

การคัดเลือกและขยายหน่อพันธุ์สับประรดปลอดจากไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยว  
 Selection and Propagation of Pineapple Suckers Free From  
*Pineapple mealybug wilt-associated virus*

วันเพ็ญ ศรีทองชัย      มัลลิกา นวลแก้ว  
 สาวิตรี เขมวงค์      เขมิกา โขมพัตร  
 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการสำรวจและเก็บต้นสับประรดที่มีลักษณะสมบูรณ์ในพื้นที่ปลูกสับประรดจากจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สงขลาและพัทลุง ในปี 2551 จำนวน 69 67 8 และ 12 ต้น ตามลำดับ รวมเป็น 156 หน่อ หลังจากนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลปรากฏว่า การตรวจพบไวรัส PMWAV-1 ใน 93 หน่อ (55 33 0 5 ตามลำดับ) และไวรัส PMWAV-2 ใน 31 หน่อ (6 25 0 0 ตามลำดับ) มีหน่อที่ปลอดไวรัสทั้ง 2 strain จำนวน 32 หน่อ ในปี 2552 เก็บต้นสับประรดที่มีลักษณะสมบูรณ์ในพื้นที่ปลูกสับประรดจากศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตรัง จำนวน 109 100 และ 100 ต้น ตามลำดับ รวมเป็น 309 หน่อ หลังจากนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลปรากฏว่า มีหน่อสับประรดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัสจำนวน 37 หน่อ จึงนำมาขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อสับประรดปลอดไวรัส ด้วย 0.3% โพชาน , 10 % และ 5% คลอโรอกซ์ และ 70% แอลกอฮอล์ สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี หลังจากเลี้ยงหน่อปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) ตาเจริญเป็นหน่ออ่อนภายใน 6 สัปดาห์ จึงทำการตัดแยก (subculture) ลงเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดการแตกกอ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อน และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน จากนั้นดำเนินการขยายต้นอ่อนและเร่งรากในอาหารสูตร MS+IBA 0.5 ppm ให้ได้เป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ และได้ทำการย้ายปลูกในวัสดุปลูก (ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1) จำนวน 2,000 ต้น ดูแลรักษาภายใต้โรงเรือนอนุบาล และให้ปุ๋ยละลายน้ำสูตร 16-16-16 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และพ่นสารกำจัดเพลี้ยแป้งเดือนละ 1 ครั้ง พร้อมทั้งโรยยากำจัดมด พบว่าทุกต้นมีการเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งจะนำไปปลูกขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวในแปลงปลูกต่อไป

## คำนำ

สับปะรด [*Ananas comosus* (L.) Merr.] อยู่ในวงศ์ Bromeliaceae เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สามารถปลูกและเก็บผลผลิตได้ตลอดปี เพื่อใช้บริโภคสดภายในประเทศและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ มีมูลค่าส่งออกประมาณปีละ 13,000-15,000 ล้านบาท โดยประเทศไทยครองความเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกสับปะรดเป็นอันดับหนึ่งของโลก เป็นเวลานานกว่า 10 ปี จนถึงปัจจุบัน โดยมีตลาดผู้นำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐประชาชนจีน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547)

ศัตรูพืชเป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกสับปะรด ทำให้ผลผลิตและคุณภาพสับปะรดเสียหายอย่างรุนแรง จนบางครั้งไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ศัตรูสำคัญที่สุดที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญต่อการปลูกสับปะรดของไทยในปัจจุบัน ได้แก่ โรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple wilt disease หรือ Mealybug wilt of pineapple) โรคนี้เกิดจากไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaVs) ได้แก่ PMWaV-1 และ PMWaV-2 ซึ่งมีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ 1,200 X 12 นาโนเมตร กรดนิวคลีอิกเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA, ssRNA) และมีน้ำหนักโมเลกุล  $8.35 \times 10^6$  ดาลตัน (dalton) จัดอยู่ในสกุล คลอสเตอโรไวรัส (*Closterovirus*) วงศ์ คลอสเตอโรไวรัส (*Closteroviridae*) กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหารของพืช (Beardsley, 1993) สามารถตรวจสอบและจำแนกชนิดของ PMWaVs โดยเทคนิค RT-PCR (Sether and Hu, 2002a, 2002b)

ลักษณะอาการของโรค ใบเริ่มแสดงอาการอ่อนน้อม มีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง ปลายใบแห้งตายเป็นสีน้ำตาลหรือสีแดงลามเข้าสู่โคนใบ (die back) ใบลู่ลงและแผ่แบนไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ ต่อมาต้นเหี่ยวและแห้งตายในที่สุด รากมีขนาดสั้นและแตกแขนงน้อยมาก ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ง่าย ซึ่งตรงข้ามกับต้นปกติที่มีรากจำนวนมากยึดเกาะดินแน่น ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ยาก ผลมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ (Dilokkunanant *et al.*, 1996) ในธรรมชาติพืชอาศัยที่สำคัญและอ่อนแอต่อไวรัส คือ สับปะรด และโรคนี้สามารถถ่ายทอดโดยมีเพลี้ยแป้ง [pink pineapple mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ gray pineapple mealybug, *D. neobrevipes* (Beardsley)] เป็นพาหะ (German *et al.*, 1992)

โรคเหี่ยวสับปะรดสามารถติดไปกับหน่อพันธุ์ ในปัจจุบันมีการนำหน่อพันธุ์จากแหล่งที่มีโรคระบาดไปปลูกหรือขยายพันธุ์ในแหล่งที่ยังไม่มีโรคนี้ระบาด ทำให้โรคเหี่ยวแพร่ระบาดจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่งได้รวดเร็วยิ่งขึ้น เนื่องจากอาจมีไวรัสแฝงอยู่ในหน่อพันธุ์แม้ว่าจะไม่แสดงอาการของโรคให้ก็ตาม (วันเพ็ญ, 2546) ถ้าสับปะรดมีราคาสูงขึ้น ยิ่งทำให้เกิดความขาดแคลนหน่อพันธุ์ที่จะนำมาปลูก ทำให้เกษตรกรซื้อหน่อพันธุ์จากแหล่งที่มีโรคระบาดมาปลูกและเก็บหน่อพันธุ์เหล่านี้ไว้ใช้ในฤดูถัดไป ปัญหาดังกล่าวนี้เคยเกิดขึ้นในฮาวาย จึงได้มีการผลิตหน่อพันธุ์ปลอดโรคโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อนำไปปลูกขยายในแปลงและใช้ในงานทดลองด้านการถ่ายทอดโรค (Sether *et*

al., 1998) ในประเทศไทยมีนักวิจัยทำการศึกษาเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหน่อพันธุ์สับปะรด (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2546) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในกระบวนการขยายพันธุ์สับปะรดปลอดโรคเหี่ยวได้ ฉะนั้นควรมีการดำเนินการคัดเลือกและขยายหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดโรค เพื่อปลูกทดแทนหน่อที่มีเชื้อไวรัสติดไปและแพร่ระบาดอย่างรุนแรงในแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญของประเทศ

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. หน่อพันธุ์สับปะรดที่ปลอดโรค
2. อุปกรณ์และสารเคมีในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
3. ห้องควบคุมอุณหภูมิสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
4. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิคอณูชีววิทยา
5. สารเคมีสำหรับใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืชในโรงเรือนทดลอง

### วิธีการ

#### 1. การตรวจสอบหน่อพันธุ์สับปะรดที่ได้จากแหล่งปลูกที่ไม่มีโรคเหี่ยวระบาด โดยเทคนิคอณูชีววิทยา (RT-PCR)

สำรวจพื้นที่ปลูกสับปะรด ในจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สงขลา พัทลุง และตรัง จากนั้นเก็บตัวอย่างต้นสับปะรดที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่แสดงอาการของโรคเหี่ยวในพื้นที่ดังกล่าว และนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติ ดังนี้

##### 1.1 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอของไวรัสจากใบสับปะรด

โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (MasterPure™ RNA Purification Kit ของบริษัท EPICENTRE)

1. เก็บตัวอย่างพืช 1 – 5 มิลลิกรัม ใช้ทำได้ทันที หรือจะแช่เก็บที่ - 70 °ซ
2. ดูด Proteinase K (50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ทำให้เจือจางใน 300 ไมโครลิตรของ Tissue and Cell Lysis Solution (1 ตัวอย่าง) ใส่ 5 ไมโครลิตร ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร
3. บดตัวอย่างพืชใน ไนโตรเจนเหลว และเก็บใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร
4. เติมสารละลาย Tissue and Cell Lysis Solution ซึ่งผสมกับ Proteinase K แล้ว (ข้อ 2) 300 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน
5. นำไปบ่มที่ 65 °ซ นาน 15 นาที (ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex ทุกๆ 5 นาที)  
นำสารละลายเซลล์พืชที่ได้มาแช่ในน้ำแข็ง นาน 3 – 5 นาที
6. เติม MPC Protein Precipitation Reagent 175 ไมโครลิตร. ในสารละลายของ RNA ของเซลล์พืช 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex นาน 10 วินาที

7. นำมาปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที
8. ทิ้งตะกอน และเก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่
9. เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร โดยต้องเย็นจัดโดยแช่ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  แล้วพลิกหลอดขึ้นลง 30-40 ครั้ง
10. นำสารละลายข้อ 4 มาปั่น 10,000 รอบ/นาที ที่  $4^{\circ}\text{C}$  นาน 10 นาที
11. ล้างตะกอนด้วย 75 % ethanol 500 ไมโครลิตร แล้ว quick spin (ล้าง 2 ครั้ง)
12. dry ตะกอนใน  $37^{\circ}\text{C}$  นานประมาณ 2 ชั่วโมง
13. ละลายตะกอนของ RNA ที่ได้ใน TE buffer 15-20 ไมโครลิตร

## 1.2 การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัด มาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะกับไวรัส PMWaV แต่ละ strain (Sether and Hu, 2002a) ได้แก่

Pa222-F1	5'-ACA GGA AGG ACA ACA CTC AC-3'	} PMWaV-1
Pa223-R1	5'-CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC-3'	
Pa224-F2	5'-CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG-3'	} PMWaV-2
Pa225-R2	5'-CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC-3'	

โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

### RT-PCR Profile

#### 20 ul. Reaction (ใช้ชุดของ Bioneer)

dH <sub>2</sub> O	6 ไมโครลิตร
Primer R (100 พิโคโมล)	1 ไมโครลิตร
RNA template	5 ไมโครลิตร
บ่มที่ $95^{\circ}\text{C}$ 3 นาที แล้วแช่บนน้ำแข็ง.อีก 5 นาที จากนั้นเติม	
5X RT buffer	4 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	1 ไมโครลิตร
DTT	2 ไมโครลิตร
บ่มที่ $37^{\circ}\text{C}$ 10 นาที แล้วเติม	
M-MLV Reverse Transcriptase	1 ไมโครลิตร
บ่มที่ $45^{\circ}\text{C}$ 50 นาที	

## PCR Profile

20 ul. Reaction

GoTaq <sup>®</sup> Green Master Mix (Promega)	10.0	ไมโครลิตร
Primer R (100 พิโคโมล)	0.5	ไมโครลิตร
Primer F (100 พิโคโมล)	0.5	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	6.0	ไมโครลิตร
Template (ที่ได้จาก RT-PCR)	3.0	ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ cDNA ตาม program ดังนี้

94 °ซ	5 นาที	} 35 รอบ
94 °ซ	1.30 นาที	
55 °ซ	1.30 นาที	
72 °ซ	1.30 นาที	
72 °ซ	10 นาที	

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 2 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

การตรวจสอบหาไวรัส PMWaVs เริ่มตรวจสอบ PMWaV-1 ที่ติดมากับหน่อพันธุ์ก่อน หลังจากนั้นนำหน่อที่ตรวจไม่พบไวรัส PMWaV-1 มาตรวจหา PMWaV-2 อีกครั้ง

สำหรับการตรวจสอบไวรัส PMWaV1,2 ในจังหวัดสงขลา พัทลุง และตรัง ใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอของบริษัท Rochs และเพิ่มปริมาณ cDNA และอ่านค่าวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Real-time PCR

## 2. ขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำหน่อสับประדתี่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัส มาฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อพันธุ์โดยแช่หน่อใน 1% คอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ (copper oxychloride) นาน 1 นาที แล้วย้ายหน่อมาแช่ใน 0.1% เมอร์คิวรีค คลอไรด์ (mercuric chloride) นาน 1 นาที จากนั้นนำหน่อมาแช่ใน 10 % คลอโรกซ์ (clorox) ที่มี 0.01% ทวิน 20 (Tween 20) ผสมอยู่ และเขย่าด้วยเครื่องเขย่า นาน 15 นาที ฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งใน 5% คลอโรกซ์ ที่มี 0.01% ทวิน 20 ผสมอยู่ และเขย่าด้วยเครื่องเขย่า นาน 10 นาที ล้างหน่อด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆละ 5 นาที ผึ่งให้แห้งพอสมควร แล้วตัดแบ่งหน่อเป็น 4 ส่วน จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2546) นอกจากนี้ยังได้ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อ โดยเปลี่ยนขั้นตอนจากสาร คอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ และ เมอร์คิวรีค คลอไรด์ เป็นสาร ฟิซซาน (physan)

และ แอลกอฮอล์ (ethanol) โดยเริ่มจากการแช่หน่อใน 70% แอลกอฮอล์ นาน 15 นาที ก่อนย้ายไปแช่ใน 0.3% ไฟซัน นาน 30 นาที เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่ติดอยู่ในหน่อพันธุ์หลังจากตาเจริญเป็นหน่อใหม่ ประมาณ 6 สัปดาห์ ทำการตัดแยก (subculture) ลงเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดการแตกกอ และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน จนได้จำนวนต้นอ่อนในปริมาณมากพอให้ย้ายเป็นต้นเดี่ยวลงเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก (MS+IBA 0.5 ppm) และสุ่มตรวจสอบว่าต้นเหล่านี้ยังปลอดไวรัสหรือไม่ โดยใช้เทคนิคอณูชีววิทยา (RT-PCR)

### 3. ปลูกขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำต้นอ่อนสับปะรดปลอดโรคที่ชักนำให้เกิดรากแล้วในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาปลูกในวัสดุปลูก (ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1) จำนวน 2,000 ต้น ดูแลรักษาภายใต้โรงเรือนอนุบาลของศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี และให้ปุ๋ยละลายน้ำสูตร 16-16-16 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และพ่นสารกำจัดเพลี้ยแป้งเดือนละ 1 ครั้ง พร้อมทั้งโรยยากำจัดมด เพื่อขยายเพิ่มปริมาณหน่อสับปะรดปลอดโรคต่อไป

เวลาและสถานที่	ระยะเวลา	ตุลาคม 2550 - กันยายน 2553
	สถานที่	กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
		สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
		ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี
		สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. การตรวจสอบหน่อพันธุ์สับปะรดที่ได้จากแหล่งปลูกที่ไม่มีโรคที่ระบาด โดยเทคนิคอณูชีววิทยา (RT-PCR)

จากการสำรวจพื้นที่ปลูกสับปะรด ในจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สงขลาและพัทลุง ในปี 2551 จากนั้นเก็บต้นสับปะรดที่มีลักษณะสมบูรณ์ในพื้นที่ดังกล่าว จำนวน 69 67 8 และ 12 ต้นตามลำดับ จากนั้นนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคที่ระบาดทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลปรากฏว่า การตรวจสอบไวรัส PMWAV-1 โดยใช้ไพรเมอร์ Pa222-F1 และ Pa223-R1 จะให้แถบ band ขนาด 589 คู่เบส ในการวิเคราะห์ผลด้วย agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 1) และการตรวจหาไวรัส PMWAV-2 โดยใช้ไพรเมอร์ Pa224-F2 และ Pa225-R2 ให้แถบ band ขนาด 609 คู่เบส (ภาพที่ 2) พบว่า มีหน่อสับปะรดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัส 32 ต้น จากจำนวนทั้งหมด 156 หน่อ จากนั้นนำหน่อเหล่านี้มาขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ตารางที่ 1) และในปี 2552 ดำเนินการสำรวจพื้นที่ปลูกสับปะรด ใน

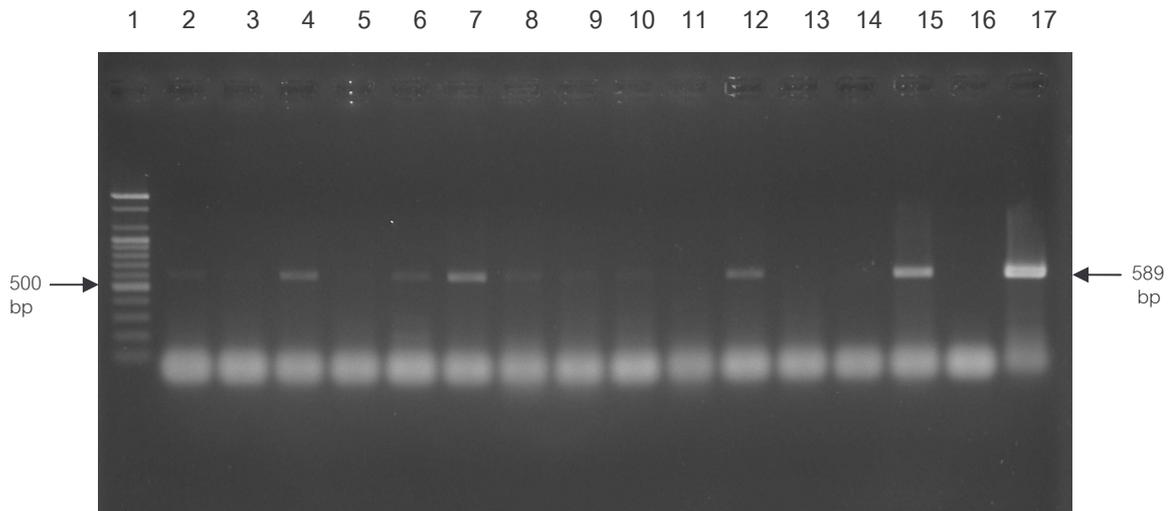
ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิต ตัง จากนั้นเก็บต้นสับปะรดที่มีลักษณะสมบูรณ์ในพื้นที่ดังกล่าว จำนวน 109 100 และ 100 ต้น ตามลำดับ จากนั้นนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลปรากฏว่า มีหน่อสับปะรดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัสทั้งสอง strain จำนวน 23 หน่อ จากศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี สำหรับสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียจากแปลงปลูกใน ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และในศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตัง แหล่งละ 100 ตัวอย่าง พบว่ามีต้นที่ปลอดไวรัสทั้งสอง strain จำนวน 46 และ 34 ต้น ตามลำดับ จากนั้นนำมา เลี้ยงให้แตกหน่อและเก็บหน่อพันธุ์เพื่อยืนยันผลวิเคราะห์อีกครั้ง ผลปรากฏว่า มีหน่อสับปะรดที่ปลอด ไวรัสทั้ง 2 strain เพียง 14 หน่อ หลังจากนั้นส่งให้กลุ่มงานไวรัสวิทยานำไปขยายพันธุ์โดยเทคนิค การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

ตารางที่ 1. ผลการตรวจวิเคราะห์ไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยว (PMWaV-1 และ PMWaV-2) ของสับปะรด จากแหล่งปลูกต่างๆ

แหล่งปลูก	จำนวนต้นทั้งหมด	ผลการตรวจไวรัส <sup>1</sup>		
		PMWaV-1	PMWaV-2	ปลอดไวรัส
<b>ปี 2551</b>				
เพชรบุรี	69	55	6	8
ประจวบคีรีขันธ์	67	33	25	9
สงขลา	8	0	0	8
พัทลุง	12	5	0	7
<b>รวม</b>	<b>156</b>	<b>93</b>	<b>31</b>	<b>32</b>
<b>ปี 2552</b>				
<sup>2</sup> ศวพ. เพชรบุรี	109	82	4	23
ศวพ. สงขลา	100	47	7	46
ศวพ. สงขลา	100	56	10	34
<b>รวม</b>	<b>309</b>	<b>185</b>	<b>21</b>	<b>103</b>

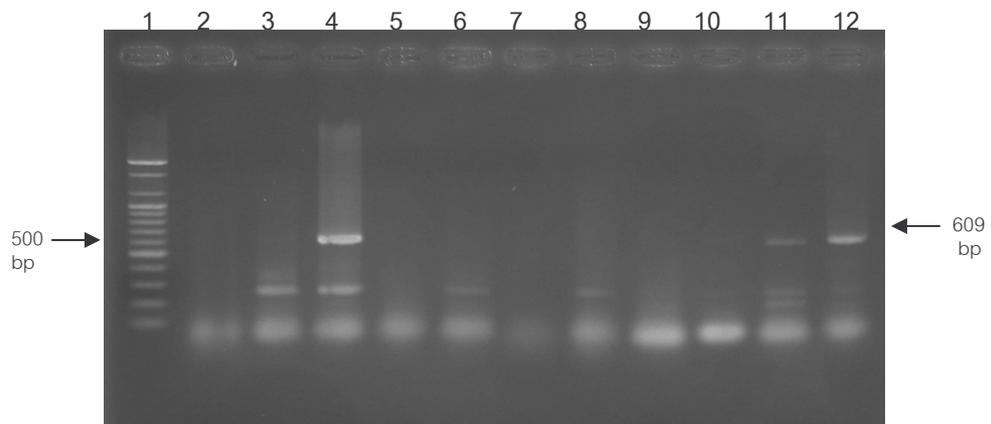
<sup>1</sup> นำตัวอย่างสับปะรดทั้งหมด มาตรวจสอบไวรัส PMWaV-1 ก่อน ถ้าต้นใดตรวจไม่พบเชื้อจึงนำมา ตรวจสอบไวรัส PMWaV-2

<sup>2</sup> ศวพ. = ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร



ภาพที่ 1. ผลวิเคราะห์การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV-1 ของสับปะรดโดยใช้ไพรเมอร์ Pa222-F1 และ Pa223-R1

- 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp. DNA Ladder)
- 2-15 : ตัวอย่างสับปะรดที่เก็บจากแปลง
- 16 : ต้นปกติ
- 17 : ต้นเป็นโรคที่เกิดจาก PMWaV-1



ภาพที่ 2. ผลวิเคราะห์การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV-2 ของสับปะรดโดยใช้ไพรเมอร์ Pa224-F1 และ Pa225-R1

- 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp. DNA Ladder)
- 2-15 : ตัวอย่างสับปะรดที่เก็บจากแปลง
- 16 : ต้นปกติ
- 17 : ต้นเป็นโรคที่เกิดจาก PMWaV-2

## 2. ขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการทดลองพบว่า การฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อสับประรดปลอดไวรัส ด้วย 0.3% โพพาน , 10 % และ 5% คลอรีน และ 70% แอลกอฮอล์ สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี อาจเป็นเพราะว่า โพพาน สามารถใช้ในการฆ่าเชื้อรา แบคทีเรีย และสาหร่าย ซึ่งนิยมใช้กับกล้วยไม้ และเป็นสารไม่มีสีทำให้หน่อหลังฟอกดูสะอาด ไม่เหมือนกับการใช้คอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ ซึ่งทำให้หน่อมีสีฟ้าปนเปื้อน

หลังจากเลี้ยงหน่อปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) ตาเจริญเป็นหน่ออ่อนภายใน 6 สัปดาห์ จึงทำการตัดแยก (subculture) ลงเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดการแตกกอ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อน และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน (ภาพที่ 3) ขณะนี้ดำเนินการขยายหน่อพันธุ์สับประรดปลอดโรคในอาหารสูตรเร่งต้นอ่อน จำนวน 200 ขวด พร้อมมีการสุ่มตรวจหน่อสับประรดในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่า ไม่มีการปนเปื้อนของไวรัสสาเหตุของโรคเหี่ยว จากนั้นได้ส่งหน่อพันธุ์ปลอดไวรัสจำนวน 200 ขวด ไปเลี้ยงในอาหารเร่งรากที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ด้วยอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 ppm ขณะนี้สามารถเพิ่มปริมาณหน่อปลอดโรคได้จำนวน 700 ขวด และต้นขนาดเล็กที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่มี BA 1 ppm จำนวน 300 ขวด เพื่อจะนำลงปลูกในดินต่อไป นอกจากนี้ได้นำหน่อปลอดโรคจากจังหวัดสงขลาและตรังที่ผ่านการตรวจสอบเรียบร้อยแล้ว จำนวน 14 หน่อ มาฟอกฆ่าเชื้อและเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดต้นอ่อน พบว่า เริ่มมีหน่ออ่อนสีเขียวเจริญจากตา และมีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียประมาณ 10-15% หลังจากได้ต้นอ่อนจึงนำมาเพิ่มปริมาณจำนวนต้นอ่อนในอาหารสูตรเร่งต้นและเร่งรากต่อไป



ภาพที่ 3. การเจริญของหน่ออ่อนที่ได้จากหน่อสับประรดปลอดไวรัส

- ก. หน่ออ่อนอายุ 6 สัปดาห์ หลังเลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 1 ppm
- ข. ต้นอ่อนที่ได้จากการ subculture

### 3. ปลูกลูกขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ได้นำต้นอ่อนของสับปะรดปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 2000 ต้น ออกปลูกในวัสดุปลูก (ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1) ดูแลรักษาภายใต้โรงเรือนอนุบาล (ภาพที่ 4) และให้ปุ๋ยละลายน้ำสูตร 16-16-16 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และพ่นสารกำจัดเพลี้ยแป้งเดือนละ 1 ครั้ง พร้อมทั้งโรยยากำจัดมด พบว่าทุกต้นมีการเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งจะนำไปปลูกลูกขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวในแปลงปลูกต่อไป



ภาพที่ 4. การเจริญของต้นอ่อนที่ได้จากหน่อสับปะรดปลอดไวรัส

#### สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บต้นสับปะรดที่มีลักษณะสมบูรณ์ในพื้นที่ปลูกสับปะรดในปี 2551 จากจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สงขลาและพัทลุง จำนวน 69 67 8 และ 12 ต้น ตามลำดับ รวมเป็น 156 หน่อ หลังจากนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลปรากฏว่า การตรวจพบไวรัส PMWAV-1 ใน 93 หน่อ และไวรัส PMWAV-2 ใน 31 หน่อ สรุปว่า มีหน่อสับปะรดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัส 32 หน่อ และในปี 2552 เก็บต้นสับปะรดที่มีลักษณะสมบูรณ์ในพื้นที่ปลูกสับปะรดจากศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่ สงขลา และศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตรัง จำนวน 109 100 และ 100 ต้น ตามลำดับ รวมเป็น 309 หน่อ หลังจากนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลปรากฏว่า มีหน่อสับปะรดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัส

จำนวน 37 หน่อ จึงนำมาขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่าการพอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อสับประรดปลอดไวรัส ด้วย 0.3% ไฟซาน , 10 % และ 5% คลอโรอกซ์ และ 70% แอลกอฮอล์ สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดีกว่าการพอกด้วย 1% คอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ 0.1% เมอร์คิวริก คลอไรด์ และ 10 % และ 5% คลอโรอกซ์ หลังจากเลี้ยงหน่อปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) ตาเจริญเป็นหน่ออ่อนภายใน 6 สัปดาห์ จึงทำการตัดแยก (subculture) ลงเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดการแตกกอ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อน และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน ได้ขยายเพิ่มขยายปริมาณต้นอ่อนสับประรด จนมีปริมาณ 900 ขวด ก่อนจะย้ายเป็นต้นเดี่ยวลงเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก (MS+IBA 0.5 ppm) เพื่อให้ได้ต้นที่สมบูรณ์และได้ทำการย้ายปลูกในวัสดุปลูก (ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1) จำนวน 2,000 ต้น ดูแลรักษาภายใต้โรงเรือนอนุบาล และให้ปุ๋ยละลายน้ำสูตร 16-16-16 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และพ่นสารกำจัดเพลี้ยแป้งเดือนละ 1 ครั้ง พร้อมทั้งโรยยากำจัดมด พบว่าทุกต้นมีการเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งจะนำไปปลูกขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวในแปลงปลูกต่อไป

### เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ยุทธศาสตร์สับประรด Pineapple National Strategy 2547-2551. 51 หน้า.
- สถาบันวิจัยพืชสวน. 2546. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน เอกสารวิชาการ กรมวิชาการเกษตร. 156 หน้า.
- วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2546. โรคเหี่ยว : ภัยคุกคามต่อการปลูกสับประรดของไทย. วารสารโรคพืช 17 (1-2) : 48-53.
- Beardsley, J.W. 1993. The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host relationships. *Acta Hort.* (ISHS) 334:383-386.
- Dilokkunanant, U., S. Kladpan, R. Prateepasen and U. Suwanwong. 1996. Pineapple wilt disease in Thailand. *Thai. J. Agric.* 29: 337-348.
- German, T.L., D.E. Ullman and U.B. Gunashinghe. 1992. Mealybug Wilt of Pineapple. Chapter 7 *In Advance in Disease Vector Research* vol. 9. pp. 241-258 ed. by K.F. Harris. Springer-Verlag New York.
- Sether, D.M., D.E. Ullman and J.S. Hu. 1998. Transmission of pineapple mealybug wilt-associated virus by two species of mealybug (*Dysmicoccus* spp.). *Phytopathology* 88: 1224-1230.

Sether, D.M. and J.S. Hu. 2002a. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. *Phytopathology* 92: 928-935.

Sether, D.M. and J.S. Hu. 2002b. Yield impact and spread of pineapple mealybug wilt associated virus-2 and mealybug wilt of pineapple in Hawaii. *Plant Dis.* 86: 867-874.