

การคัดเลือกสายพันธุ์มะละกอต้านทานไวรัสจุดวงแหวน *Papaya ring spot virus* ในสภาพเรือนทดลอง

¹ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภรณ์ ¹วันเพ็ญ ศรีทองชัย
¹กาญจนา วาระวิชะนี ²ธวัชชัย นิมกิงรัตน์
¹กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
²ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ สถาบันวิจัยพืชสวน

บทคัดย่อ

เชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) เป็นศัตรูพืชที่สำคัญของมะละกอ ทำให้เกิดโรคต่างวงแหวน สร้างความเสียหายกับการผลิตมะละกอ โดยทำให้ผลผลิตลดลงและคุณภาพที่ได้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งมะละกอสายพันธุ์ที่เป็นที่นิยมในท้องตลาดหลายสายพันธุ์ เช่น แหกดำ และ ขอนแก่น 1, 2 มีความอ่อนแอต่อโรคนี้นี้มาก ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาแก้ปัญหาดังกล่าวโดยการดัดแปลงตัดต่อสารพันธุกรรมให้พืชมีความสามารถในการต้านทานโรคต่างวงแหวนได้ แต่พบว่ากลับไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศเนื่องจากการความกังวลของผู้บริโภคต่อความปลอดภัยในการบริโภค และความเสี่ยงด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ เช่น การผสมกับพันธุ์พื้นเมือง เป็นต้น ทำให้ปัญหาการเข้าทำความเสียหายของโรคต่างวงแหวนยังคงเป็นปัญหาสำหรับเกษตรกรผู้ผลิตมะละกอต่อไป วิธีการคัดเลือกพันธุ์แบบดั้งเดิมโดยนักปรับปรุงพันธุ์จึงเป็นทางเลือกใช้ปัญหาดังกล่าวได้ แต่อย่างไรก็ตามการตรวจคัดเลือกละกอสายพันธุ์มะละกอที่ผ่านกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ว่ามีคุณสมบัติในการต้านทานโรคได้หรือไม่เป็นสิ่งสำคัญที่นักไวรัสวิทยาความจำต้องเข้ามาร่วมประสานงานทำการทดสอบพันธุ์ต้านทานโรค เพื่อให้มะละกอสายพันธุ์ต้านทานที่กรมวิชาการเกษตรผลิตได้มีคุณภาพและเข้าถึงเกษตรกรไทยได้

คำนำ

มะละกอ : (*Carica papaya* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ Carecaceae เป็น ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว 5-9 แฉก เกาะกลุ่มอยู่ด้านบนสุดของลำต้น ภายในก้านใบและใบมียางเหนียวสีขาวอยู่ มะละกอบางต้นอาจมีดอกเพียงเพศเดียว แต่บางต้นอาจมีดอกได้ทั้งสองเพศก็ได้

มะละกอเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ทั้งการทานผลไม้สด การนำมาทำอาหารคาว และการนำมาแปรรูปในเชิงอุตสาหกรรม ศัตรูพืชที่สำคัญอย่างหนึ่งของมะละกอคือเชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) ซึ่งทำให้เกิดโรคต่างวงแหวน เชื้อไวรัสชนิดนี้เข้าทำความเสียหายกับการผลิตมะละกอ โดยทำให้ผลผลิตลดลงและคุณภาพที่ได้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่ง

รหัสการทดลอง 01-23-54-01-00-00-11-54

มะละกอสายพันธุ์ที่เป็นที่นิยมในท้องตลาดหลายสายพันธุ์ เช่น แหกดำ และขอนแก่น 1, 2 มีความอ่อนแอต่อโรคนี้นี้มาก ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาแก้ปัญหาดังกล่าวโดยการตัดแปลงตัดต่อสารพันธุกรรมให้พืชมีความสามารถในการต้านทานโรคต่างวงแหวนได้ แต่พบว่ากลับไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศเนื่องจากการความกังวลของผู้บริโภคต่อความปลอดภัยในการบริโภค และความเสี่ยงด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ เช่น การผสมกับพันธุ์พื้นเมือง เป็นต้น ทำให้ปัญหาการเข้าทำลายของโรคต่างวงแหวนยังคงเป็นปัญหาสำหรับเกษตรกรผู้ผลิตมะละกอต่อไป

Papaya ringspot virus (PRSV) เป็นเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สำคัญในมะละกอ ทำให้ใบมีอาการผิดปกติต่างจุด มีอาการต่างจุดวงแหวนที่ผล ลำต้นและก้านใบแคระแกร็น ผลที่ได้มีขนาดและปริมาณน้อยลง และอาการจะทวีความรุนแรงในช่วงอากาศหนาว เชื้อ PRSV จัดจำแนกอยู่ในวงศ์ Potyviridae สกุล Potyvirus ถ่ายทอดโรคผ่านทางแมลงพาหะ เพลี้ยอ่อนสองชนิด (*Myzus persicae* และ *Aphis gossypii*) โดยมีการถ่ายทอดโรคแบบ non-persistent ไวรัสชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโรคได้ด้วยวิธีกล แต่ไม่สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

๑. โรงเรือนมุ้งกันแมลง
๒. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส
๓. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 3 ตำแหน่ง
๔. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
๕. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
๖. 100 bp DNA Ladder
๗. ชุดตรวจสอบเชื้อ PRSV reagent set (Agdia)
๘. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการปลูกเชื้อบนพืชด้วยวิธีกล และการตรวจวินิจฉัยเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค ELISA
๙. วัสดุการเกษตรต่าง ๆ ดินและปุ๋ยเคมี

วิธีการ

๑. สืบค้นข้อมูลทางชีววิทยา วิธีการตรวจวินิจฉัย และการถ่ายทอดโรคของเชื้อ *Papaya ringspot virus* และวางแผนการทดลอง

โดยตรวจเอกสารข้อมูลของเชื้อ PRSV วิธีการตรวจสอบ (รวมถึงไพรเมอร์ที่จำเพาะ) การถ่ายทอดโรค ลักษณะอาการที่สำคัญของโรค และอาการของโรคชนิดอื่นในมะละกอรวมถึงความผิดปกติของมะละกอที่ไม่ได้เกิดจากเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ PRSV

๒. เตรียมโรงเรือนสำหรับการทดลอง วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ อุปกรณ์ทางการเกษตรที่จำเป็นในขั้นตอนต่าง ๆ รวมถึงการจัดเตรียมไพโรเมอร์และแอนติชีรึมสำหรับใช้ตรวจสอบโรค
๓. สํารวจและเก็บรวบรวมไอโซเลตของเชื้อ Papaya ringspot virus จากแหล่งปลูกสำคัญของประเทศไทย เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันตก รวมถึงปลูกเชื้อบนมะละกอพันธุ์แขกดำเพื่อใช้เป็นแหล่งของเชื้อในการทดลอง
๔. นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะละกอสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ เก็บรวบรวมและพัฒนาพันธุ์ มาเพาะเพื่อทดสอบความต้านทานโรคในโรงเรือนทดลอง
๕. ปลูกเชื้อ PRSV ด้วยวิธีกล โดยใช้ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M และผงซีไลท์ ในปริมาณ 40 - 60 ต้น ต่อสายพันธุ์ สังเกตและบันทึกลักษณะอาการที่ปรากฏหลังจากปลูกเชื้อประมาณ 4 - 6 อาทิตย์ จากนั้นปลูกเชื้อซ้ำในกรณีที่พืชไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น
๖. ตรวจสอบเชื้อ PRSV ด้วยวิธี ELISA (Agdia) ในกรณีที่ปลูกเชื้อซ้ำ 2 ครั้งแล้วพืชยังไม่แสดงอาการผิดปกติ และยืนยันผลซ้ำด้วยเทคนิค RT-PCR จากนั้นส่งต้นที่คัดแยกและผ่านการตรวจยืนยันผลแล้วกลับไปยังศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษเพื่อดำเนินการต่อไป
๗. เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้ และจัดทำรายงาน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา: ตั้งแต่ ตุลาคม ๒๕๕๓ ถึงกันยายน ๒๕๕๖ รวม ๓ ปี

สถานที่วิจัย : ๑. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

๑. จากการทดสอบมะละกอทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ KDDNS, KDLS1, KDLS2, KNLS1, LN และ MA รวมถึงพันธุ์แขกดำซึ่งนำมาใช้เป็นพันธุ์ควบคุม จำนวนพันธุ์ละ 36 ต้น พบว่าหลังจากการปลูกถ่ายเชื้อ PRSV ประมาณ 6 อาทิตย์ มะละกอทั้ง 7 สายพันธุ์ จะแสดงอาการต่างวงแหวนที่บริเวณใบและยอดอย่างชัดเจน รวมถึงมีอาการลำต้นเตี้ยแคระแกร็นด้วย แสดงให้เห็นว่าไม่มีสายพันธุ์ใดแสดงความต้านทานต่อเชื้อ PRSV เลย โดยทั้ง 6 สายพันธุ์จะแสดงความอ่อนแอต่อโรคน้อยกว่าพันธุ์แขกดำซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมประมาณ 80% ซึ่งประเมินจากการวัดจากความสูงของต้นและความรุนแรงของอาการ
๒. ถัดมาได้ทดสอบกับอีก 12 สายพันธุ์ ได้แก่ Maradol, MIR, SEW 58, SKLD, Taiwan, ครั้ง, ท่าพระ 3, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย และ HN โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์แขกดำ แต่เกิดปัญหาเนื่องจากถูกหนุซึ่งระบาดที่ตึกสิทธิพรเข้ากัดกินทำลายจนหมด จึงต้องดำเนินการกำจัดหนุและทำการทดลองซ้ำ

๓. ถัดมาได้ทดสอบกับอีก 12 สายพันธุ์ ได้แก่ ท่าพระ 3, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย, HN, HO, HOS no.1, HOS no.2, HOS no.3, KD-Si และ KK 80 โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ แหกดำ ซึ่งอยู่ในระหว่างการดำเนินการ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการทดลองมะละกอทั้ง 7 สายพันธุ์ ได้แก่ KDDNS, KDLS1, KDLS2, KNLS1, LN, MA และ แหกดำไม่แสดงความต้านทานต่อเชื้อ *Papaya ringspot virus* เลย

ปัญหาและอุปสรรค

เนื่องจากเกิดปัญหาหุระบาดกัดเข้าทำลายโรงเรือนมุ้งที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้ (ชั้น 5 ตึก สิริพิพร) เนื่องจากในช่วงกลางปี 2554 มีการปรับปรุงชั้น 4 ตึก สิริพิพร และมีการถอนเก็บเศษวัสดุไม้ ประตุ ฝา ฯลฯ ไว้บริเวณชั้น 4 และ 5 ของตึก สิริพิพร ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่ของหนู ทำให้หนูเข้ากัดกิน เมล็ดพันธุ์และทำลายต้นกล้ามะละกอสายพันธุ์ที่ทดสอบจะหมดทำให้ต้องปลูกซ้ำใหม่หลายครั้ง ทำให้ การทดลองดังกล่าวได้ผลล่าช้า และไม่สามารถดำเนินการต่อได้ ปัจจุบันกลุ่มงานสัตววิทยา สำนักวิจัย พัฒนาการอารักขาพืช ได้ให้ความกรุณาเข้าดำเนินการติดตั้งกรงดักหนูจำนวน 50 กรง ปรากฏว่ายังไม่สามารถแก้ปัญหาได้ (ดักหนูได้เพียง 4 ตัวเท่านั้น) ปัจจุบันจึงได้ขอเหี่ยวโปรโตชีวกำจัดหนูจากกลุ่มงานสัตววิทยาเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวซึ่งถ้ากำจัดหนูเสร็จสิ้นจะดำเนินงานทดลองต่อทันที แต่หากยัง ดำเนินการกำจัดหนูไม่สำเร็จจะดำเนินการขอความอนุเคราะห์ขอใช้โรงเรือนจากหน่วยงานอื่นต่อไป นอกจากนี้ยังมีปัญหาอุปสรรคอันเนื่องมาจากสภาพอากาศฝนตกหนัก รวมถึงอุทกภัยน้ำท่วมหนักใน กรุงเทพฯ ที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการทำการทดลองด้วย

เอกสารอ้างอิง

CAB *international*. 2007. **Crop Protection Compendium 2003 Edition**. (Computer Program). CAB International. Wallingford, UK.

Conover RA, 1964. Distortion ringspot, a severe virus disease of papaya in Florida. Proceedings, Florida State Horticultural Society, 77:440-444.

Conover RA, 1964. Mild mosaic and faint mottle ringspot, two papaya virus diseases of minor importance in Florida. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 77:444-448.