWaV-๒ โดยใช้เพลี้ยแป้ง ๑๐ ตัว/ต้น มีระยะเวลาในการรับเชื้อและถ่ายทอดเชื้อ ๓ และ ๕ วัน ตามลำดับ เก็บใบสับปะรดมาตรวจหาไวรัสโดยเทคนิค RT-PCR พบว่า ต้นสับปะรดที่รับเชื้อไวรัส strain เดี่ยว (PMWaV-๒) และstrain ผสม (PMWaV-๑ + PMWaV-๒) โดยใช้เพลี้ยแป้งสีชมพูเป็นพาหะ เริ่มตรวจพบ แถบ band ของดีเอ็นเอของ PMWaV-๒ ขนาด ๖๐๙ คู่เบส หลังการถ่ายทอดโรคแล้ว ๘-๑๐ สัปดาห์ แต่ต้นสับปะรดเริ่มแสดงอาการใบอ่อนนิ่ม สีเหลืองซีด และ ลู่ลง หลังจากถ่ายทอดเชื้อแล้ว ๔ เดือน ต้นที่ได้รับไวรัสทั้งสอง strain แสดงอาการแคระแกร็นกว่าต้นที่ได้รับไวรัส PMWaV-๒ สำหรับ PMWaV-๑ เริ่มตรวจพบแถบ band ของดีเอ็นเอ ขนาด ๕๘๙ คู่เบส หลังการถ่ายทอดโรคแล้ว ๔ เดือน และแสดงอาการเหี่ยวไม่รุนแรงเท่ากับต้นที่มีไวรัส PMWaV-๑ + PMWaV-๒ แสดงว่า ถ้าไวรัสเข้าทำลายต้นสับปะรดทั้งสอง strain มีผลทำให้พืชแสดงอาการเหี่ยวรุนแรงกว่าการเข้าทำลายโดยไวรัส strain เดี่ยว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sether และคณะ (๒๐๐๑) และเปอร์เซ็นต์การ

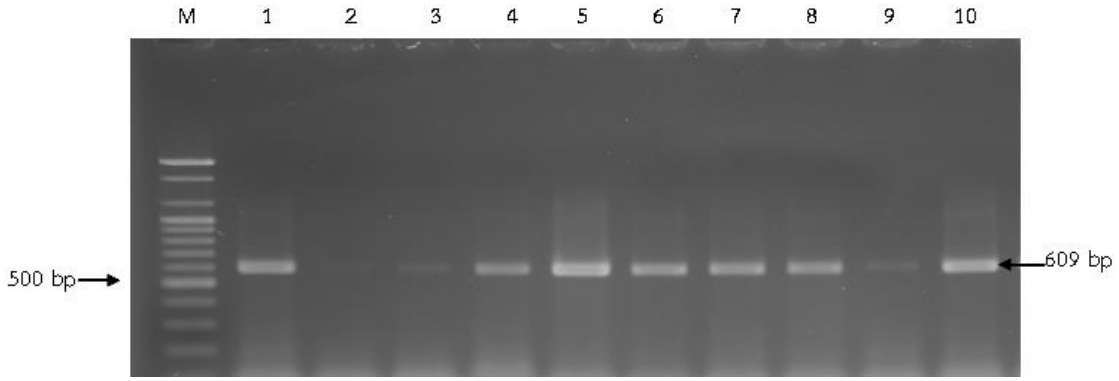
ถ่ายทอดโรคของไวรัสทั้ง ๒ strain ค่อนข้างสูงประมาณ ๘๐-๑๐๐% (ตารางที่ ๑, ภาพที่ ๑) แสดงว่าเพลี้ยแป้งสีชมพูเป็นพาหะที่สำคัญในการถ่ายทอดโรคเหี่ยวสับปะรด

สำหรับการถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยใช้เพลี้ยแป้งสีเทาเป็นพาหะ พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดโรคค่อนข้างต่ำ ประมาณ ๒๐ % และสับปะรดไม่แสดงอาการของโรคหลังจากการถ่ายทอดไวรัสแล้ว ๕ เดือน (ตารางที่ ๑) ซึ่งสอดคล้องกับสภาพธรรมชาติในแปลงปลูกสับปะรด ที่พบเพลี้ยแป้งชนิดนี้ในบางแหล่งปลูกเท่านั้น

ตารางที่ ๑. เปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดโดยเพลี้ยแป้ง

	จำนวนต้นที่ตรวจพบไวรัสหลังการถ่ายทอดโรคเหี่ยว (%)				
	๑ เดือน	๒ เดือน	๓ เดือน	๔ เดือน	๕ เดือน
เพลี้ยแป้งสีชมพู					
PMWaV-๑	๐	๐	๐	๒ (๔๐%)	๔ (๘๐%)★
PMWaV-๒	๐	๑ (๒๐%)	๒ (๔๐%)	๔ (๘๐%)★	๔ (๘๐%)
PMWaV-๑+๒	๐	๓ (๖๐%)	๔ (๘๐%)	๕ (๑๐๐%)★	๕ (๑๐๐%)
เพลี้ยแป้งสีเทา					
PMWaV-๑	๐	๐	๐	๐	๑ (๒๐%)
PMWaV-๒	๐	๐	๐	๑ (๒๐%)	๑ (๒๐%)
PMWaV-๑+๒	๐	๐	๐	๑ (๒๐%)	๑ (๒๐%)

★ เริ่มพบลักษณะอาการของโรคเหี่ยวบนต้นสับปะรด



ภาพที่ ๑. ผลวิเคราะห์การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV-๒ ของสับปะรดโดยใช้ไพรเมอร์ Pa๒๒๔-F๑ และ Pa๒๒๕-R๑

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (๑๐๐ bp. DNA Ladder)

๑ : ต้นเป็นโรคที่เกิดจาก PMWaV-๒

๒ : ต้นปกติ

๓-๖ : ต้นสับปะรดที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อ PMWaV-๒

๗-๑๐ : ต้นสับปะรดที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อ PMWaV-๑ + PMWaV-๒

๖. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สำรวจและเก็บเพลี้ยแป้งสีชมพูและสีเทาจากแปลงในเขตจังหวัดเพชรบุรีและราชบุรี มาเลี้ยงให้ปลอดไวรัสในกรงกันแมลง จากนั้นนำหน่อสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมาตรวจสอบว่าปลอดไวรัส PMWaV-๑ และ PMWaV-๒ โดยเทคนิค RT-PCR ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-๑ ได้แก่ Pa๒๒๒-F๑ (๕′-ACAGGAAGGACAACACTCAC-๓′) และ Pa๒๒๓-R (๕′-CGCACAAACTTCAAGCAATC-๓′) จะให้แถบ band ของดีเอ็นเอ ขนาด ๕๘๙ คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-๒ คือ Pa๒๒๔-F๒ (๕′-CATACGAACTAGACTCATACG-๓′) และ Pa๒๒๕-R๒ (๕′-CCATCCACCAATTTTACTAC-๓′) ให้แถบ band ของดีเอ็นเอ ขนาด ๖๐๙ คู่เบส มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA ๑ ppm) และย้ายอาหารทุก ๑-๒ เดือน จากนั้นจึงย้ายเป็นต้นเดี่ยวลงเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก (MS+IBA ๐.๕ ppm) และย้ายลงปลูกลงดิน จนมีอายุประมาณ ๔-๕ เดือน จึงนำมาถ่ายทอดโรคโดยใช้เพลี้ยแป้ง ๑๐ ตัว/ต้น มีระยะเวลาในการรับเชื้อและถ่ายทอดเชื้อ ๓ และ ๕ วัน ตามลำดับ เก็บใบสับปะรดมาตรวจหาไวรัสโดยเทคนิค RT-PCR พบว่า ต้นสับปะรดที่รับเชื้อไวรัส strain เดี่ยว (PMWaV-๒) และstrain ผสม (PMWaV-๑ + PMWaV-๒) โดยใช้เพลี้ยแป้งสีชมพูเป็นพาหะ เริ่มตรวจพบ แถบ band ของดีเอ็นเอของ PMWaV-๒ ขนาด ๖๐๙ คู่เบส หลังการถ่ายทอดโรคแล้ว ๒ เดือน แต่ต้นสับปะรดเริ่มแสดงอาการใบอ่อนนิ่ม สีเหลืองซีด และ ลู่ลง หลังจากถ่ายทอดเชื้อแล้ว ๔ เดือน สำหรับ PMWaV-๑ เริ่มตรวจพบแถบ band ของดีเอ็นเอ หลังการถ่ายทอดโรคแล้ว ๔ เดือน และแสดงอาการเหี่ยวไม่รุนแรงเท่ากับต้นที่มีไวรัส PMWaV-๑ + PMWaV-๒ และเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดโรคของไวรัสทั้ง ๒ strain ค่อนข้างสูงประมาณ ๘๐-๑๐๐% แสดงว่าเพลี้ยแป้งสีชมพูเป็นพาหะที่สำคัญในการถ่ายทอดโรคเหี่ยวสับปะรด สำหรับการถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยใช้เพลี้ยแป้งสีเทาเป็นพาหะ พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดโรคค่อนข้างต่ำ ประมาณ ๒๐ % และสับปะรดไม่แสดงอาการของโรคหลังจากการถ่ายทอดไวรัสแล้ว ๕ เดือน ผลการทดลองนี้สามารถนำไปใช้ในการทดสอบความต้านทานของสายพันธุ์สับปะรดต่อไวรัสแต่ละสายพันธุ์ เพื่อหาสายพันธุ์ต้านทานหรือทนทานต่อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยว เพราะในปัจจุบันพันธุ์สับปะรดที่ปลูกเป็นการค้าของไทย ไม่มีพันธุ์ต้านทานต่อโรคนี้เลย

๗. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

<u>ประโยชน์ คือ</u>

สามารถนำข้อมูลจากการทดลองไปใช้ในการทดสอบความต้านทานของสายพันธุ์สับปะรดต่อไวรัสแต่ละ strain เพื่อหาสายพันธุ์ต้านทานหรือทนทานต่อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยว เพราะไวรัสชนิดนี้ไม่สามารถถ่ายทอดโดยวิธีกลได้

<u>กลุ่มเป้าหมาย คือ</u>

๑. เ กษตรกรผู้ปลูกสับปะรดเพื่อการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคเหี่ยว

๒. นักปรับปรุงพันธุ์สับปะรด และนักวิชาการโรคพืชที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาโรคเหี่ยวสับประรด

๘. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

๙. เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ๒๕๔๗. ยุทธศาสตร์สับปะรด Pineapple National Strategy ๒๕๔๗-๒๕๕๑. ๕๑ หน้า.

ชำนาญ พิทักษ์ อนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ และอรนุช กองกาญจนะ. ๒๕๔๐. การป้องกันกำจัดมดในไร่สับปะรด. รายงานผลงานวิจัย กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่นๆ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. โรเนียว ๒๑ หน้า.

ชมัยพร บัวมาศ ชลิดา อุณหวุฒิ สุนัดดา เชาวลิต และลักขณา บำรุงศรี. ๒๕๕๕. อนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งในมันสำปะหลัง. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืชภาคยรรยาย. ๗-๙ สิงหาคม ๒๕๕๕. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า ๑-๓๑.

วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุลชัย และ จารุวรรณ คุณาบุตร. ๒๕๔๖. เทคโนโลยีการผลิตและการแปรรูปสับปะรด. เทคโนโลยีการผลิตสับปะรดรับรองคุณภาพ. หน้า ๑-๒๒.

วันเพ็ญ ศรีทองชัย. ๒๕๔๖. โรคเหี่ยว : ภัยคุกคามต่อการปลูกสับปะรดของไทย. วารสารโรคพืช ๑๗ (๑-๒) : ๔๘-๕๓.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. ๒๕๔๖. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก ๒๕๔๔/๒๕๔๕. เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ ๓/๒๕๔๕ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ๕๑ หน้า.

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. ๒๕๔๖. ศัตรูสับปะรด เอกสารวิชาการ กรมวิชาการเกษตร. ๔๔ หน้า.

Beardsley, J.W. ๑๙๙๓. The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host relationships. *Acta Hort*. (ISHS) ๓๓๔:๓๘๓-๓๘๖.

Dilokkunanant, U., S. Kladpan, R. Prateepasen and U. Suwanwong. ๑๙๙๖. Pineapple wilt disease in Thailand. *Thai. J. Agric*. ๒๙: ๓๓๗-๓๔๘.

German, T.L., D.E. Ullman and U.B. Gunashinghe. ๑๙๙๒. Mealybug Wilt of Pineapple. Chapter ๗ *In* Advance in Disease Vector Besearch vol. ๙. pp. ๒๔๑-๒๕๘ ed. by K.F. Harris. Springer-Verlag New York.

Sether, D.M., A.V. Karasev, C. Okumura, C. Arakawa, F. Zee, M.M. Kislan, J.L. Busto and J.S. Hu. ๒๐๐๑. Differentiation, distribution, and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. Plant Disease ๘๕: ๘๕๖-๘๖๔.

Sether, D.M. and J.S. Hu. ๒๐๐๒. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. Phytopathology ๙๒: ๙๒๘-๙๓๕.

Van Regenmortel, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. Mc Geoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner. ๒๐๐๐. Virus Taxonomy seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego. ๑๑๖๒ p