การเฝ้าระวังโรคไวรัสของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อ OFV, TRSV และ Potyvirus

Surveillance for Virus Diseases of Orchid cause by OFV TRSV and Potyvirus

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1/] สรุภี กีรติยะอังกูร[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]สำนักผู้เชี่ยวชาญ

บทคัดย่อ

การตรวจตัวอย่างกล้วยไม้นำเข้าจากเนเธอร์แลนด์, ญี่ปุ่น,ไต้หวันของบริษัทไพรทูรย์สะพลี และตัวอย่างของบริษัทเทพวงศ์ออคิดส์ และแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ของ จ.เชียงใหม่และจ.ลำพูน นำมาตรวจหาเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการเพื่อหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) และตรวจสอบเชื้อไวรัส OFV, TRSV เพื่อหาอนุภาคเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนนั้น ยังไม่พบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus และเชื้อไวรัส OFV, TRSV ในแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกรและบริษัทนำเข้ากล้วยไม้ของไทย และการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ในแปลงปลูกในปีสุดท้ายนั้นเพื่อทำการตรวจสอบหาเชื้อในกลุ่ม Potyvirus และเชื้อไวรัส OFV, TRSV ยังอยู่ในระหว่างการดำเนินงาน เพื่อรวบรวมและสรุปผลต่อไป

รหัสการทดลอง 07-01-51-01-01-01-09-51

คำนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกและนำเข้าต้นกล้วยไม้เพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ สำหรับประเทศที่นำเข้าต้นกล้วยไม้จากไทยส่วนใหญ่นำไปประดับ มีส่วนน้อยที่นำไปเป็นต้นพันธุ์ แต่การนำเข้าของผู้ปลูกเลี้ยงในประเทศไทยจะนำพันธุ์ที่แปลกใหม่มาเป็นต้นพันธุ์ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การนำต้นที่ติดเชื้อไวรัสเข้ามาโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัสที่ไม่เคยมีมาก่อนในประเทศไทยย่อมมีผลกระทบโดยตรงต่อการเพิ่มและแพร่ กระจายโรคไวรัสที่ติดมากับต้นพันธุ์ ส่วนที่นำต้นพันธุ์เข้ามาเพื่อผสมพันธุ์แม้เชื้อจะไม่ถ่ายทอดทางเมล็ดแต่ เป็นการนำต้นกล้วยไม้ที่มีเชื้อไวรัสมาปะปนอยู่ในแหล่งปลูก หลายประเทศมีข้อกำหนดให้มีใบรับรองการปลอดเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่นอกเหนือจาก CyMV และ ORSV เช่นต้องการให้รับรองต้นกล้วยไม้ปลอดจาก เชื้อ Orchid fleck virus (OFV), Tomato ring spot virus (TRSV) และ Potyvirus ซึ่งมีการระบาดอยู่ในหลายประเทศ ได้แก่ Australia Germany Japan New Zealand ไต้หวัน เกาหลี เป็นต้น Franki (1985) พบว่าเชื้อไวรัสที่ทำให้ กล้วยไม้พันธุ์ Dendrobium spp มีอาการด่างคือเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus เป็น Dendrobium mosaic virus (DeMV) (Synonym of clover yellow vein virus) มีการรายงาน coat protein gene ขนาด 1,143bp ส่วน OFV ทำให้กล้วยไม้มีอาการขีดประดำบนใบ (Chang *et.al.* 1991, Chang, *et.al.* 2007)

มีรายงานการตรวจพบเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus ในกล้วยไม้อยู่หลายชนิดได้แก่ Bean yellow mosaic virus, Clover yellow vein virus, Dendrobium mosaic potyvirus, Filamentous Orchid virus, Spiranthes mosaic virus, Turnip mosaic virus (Zettler *et al*., 1990) แล้วยังพบว่าพืชในตระกูล Orchidaceae หลายชนิดมีเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus เข้าทำลายได้ ได้แก่ Vanilla พบเชื้อ Vanilla mosaic potyvirus, Pecteillis mosaic potyvirus และ Habenaria พบเชื้อ Habenaria mosaic potyvirus รวมทั้ง Dendrobium พบเชื้อ Dendrobium mosaic potyvirus เข้าทำลายเป็นต้น และเชื้อไวรัสเหล่านี้สามารถถ่ายทอดได้โดยแมลงเพลี้ยอ่อน ดังนั้นนอกเหนือจากเชื้อ CyMV และ ORSV แล้วยังมีเชื้อ OFV, TRSV, และไวรัสในกลุ่มของ Potyvirus หลายชนิดดังกล่าวที่ถูกตรวจพบบนกล้วยไม้ สุรภี(2547) รายงานพบเชื้อไวรัสชนิดท่อนยาวคดมีขนาดของอนุภาค ประมาณ 750 นาโนเมตรทำให้เกิดอาการปื้นดำบนกล้วยไม้หลายพันธุ์ซึ่งสามารถตรวจจำแนกได้ด้วยสายตาและพบจำนวนน้อยเพียง 2-3 แห่งได้แนะนำให้กำจัดและหลีกเลี่ยงนำมาทำพันธุ์

Mackenzie (1998) ตรวจพบ Potyvirus ในกล้วยไม้ 33 ชนิด ด้วยวิธี RT-PCR ด้วยชุด primers ที่เฉพาะเจาะจงกับกลุ่ม Potyvirus ในส่วนของ SP6 หรือ T7 ลำดับเบสของ genome ของ

ไวรัสที่แยกมาจากกล้วยไม้เป็นโรค 5 ตัวอย่างโดยส่วนใหญ่ มีความสัมพันธุ์ใกล้กับ bean common mosaic group

Chang(1991) ได้สำรวจโรคไวรัสในกล้วยไม้ในประเทศเกาหลี จำนวน 640 ชนิด ใน 13 genera พบไวรัสหลายชนิดได้แก่ Orchid fleck virus (OFV), Cymbidium mosaic virus (CyMV), Odontoglossum ringspot virs (ORSV), Dendrobium mosaic virus (DMV) และ Potyvirus พบทั้งที่เข้าทำลายกล้วยไม้เป็นเชื้อเดี่ยวและเข้าทำลายทีละ 2-3 เชื้อ

Kendo(2003) รายงานว่า OFV สามารถถ่ายทอดได้ด้วยการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นและไร (*Brevipalpus californicus* Bank) แบบ persistent ถ่ายทอดได้ทั้งตัวเต็มวัยและตัวอ่อน และพบว่า OFV ประกอบด้วย RNA 2 ชนิดคือ RNA1 (6431 bp) และ RNA2 (6001 bp) จัดอยู่ในกลุ่ม Plant Rhabdoviruses ใน Rhabdoviridae family

Chang(2007) แยกเชื้อ OFV ออกมาได้จากกล้วยไม้พันธุ์ Cymbidium, Dendrobium, Odontoglossum, Oncidium , Angulorea และ Pescatorea เชื้อ OFV มีพืชอาศัยหลายชนิด ได้แก่ ยาสูบใบใหญ่ ยาสูบใบเล็ก *Chenopodium amaranticolor* และถ่ายทอดด้วยวิธีการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นพืช อนุภาคของ OFV เป็นแบบ bacilliform ที่มีขนาดประมาณ 40 X 150 nm

Singh(2007) แยกเชื้อ Potyvirus ได้จากกล้วยไม้ป่าพันธุ์ *Cymbidium pendulum* และ *C. tigrinum* ที่เมือง Sikkim ทางเหนือของอินเดีย ตรวจสอบด้วยวิธี ELISA, RT-PCR และ Northern blot analysis การใช้ primer ที่มีความเฉพาะของ Potyvirus group พบว่าไวรัสนี้มีความสัมพันธุ์ใกล้กับ Calanthe mild mosaic virus

ประเทศไทยยังไม่มีรายงานเชื้อไวรัสชนิดทั้ง 3 ชนิดนี้บนกล้วยไม้ จึงควรทำการสำรวจและจำแนก เพื่อจัดทำข้อมูลในการทำรายชื่อศัตรูพืชและวิเคราะห์ความเสี่ยงในการกำหนดศัตรูพืชกักกันปัจจุบันผู้ปลูกกล้วยไม้ของไทยมีความสามารถในการผลิตต้นกล้วยไม้ปลอดโรคได้กว้างขวางมากขึ้นและมีความเข้าใจในการต้องคัดเลือกใช้เฉพาะต้นพันธุ์ปลอดเชื้อมาทำพันธุ์ และประโยชน์จากการสำรวจเชื้อทั้ง 3 ชนิด ทำให้ได้ข้อมูลของการเป็นโรคจากเชื้อ CyMV และ ORSV และความเสียหายของต้นกล้วยไม้ในแหล่งปลูกที่แท้จริง เพื่อกำหนดแนวทางในการควบคุมอัตราการเป็นโรคเชื้อ CyMV และ ORSV เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการให้การรับรองสวนเพื่อการส่งออกและยังใช้เป็นข้อมูลในการวางข้อกำหนดอัตราการติดเชื้อ CyMV และ ORSV ของกล้วยไม้นำเข้าต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
- Ultra centrifuge
- ตู้แช่แข็ง -80 ^{0}C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการปลูกเชื้อไวรัส
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA
- พืชทดสอบและพืชอาศัย

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และเตรียมแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้

ทำการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ที่พบลักษณะอาการผิดปกติ มีอาการใบด่าง necrosis และอาการขีดไหม้ จากแปลงปลูกกล้วยไม้รวมทั้งตัวอย่างนำเข้าในพื้นที่ต่างๆ มาศึกษาลักษณะอาการ ทำการจดบันทึกรายละเอียดข้อมูลแหล่งพบ และชนิด พันธุ์

2. ตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) และตรวจหาเชื้อไวรัส OFV, TRSV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.1 ตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) ในกลุ่ม Potyvirus

นำตัวอย่างใบพืชที่ต้องการตรวจสอบใส่ในถุงพลาสติก เติม Extraction buffer (0.02 M Tris, 0.2 M NaN_3, 0.2% Na_2SO_3, pH 7.5) ในอัตราส่วน (ใบพืช : บัฟเฟอร์ = 1:5) แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียด ทำการวางรูปแบบของแผ่น Nitrocellulose membrane (NCM) ขนาด 0.45 µm ชนิด High bone N+ ด้วยการตีเป็นช่องตารางสี่เหลี่ยม (ขนาด 1X1 ตารางเซนติเมตร) ทำเครื่องหมายที่ตารางของตัวแผ่น NCM หัวท้ายเพื่อเรียงลำดับตัวอย่างจาก 1 ถึงตัวอย่างสุดท้าย นำแผ่น NCM พร้อมกับวางกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ตัดให้มีขนาดพอดีกับแผ่น NCM แช่ใน TBS (0.02M Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.5) ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นคีบแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 ขึ้นมาพร้อมกับแผ่น NCM ที่แช่ไว้ด้วยกัน วางลงบนแผ่นกระดาษกรองแผ่นใหม่ที่แห้งและมีขนาดใหญ่กว่า โดยใช้ pasteur pipette ที่สะอาดรีดแผ่น NCM ให้แนบติดกับกระดาษกรอง ทำการหยด

ตัวอย่างน้ำคั้นพืช 1 หยด หรือประมาณ 20-25 ไมโครลิตร ลงในช่องตารางบนแผ่น NCM ตามรูปแบบที่วางไว้ เมื่อหยดตัวอย่างเสร็จแล้วคีบแผ่น NCM ออกมาวางบนกระดาษสะอาดผึ่งไว้ประมาณ 10-20 นาที นำแผ่นตัวอย่างที่แห้งแล้วแช่ลงในกล่องสี่เหลี่ยมที่มี blocking buffer (2% non fat milk ใน TBS pH 7.5) อยู่ 10 มิลลิลิตร + 0.8 มิลลิลิตร ของ 25% titonx100 แช่นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ประมาณ 27-30°C หลังจากนั้นเท blocking buffer ออก ใส่ส่วนผสมของ IgG ของ Potyvirus ที่ละลายอยู่ใน blocking buffer ใหม่ ในอัตรา 1:500 แช่แผ่น NCM นั้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ประมาณ 27-30°C แล้วจึงล้างแผ่น NCM ด้วย TBS-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที เทส่วนผสม Goat anti-rabbit conjugated Alkaline phosphatase (SIGMA A7778) ที่เจือจางเป็น 1:3000 ในสารละลาย blocking buffer จำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย TBS-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที แล้วเทส่วนผสม substrate (ละลาย 0.25% AS- MX จำนวน 1 มิลลิลิตร ใน 5 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl , pH 8.2 และละลายสาร Fast red TR-salt (FR-TR) ใน 6 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl , pH 8.2 เทส่วนผสมทั้ง 2 รวมกัน แล้วเทลงในกล่องแช่แผ่น NCM เขย่าเบาๆ) รอดูผลของปฏิกิริยาประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาเห็นสีชมพูชัดเจนแล้วเท substrate ออก แล้วเทน้ำกลั่นลงแทน เพื่อเป็นการล้างและหยุดปฏิกิริยา

2.2 ตรวจหาเชื้อไวรัส OFV, TRSV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำตัวอย่างกล้วยไม้ในแต่ละแหล่งปลูกที่เก็บรวบรวมในข้อ 1 ที่ผ่านการตรวจหาเชื้อในกลุ่ม Potyvirus ด้วยวิธี NCM-ELISA มาตรวจสอบหาเชื้อไวรัส OFV และ TRSV โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยเทคนิค Brandes' dip โดยบดตัวอย่างใบพืชใน 0.05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 บนแผ่นไสลด์ นำกริด (grid) ขนาด 300 mesh (มีช่องสี่เหลี่ยม 300 ช่องต่อตารางนิ้ว) มาคว่ำลงบนน้ำคั้นทิ้งไว้ 1 นาที ใช้คีมคีบกริดขึ้นจากน้ำคั้น ซับส่วนที่เป็นของเหลวรอบกริด หยดน้ำกลั่นลงบนกริดเพื่อชะล้างสารโมเลกุลใหญ่ เช่นเกลือต่างๆออกไป ทำการย้อมสีแบบ negative staining ซึ่งเป็นการย้อมสีพื้นที่รอบๆอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วย 2% Phosphotungstic acid (PTA) นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2551 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2553

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้เพื่อใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อไวรัส

ในปี 2552 ได้เก็บตัวอย่างกล้วยไม้นำเข้าจากเนเธอร์แลนด์, ญี่ปุ่น,ไต้หวันของบริษัทไพรทูรย์สะพลีและตัวอย่างของบริษัทเทพวงศ์ออคิดส์ รวมทั้งจากแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกรที่มีอาการผิดปกติ และในปี 2553 ได้เก็บตัวอย่างกล้วยไม้จากแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ของ จ.เชียงใหม่ และ จ.ลำพูน รวมทั้งเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ของทางบริษัทไพรทูรย์สะพลี ซึ่งเป็นกล้วยไม้นำเข้าจากไต้หวัน (ระหว่างเดือนตุลาคม 2552 – มีนาคม 2553) นำมาตรวจหาเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจากการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ที่พบลักษณะอาการผิดปกติ มีอาการใบด่าง necrosis และอาการขีดไหม้ ที่ไม่ได้เกิดจากเชื้อ CyMV และ ORSV ต้องทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนดูอนุภาคของเชื้อไวรัสว่าเป็นชนิดท่อนยาวคด หรือแบบ bacilliform

2. ตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) และตรวจหาเชื้อไวรัส OFV, TRSV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

จากการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้เพื่อหาเชื้อไวรัสทั้งในกลุ่ม Potyvirus ด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) และตรวจสอบเชื้อไวรัส OFV, TRSV เพื่อหาอนุภาคเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนนั้น ยังไม่พบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus และเชื้อไวรัส OFV, TRSV ในแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกรและบริษัทนำเข้ากล้วยไม้ของไทย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้ดังกล่าว ที่ได้เก็บตัวอย่างในพื้นที่ปลูกตามแหล่งต่างๆ มาทำการตรวจสอบนั้นจึงสรุปได้ว่ายังไม่พบเชื้อ Potyvirus ของกล้วยไม้ระบาดในประเทศไทยและยังไม่พบเชื้อไวรัส OFV, TRSV ในแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกรและบริษัทนำเข้ากล้วยไม้ของไทยอีกด้วย ซึ่งการตรวจสอบเชื้อ Potyvirus ของกล้วยไม้นั้น มีการใช้ MAb ของ Potyvirus ทั้งของ สวทช. และ AGDIA ในการตรวจจำแนกเชื้อ Potyvirus และยังใช้ MAb ตรวจหาเชื้อ PhCSV ในกล้วยไม้นำเข้าของไต้หวันอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2534. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบเชื้อ TMV-O ของกล้วยไม้พันธุ์หวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2534. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-8.

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2533. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus ของหวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและ จุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 115-122.

Chang, M.U., H.H. Chun, D.H. Baek and J.D. Chung. 1991. Study on the Viruses in Orchids in Korea : Dendrobium mosaic virus, Odontoglossum ringspot virus, Orchid fleck virus, and unidentified potyvirus. The Plant Pathology Jurnal. Vol. 6 :118-129.

Chang,M.U., A.Kei, D.Yoji and Y. Koyoshi. 2007. Morphology and Intracellular Appearance of Orchid fleck virus. The Phytopathological Society of Japan Vol 42 (2) :156-167.

Kendo,H., T. Maeda and T. Tamada. 2003. Orchid fleck virus: Brevipalpus californicus Mite Transmission, Biological properties and genome structure. Experimental and Applied Acarology Vol. 30(1-3) : 215-223.

Mackenzie,A.M., M.Nolan, K.J.Wel, M.A. Clements, D.Gowanlock, B.J.Wallace and A.J.Gibbs. 1998 . Ceratobium mosaic Potyvirus : another virus from orchids. Archives of Virology. Vol 143 (5) 903-914.

Singh,M.K.,A.R.Sherpa,V.Hallan and A.A.Zaidi. 2007. A Potyvirus in Cymbidium spp.in northern India. Australasian Plant Disease Notes 2(1) 11-13.

Zettler,F.W., N.J. Ko, G.C. Wisler, M.S. Elliottanc and S.M. Wong. 1990. Viruses of Orchids and Thair Control. Plant Disease, Vol. 74(9) 621-626.