

เรื่อง การตรวจวินิจฉัย *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd)

ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า

Interception on the *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) quarantine pest

Associated with imported Seed Potatoes

^{1/}สุรศักดิ์ แสนโคตร ^{1/}สุคนทิพย์ สมบัติ ^{1/}วาสนา รุ่งสว่าง ^{1/}โสภา มีอำนาจ ^{1/}จันทร์พิศ เดชhamatย์

^{1/}กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The Potato spindle tuber viroid (PSTVd) is classified as a quarantine pest in Thailand. It causes significant diseases in potatoes, leading to reduced tuber yields and poor quality unsuitable for processing. PSTVd also infects several species in the Solanaceae family and can be transmitted through both seed tubers and potato tubers, making it a serious pest. Although PSTVd has not been detected in Thailand, it remains a quarantine pest in many countries. To prevent its establishment and potential outbreaks that could harm potato cultivation and other host crops in Thailand, accurate, reliable, rapid, and widely accepted diagnostic methods are necessary. A study was conducted to develop such diagnostic methods by randomly sampling imported seed potatoes between 2022 and 2024. The imports, totaling 105 samples, were sourced from six countries: 1) Australia, 2) Canada, 3) the Netherlands, 4) New Zealand, 5) Scotland, and 6) the United States. The samples were examined for signs of deformation or abnormalities in the tubers and tested for the pathogen using molecular techniques. The diagnostic process combined visual symptom observation with Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) testing. Results revealed no detection of PSTVd in the imported seed potatoes. Furthermore, follow-up surveys of planting sites using the imported tubers did not show any disease symptoms in the potato fields. These findings can serve as a basis for revising import conditions for seed potatoes from authorized countries and facilitating new market access agreements for imports from additional countries

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัส *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) จัดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย ก่อให้เกิดโรคในมันฝรั่งทำให้ผลผลิตหัวมันฝรั่งลดลงและไม่มีคุณภาพสำหรับการแปรรูป ทั้งยังสามารถเข้าทำลายพืชในวงศ์มะเขือ (Solanaceae) หลายชนิด สามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านเมล็ดพันธุ์ และหัวพันธุ์มันฝรั่งได้ จัดเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ยังไม่ปรากฏพบในประเทศไทยและเป็นศัตรูพืชกักกันของหลายประเทศ เพื่อเป็นการสกัดกั้นไม่ให้เชื้อสาเหตุเข้ามาตั้งรกราก และเกิดการแพร่ระบาดสร้างความเสียหายให้กับการเพาะปลูกมันฝรั่งและพืชอาศัยชนิดอื่นๆ ภายในประเทศ จึงได้ศึกษาหาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว เหมาะสมเป็นที่ยอมรับสำหรับการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อสาเหตุในหัวพันธุ์มันฝรั่ง โดยทำการสุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าระหว่างปี พ.ศ. 2565 ถึง พ.ศ. 2567 มีการนำเข้าจาก 6 ประเทศ ได้แก่ 1) ออสเตรเลีย 2) แคนาดา 3) เนเธอร์แลนด์ 4) นิวซีแลนด์ 5) สกอตแลนด์ และ 6) สหรัฐอเมริกา จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 105 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุด้วยการสังเกตลักษณะอาการการบิดเบี้ยวผิดปกติของหัวพันธุ์มันฝรั่งร่วมกับการตรวจสอบด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล ผลการตรวจสอบตัวอย่างหัวพันธุ์นำเข้าด้วยการสังเกตลักษณะอาการของโรคร่วมกับการตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุด้วยเทคนิค Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ยังไม่พบเชื้อไวรัส *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) และผลการติดตามสำรวจแปลงปลูกหัวพันธุ์มันฝรั่งหลังการนำเข้าในพื้นที่แปลงปลูก ยังไม่พบกลุ่มอาการของโรคในแปลงปลูกมันฝรั่ง ซึ่งข้อมูลการตรวจสอบศัตรูพืชดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นข้อกำหนดปรับปรุงเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากประเทศที่มีการอนุญาตนำเข้าแล้วและประเทศที่ยังต้องการเปิดตลาดนำเข้าใหม่ได้

คำหลัก : ไวรัส มันฝรั่ง PSTVd

คำนำ

ไวรัส *Potato spindle viroid* (PSTVd) สาเหตุโรคในมันฝรั่งทำให้หัวมันฝรั่งรูปร่างผิดปกติขนาดเล็ก ผลผลิตลดลง มีองค์ประกอบเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (ssRNA) ไม่มีโปรตีนห่อหุ้มเหมือนกับไวรัสสาเหตุโรคพืช มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 359 เบส ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและในสภาพธรรมชาติอาร์เอ็นเอของไวรัสจะอยู่ในลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิคล้ายท่อนตรง (rod-like) เนื่องจากการเชื่อมเกาะกันด้วยพันธะโควาเลนต์ของนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกัน (stem-loop) ทำให้เกิดโครงสร้างที่แข็งแรงของอาร์เอ็นเอไวรัส และเป็นไวรัสชนิดแรกที่รายงานการก่อโรคในมันฝรั่ง จัดจำแนกในวงศ์ (Family) *Pospiviroidae* สกุล (Genus) *Pospiviroid* ไวรัสชนิดนี้เข้าทำลายพืชได้หลายชนิด เช่น มันฝรั่ง มะเขือเทศ พริก ไม้ผลและไม้ดอกไม้ประดับ โดยเป็นโรคที่สำคัญสำหรับ มันฝรั่ง มะเขือเทศ และพริก จากการรายงานพบว่าอาการของโรคในไม้ผลและไม้ดอกไม้ประดับแสดงอาการเพียงเล็กน้อยหรือไม่พบการแสดงอาการของโรค ซึ่งไวรัสสามารถถ่ายทอด

โรคได้หลายทาง ได้แก่ วิธีกล เช่น การสัมผัส ติดไปกับอุปกรณ์ทางการเกษตร เมล็ดพันธุ์ หัวพันธุ์ แต่สำหรับเมล็ดพันธุ์มันฝรั่งยังไม่พบรายงานการถ่ายทอดของไวรอยด์ (EPPO, 2024)

ประเทศไทยมีการนำเข้าพืชอาศัยที่สำคัญเป็นจำนวนมาก รวมถึงหัวพันธุ์มันฝรั่งจำนวนมากในแต่ละปีมาปลูกภายในประเทศเพื่อผลิตหัวมันฝรั่งในอุตสาหกรรมแปรรูป ซึ่งพื้นที่ส่วนใหญ่พบการปลูกพืชอาศัยหลายชนิดร่วมกันในฤดูกาลเพาะปลูก และไวรอยด์ *Potato spindle viroid* (PSTVd) เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้าม ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6 พ.ศ. 2550) เพื่อเป็นการสกัดกั้นไม่ให้ศัตรูพืชกักกันร้ายแรงดังกล่าวติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า มาแพร่ระบาดสร้างความเสียหายให้กับมันฝรั่งและพืชอาศัยอื่นที่เพาะปลูกภายในประเทศ จึงได้ศึกษาวิธีการตรวจวินิจฉัยไวรอยด์ที่เหมาะสม รวดเร็ว แม่นยำ สำหรับหัวพันธุ์มันฝรั่งจากประเทศที่มีการอนุญาตนำเข้าทั้ง 7 ประเทศในปัจจุบันได้แก่ แครีอัฐออสเตรเลีย แคนาดา ราชอาณาจักรเนเธอร์แลนด์ ราชอาณาจักรสกอตแลนด์ ราชอาณาจักรนิวซีแลนด์ สหรัฐอเมริกา และรัฐอิสราเอล

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ วารสาร
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติก มาร์กเกอร์ คัตเตอร์
3. วัสดุและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น สารเคมีต่าง ๆ สารละลายสกัดอาร์เอ็นเอ ไปเปอร์ต ทิป ปีกเกอร์ หลอดพลาสติกขนาด 1.5 - 2 มิลลิลิตร
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
5. เครื่อง Thermal cycler (PCR)
6. เครื่อง Gel electrophoresis
7. เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator
8. ตู้แช่แข็ง -20 หรือ -80 องศาเซลเซียส
9. โรงเรือนปลูกพืช กระถางปลูกพืช ดินปลูก ปุ๋ยเคมี

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรอยด์ *potato spindle tuber viroid* ที่มีรายงานการเข้าทำลายในหัวพันธุ์มันฝรั่งของประเทศคู่ค้าที่ประเทศไทยมีการนำเข้า รวมทั้งข้อมูลเทคนิควิธีการตรวจสอบเชื้อและมาตรการการป้องกันการเข้ามาของเชื้อนี้
2. สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากทุกประเทศตามมาตรฐาน ISPM 31 (Methodologies for sampling of consignments) โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากด่านตรวจพืชต่าง ๆ ที่มีการนำเข้า 600 หัวต่อครั้ง

3. การตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตรวจสอบด้วยตาเปล่า บันทึกข้อมูลต่าง ๆ และบันทึกภาพ หากตรวจพบลักษณะอาการหัวผิดปกติหรือขนาดเล็กกว่าปกติ นำมาตรวจวินิจฉัยขั้นละเอียดด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

4. การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส *potato spindle tuber viroid* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าโดยใช้เทคนิค Conventional-PCR ตามวิธีการดังนี้

4.1 สกัดสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอ ตาอ่อนจากหัวพันธุ์มันฝรั่ง (sprouted potato) ด้วยสารละลาย CTAB (Gambino *et al.*, 2008)

4.2 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อไวรัส *potato spindle tuber viroid* ด้วยเทคนิค one-step RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับไวรัสกลุ่ม *pospiviroid*

4.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยใช้วุ้นอะกาโรส (Agarose Gel) 2 เปอร์เซ็นต์ ให้แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที

4.4 ตัวอย่างที่ปรากฏแถบแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายถือว่าให้ผลบวกกับการตรวจสอบ ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอีกครั้งเพื่อส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

4.5 วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่าง โดยจัดการข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป DNASTAR และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

5. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงของบริษัทที่นำเข้าในจังหวัดตาก

6. การบันทึกข้อมูลการตรวจพบและไม่พบเชื้อไวรัส *potato spindle tuber viroid* จำนวนครั้ง ปริมาณ และประเทศผู้ส่งออกหัวพันธุ์มันฝรั่ง

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการ ปีเริ่มต้นตุลาคม 2565 สิ้นสุด กันยายน 2567

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงปลูก หัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าของบริษัทเอกชนหรือเกษตรกรใน อำเภอพบพระ จังหวัดตาก

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

- สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัส *potato spindle tuber viroid* (PSTVd) ที่มีรายงานการเข้าทำลายในหัวพันธุ์มันฝรั่งของประเทศคู่ค้าที่ประเทศไทยมีการนำเข้า ประเทศไทยมีเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจาก 7 ประเทศ ได้แก่ หัวพันธุ์นำเข้าจากเครือรัฐออสเตรเลีย (กรมวิชาการเกษตร, 2552จ) จากประเทศแคนาดา (กรมวิชาการเกษตร, 2559) ราชอาณาจักรเนเธอร์แลนด์ (กรมวิชาการเกษตร, 2552ข) ราชอาณาจักรสกอตแลนด์ (กรมวิชาการเกษตร, 2552ค) นิวซีแลนด์ (กรมวิชาการเกษตร, 2552ก) สหรัฐอเมริกา (กรมวิชาการเกษตร, 2552ง) และรัฐอิสราเอล (กรมวิชาการเกษตร, 2552ฉ)

เชื้อไวรัส *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (EPPO, 2024)

เชื้อไวรอยด์ Family : *Pospiviroidae* Genus : *Pospiviroid*

ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name) : *Potato spindle tuber viroid*

ชื่อวิทยาศาสตร์อื่น ๆ : PSTVd, *Potato gothic virus*, *Potato spindle tuber pospiviroid*, *Potato spindle tuber virus*, *Tomato bunchy top viroid*

ชื่อสามัญ (common name): bunchy top of tomato spindle tuber of potato

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) เป็นเชื้อก่อโรคพืชชนิดแรกที่ถูกระบุชื่อว่าเป็นไวรอยด์ ซึ่งคุณสมบัติของเชื้อมีความแตกต่างจากแบคทีเรียและไวรัส จากการทำนายโครงสร้างของสารพันธุกรรมลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 359 เบส (nt) เชื่อมต่อกันคล้ายท่อนตรง เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงทำให้เข้าใจว่าเป็นโมเลกุลของ RNA ที่เรียกว่าไวรอยด์ ซึ่งเชื้อ PSTVd จัดอยู่ในสกุล (Genus) ไวรอยด์ *Pospiviroid* ภายใต้วงศ์ (Family) *Pospiviroidae*

พืชอาศัย

พืชอาศัยหลักได้แก่ มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) และพืชสกุล *Solanum* ชนิดอื่น ๆ ที่สร้างหัวสะสมอาหาร และพืชในตระกูลพริกมะเขือเทศ (*Solanaceae*) หลายชนิดมีรายงานเป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรอยด์ เช่น มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) พริก (*Capsicum* spp.) ไม้ผล ไม้ดอกไม้ประดับ และวัชพืช สำหรับการติดเชื้อในไม้ดอกไม้ประดับและวัชพืชพบการแสดงอาการเพียงเล็กน้อยหรือไม่พบแสดงอาการเป็นโรค เช่นเดียวกับพืชบางชนิดในพืชสกุลพริกมะเขือเทศจากการทดสอบปลูกเชื้อก็พบอาการเพียงเล็กน้อย และพืชที่มีผลกระทบจากเชื้อไวรอยด์ PSTVd ที่สำคัญคือยังคงเป็น มันฝรั่ง และมะเขือเทศ

ชนิดพืชอาศัยที่มีรายงานพบเชื้อไวรอยด์ PSTVd ได้แก่ *Atriplex semilunaris*, *Brugmansia hybrids*, *Brugmansia sanguinea*, *Brugmansia suaveolens*, *Calibrachoa* sp., *Capsicum annuum*, *Cestrum aurantiacum*, *Cestrum elegans*, *Cestrum endlicheri*, *Cestrum nocturnum*, *Chenopodium eremaeum*, *Dahlia* sp., *Datura leichhardtii*, *Datura* sp., *Erigeron bonariensis*, *Hevea brasiliensis*, *Ipomoea batatas*, *Lycianthes rantonnetii*, *Lycium* sp., *Nicandra physalodes*, *Persea americana*, *Petunia* sp., *Physalis angulata*, *Physalis peruviana*, *Solanum anguivi*, *Solanum coagulans*, *Solanum dasyphyllum*, *Solanum laxum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum muricatum*, *Solanum nigrum*, *Solanum pseudocapsicum*, *Solanum sisymbriifolium*, *Solanum tuberosum*, *Streptoglossa* sp., *Streptosolen jamesonii*

การแพร่กระจาย

เชื้อไวรัส *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) ถูกพบรายงานครั้งแรกที่ประเทศสหรัฐอเมริกา และต่อมามีรายงานพบในทวีปอเมริกา เอเชีย แอฟริกา ยุโรป และโอเชียเนีย (ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์) มีรายงานว่า PSTVd หลายประเทศสามารถมีมาตรการป้องกันกำจัดได้สำเร็จ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการติดเชื้อ PSTVd อาจไม่แสดงอาการในพืชอาศัยหลายชนิด ดังนั้นจึงมีไม่อาจสรุปได้แน่นอนถึงสถานะการแพร่กระจายที่ปรากฏในข้อมูลปัจจุบัน

ยุโรป : ออสเตรีย อาเซอร์ไบจาน เบลารุส เบลเยียม โครเอเชีย สาธารณรัฐเช็ก จอร์เจีย เยอรมนี กรีซ (แผ่นดินใหญ่ ครีต) ฮังการี อิสราเอล อิตาลี (แผ่นดินใหญ่) คาซัคสถาน มอลตา มอนเตเนโกร เนเธอร์แลนด์ รัสเซีย (รัสเซียกลาง ตะวันออก ไซบีเรีย ตะวันออกไกล รัสเซียตอนเหนือ รัสเซียตอนใต้ สโลวีเนีย สเปน (แผ่นดินใหญ่) สวิตเซอร์แลนด์ ตุรกี ยูเครน สหราชอาณาจักร (อังกฤษ)

แอฟริกา : อียิปต์ กานา เคนยา ไนจีเรีย ยูกันดา

เอเชีย : อัฟกานิสถาน บังคลาเทศ จีน (กวางสี) , เหนือเป่ย, เฮยหลงเจียง, เจียงซู, จีหลิน, เหลียวหนิง, เนย์เมงกุ, ซิงไห่, ซานซี, ซานตง), อินเดีย (หิมาจัลประเทศ, กรณาฏกะ, มหาราษฏระ), อิหร่าน, อิสราเอล, ญี่ปุ่น (ฮอนชู), คาซัคสถาน, ปากีสถาน, เวียดนาม

อเมริกาเหนือ : เม็กซิโก

อเมริกากลางและแคริบเบียน : คอสตาริกา สาธารณรัฐโดมินิกัน

อเมริกาใต้ : เปรู เวเนซุเอลา

โอเชียเนีย : ออสเตรเลีย (ควีนส์แลนด์ ออสเตรเลียใต้ วิกตอเรีย ออสเตรเลียตะวันตก)

ลักษณะทางชีววิทยาเชื้อสาเหตุ

เชื้อไวรัส PSTVd ที่เข้าทำลายต้นมะเขือเทศสามารถถ่ายทอดได้ผ่านทางท่ออาหารพืชโฟลเอ็ม (phloem) จากการทดสอบการปลูกเชื้อที่ใบพืชสามารถถ่ายทอดเชื้อได้ไปทั่วทั้งต้นของพืช เช่นส่วนของใบใหม่หรือส่วนของผล และมีแนวโน้มกลไกในการถ่ายทอดของเชื้อคล้ายกับไวรัสพืช สำหรับต้นมันฝรั่ง สามารถตรวจพบไวรัสได้ทั่วทั้งต้น รวมทั้งส่วนหัวด้วย และพบว่าตำแหน่งของใบที่ต่างกัน มีความเข้มข้นของเชื้อที่ต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เช่นเดียวกันกับส่วนต่าง ๆ ของส่วนหัวมันฝรั่ง แต่สำหรับพริกยังไม่มีรายละเอียดเพิ่มเติมมากพอจากการตรวจสอบสามารถพบเชื้อ PSTVd ทั้งในส่วนใบและผลของพริก ซึ่งการติดเชื้อในระยะเริ่มแรกมักพบความเข้มข้นสูงสุดของเชื้อที่ส่วนใบยอด และระยะพักตัวของเชื้อยังเป็นเรื่องยากในการศึกษาเนื่องจากขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัส ปริมาณของเชื้อ ชนิดพันธุ์และพันธุ์พืชอาศัย ตลอดจนสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอุณหภูมิ โดยเชื้อ PSTVd สามารถถ่ายทอดได้โดยการสัมผัส แมลง ละอองเกสร (pollen) และเมล็ดพืช (seed)

การถ่ายทอดของเชื้อ

วิธีการถ่ายทอดของ PSTVd ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือผ่านการขยายพันธุ์พืช เมื่อมีการติดเชื้อในต้นพ่อแม่พันธุ์ ไวรอยด์จะสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกทั้งหมดที่ได้รับจากพืชที่ติดเชื้อ รวมทั้งส่วนหัวใต้ดิน กิ่งชำ กิ่งตอน ต้นกล้า วิธีการขยายพันธุ์พืชเป็นสาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายของ PSTVd ในมันฝรั่งและไม้ประดับที่นำไปขยายพันธุ์ต่อ

การถ่ายทอดด้วยวิธีกล (Mechanical transmission)

ต้นพืชที่ติดเชื้อ PSTVd จะเป็นแหล่งแพร่กระจายของเชื้อผ่านการสัมผัสระหว่างพืชที่เป็นโรคกับพืชไม่เป็นโรคในระหว่างการเพาะปลูก การถ่ายทอดด้วยวิธีกลนั้นอาจเกิดขึ้นได้ในช่วงการจัดการแปลงปลูกโดยเชื้อมีติดไปกับเครื่องมือการเกษตรและเครื่องจักร และพบว่าประสิทธิภาพในการถ่ายทอดของเชื้อจะเพิ่มมากขึ้นในสภาพอุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส ดังนั้นลักษณะการถ่ายทอดของเชื้อ PSTVd ไม่เหมาะสมสำหรับพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่งในประเทศเขตอบอุ่น แต่ก็ยังพบการรายงานการระบาดในพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่ง เช่น แคนาดา จีน ยูเครน และสหรัฐอเมริกา ในการปลูกมะเขือเทศในสภาพโรงเรือนซึ่งมีอุณหภูมิภายในค่อนข้างสูง พบว่าการติดเชื้อ PSTVd แพร่กระจายอย่างรวดเร็วภายในพืชแถวที่ใกล้ชิดกัน และพบว่าสายพันธุ์มะเขือเทศที่มีขนใบเยอะจะช่วยให้ส่งเสริมให้เกิดการถ่ายทอดของเชื้อด้วยวิธีกลง่ายยิ่งขึ้นเช่นกัน

การถ่ายทอดเชื้อด้วยละอองเกสรตัวผู้ และเมล็ดพันธุ์ (pollen and seeds)

จากการศึกษาพบว่าเชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านทางละอองเกสรตัวผู้ (pollen) และ เมล็ดพันธุ์ของมันฝรั่งได้ ทั้งยังมีรายงานพบว่า PSTVd ถูกตรวจพบในเมล็ดพันธุ์พริก และมะเขือเทศ ซึ่งมีการรายงานอัตราการถ่ายทอดสู่เมล็ดพันธุ์ตั้งแต่ 0 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จากพันธุ์พืชและสถานที่ที่แตกต่างกัน โดยข้อมูลการศึกษาได้จากการทดสอบระดับห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก PSTVd สามารถถ่ายทอดได้ง่ายผ่านการสัมผัสและการปลิวของละอองเกสรจากต้นที่เป็นโรค แต่ก็เป็นที่ถกเถียงกันว่าอาจเกิดจากการปนเปื้อนระหว่างต้นในการเพาะปลูก การเก็บตัวอย่าง การปนเปื้อนระหว่างทดสอบ ดังนั้นข้อมูลการถ่ายทอดของเชื้อผ่านละอองเกสรตัวผู้จึงเป็นที่ถกเถียงกันในการระบาดของเชื้อ PSTVd

การถ่ายทอดเชื้อด้วยแมลง (insects)

บทบาทของแมลงในการถ่ายทอดเชื้อ PSTVd ในมันฝรั่งยังไม่พบข้อมูลที่ชัดเจน เดิมพบการรายงานว่าเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะสามารถถ่ายทอดเชื้อได้ แต่ก็มีการศึกษาที่ให้ผลตรงกันข้ามกับการศึกษาก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานการถ่ายทอดเชื้อ PSTVd โดยเพลี้ยอ่อนจากต้นมันฝรั่งที่ติดเชื้อไวรัส potato leaf roll virus ได้ สำหรับในมะเขือเทศมีรายงานการถ่ายทอดเชื้อ *Pospiviroids* โดยเพลี้ยอ่อน แต่ก็ยังไม่สามารถ

ยืนยันได้สำหรับ PSTVd การผสมเกสรโดยผึ้งบัมเบิลบีมีความเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในมะเขือเทศที่ปลูกในสภาพโรงเรือนจากต้นที่เป็นโรคได้ แต่ไม่พบในเชื้อ PSTVd เนื่องจากปฏิสัมพันธ์ที่ไม่เฉพาะเจาะจงระหว่างผึ้งบัมเบิลบีกับไวรัส จึงไม่สามารถถ่ายทอดโดยแมลงผสมเกสรได้

ลักษณะอาการ

ชนิดและความรุนแรงอาการที่เกิดจากเชื้อ PSTVd ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ไวรัสชนิดและพันธุ์พืชอาศัย รวมถึงสภาพแวดล้อม การติดเชื้อ PSTVd อาจไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการเพียงเล็กน้อยถึงรุนแรง เชื้อจะเพิ่มปริมาณสะสมเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดอาการรุนแรงมากขึ้น สำหรับพืชอาศัยหลัก เช่น มันฝรั่ง มะเขือเทศ และพริก มีการอธิบายอาการโดย Owens and Verhoeven (2009) คำอธิบายโดยย่อของอาการที่โดดเด่นที่สุดดังต่อไปนี้ สำหรับการติดเชื้อ PSTVd ในพืชอาศัยอื่นในวงศ์ Solanaceae เช่น *Solanum melongena* (มะเขือยาว) และ *Solanum muricatum* (pepino) และไม้ดอกไม้ประดับส่วนใหญ่ โดยทั่วไปยังคงไม่แสดงอาการ

ลักษณะอาการโรคในมันฝรั่ง

พืชที่ติดเชื้ออาจต้นแคระแกรน ใบอาจเล็กกว่า ตั้งตรงมากขึ้น มีสีเขียวเข้มกว่าปกติ และมีลักษณะขรุขระเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติ ส่วนหัวที่ติดเชื้ออาจมีขนาดเล็ก ยาวบิดเกลียว มีรูปทรงผิดปกติและแตกร้าว ส่วนตาใบของพืชอาจเด่นชัดมากขึ้นและมีสีที่เย็นออกมามากคล้ายปุ่มอาจพัฒนาเป็นหัวขนาดเล็ก

ลักษณะอาการโรคในมะเขือเทศ

ในระยะแรกของการติดเชื้อ พืชที่ติดเชื้อจะมีการเจริญเติบโตลดลงและมีคลอโรซีบริเวณส่วนบนของพืช การเจริญเติบโตลดลงอาจรุนแรงมากขึ้น และใบที่มีสีเขียวเปลี่ยนสีอาจเปลี่ยนเป็นสีแดงและ/หรือสีม่วงและเปราะบาง ในระยะนี้การออกดอกและติดผลจะชะงัก พืชอาจตายหรือฟื้นตัวได้บางส่วน

ลักษณะอาการโรคในพริก

โดยทั่วไปพืชที่ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการหรือมีอาการเพียงเล็กน้อย เช่น ขอบใบปลายบิดเบี้ยว ในสภาพห้องทดลอง ออกดอกล่าช้าและส่วนของผลมีสีไม่สม่ำเสมอและมีรูปร่างผิดปกติ

ลักษณะลักษณะพื้นฐานวิทยา

PSTVd ประกอบด้วยโมเลกุล RNA สายเดี่ยวที่เป็นวงกลมปิดด้วยโควาเลนต์ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ประมาณ 359 นิวคลีโอไทด์ (nt) เปล่าสร้างโครงสร้างคล้ายแท่งโดยการจับคู่ฐานภายใน

การตรวจวินิจฉัย

การติดเชื้อ PSTVd อาจตรวจพบได้ด้วยการตรวจในสภาพแปลงปลูกและสภาพปลูกในโรงเรือนเรือน ขึ้นอยู่กับปัจจัยสภาพแวดล้อม เช่น ชนิดของไวรอยต์ ชนิดพืชอาศัยและพันธุ์พืช และสภาพแวดล้อม ขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยสำหรับมันฝรั่ง มะเขือเทศ และพริก ตามมาตรฐานขององค์กร EPPO PM 3/71 (EPPO, 2007) และ PM 3/77 (EPPO, 2015) ตามลำดับ ระหว่างการเก็บเกี่ยวผลผลิตมันฝรั่งจะมีการตรวจสอบหัวมันฝรั่งที่มีหัวลักษณะอาการขนาดหัวรูปร่างผิดปกติลักษณะบิดเกลียว สำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิคในห้องปฏิบัติการสำหรับพืชที่ไม่แสดงอาการหรือมีอาการเพียงเล็กน้อยเพื่อตรวจหาไวรอยต์ และการตรวจหาไวรอยต์ชนิดอื่นในกลุ่ม pospiviroid ซึ่งทำให้เกิดอาการคล้ายกัน (Verhoeven et al., 2004) วิธีการทดสอบที่ต้องการสำหรับการตรวจหา PSTVd คือวิธีทางชีวโมเลกุล เช่น RT-PCR และ real time RT-PCR อย่างไรก็ตาม เทคนิค PCR ยังไม่มีไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงสำหรับระบุชนิดของ PSTVd เพียงชนิดเดียว นอกจากไวรอยต์ชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ โดยเฉพาะไวรอยต์ tomato chlorotic dwarf viroid และบางไอโซเลทของไวรอยต์ tomato planta macho viroid ดังนั้นการระบุชนิดของไวรอยต์จำเป็นต้องนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และควรเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม รายละเอียดเพิ่มเติมและการทดสอบอื่น ๆ สำหรับการตรวจหาและระบุชนิดไวรอยต์ PSTVd สามารถปฏิบัติตามมาตรฐานการวินิจฉัยของ EPPO และ IPPC

การแพร่ระบาดของเชื้อ

PSTVd สามารถแพร่ระบาดไปกับส่วนขยายพันธุ์และถ่ายทอดเชื้อระหว่างต้นโดยการสัมผัส แผลง ละอองเกสร และเมล็ดพันธุ์พืช ส่วนขยายพันธุ์ที่ติดเชื้อ เช่น หัวจากกาบใบ (bull) หัวสะสมอาหาร (tuber) กิ่งตอน ต้นหน่ออ่อน และเมล็ดพืช ซึ่งส่วนขยายพันธุ์เหล่านี้ที่ติดเชื้อสามารถแพร่กระจายไวรอยต์ไปแหล่งต่าง ๆ ทั่วโลกได้

การแพร่ระบาดของไวรอยต์ได้อย่างกว้างขวางโดยส่วนขยายพันธุ์ของพืชและอุปกรณ์ทางการเกษตรที่มีการติดเชื้อ สำหรับการถ่ายทอดไวรอยต์ผ่านทางเมล็ดพันธุ์ของมันฝรั่ง ยังคงไม่มีข้อสนับสนุนมากเพียงพอที่จะสรุปได้ว่าสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด แม้ว่าปัจจุบันจะมีการซื้อขายเมล็ดพันธุ์มันฝรั่งเพื่อปลูกเพิ่มมากขึ้นก็ตาม แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาข้อมูลเชิงลึกเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการเคลื่อนย้ายของไวรอยต์ PSTVd ในเมล็ดพันธุ์มันฝรั่ง แต่สำหรับมะเขือเทศและพริก มีรายงานการตรวจพบไวรอยต์ PSTVd ในเมล็ดพันธุ์นำเข้าเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตาม มีรายงานการแพร่ของไวรอยต์ชนิดนี้ในจำนวนจำกัดเท่านั้น การปลูกเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกไทยที่เพื่อจำหน่ายเชิงการค้ามีการตรวจพบเชื้อ PSTVd หรือไวรอยต์กลุ่ม *pospiviroid* แต่ไม่ส่งผลกระทบในต้นกล้าราว 100,000 ต้น และการศึกษาไวรอยต์ PSTVd พบว่าต้นกล้ามะเขือเทศ 1 ใน 370 ต้นจากล็อตเมล็ดมะเขือเทศที่ปนเปื้อน สำหรับไวรอยต์ tomato chlorotic dwarf viroid และรายงานว่าต้นกล้ามะเขือเทศ 2 - 20 ต้นจาก 2,500 ต้นที่พบเชื้อ ข้อเท็จจริงที่ว่าในปี 2016 มีการตรวจพบอาการจากไวรอยต์ในต้นมะเขือเทศที่มาจากเมล็ดที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรอยต์ ในปี 1992 อย่างน้อย 10 ปีก่อนที่จะมีการบังคับการ

ตรวจสอบไวรอยด์ เป็นไปได้ว่า *Pospiviroid* ที่ปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์ เดิมไม่ค่อยมีการบันทึกถึงความเสียหายและการระบาด จึงสรุปว่าการแพร่ระบาดของเชื้อในมะเขือเทศมาจากการปนเปื้อนไวรอยด์ในเมล็ดพันธุ์ สำหรับพริกยังไม่มีหรือพบการระบาดมากนัก ดังนั้นการแพร่ระบาดของ PSTVd จึงอาจถูกประเมินสูงเกินไปในอดีต สำหรับการแพร่กระจายของ PSTVd ในพื้นที่ปลูกนั้น ๆ และการถ่ายทอดด้วยวิธีกลจึงเป็นวิธีการถ่ายทอดที่ดีที่สุด รวมถึงกิจกรรมของมนุษย์ เช่น ถ่ายทอดผ่านอุปกรณ์และเครื่องจักรที่ใช้ในระหว่างการเพาะปลูก ตัวอย่างเช่น การระบาดหลายครั้งในมะเขือเทศอาจเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในไม้ประดับไม้ประดับ จากข้อมูลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของไวรอยด์ที่แยกได้ในพืชเหล่านี้

ผลกระทบทางเศรษฐกิจ

ผลกระทบทางเศรษฐกิจจากไวรอยด์ PSTVd ทั้งผลกระทบทางตรงและทางอ้อม ผลกระทบโดยตรง ได้แก่ การสูญเสียผลผลิตและคุณภาพ ในขณะที่ผลกระทบทางอ้อมเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของราคาและผลกระทบต่อการค้าระหว่างประเทศ ได้ทำการประเมินผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งหมดโดยอาศัยการสร้างแบบจำลอง โดยคำนึงถึงความชุก การสูญเสียผลผลิต ข้อมูลภูมิอากาศ (อุณหภูมิ) รวมถึงราคาและการเปลี่ยนแปลงทางการค้า การประเมินผลกระทบนี้แสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมากขึ้นอยู่กับอุบัติการณ์โดยประมาณของไวรอยด์ และยากต่อการหาปริมาณ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื่องจากความไม่แน่นอนเกี่ยวกับความเป็นไปได้ของการแพร่กระจายและการแพร่กระจายต่อไปในพืชและภูมิภาค อย่างไรก็ตาม สรุปได้ว่าผลกระทบโดยตรงรวมกับการสูญเสียการส่งออกมันฝรั่งและมะเขือเทศ ทำให้เกิดต้นทุนของมาตรการสุขอนามัยพืชในปัจจุบันในสหภาพยุโรป ในช่วงศตวรรษที่ผ่านมา มีรายงานการสูญเสียผลผลิตอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากการติดเชื้อ PSTVd ในมันฝรั่ง ปัจจุบันซึ่งรวมถึงมาตรการสุขอนามัยพืชที่ครอบคลุม ในทำนองเดียวกัน PSTVd อาจทำให้เกิดการติดเชื้อร้ายแรงในมะเขือเทศเป็นครั้งคราว สำหรับไม้ผลมีผลกระทบต่ำมีการรายงานตรวจพบน้อย แต่สำหรับพริกไม่มีรายงานอาการหรือมีอาการเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากการทดลองพบว่าขนาดผลพริกจะลดลงและยังไม่มีข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการระบาดและผลกระทบในพริก สำหรับไม้ผลอื่น ๆ ที่ไม่แสดงอาการ คาดว่าจะไม่ได้รับผลกระทบโดยตรง แต่การส่งออกพืชเหล่านี้และไม้ผลอื่น ๆ อาจได้รับผลกระทบ

การป้องกันและควบคุม

เนื่องจากยังไม่มีวิธีการทางเคมีหรือชีวภาพในการควบคุม PSTVd ภายในต้นพืชที่ติดเชื้อ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการป้องกันเพื่อหลีกเลี่ยงการติดเชื้อ PSTVd มาตรการกำจัดการเป็นสิ่งจำเป็นในกรณีที่มีการระบาด

ควรมีขั้นตอนสุขอนามัยตลอดกระบวนการผลิตเพื่อป้องกันการติดเชื้อจากการปนเปื้อน มาตรการอาจเกี่ยวข้องกับการแยกพื้นที่ของพืช (โฮสต์) รวมถึงการใช้เครื่องมือที่สะอาด (ฆ่าเชื้อ) และชุดป้องกันโดยเจ้าหน้าที่ในระหว่างการจัดการการปลูกภายในแปลงปลูกพืช

2. สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากทุกประเทศตามมาตรฐาน ISPM 31 (Methodologies for sampling of consignments) โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากด่านตรวจพืชต่างๆ ที่มีการนำเข้า 600 หัวต่อครั้ง หัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีการนำเข้าตั้งแต่ ปี 2565 ถึง 2567 มีการนำเข้าจาก 6 ประเทศ ได้แก่ 1) เครือรัฐออสเตรเลีย นำเข้าจำนวน 37 ครั้ง น้ำหนักรวม 2,574.325 ตัน 2) แคนาดา นำเข้าจำนวน 14 ครั้ง น้ำหนักรวม 2,808.000 ตัน 3) เนเธอร์แลนด์ นำเข้าจำนวน 4 ครั้ง น้ำหนักรวม 200 ตัน 4) สกอตแลนด์ นำเข้าจำนวน 42 ครั้ง น้ำหนักรวม 8,223.340 ตัน 5) นิวซีแลนด์ 5 ครั้ง น้ำหนักรวม 475 ตัน 6) สหรัฐอเมริกา นำเข้าจำนวน 3 ครั้ง น้ำหนักรวม 0.396 ตัน โดยทำการสุ่มหัวพันธุ์มันฝรั่งจำนวน 600 หัวต่อครั้ง เป็นจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 105 ตัวอย่าง สำหรับการตรวจสอบอาการของโรคที่เกิดจากไวรอยด์ในหัวพันธุ์มันฝรั่ง การตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตรวจสอบด้วยตาเปล่า บันทึกข้อมูลต่าง ๆ และบันทึกภาพ หากตรวจพบลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจากไวรอยด์ในมันฝรั่งให้นำไปต้มหัวพันธุ์เพื่อให้เกิดตาอ่อน (sprouted potato) ประมาณ 7-14 วัน และนำไปสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจหาเชื้อสาเหตุต่อไป

3. จากการติดตามและตรวจสอบโรครายหลังการนำเข้าในแหล่งปลูก อำเภอบพพระ จังหวัดตาก ยังไม่พบลักษณะอาการที่เกิดจากไวรอยด์ในพื้นที่ปลูก

4. การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) ด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีการดังนี้

4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากตาอ่อนบนหัวมันฝรั่ง (sprouted potato) ด้วยสารละลายสกัด CTAB ตามวิธี Gambino และคณะ (2008) การสกัดดีเอ็นเอจากหัวพันธุ์มันฝรั่งบริเวณเนื้อเยื่อ vascular ring (ภาพที่ 1) ด้วยวิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) โดยนำส่วนตาอ่อนบดให้ละเอียดและเติมสารละลาย CTAB 1 มิลลิลิตร (100 mM Tris, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 8.0, 2% (w/v) CTAB, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP)-40 and 0.2 % (v/v) 2-mercaptoethanol) บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน และดูดสารละลายลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วจึงทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย Chloroform: isoamyl (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับหลอดไปมา และนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใสในหลอดใหม่ แล้วเติมด้วยสารละลาย isopropanal ที่แช่เย็นปริมาตร 1 เท่าของสารละลายส่วนใสและกลับหลอดไปมาให้สารละลายเข้ากันจะสังเกตเห็นการตกตะกอนของโมเลกุลดีเอ็นเอถ้าความเข้มข้นของโมเลกุลดีเอ็นเอสูง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนสารละลายใสทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเย็นจัดเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ สองครั้ง และนำตะกอนดีเอ็นเอไปตากไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ระเหยจนแห้งสนิท จึงนำตะกอนดีเอ็นเอมาละลายด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 20 – 50 ไมโครลิตร เมื่อตะกอนดีเอ็นเอละลายดีแล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 30 วัน ที่ -80 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นานหลายปี เพื่อนำไปตรวจหาเชื้อไวรอยด์ *Potato spindle tuber viroid* ด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

4.2 4.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส *Potato spindle tuber viroid* ด้วยเทคนิค One-step RT-PCR ตามวิธีตรวจสอบของหน่วยงาน The Subcommittee on Plant Health Diagnostic Standards (SPHDS) ประเทศออสเตรเลีย National Diagnostic Protocol for Potato spindle tuber viroid, PSTVd. (2015) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงคือ TG21(F) 5'-TGTGGTTCACACCTGACCTCC-3'CT20(R) 5'-CTTCAGTTGTTTCCACCGGG-3' ให้ผลิตภัณฑ์ PCR 258 bp (Constable and Moran., 1996) และใช้ nad5 gene เป็น internal control nad5-R 5'-CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3' (Figure 5) เนื่องจากเชื้อไวรัสยังไม่ปรากฏพบในประเทศไทยจึงต้องสังเคราะห์สารพันธุกรรมจำลองเพื่อใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบสำหรับ positive control

4.2.1 เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา ที่ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร (μl) ดังนี้

น้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อ	10.0	μl
2X Reaction Mix	12.5	μl
10 μM TG21(F)	1.0	μl
10 μM CT20(R)	1.0	μl
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	0.5	μl
Total RNA	1.0	μl

4.2.2 นำตัวอย่างทั้งหมดเข้าเครื่อง thermal cycler (PCR) โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

48 °C	นาน	45	นาที	1 รอบ
94 °C	นาน	2	นาที	
94 °C	นาน	30	วินาที	} 35 รอบ
55 °C	นาน	30	วินาที	
68 °C	นาน	1	นาที	
68 °C	นาน	5	นาที	1 รอบ
20 °C	นาน	10	นาที	1 รอบ

4.2.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ด้วยเทคนิค gel electrophoresis เตรียมสารละลายเจล 2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล (gel agarose) ในสารละลาย 0.5x TBE buffer หลอมละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมสารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) และเทเจลลงในถาดเจลตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 45 นาทีเพื่อให้เจลแข็งตัว จากนั้น ดูดสารละลาย PCR product ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในแต่ละหลุม (well) และใส่ดีเอ็นเอมาตรฐาน ปริมาตร 3 ไมโครลิตร หลังจากนั้นให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40-50 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่นเจลไปตรวจดูแถบแบนดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel document พร้อมทั้งบันทึกภาพ

4.2.4 หากตรวจพบตัวอย่างที่ปรากฏแถบแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายถือว่าให้ผลบวกกับการตรวจสอบ จึงทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอีกครั้งเพื่อส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ GenBank

5. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงของบริษัทที่นำเข้าในอำเภอบพพระ จังหวัดตาก ผลการติดตามในแปลงปลูกยังไม่พบลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากไวรอยด์

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. การสืบค้นข้อมูล โครงสร้างของสารพันธุกรรมเป็นโมเลกุลของ RNA ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 359 bp เชื่อมต่อกันคล้ายท่อนตรง เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เรียกว่าไวรอยด์ ซึ่งเชื้อ PSTVd จัดอยู่ในสกุล (Genus) ไวรอยด์ Pospiviroid ภายใต้วงศ์ (Family) Pospiviroidae พืชอาศัยหลักได้แก่ มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) และพืชสกุล *Solanum* ชนิดอื่น ๆ ไวรอยด์จะสามารถถ่ายทอดไปกับส่วนหัวใต้ดิน กิ่งชำ กิ่งตอน ต่อกิ่ง วิธีขยายพันธุ์พืชเป็นสาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายของ PSTVd ในมันฝรั่งและไม้ประดับที่นำไปขยายพันธุ์ต่อ แต่ยังไม่พบการรายงานแน่ชัดสำหรับการถ่ายทอดผ่านเมล็ดพันธุ์ของมันฝรั่ง
2. การสุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจาก 6 ประเทศ ได้แก่ สกอตแลนด์ แคนาดา ออสเตรเลีย เนเธอร์แลนด์ นิวซีแลนด์ และสหรัฐอเมริกา รวมทั้งหมด 105 ครั้ง โดยการสุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์ดำเนินการตามมาตรฐาน ISPM No. 31 โดยสุ่ม 600 หัวต่อครั้ง
3. การตรวจลักษณะอาการผิดปกติของหัวพันธุ์ ตัวอย่างจากทุกประเทศที่นำเข้าไม่พบลักษณะอาการบิดเบี้ยวหรือขนาดผิดปกติ
4. การตรวจหาเชื้อไวรอยด์ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) จากตาอ่อนของหัวพันธุ์มันฝรั่ง (sprouted potato) ด้วยวิธีการ CTAB method และตรวจสอบด้วยเทคนิค One-step RT-PCR ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง TG21(F)1 และ CT20(R) ให้ขนาด PCR product 258 bp ควรพิจารณาความเข้มข้นของตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ก่อนนำมาตรวจสอบที่ระดับความเข้มข้น 1: 10 หรือ 1: 100 เท่า ตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่า ตัวอย่าง RNA ทั้งหมด 105 ตัวอย่าง ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรอยด์ PSTVd ทวนสอบความถูกต้องของกระบวนการตรวจสอบด้วย RNA จำลองที่สังเคราะห์ (positive control) พบว่าเทคนิค One-step RT-PCR มีความน่าเชื่อถือ ถูกต้องแม่นยำเหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ PSTVd ในหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า (Figure 6)
5. การติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้าในแปลงปลูก ณ อำเภอบพพระ จังหวัดตาก ไม่พบลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจาก PSTVd เช่น ใบลดรูป ต้นแคระแกร็น สีเขียวเข้มหรือเนื้อเยื่อตายร่วมด้วย

คำแนะนำ

1. การดำเนินงานเพิ่มเติมเพื่อความปลอดภัยทางการเกษตร
 - ฝักระวังอย่างต่อเนื่องควรมีการสุ่มตรวจในแปลงปลูกเป็นระยะ เพื่อยืนยันว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ PSTVd
 - ควบคุมการนำเข้าดำเนินการสุ่มตัวอย่างและตรวจหาเชื้อทุกครั้งตามมาตรฐาน ISPM No. 31
2. การพัฒนาขีดความสามารถการตรวจวินิจฉัย
 - พัฒนาเทคนิคที่มีความไวมากขึ้น เช่น Real-time RT-PCR เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อในปริมาณต่ำ
3. การให้ความรู้แก่เกษตรกร
 - เผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับโรคที่เกิดจากไวรัส PSTVd และอาการที่ควรสังเกต เพื่อให้เกษตรกรสามารถแจ้งเตือนและป้องกันการแพร่ระบาดได้ตั้งแต่วัยแรก

การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค One-step RT-PCR สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อ PSTVd ได้อย่างมีประสิทธิภาพในประเทศไทย และช่วยลดความเสี่ยงจากการระบาดของศัตรูพืชในอนาคต.

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชลาดกระบังและด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ที่อำนวยความสะดวกในการสุ่มตรวจตัวอย่างในเบื้องต้น และนำส่งตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักพืชและอนุเคราะห์ให้ข้อมูลการนำเข้าห้วงพันธุ์มันฝรั่งเสมอมา และขอขอบคุณผู้ร่วมงานวิจัยทุกท่านที่อนุเคราะห์อุปกรณ์ สถานที่และให้คำปรึกษาข้อมูลด้านศัตรูพืชและวิธีการตรวจสอบได้จนสำเร็จครบตามวัตถุประสงค์ของโครงการ

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2552ก. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากนิวซีแลนด์ พ.ศ. 2552 ประกาศ ณ วันที่ 9 กรกฎาคม 2552 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 110 ง. ลงวันที่ 6 สิงหาคม 2552. หน้า 19
- กรมวิชาการเกษตร. 2552ข. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากราชาอาณาจักรเนเธอร์แลนด์ พ.ศ. 2552 ประกาศ ณ วันที่ 13 พฤศจิกายน 2552 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 182 ง. ลงวันที่ 21 ธันวาคม 2552. หน้า 68.
- กรมวิชาการเกษตร. 2552ค. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสกอตแลนด์ พ.ศ. 2552 ประกาศ ณ วันที่ 9 กรกฎาคม 2552 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 110 ง. ลงวันที่ 6 สิงหาคม 2552. หน้า 33.
- กรมวิชาการเกษตร. 2552ง. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสหรัฐอเมริกา พ.ศ. 2552 ประกาศ ณ วันที่ 13 ตุลาคม 2552 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 170 ง. ลงวันที่ 23 พฤศจิกายน 2552. หน้า 55-56.
- กรมวิชาการเกษตร. 2552จ. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากเครือรัฐออสเตรเลีย พ.ศ. 2552 ประกาศ ณ วันที่ 15 กรกฎาคม 2552 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 114 ง. ลงวันที่ 14 สิงหาคม 2552. หน้า 56.
- กรมวิชาการเกษตร. 2552ฉ. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากรัฐอิสราเอล พ.ศ. 2552 ประกาศ ณ วันที่ 9 กรกฎาคม 2552 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 110 ง. ลงวันที่ 6 สิงหาคม 2552. หน้า 54.
- กรมวิชาการเกษตร. 2559. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากแคนาดา พ.ศ. 2559 ประกาศ ณ วันที่ 28 กันยายน 2559 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 133 ตอนพิเศษ 221 ง. ลงวันที่ 30 กันยายน 2559. หน้า 32-33.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2024. Potato spindle tuber viroid (PSTVd) [ออนไลน์]. <https://gd.eppo.int/taxon/PSTVD0> : สืบค้นเมื่อ 1 มีนาคม 2567
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2020. Diagnostic, PM 7/138 (1) Pospiviroids (genus Pospiviroid). OEPP/EPPO Bulletin (2021) 51 (1), 144–17.
- Gambino G, Perrone I and Gribaudo I. 2008. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. Phytochemical Analysis 19(6), 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>.

Hammond, R. W. and Owens, R. A. 2006. Viroids: New and Continuing Risks for Horticultural and Agricultural Crops. Oniine. APSnet Features. doi: 10.1094/APSnetFeature-2006-1106.

Tangkanchanapas P, Reanwarakorn K, Chanprame S, Hongprayoon R, 2005. An RT-PCR primer pair for the detection of six pospiviroid in tomato plants. Thai Phytopathology 19, 13-21.

Table

Table 1 Quantity and value of seed potatoes imports from Thailand during 2022 – 2024

importing	Year 2022		Year 2023		Year 2024	
country	Quantity	Value	Quantity	Value	Quantity	Value
	(Ton)	(Million Bath)	(Ton)	(Million Bath)	(Ton)	(Million Bath)
Australia	1,650	54.92	749.92	24.70	175	6.74
Canada	729	18.51	1,107	32.18	972	33.40
Netherlands	125	3.84	75	2.50	0	0.00
Scotland	5,012	165.42	2,899.84	90.39	311.75	10.19
New Zealand	25	0.96	150	5.81	300	12.30
United States of America	0.376	0.34	0.02	0.14	0	0.00
Total	7,541.12	244.00	4,981.18	155.71	1,758.75	62.63

Table 2 Pest status of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (EPPO, 2024)

Countries that allow the import of seed potato	Status of <i>potato spindle tuber viroid</i> (PSTVd)	Reported
Australia	Present	New South Wales : Absent, pest eradicated Northern Territory : Absent, pest eradicated Queensland : Present, few occurrences South Australia : Present, few occurrences Victoria : Present, few occurrences Western Australia : Present, restricted distribution
Canada	Absent	Alberta : Absent, pest no longer present British Columbia : Absent, pest no longer present

		New Brunswick : Absent, pest eradicated Ontario : Absent, unreliable record Prince Edward Island : Absent, pest eradicated Québec : Absent, unreliable record
Netherlands	Present	Present, few occurrences
Scotland	Absent	Absent, intercepted only
New Zealand	Absent	Absent, pest no longer present
United States of America	Absent	Alaska : Absent, pest eradicated California : Absent, pest eradicated Colorado : Absent, pest eradicated Idaho : Absent, pest eradicated Kansas : Absent, invalid record Maine : Absent, pest eradicated Maryland : Absent, invalid record Michigan : Absent, pest eradicated Minnesota : Absent, pest eradicated Mississippi : Absent, pest eradicated Montana : Absent, pest eradicated Nebraska : Absent, pest eradicated New Hampshire : Absent, pest eradicated New York : Absent, pest eradicated North Carolina : Absent, pest eradicated North Dakota : Absent, pest eradicated Ohio : Absent, pest eradicated Oregon : Absent, pest eradicated Washington : Absent, pest eradicated Wisconsin : Absent, pest eradicated Wyoming : Absent, pest eradicated
Israel	Present	Present, no details

Table 3 Detected of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) of imported seed potatoes during 2022 to 2024

Country	Quantity of sample	Quantity (Ton)	PSTVd	Other Pest	Frequency
Australia	37	2,574.325	Not	Not	0
Canada	14	2,808.000	Not	Not	0
Netherlands	4	200.000	Not	Not	0
Scotland	42	8,223.340	Not	Not	0
New Zealand	5	475.000	Not	Not	0
United States of America	3	0.396	Not	Not	0
Total	105	14,281.061			

Figure

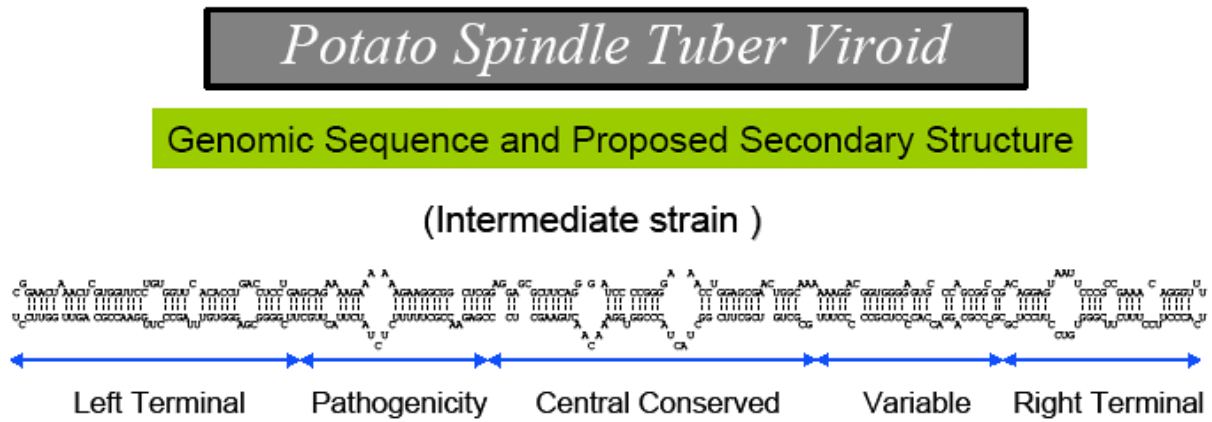


Figure 1 Secondary structure ssRNA of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) Hammond, R. W. and Owens, R. A (2006)



Figure 2 Symptoms disease of *Potato spindle tuber viroid* in tuber potato (EPPO, 2024)



Figure 3 Symptoms disease of *Potato spindle tuber viroid* in potato (EPPO, 2024)



Figure 4 Extraction RNA of viroid from the sprouted potato

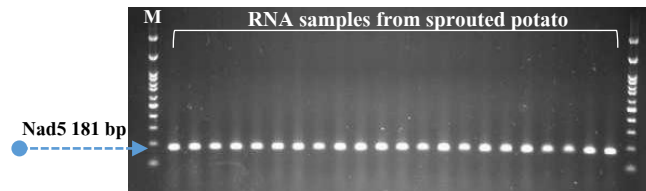


Figure 5: Internal control using the nad5 gene to assess RNA quality

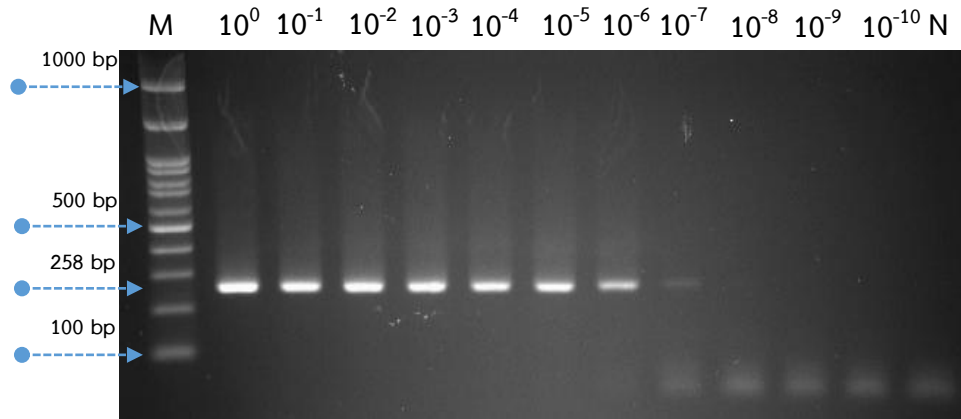


Figure 6: Gel electrophoresis on 2% agarose using one-step RT-PCR for PSTVd detection with primers TG21(F)1 and CT20(R)1. A 259 bp PCR product was successfully obtained from the positive control RNA (synthesized at 5 ng/ μ l) with various RNA dilutions.
Lane M = DNA Marker 100 bp Lane 10^0 - 10^{-10} = RNA dilution and Lane N = negative control (dH₂O)