การเฝ้าระวังการแพร่กระจายโรคไวรัสของมันฝรั่งที่เกิดจากไวรัส Potato virus A (PVA) Potato virus M (PVM) Potato virus T (PVT) Potato virus X (PVX) Potato virus S (PVS) และ Potato leaf roll virus (PLRV)

Survey and Identification of Potato Virus Diseases caused by Potato virus A (PVA) Potato virus M (PVM) Potato virus T (PVT) Potato virus X (PVX) Potato virus S (PVS) และ Potato leaf roll virus (PLRV)

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

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[3/]ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัย การผลิตเชียงใหม่ อ.ฝาง จ.เชียงใหม่

รายงานความก้าวหน้า

ได้ออกสำรวจและเก็บตัวอย่างใบมันฝรั่ง ในระหว่างเดือนตุลาคม 2554–เดือนพฤษภาคม 2555 ที่แสดงอาการใบด่างและใบม้วนงอของมันฝรั่งในพื้นที่ปลูก อ.แม่อาย อ.ฝาง อ.ไชยปราการ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ อ.แจ้ห่ม จ.ลำปาง อ.แม่สอด อ.พบพระ จ.ตาก โดยตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ PVA PVX PVS และ PLRV ด้วยวิธี NCM-ELISA และตรวจหาเชื้อ PVT และ PVM ด้วยวิธี ELISA กับตัวอย่างใบมันฝรั่ง จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 630 ตัวอย่าง ซึ่งจากตัวอย่างทั้งหมดยังไม่พบเชื้อไวรัสดังกล่าว และขณะนี้กำลังดำเนินการเตรียมเก็บตัวอย่างใบมันฝรั่งมาตรวจหาเชื้อไวรัสดังกล่าวในช่วงฤดูฝนและดำเนินการสรุปงานทดลองทั้งหมดที่ดำเนินการมาตั้งแต่เดือนตุลาคม 2554–เดือนกันยายน 2556 ต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-06-00-10-54

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยได้เปิดเขตการค้าเสรีกับหลายประเทศภายใต้หลักเกณฑ์ขององค์การการค้าโลก (World Trade Organization: WTO) ในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ประเทศไทยจำเป็นต้องยึดหลักการตามความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) มาตรการ SPS Agreement นี้ยึดหลักการทางวิทยาศาสตร์ และการประเมินความเสี่ยงเพื่อปกป้องสินค้าเกษตรจากศัตรูพืชที่ไม่เคยมีมาก่อน

ประเทศไทยมีการนำเข้าพืชจำนวนมากจากทั่วโลกในแต่ละปี และปัจจุบันประเทศไทยได้มีข้อตกลงเปิดการค้าเสรีกับหลายประเทศ มีการวางข้อกำหนดด้านคุณภาพของสินค้า ความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมาเป็นข้อกำหนดการนำเข้าสินค้า ดังนั้นแต่ละประเทศจำเป็นต้องมีข้อมูลด้านวิชาการที่ชัดเจนเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการเจรจาตกลงในเรื่องข้อกำหนดในแต่ละเรื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลด้านศัตรูพืชและการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช ที่จะถูกหยิบยกขึ้นมาเป็นเรื่องการกีดกันทางการนำเข้าได้เป็นอย่างดี ในระยะเวลาที่ผ่านมาประเทศไทยได้มีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งมากกว่าปีละ 8,000-12,000 ตัน จากหลายประเทศ ทั้งจากประเทศออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา สก๊อตแลนด์ เป็นต้น เนื่องจากประเทศไทยไม่สามารถผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้ปลูก แต่จากการนำเข้าหัวพันธุ์จากต่างประเทศมีปัญหาการติดเชื้อไวรัสเข้ามา ได้แก่เชื้อ PVS PVX PVY PLRV ฯลฯ ในภาวะปัจจุบันที่ประเทศไทยต้องสั่งหัวพันธุ์จากประเทศต่างๆ เข้ามาจำนวนมากทุกปี การเร่งรวบรวมและหาข้อมูลของเชื้อไวรัสโดยเฉพาะ PVA PVM PVT PVX PVS และ PLRV ให้เป็นปัจจุบัน ว่าเชื้อไวรัสทั้ง 6 ชนิดนี้ยังคงมีปรากฏอยู่ในแหล่งปลูกของประเทศไทยหรือไม่ หากปรากฏว่าสำรวจไม่พบว่ามีอยู่ในประเทศไทยอีกเลย นับว่าเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ที่จะนำมาแจ้งประกาศใน IPPC ว่าเชื้อเหล่านี้ไม่ได้มีอยู่ในประเทศไทยโดยถิ่นกำเนิด และปัจจุบันได้หายไปจากแหล่งปลูกมันฝรั่งของไทยแล้ว จากการที่ไทยมีข้อกำหนดให้มีการติดเชื้อไวรัสมากับหัวพันธุ์ได้ไม่เกิน 0.1% และฝ่ายวิชาการกักพืชมีการตรวจสอบอย่างเข้มงวดจริงจังทำให้หัวพันธุ์ที่นำเข้ามามีคุณภาพดี ปลอดโรคไวรัสมากขึ้น ดังนั้นการสำรวจให้ได้ข้อมูลของเชื้อทั้ง 6 ชนิดนี้จะเป็นประโยชน์ในการจัดทำเพื่อใช้เป็นข้อมูล ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืช (Pest list) และวิเคราะห์ความเสี่ยง (Pest Risk Analysis) ไวรัสของมันฝรั่ง และเป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดเพื่อการผลิตหัวพันธุ์ปลอดเชื้อไวรัส ดังนั้นจึงมีส่วนสำคัญมากเพื่อเป็นการป้องกันการนำเข้าเชื้อไวรัสจากต่างประเทศเข้ามาภายในประเทศไทย จึงควรเร่งรวบรวมและหาข้อมูลของเชื้อไวรัสดังกล่าวว่าพบหรือไม่พบภายในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- ตู้แช่แข็ง -80 ^{0}C

- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการปลูกเชื้อไวรัส
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี NCM-ELISA และ ELISA
- พืชทดสอบและพืชอาศัย

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างใบมันฝรั่ง เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนกโรคไวรัสของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อไวรัส

Potato virus A (PVA) Potato virus M (PVM) Potato virus T (PVT) Potato virus X (PVX)

Potato virus S (PVS) และ Potato leaf roll virus (PLRV)

สำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างของมันฝรั่งจากแหล่งปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรโดยเก็บตัวอย่างใบจากแปลงปลูกที่ใช้หัวพันธุ์นำเข้าและแปลงที่ใช้หัวพันธุ์ที่ผลิตในประเทศไทยหรือเก็บใช้เองของผู้ปลูกมันฝรั่ง ใช้หลักการเก็บแบบ grid pattern (Canada/USA PVY-n Management plan) นำมาใช้สุ่มเก็บตัวอย่างในแปลงปลูกมันฝรั่งสำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส PVA PVM PVT PVX PVS และ PLRV จะเก็บเฉพาะตัวอย่างที่แสดงอาการที่สงสัยว่าเป็นโรค โดยการเดินสำรวจในแปลงหาต้นเป็นโรคที่มีอาการด่างและอาการใบม้วนงอที่เกิดจากเชื้อไวรัสดังกล่าว 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) ของเชื้อไวรัส PVA PVX PVS และ PLRV

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 PVA PVX PVS 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 ครั้งๆ 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 ครั้งๆ 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 ส่วนการตรวจจำแนกด้วยวิธี Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) ของเชื้อไวรัส PVT และ PVM ดำเนินการตามคู่มือแนะนำ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2555 - เดือนพฤษภาคม 2556

สถานที่ ไร่เกษตรกรจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ตาก

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างใบมันฝรั่ง เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนกโรคไวรัสของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อไวรัส

Potato virus A (PVA) Potato virus M (PVM) Potato virus T (PVT) Potato virus X (PVX)

Potato virus S (PVS) และ Potato leaf roll virus (PLRV)

การสำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างของมันฝรั่งจากแปลงปลูกของเกษตรกรใน อ.แม่อาย อ.ฝาง อ.ไชยปราการ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ อ.แจ้ห่ม จ.ลำปาง อ.แม่สอด อ.พบพระ จ.ตาก ตัวอย่างทั้งหมด ที่เก็บในระหว่างเดือนตุลาคม 2555-เดือนพฤษภาคม 2556 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 630 ตัวอย่าง ก่อนการสำรวจและจำแนกนั้นได้ทำการรวบรวมข้อมูลแหล่งปลูกมันฝรั่งเพื่อออกสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมันฝรั่งในแต่ละแหล่งปลูกของเกษตรกรเพื่อนำตัวอย่างใบมันฝรั่งนั้นกลับมาตรวจในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เป็นข้อมูลของเชื้อ PVA PVM PVT PVX PVS และ PLRV ที่ตรวจพบในแต่ละแหล่งปลูก

2. ตรวจจำแนกด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) ของเชื้อไวรัส PVA PVX PVS และ PLRV

การสำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างของมันฝรั่งจากแปลงปลูกของเกษตรกร อ.แม่อาย อ.ฝาง อ.ไชยปราการ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ อ.แจ้ห่ม จ.ลำปาง อ.แม่สอด อ.พบพระ จ.ตาก โดยตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ PVA PVX PVS และ PLRV ด้วยวิธี NCM-ELISA และตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ PVT และ PVM ด้วยวิธี ELISA กับตัวอย่างใบมันฝรั่ง ซึ่งจากตัวอย่างทั้งหมด ที่เก็บในระหว่างเดือนตุลาคม 2555-เดือนพฤษภาคม 2556 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 630 ตัวอย่าง ยังไม่พบเชื้อไวรัสดังกล่าว

เอกสารอ้างอิง

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

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

Salim Khan M., M. I. Hoque, R. H. Sarker and H.-P. Muehlbach. 2003. Detection of Important Plant Viruses in In vitro Regenerated Potato Plants by Double Antibody Sandwich Method of ELISA. Plant Tissue Cult. 13(1) : 21-29, 2003.