

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 พงศาพิชณ^{3/}

^{1/ 3/} สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/} ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่

บทคัดย่อ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบต่างของมันฝรั่งจากแปลงปลูกของเกษตรกรใน อ.ไชยปราการ, อ.แม่สาย, อ.ฝาง, อ.สันทรายและอ.เจดีย์แม่ครัว จ.เชียงใหม่, อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง, อ.พบพระและอ.แม่สอด จังหวัดตาก โดยได้คัดเลือกเฉพาะที่เป็นโรคมาทำการตรวจสอบ นำตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส PVS PVX และ PLRV ด้วยวิธี GLIFT และ NCM-ELISA ในห้องปฏิบัติการพบการเกิดโรคไวรัส โดยพบเชื้อไวรัส PVS ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งอ.แม่สอด จ.ตาก และ อ.เจดีย์แม่ครัว จ.เชียงใหม่ พบเชื้อไวรัส PVX ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งอ.ฝาง จ.เชียงใหม่ และพบเชื้อ PLRV ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งอ.ไชยปราการ อ.แม่สายและอ.เจดีย์แม่ครัว จ.เชียงใหม่ ซึ่งการเก็บตัวอย่างใบมันฝรั่งในพื้นที่ปลูกในปีสุดท้ายนั้นเพื่อทำการตรวจสอบและจำแนกเชื้อไวรัส PVS PVX และ PLRV แล้วทำการรวบรวมและสรุปผล ยังอยู่ในระหว่างการดำเนินงาน

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยได้มีข้อตกลงเปิดการค้าเสรีกับหลายประเทศ มีการวางข้อกำหนดด้านคุณภาพของสินค้า ความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมาเป็นข้อกำหนดการนำเข้าสินค้า ดังนั้นแต่ละประเทศจำเป็นต้องมีข้อมูลด้านวิชาการที่ชัดเจนเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการเจรจาตกลงในเรื่องข้อกำหนดในแต่ละเรื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลด้านศัตรูพืชและการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช ที่จะถูกหยิบยกขึ้นมาเป็นเรื่องการกีดกันทางการนำเข้าได้เป็นอย่างดี ในระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมาประเทศไทยได้มีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งมากกว่าปีละ 8,000-12,000 ตัน จากหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา สกอตแลนด์ เป็นต้น เนื่องจากประเทศไทยไม่สามารถผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้ปลูก แต่จากการนำเข้าหัวพันธุ์จากต่างประเทศมีปัญหาการติดเชื้อไวรัสเข้ามา ได้แก่ เชื้อ PVS PVX PVY PLRV ฯลฯ จากการทำงานของ Gray *et al.* (2003) ได้ทำการสำรวจและประเมินความรุนแรงของโรคใบด่างจาก PVY ในหัวมันฝรั่งใน Maine and New York. โดยสำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างจากต้นมันฝรั่งจำนวน 1,330 ต้น จาก 90 ฟาร์ม 300 ตัวอย่าง เก็บจากต้นมีอาการต่างอย่างชัดเจน และ 1,030 ตัวอย่าง สุ่มจากต้นทั่วไป และทำการตรวจทางเซรุ่มวิทยากับแอนติซีรัมของไวรัส 6 ชนิด ได้แก่ PVA, PVS, PVX, PVY, PVM และ PLRV ซึ่งในโปรแกรมการผลิตหัวพันธุ์รับรองได้ทำการตรวจสอบไวรัสทั้ง 6 ชนิด เพราะไวรัสทั้ง 6 ชนิดนี้ เป็นเชื้อไวรัสที่พบเสมอในแหล่งปลูกมันฝรั่งในสหรัฐอเมริกา ผลจากการสำรวจพบว่าการเข้าทำลายของเชื้อ PVY สูงที่สุดมีการเข้าทำลายถึง 68% และ PVS 61% ส่วน PVX มีเพียง 10 % ส่วนไวรัสอื่นๆ มีน้อยกว่า 1% ผลการสำรวจที่ได้นี้มีแนวโน้มใกล้เคียงกับการสำรวจในปี 2002 กิตติศักดิ์และคณะ(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 นับว่าเป็นข้อมูลที่ประเสริฐที่จะนำมาแจ้งประกาศใน IPPC ว่าเชื้อเหล่านี้ไม่ได้มีอยู่ในประเทศไทยโดยถิ่นกำเนิด และปัจจุบัน

ได้หายไปจากแหล่งปลูกมันฝรั่งของไทยแล้ว จากการที่ไทยมีข้อกำหนดให้มีการติดเชื้อไวรัสกับหัวพันธุ์ได้ไม่เกิน 0.1% และฝ่ายวิชาการก็พิจารณาการตรวจสอบอย่างเข้มงวดจึงทำให้หัวพันธุ์ที่นำเข้ามาคุณภาพดี ปลอดภัยไวรัสมากขึ้น สุทธิและคณะ(2551) ดังนั้นการสำรวจให้ได้ข้อมูลของเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้จะเป็นประโยชน์ในการจัดทำเพื่อเป็นใช้ข้อมูล ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืช (Pest list) และ วิเคราะห์ความเสี่ยง (Pest Risk Analysis) ไวรัสของมันฝรั่ง และเป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดเพื่อการผลิตหัวพันธุ์ปลอดเชื้อไวรัส

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- ตู้แช่แข็ง -80 °C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการปลูกเชื้อไวรัส
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA
- พืชทดสอบและพืชอาศัย

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างใบมันฝรั่ง เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนกโรคไวรัสของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ PVS, PVX และ PLRV

สำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบต่างของมันฝรั่งจากแหล่งปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรโดยเก็บตัวอย่างใบจากแปลงปลูกที่ใช้หัวพันธุ์นำเข้าและแปลงที่ใช้หัวพันธุ์ที่ผลิตในประเทศไทยหรือเก็บใช้เองของผู้ปลูกมันฝรั่ง ใช้หลักการเก็บแบบ grid pattern (Canada/USA PVY-n Management plan) นำมาใช้สุ่มเก็บตัวอย่างในแปลงปลูกมันฝรั่งสำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส PVS PVX และ PLRV จะเก็บเฉพาะตัวอย่างที่แสดงอาการที่สงสัยว่าเป็นโรค โดยการเดินสำรวจในแปลงหาต้นเป็นโรคที่มีอาการต่างและอาการใบมันงอที่เกิดจากเชื้อ PVS, PVX และ PLRV การเดินแบบ grid pattern จะเดินเป็นรูปตัว U คูแฉกริมตลอดแถวแล้วเดินวนไป 10 แถว หรือ 10 เมตร เดินเข้าแถวที่ 10 และ 11 แล้วเดินตลอดแถวมาจนทะลุหัวแถว ขณะเดินสามารถมองสำรวจดูออกไปในรัศมีของแถวที่ 9, 10, 11 และ 12 ได้เป็น 4 แถว เมื่อมาถึงปลายแถวก็เดินขึ้นไปข้างหน้าของแถวที่ยังไม่ได้เดินผ่าน เดินผ่านหัวแถววนไปอีก 10 แถว เดินเข้าระหว่างแถวที่ 20 และ 21 เดินดูได้ อีก 4 แถวคือ 19, 20, 21 และ 22 จึงเดินเป็นรูปตัว U ครึ่งทางชนกันไปตลอดแปลง การเก็บตัวอย่างเลือกเก็บที่มีอาการต่างทุกชนิดที่พบระหว่างการสำรวจ หากมีอาการต่าง

มากทั้งแปลงให้เก็บโดยเว้นระยะ 3 เมตรต่อ 1 ต้น ในแถวที่เดินผ่านทั้งซ้ายและขวา เพราะอาการใบด่างเกิดจากเชื้อไวรัสได้หลายชนิดจำเป็นต้องเก็บให้มาก ส่วนอาการใบม้วนงอที่มีความชัดเจนอยู่ในต้นที่เกิดจากเชื้อ 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 หรือประมาณ 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) รอผลของปฏิกิริยา ประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาเห็นสีชมพูชัดเจนแล้วเท substrate ออก แล้วเทน้ำกลั่นลงแทน เพื่อเป็นการล้างและหยุดปฏิกิริยา

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2551 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2553

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างใบมันฝรั่ง เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนกโรคไวรัสของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ PVS, PVX และ PLRV

การสำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบต่างของมันฝรั่งจากแปลงปลูกของเกษตรกรใน อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง อ.พบพระและอ.แม่สอด จังหวัดตาก ในปี 2552 ได้ตัวอย่างทั้งหมด 700 ตัวอย่าง และในปี 2553 ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างใบมันฝรั่งในพื้นที่ อ.ไชยปราการ อ.แม่เมาะ อ.ฝาง อ.สันทราย อ.เจดีย์แม่ครัว จ.เชียงใหม่ และ อ.พบพระ จ.ตาก ทั้งหมด 700 ตัวอย่าง ซึ่งการสำรวจและจำแนกต้องทำการรวบรวมข้อมูลแหล่งปลูกมันฝรั่งก่อนเป็นขั้นตอนแรกก่อนทำการออกสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมันฝรั่งในแต่ละแหล่งปลูกของเกษตรกรเพื่อนำตัวอย่างใบมันฝรั่งนั้นกลับมาตรวจในห้องปฏิบัติการ 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.แม่เมาะ อ.ฝาง อ.สันทราย อ.เจดีย์แม่ครัว จ.เชียงใหม่ และ อ.พบพระ จ.ตาก ทั้งหมด 700 ตัวอย่าง (ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2552 - มีนาคม 2553) โดยได้คัดแยกเฉพาะที่เป็นโรคมาทำการตรวจสอบด้วย NCM-ELISA ในห้องปฏิบัติการ ทำการตรวจหาเชื้อ PVS, PVX และ PLRV พบการเกิดโรคไวรัสของเชื้อ PVS, PVX และ PLRV โดยพบเชื้อ PVS ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งอำเภอแม่สอด จ.ตาก และ อำเภอเจดีย์แม่ครัว จ.เชียงใหม่ พบเชื้อ PVX ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งอำเภอฝาง จ.เชียงใหม่ และพบเชื้อ PLRV ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งอำเภอไชยปราการ อำเภอแม่เมาะและอำเภอเจดีย์แม่ครัว จ.เชียงใหม่

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การตรวจสอบตัวอย่างทั้งหมดทำให้ทราบว่ายังมีเชื้อไวรัส PVX ระบาดในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งอ.ฝาง จ.เชียงใหม่ เชื้อไวรัส PVS ระบาดในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง อ.เจดีย์แม่ครัว จ.เชียงใหม่และ อ.แม่สอด จ.ตาก และเชื้อไวรัส PLRV ระบาดในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง อ.เจดีย์แม่ครัว อ.แม่สาย อ.ชัยปราการ จ.เชียงใหม่ ดังนั้นจากผลการทดลองทำให้ทราบข้อมูลของเชื้อไวรัส PVX, PVS และ PLRV ว่าปัจจุบันยังพบเชื้อดังกล่าวมีการระบาดอยู่ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรในประเทศไทย ดังนั้นจึงทำให้ได้ข้อมูลทางวิชาการนี้ มาวางมาตรการด้านศัตรูพืชและการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการปรับปรุงเงื่อนไขและข้อกำหนดในการวางมาตรการการอนุญาตนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากประเทศต่างๆ ให้เป็นปัจจุบันและเพื่อจะได้นำข้อมูลนี้ไปวางแผนในการวางแผนทางการป้องกันกำจัดเพื่อการผลิตหัวพันธุ์ปลอดเชื้อไวรัส PVX, PVS และ PLRV และเพื่อวางแผนทางการควบคุมโรคในแปลงปลูกมันฝรั่งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

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

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

สุรภี กียรติยะอังกูร์ สิทธิศักดิ์ แสไพศาล วิวัฒน์ ภาณุอำไพ เขาวภา ตันติวานิช ปรียพวรรณ พงศาพิชณ์. 2551. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม: โครงการตรวจหา PVY strain และการประเมินความเสียหายของผลผลิตมันฝรั่งจากเชื้อ PVY ในประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตร. 42 หน้า.