การสำรวจและจำแนกโรคไวรัสของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ PVS PVX และ PLRV

Survey and Identification of Potato Virus Diseases caused by PVS, PVX and PLRV

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] วิวัฒน์ ภาณุอำไพ[2/] ปรียพรรณ พงศาทิชณ์[3/]

[1/ 3/]สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

[2/]ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่ กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างใบมันฝรั่งจากแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่, จังหวัดลำปางและจังหวัดตาก โดยคัดแยกเฉพาะอาการคล้ายโรคไวรัสที่มีอาการใบด่าง ใบม้วน มาทำการตรวจสอบและตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส PVS PVX และ PLRV ด้วยวิธี GLIFT kit และ NCM-ELISA ในห้องปฏิบัติการ จากตัวอย่างทั้งหมดพบการระบาดของโรคไวรัส PLRV ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง อ.ชัยปราการ อ.แม่อายและอ.เจดีย์แม่ครัว จ.เชียงใหม่ ส่วนเชื้อไวรัส PVS และ PVX ไม่พบการระบาดในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง

รหัสการทดลอง 01-16-49-05-01-03-07-52

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยได้มีข้อตกลงเปิดการค้าเสรีกับหลายประเทศ มีการวางข้อกำหนดด้านคุณภาพของสินค้า ความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมาเป็นข้อกำหนดการนำเข้าสินค้า ดังนั้นแต่ละประเทศจำเป็นต้องมีข้อมูลด้านวิชาการที่ชัดเจนเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการเจรจาตกลงในเรื่องข้อกำหนดในแต่ละเรื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลด้านศัตรูพืชและการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช ที่จะถูกหยิบยกขึ้นมาเป็นเรื่องการกีดกันทางการนำเข้าได้เป็นอย่างดี ในระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมาประเทศไทยได้มีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งมากกว่าปีละ 8,000-12,000 ตัน จากหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา สก๊อตแลนด์ เป็นต้น เนื่องจากประเทศไทยไม่สามารถผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้ปลูก แต่จากการนำเข้าหัวพันธุ์จากต่างประเทศมีปัญหาการติดเชื้อไวรัสเข้ามา ได้แก่เชื้อ PVS PVX PVY PLRV ฯลฯ จากการรายงานของ Gray *et.al.* (2003) ได้ทำการสำรวจและประเมินความรุนแรงของโรคใบด่างจาก PVY ในหัวมันฝรั่งใน Maine and New Yoke. โดยสำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างจากต้นมันฝรั่ง จำนวน 1,330 ต้น จาก 90 ฟาร์ม 300 ตัวอย่าง เก็บจากต้นมีอาการด่างอย่างชัดเจน และ 1,030 ตัวอย่าง สุ่มจากต้นทั่วๆ ไป และทำการตรวจทางเซรุ่มวิทยากับแอนติซีรัมของไวรัส 6 ชนิด ได้แก่ PVA, PVS, PVX, PVY, PVM และ PLRV ซึ่งในโปรแกรมการผลิตหัวพันธุ์รับรองได้ทำการตรวจสอบไวรัสทั้ง 6 ชนิด เพราะไวรัสทั้ง 6 ชนิดนี้ เป็นเชื้อไวรัสที่พบเสมอในแหล่งปลูกมันฝรั่งในสหรัฐอเมริกา ผลจากการสำรวจพบว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อ PVY สูงที่สุดมีการเข้าทำลายถึง 68% และ PVS 61% ส่วน PVX มีเพียง 10 % ส่วนไวรัสอื่นๆ มีน้อยกว่า 1% ผลการสำรวจที่ได้นี้มีแนวโน้มใกล้เคียงกับการสำรวจในปี 2002 กิตติ ศักดิ์และคณะ(2531) ได้ทำการทดลองศึกษาความเสียหายที่เกิดขึ้นกับมันฝรั่งพันธุ์ Kennebec จากการเข้าทำลายของเชื้อ PVY และ PVX ที่เป็นโรคใน 3 อัตรา คือ 65% 41% และ 30% ตามลำดับ พบว่าหัวมันฝรั่งที่เก็บได้จากต้นเป็นโรคจะมีขนาดของหัวเล็กลงมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย 30 กรัม ในขณะที่หัวมันที่เก็บได้จากต้นปกติมีน้ำหนักโดยเฉลี่ยเป็น 70 กรัม แต่ผลผลิตโดยรวมตามน้ำหนักต้นเป็นโรคจะได้น้ำหนักน้อยกว่าไม่เป็นโรค ประมาณ 9.67% เมื่อวิเคราะห์ตัวเลขทางสถิติไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่คุณภาพของหัวพันธุ์ที่ได้จากต้นไม่เป็นโรคมีขนาดใหญ่กว่า

ในภาวะปัจจุบันที่ประเทศไทยต้องสั่งหัวพันธุ์จากประเทศต่างๆ เข้ามาจำนวนมากทุกปี จึงจำเป็นต้องเร่งดำเนินการสำรวจ รวมถึงเร่งรวบรวมและหาข้อมูลของเชื้อไวรัสโดยเฉพาะ PVS PVX และ PLRV ให้เป็นปัจจุบัน ว่าเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิดนี้ยังคงมีปรากฏอยู่ในแหล่งปลูกของประเทศไทยหรือไม่ หากปรากฏว่าสำรวจไม่พบว่ามีอยู่ในประเทศไทยอีกเลย นับว่าเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ที่จะนำมาแจ้งประกาศใน IPPC ว่าเชื้อเหล่านี้ไม่ได้มีอยู่ในประเทศไทยโดยถิ่นกำเนิด และปัจจุบันได้หายไปจากแหล่งปลูกมันฝรั่งของไทยแล้ว จากการที่ไทยมีข้อกำหนดให้มีการติดเชื้อไวรัสมากับหัวพันธุ์ได้ไม่เกิน 0.1% และฝ่ายวิชาการกักพืชมีการตรวจสอบอย่างเข้มงวดจริงจังทำให้หัวพันธุ์ที่นำเข้ามามีคุณภาพดี ปลอดโรคไวรัสมากขึ้น สุรภีและคณะ(2551) ดังนั้นการสำรวจให้ได้ข้อมูลของเชื้อทั้ง 3

ชนิดนี้จะเป็นประโยชน์ในการจัดทำเพื่อเป็นใช้ข้อมูล ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืช (Pest list) และวิเคราะห์ความเสี่ยง (Pest Risk Analysis) ไวรัสของมันฝรั่ง และเป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดเพื่อการผลิตหัวพันธุ์ปลอดเชื้อไวรัส

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

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

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างใบมันฝรั่ง เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนกโรคไวรัสของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ PVS, PVX และ PLRV

สำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างของมันฝรั่งจากแหล่งปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรโดยเก็บตัวอย่างใบจากแปลงปลูกที่ใช้หัวพันธุ์นำเข้าและแปลงที่ใช้หัวพันธุ์ที่ผลิตในประเทศไทยหรือเก็บใช้เองของผู้ปลูกมันฝรั่ง ใช้หลักการเก็บแบบ grid pattern (Canada/USA PVY-n Management plan) นำมาใช้สุ่มเก็บตัวอย่างในแปลงปลูกมันฝรั่งสำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส PVS PVX และ PLRV จะเก็บเฉพาะตัวอย่างที่แสดงอาการที่สงสัยว่าเป็นโรค โดยการเดินสำรวจในแปลงหาต้นเป็นโรคที่มีอาการด่างและอาการใบม้วนงอที่เกิดจากเชื้อ PVS, PVX และ PLRV การเดินแบบ grid pattern จะเดินเป็นรูปตัว U ดูแถวริมตลอดแถวแล้วเดินเว้นไป 10 แถว หรือ 10 เมตร เดินเข้าแถวที่ 10 และ 11 แล้วเดินตลอดแถวมาจนทะลุหัวแถว ขณะเดินสามารถมองสำรวจดูออกไปในรัสมีของแถวที่ 9, 10, 11 และ 12 ได้เป็น 4 แถว เมื่อมาถึงปลายแถวก็เดินขึ้นไปข้างหน้าของแถวที่ยังไม่ได้เดินผ่าน เดินผ่านหัวแถวเว้นไปอีก 10 แถว เดินเข้าระหว่างแถวที่ 20 และ 21 เดินดูได้ อีก 4 แถวคือ 19, 20, 21 และ 22 จึงเดินเป็นรูปตัว U คว่ำหงายชนกันไปตลอดแปลง การเก็บตัวอย่างเลือกเก็บที่มีอาการด่างทุกชนิดที่พบระหว่างการสำรวจ หากมีอาการด่างมากทั้งแปลงให้เก็บโดยเว้นระยะ 3 เมตรต่อ 1 ต้น ในแถวที่เดินผ่านทั้งซ้ายและขวา เพราะอาการใบด่างเกิดจากเชื้อไวรัสได้หลายชนิดจำเป็นต้องเก็บให้มาก ส่วนอาการใบม้วนงอที่มีความชัดเจนอยู่ในต้นว่าเกิดจากเชื้อ PLRV เก็บในลักษณะเดียวกับใบด่าง

2. ตรวจจำแนกด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay

(NCM-ELISA)

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 ทำการหยดตัวอย่างน้ำคั้นพืช 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 PVS, PVX และ PLRV 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) รอดูผลของปฏิกิริยา ประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาเห็นสีชมพูชัดเจนแล้วเท substrate ออก แล้วเทน้ำกลั่นลงแทน เพื่อเป็นการล้างและหยุดปฏิกิริยา

เวลาและสถานที่

<u>ระยะเวลา</u> เริ่มเดือนตุลาคม 2551 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2553

<u>สถานที่</u> ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างใบมันฝรั่ง เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนกโรคไวรัสของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ PVS, PVX และ PLRV

การสำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างของมันฝรั่งจากแปลงปลูกของเกษตรกรใน อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง อ.พบพระและอ.แม่สอด จังหวัดตาก ในปี 2552 ได้ตัวอย่างทั้งหมด 700 ตัวอย่าง และในปี 2553 ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างใบมันฝรั่งในพื้นที่ อ.ไชยปราการ อ.แม่อาย อ.ฝาง อ.สันทราย อ. เจดีย์แม่ครัว จ.เชียงใหม่ และ อ.พบพระ จ.ตาก ทั้งหมด 700 ตัวอย่าง ซึ่งการสำรวจและจำแนกต้องทำการรวบรวมข้อมูลแหล่งปลูกมันฝรั่งก่อนเป็นขั้นตอนแรก ก่อนทำการออกสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมันฝรั่งในแต่ละแหล่งปลูกของเกษตรกรเพื่อนำตัวอย่างใบมันฝรั่งนั้นกลับมาตรวจในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เป็นข้อมูลของเชื้อ PVS, PVX และ PLRV ที่ตรวจพบในแต่ละแหล่งปลูก

2. ตรวจจำแนกด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA)

จากตัวอย่างทั้งหมด 700 ตัวอย่าง ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรใน อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง อ.พบพระและอ.แม่สอด จังหวัดตาก โดยได้นำตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส PVS PVX และ PLRV ด้วยวิธี GLIFT และ NCM-ELISA จากตัวอย่างทั้งหมดพบว่าผลการตรวจยังไม่พบเชื้อไวรัส PVS, PVX และ PLRV ระบาดในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งดังกล่าว ส่วนในปี 2553 เก็บตัวอย่างใบมันฝรั่งในพื้นที่ อ.ไชยปราการ อ.แม่อาย อ.ฝาง อ.สันทราย อ.เจดีย์แม่ครัว จ.เชียงใหม่ และ อ.พบพระ จ.ตาก ทั้งหมด 700 ตัวอย่าง (ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2552 - มีนาคม 2553) โดยได้คัดแยกเฉพาะที่มีอาการคล้ายโรคไวรัสมาทำการตรวจสอบด้วย NCM-ELISA ในห้องปฏิบัติการ ทำการตรวจหาเชื้อ PVS, PVX และ PLRV พบเชื้อไวรัส PLRV โดยพบในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งอำเภอชัยปราการ อำเภอแม่อายและอำเภอเจดีย์แม่ครัว จ.เชียงใหม่

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การตรวจสอบตัวอย่างทั้งหมด (ในปี 2551-2553) ทำให้ทราบว่ายังมีเชื้อไวรัส PLRV ระบาดในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง อ.เจดีย์แม่ครัว อ.แม่อาย อ.ชัยปราการ จ.เชียงใหม่ ซึ่งเชื้อดังกล่าวนั้นเป็นเชื้อไวรัสที่สำคัญเชื้อหนึ่งที่เข้าทำลายมันฝรั่ง ลักษณะอาการที่พบเห็นในแปลงคือ ใบยอดม้วนงอ ใบมีสีเหลืองซีด ขนาดของใบเล็ก ต้นแคระแกรน เชื้อ PLRV สามารถติดไปกับหัวพันธุ์ได้ ดังนั้นเมื่อนำหัวพันธุ์ที่เป็นโรคไปปลูกจะมีส่วนอย่างมากที่ทำให้ผลผลิตลดลง ซึ่งเชื้อนี้ไม่สามารถถ่ายทอดโรคโดยวิธีสัมผัส แต่สามารถถ่ายทอดได้

โดยเพลี้ยอ่อนแบบ persistant ในด้านการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งนั้น เชื้อไวรัส PLRV สามารถติดเข้ามากับหัวพันธุ์ได้ไม่เกิน 4 เปอร์เซ็นต์ จากเหตุนี้จึงยังทำให้มีการตรวจพบเชื้อ PLRV ในแปลงปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรอยู่ จากการที่เชื้อไวรัสชนิดนี้ถ่ายทอดโรคได้ด้วยเพลี้ยอ่อนทำให้เกิดการระบาดและส่งผลต่อผลผลิตมันฝรั่ง ทั้งยังมีเชื้อไวรัสชนิดอื่นระบาดในแปลงปลูกมันฝรั่งร่วมด้วยแล้วเช่น PVY จะยิ่งส่งผลกระทบต่อผลผลิตของมันฝรั่งเป็นอย่างมาก ส่วนเชื้อไวรัส PVX และ PVS ยังไม่พบการระบาดและจากผลการตรวจหาเชื้อไวรัสในพื้นที่แหล่งปลูกมันฝรั่งนั้น ทำให้ทราบข้อมูลของเชื้อไวรัสในสถานการณ์ปัจจุบันของเชื้อ PVX, PVS และ PLRV ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรในประเทศไทย (จังหวัดเชียงใหม่, จังหวัดลำพูนและจังหวัดตาก) ดังนั้นจากข้อมูลทางวิชาการนี้จึงเป็นประโยชน์อย่างมาก สามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาวางมาตรการด้านการกักกันศัตรูพืชและการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช และยังสามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการปรับปรุงเงื่อนไขและข้อกำหนดในการวางมาตราการการอนุญาตินำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากประเทศต่างๆ ให้เป็นปัจจุบันทั้งยังสามารถนำข้อมูลนี้ไปวางแผนในการวางแนวทางการป้องกัน เพื่อการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งปลอดเชื้อไวรัส PVX, PVS และ PLRV และวางแนวทางการควบคุมโรคในแปลงปลูกมันฝรั่งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร สุรสิทธิ์ บุญทวี วิวัฒน์ ภานุอำไพ และนวลจันทร์ ดีมา. 2531. ความเสียหายของ ผลผลิตมันฝรั่งที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ PVY และ PVX. รายงานผลงานวิจัยปี 2531 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 12-16.

สุรภี กีรติยะอังกูร สิทธิศักดิ์ แสไพศาล วิวัฒน์ ภาณุอำไพ เยาวภา ตันติวานิช ปรียพรรณ พงศาพิชณ์. 2551. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม: โครงการตรวจหา PVY strain และการประเมินความเสียหายของผลผลิตมันฝรั่งจากเชื้อ PVY ในประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตร. 42 หน้า.

Gray, S., K. Perry and P. Baldauf. 2003. Report of 2003 Research activities funded by the Maine Potato Board.