การถ่ายทอดโรคเหี่ยวสับปะรดโดยเพลี้ยแป้ง

Transmission of *Pineapple mealybug wilt-associated virus* by mealybug

วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1] กาญจนา วาระวิชะนี[1] สุเทพ สหายา[2]

[1]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2] กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

สำรวจและเก็บเพลี้ยแป้งสีชมพูจากแปลงที่ จ. เพชรบุรี มาเลี้ยงให้ปลอดไวรัสในกรงกันแมลง จากนั้นนำหน่อสับปะรดมาตรวจสอบว่าปลอดไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 จำนวน 20 หน่อ โดยเทคนิค RT-PCR ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-1 ได้แก่ Pa222-F1 (5′-ACA GGA AGG ACA ACA CTC AC-3′) และ Pa223-R (5′-CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC-3′) จะให้แถบ band ของดีเอ็นเอ ขนาด 589 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-2 คือ Pa224-F2 (5′-CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG-3′) และ Pa225-R2 (5′-CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC-3′) ให้แถบ bandของดีเอ็นเอ ขนาด 609 คู่เบส พบว่า มี 12 หน่อที่ปลอดไวรัส จึงได้นำมาปลูกในกระถาง ดูแลใส่ปุ๋ยหน่อสับปะรดซึ่งเก็บไว้ในกรงกันแมลง ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนเลี้ยงขยายเพลี้ยแป้งปลอดไวรัสให้มีเพียงพอ และรอให้หน่อมีอายุที่เหมาะสำหรับใช้ในการถ่ายทอดไวรัสต่อไป

รหัสการทดลอง 01-08-49-01-02-01-03-52

คำนำ

สับปะรด [*Ananas comosus* (L.) Merr.] อยู่ในวงศ์ Bromeliaceae มีถิ่นกำเนิดในประเทศบราซิลและปารากวัย เริ่มมีการนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยโดยชาวโปรตุเกสตั้งแต่ปี พ.ศ. 2223 และปลูกกระจายไปทั่วทุกภาคของประเทศ ตามความเหมาะสมของพื้นที่และชนิดพันธุ์ สับปะรดจัดเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย สามารถปลูกและเก็บผลผลิตได้ตลอดปี เพื่อใช้บริโภคสดภายในประเทศและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น สับปะรดกระป๋อง น้ำสับปะรด สับปะรดกวน สับปะรดแช่แข็งและสับปะรดอบแห้ง มีมูลค่าส่งออกประมาณปีละ 13,000-15,000 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2545) โดยประเทศไทยครองความเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกสับปะรดเป็นอันดับหนึ่งของโลก เป็นเวลานานกว่า 10 ปีจนถึงปัจจุบัน โดยมีตลาดผู้นำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐประชาชนจีน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547)

ศัตรูพืชเป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกสับปะรด ทำให้ผลผลิตและคุณภาพสับปะรดเสียหายอย่างรุนแรง จนบางครั้งไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ศัตรูสำคัญที่สุดที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญต่อการปลูกสับปะรดของไทยในปัจจุบัน คือ “โรคเหี่ยว” ซึ่งพบระบาดเป็นครั้งแรกในรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อต้นปี พ.ศ. 2443 และปัจจุบันโรคนี้แพร่ระบาดทั่วไปในประเทศที่มีการปลูกสับปะรดเป็นการค้า เช่น ออสเตรเลีย ไทย และคิวบา เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่าพบการระบาดของโรคเหี่ยวในแหล่งปลูกสับปะรดของจังหวัดชลบุรีตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตอย่างสูง (Dilokkunanant *et al*., 1996) ด้วยเหตุที่เกษตรกรมีการนำหน่อพันธุ์จากแหล่งที่มีโรคระบาด ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส PiWV (Pineapple wilt virus)ไปปลูก จึงทำให้โรคเหี่ยวแพร่ระบาดมายังภาคตะวันตก ในปี พ.ศ. 2546 โรคนี้ระบาดรุนแรงในแปลงปลูกสับปะรดของภาคตะวันตกบริเวณจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และเพชรบุรี ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสำคัญของประเทศ โดยมีพื้นที่ปลูกสับปะรดเป็นอันดับ 1 และ 3 ของประเทศ คือ 492,058 และ 56,192 ไร่ ตามลำดับ จากพื้นที่ปลูกทั้งประเทศ 962,693 ไร่ โดยพบการแพร่ระบาดของโรคสูงถึง 90% ของพื้นที่ในเขต ตำบลหนองพลับ อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พันธุ์ที่พบว่ามีการระบาดของโรคเหี่ยว คือ พันธุ์ปัตตาเวีย หรือรู้จักแพร่หลายในนามสับปะรดศรีราชา เป็นพันธุ์ที่ปลูกมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 70 ของผลผลิตรวมของสับปะรด จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ Smooth Cayenne เป็นพันธุ์ที่นอกจากนิยมปลูกเพื่ออุตสาหกรรมแปรรูปแล้ว ยังเป็นพันธุ์หลักเพียงพันธุ์เดียวมาโดยตลอด นอกจากนี้ยังเป็นพันธุ์ที่นิยมใช้บริโภคผลสดอีกด้วย (วันเพ็ญ, 2546)

โรคเหี่ยว เกิดจากไวรัส Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaVs ได้แก่ PMWaV-1 และ PMWaV-2) ซึ่งมีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ 1,200 X 12 นาโนเมตร จัดอยู่ในสกุล คลอสเตอโรไวรัส (*Closterovirus*) กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะภายใน

เซลล์ท่ออาหารของพืช (Van Regenmortel, 2000; Sether *et al.,* 2001) โดยมีเพลี้ยแป้ง [pink pineapple mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ gray pineapple mealybug, *D. neobrevipes* (Beardsley)] เป็นพาหะ โดยทั่วไปพบ *D. brevipes* ในแทบทุกแห่งที่มีการปลูกสับปะรด รวมทั้งประเทศไทย และมีมด ได้แก่ มดคันไฟ (*Solenopsis* sp.) และมดหัวโต (*Pheidole* sp.) เป็นตัวพาเพลี้ยแป้งให้กระจายจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง (ชำนาญ พิทักษ์ และคณะ, 2540; Beardsley, 1993) ทั้งยังมีวัชพืชชนิดต่างๆเป็นแหล่งหลบซ่อนของมดและเพลี้ยแป้ง ลักษณะอาการของโรคที่เด่นชัด คือใบเริ่มแสดงอาการอ่อนนิ่ม มีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง ปลายใบแห้งตายเป็นสีน้ำตาลหรือสีแดงลามเข้าสู่โคนใบ (die back) ใบลู่ลงและแผ่แบนไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ ต่อมาต้นเหี่ยวและแห้งตายในที่สุด รากมีขนาดสั้นและแตกแขนงน้อยมาก ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ง่าย ซึ่งตรงข้ามกับต้นปกติที่มีรากจำนวนมากยึดเกาะดินแน่น ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ยาก ผลมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ และโรคนี้ไม่สามารถถ่ายทอดโดยวิธีกล (mechanical inoculation) (German *et al.* , 1992; สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2546)

ปัจจัยสำคัญในการแพร่ระบาดของโรคเหี่ยวในแปลงปลูกคือ เพลี้ยแป้ง ซึ่งในประเทศไทยพบว่า มีเพลี้ยแป้งสีชมพูในแปลงปลูกสับปะรด ฉะนั้นจึงเห็นควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยเพลี้ยแป้ง เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ต้นสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยว
2. หน่อพันธุ์สับปะรดที่ปลอดโรค
3. เพลี้ยแป้งสีชมพู
4. โรงเรือนทดลอง และกรงกันแมลง
5. ดินและกระถางสำหรับปลูกสับปะรด
6. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิคอณูชีววิทยา

วิธีการ

1. เพลี้ยแป้งที่ใช้เป็นพาหะในการทดสอบ

สำรวจและเก็บเพลี้ยแป้งทั้งสีชมพูจากแปลงปลูกสับปะรดใน จ. เพชรบุรี มาเลี้ยงให้ปลอดจากไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดบนผลฟักทองในกล่องกันแมลง โดยย้ายเพลี้ยแป้งไปบนฟักทองผลใหม่ทุกเดือน อย่างน้อย 3 รุ่น (generation) เพื่อให้เพลี้ยแป้งปลอดไวรัส ก่อนจะนำไปใช้เป็นพาหะในการถ่ายทอดโรค

2. การเตรียมแหล่งของไวรัส

นำต้นสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวจากแปลงปลูกมาตรวจสอบว่าเป็นไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* 1 (PMWaV-1) หรือ 2 (PMWaV-2) โดยเทคนิคอณูชีววิทยา และเก็บไว้ในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นแหล่งของไวรัส

2.1 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอของของไวรัสจากใบสับปะรด

โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (MasterPure^{TM}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 Isopropanal 500 ไมโครลิตร โดยต้องเย็นจัดโดยแช่ที่ -20 °ซ แล้วพลิกหลอดขึ้นลง 30-40 ครั้ง
10. นำสารละลายข้อ 4 มาปั่น 10,000 รอบ/นาที ที่ 4°ซ นาน 10 นาที
11. ล้างตะกอนด้วย 75 % ethanol 500 ไมโครลิตร แล้ว quick spin (ล้าง 2 ครั้ง)
12. dry ตะกอนใน 37°ซ นานประมาณ 2 ชั่วโมง
13. ละลายตะกอนของ RNA ที่ได้ใน TE buffer 15-20 ไมโครลิตร

2..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

<u>20 ul. Reaction</u> **(ใช้ชุดของ Bioneer)**

dH_2O	6 ไมโครลิตร
Primer R (100 พิโคโมล)	1 ไมโครลิตร
RNA template	5 ไมโครลิตร
บ่มที่ 95 °ซ 3 นาที แล้วแช่บนน้ำแข็ง.อีก 5 นาที จากนั้นเติม	
5X RT buffer	4 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	1 ไมโครลิตร
DTT	2 ไมโครลิตร
บ่มที่ 37 °ซ 10 นาที แล้วเติม	
M-MLV Reverse Transcriptase	1 ไมโครลิตร
บ่มที่ 45 °ซ 50 นาที	

PCR Profile

<u>20 ul. Reaction</u>

GoTaq®Green Master Mix (Promega)	10.0 ไมโครลิตร
Primer R (100 พิโคโมล)	0.5 ไมโครลิตร
Primer F (100 พิโคโมล)	0.5 ไมโครลิตร
dH_2O	6.0 ไมโครลิตร
Template (ที่ได้จาก RT-PCR)	3.0 ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ cDNA ตาม program ดังนี้

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

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

3. การเตรียมหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดไวรัส

รวบรวมหน่อพันธุ์สับปะรดที่แข็งแรง ไม่แสดงอาการของโรคเหี่ยว จากศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี จำนวน 20 หน่อ มาตรวจสอบว่าปลอดไวรัสทั้งสอง strain หรือไม่ ด้วยเทคนิค RT-PCR จากนั้นนำมาเก็บรักษาในโรงเรือนกันแมลง และใส่ปุ๋ยบำรุงต้นให้มีอายุประมาณ 3-4 เดือน ก่อนจะนำไปใช้เป็นพืชทดลองในการทดสอบการถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยเพลี้ยแป้ง

เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2551 – กันยายน 2553

สถานที่ - กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เพลี้ยแป้งที่ใช้เป็นพาหะในการทดสอบ

เพลี้ยแป้งทั้งสีชมพูจากแปลงปลูกสับปะรด สามารถขยายพันธุ์ได้ดีบนผลฟักทอง และถ้าให้เพลี้ยแป้งอยู่ในที่มืด โดยนำกล่องกระดาษมาครอบกล่องเลี้ยงอีกชั้นหนึ่ง เพลี้ยแป้งจะขยายพันธุ์ได้ดีกว่าการเลี้ยงในที่สว่าง ทั้งนี้เพราะในธรรมชาติเพลี้ยแป้งสีชมพูมักอาศัยอยู่ตามซอกกาบใบโคนต้น หรือบริเวณรากสับปะรด

2. การเตรียมแหล่งของไวรัส

นำหน่อสับปะรดที่แสดงอาการเหี่ยว จากแหล่งปลูก มาตรวจสอบว่าเกิดจากไวรัส PMWaV-1 หรือPMWaV-2 โดยเทคนิค RT-PCR จากนั้นนำมาปลูกในกระถาง อย่างละ 3 กระถาง และเก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง เพื่อใช้เป็นแหล่งของไวรัสในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดไวรัส

หน่อสับปะรดที่นำมาตรวจสอบว่าปลอดไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 จำนวน 20 หน่อ โดยเทคนิค RT-PCR พบว่า มี 12 หน่อที่ปลอดไวรัส จึงได้นำมาปลูกในกระถาง ดูแลใส่ปุ๋ย หน่อสับปะรดซึ่งเก็บไว้ในกรงกันแมลง ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนเลี้ยงขยายเพลี้ยแป้งปลอดไวรัสให้มีเพียงพอ และรอให้หน่อมีอายุที่เหมาะสำหรับใช้ในการถ่ายทอดไวรัสต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สำรวจและเก็บเพลี้ยแป้งสีชมพูจากแปลงที่ จ. เพชรบุรี มาเลี้ยงให้ปลอดไวรัสในกรงกันแมลง จากนั้นนำหน่อสับปะรดมาตรวจสอบว่าปลอดไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 จำนวน 20 หน่อ โดยเทคนิค RT-PCR ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-1 ได้แก่ Pa222-F1 (5′-ACA GGA AGG ACA ACA CTC AC-3′) และ Pa223-R (5′-CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC-3′) จะให้แถบ band ของดีเอ็นเอ ขนาด 589 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-2 คือ Pa224-F2 (5′-CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG-3′) และ Pa225-R2 (5′-CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC-3′) ให้แถบ bandของดีเอ็นเอ ขนาด 609 คู่เบส พบว่า มี 12 หน่อที่ปลอดไวรัส จึงได้นำมาปลูกในกระถาง ดูแลใส่ปุ๋ยหน่อสับปะรดซึ่งเก็บไว้ในกรงกันแมลง ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนเลี้ยงขยายเพลี้ยแป้งปลอดไวรัสให้มีเพียงพอ และรอให้หน่อมีอายุที่เหมาะสำหรับใช้ในการถ่ายทอดไวรัสต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ยุทธศาสตร์สับปะรด Pineapple National Strategy 2547-2551. 51 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2546. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/2545. เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ 3/2545 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 51 หน้า.

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 2546. ศัตรูสับปะรด เอกสารวิชาการ กรมวิชาการเกษตร. 44 หน้า.

ชำนาญ พิทักษ์ อนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ และอรนุช กองกาญจนะ. 2540. การป้องกันกำจัดมดในไร่สับปะรด. รายงานผลงานวิจัย กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่นๆ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. โรเนียว 21 หน้า.

วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุลชัย และ จารุวรรณ คุณาบุตร. 2546. เทคโนโลยีการผลิตและการแปรรูปสับปะรด. เทคโนโลยีการผลิตสับปะรดรับรองคุณภาพ. หน้า 1-22.

วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2546. โรคเหี่ยว : ภัยคุกคามต่อการปลูกสับปะรดของไทย. 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 Besearch vol. 9. pp. 241-258 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. 2001. Differentiation, distribution, and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. Plant Disease 85: 856-864.

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. 2000. Virus Taxonomy seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego. 1162 p