การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดโรคไวรัสของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ PVA, PVM, PVT, PVX, PVS และ PLRV

Survey of the epidemic of Potato Virus Diseases caused by PVA, PVM, PVT, PVX, PVS and PLRV

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] วิวัฒน์ ภาณุอำไพ[2/] นางสาวปรียพรรณ พงศาทิชณ์[1/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจและเก็บตัวอย่างใบมันฝรั่ง ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2554 จากแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดลำปางและจังหวัดตาก โดยคัดแยกเฉพาะอาการคล้ายโรคไวรัสที่มีอาการใบด่างและใบม้วน ตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) (ตรวจเชื้อ PVX และ PVS) และ Double Antibody Sandwich Enzyme-linked immuno sorbent assay (DAS-ELISA) (ตรวจเชื้อ PVA, PVM, PVT และ PLRV) ในห้องปฏิบัติการ จากตัวอย่างทั้งหมด 700 พบการระบาดของเชื้อไวรัส PVS (0.71%) และ PVX (0.71%) ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง ต.แม่แฝก อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ ส่วนเชื้อไวรัส PVA, PVM, PVT และ PLRV ไม่พบการระบาดในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง

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

- ชุดตรวจ DAS-ELISA ของบริษัท BIOREBA
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี NCM-ELISA
- ตู้แช่แข็ง -20 ^{0}C
- Ice box, ถุงพลาสติกสำหรับเก็บและบดตัวอย่าง

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างใบมันฝรั่ง เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนกโรคไวรัสของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ PVA, PVM, PVT, PVX, PVS และ PLRV

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

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) ทำเครื่องหมายที่

ตารางของตัวแผ่น 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 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 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

3. ตรวจจำแนกด้วยวิธี Double Antibody Sandwich Enzyme-linked immuno sorbent assay (DAS-ELISA) เพื่อตรวจหาเชื้อ PVA, PVM, PVT และ PLRV

นำตัวอย่างใบมันฝรั่งมาตรวจหาเชื้อ PVA, PVM, PVT และ PLRV ด้วยวิธี DAS-ELISA โดยใช้ชุดตรวจของบริษัท BIOREBA และปฏิบัติตามคำแนะนำและวิธีการของบริษัท BIOREBA

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2554 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2556

สถานที่ - ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างใบมันฝรั่ง เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนกโรคไวรัสของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ PVA, PVM, PVT, PVX, PVS และ PLRV

การสำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างของมันฝรั่งจากแปลงปลูกของเกษตรกรใน อ.ฝาง อ.ไชยปราการ อ.แม่อาย อ.สันทราย อ.เจดีย์แม่ครัว อ.แม่สรวย จ.เชียงใหม่ อ.แจ้ห่ม จ.ลำปาง และ อ.พบพระ อ.แม่สอด จังหวัดตาก ในปี 2554 ได้ตัวอย่างทั้งหมด 700 ตัวอย่าง ซึ่งการสำรวจและจำแนกต้องทำการรวบรวมข้อมูลแหล่งปลูกมันฝรั่งก่อนเป็นขั้นตอนแรก ก่อนทำการออกสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมันฝรั่งในแต่ละแหล่งปลูกของเกษตรกรเพื่อนำตัวอย่างใบมันฝรั่งนั้นกลับมาตรวจในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เป็นข้อมูลของเชื้อ PVA, PVM, PVT, PVX, PVS และ PLRV ที่ตรวจพบในแต่ละแหล่งปลูก

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

จากตัวอย่างทั้งหมด 700 ตัวอย่าง ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรใน อ.ฝาง อ.ไชยปราการ อ.แม่อาย อ.สันทราย อ.เจดีย์แม่ครัว อ.แม่สรวย จ.เชียงใหม่ อ.แจ้ห่ม จ.ลำปาง และ อ.พบพระ อ.แม่สอด จังหวัดตาก โดยได้นำตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส PVS และ PVX ด้วยวิธี NCM-ELISA จากตัวอย่างทั้งหมดพบการเกิดโรคไวรัสของเชื้อ PVS, PVX ในพื้นที่ ต.แม่แฝก อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ โดยพบเชื้อ PVX จำนวน 5 ตัวอย่าง (0.71%) และ PVS จำนวน 5 ตัวอย่าง (0.71%)

3. ตรวจจำแนกด้วยวิธี Double Antibody Sandwich Enzyme-linked immuno sorbent assay (DAS-ELISA) เพื่อตรวจหาเชื้อ PVA, PVM, PVT และ PLRV

จากตัวอย่างทั้งหมด 700 ตัวอย่าง ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรใน อ.ฝาง อ.ไชยปราการ อ.แม่อาย อ.สันทราย อ.เจดีย์แม่ครัว อ.แม่สรวย จ.เชียงใหม่ อ.แจ้ห่ม จ.ลำปาง และ อ.พบพระ อ.แม่สอด จังหวัดตาก โดยได้นำตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส PVA, PVM, PVT และ PLRV ด้วยวิธี DAS-ELISA จากตัวอย่างทั้งหมดไม่พบการระบาดของเชื้อไวรัส PVA, PVM, PVT และ PLRV ในพื้นที่ดังกล่าว

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ตัวอย่างใบมันฝรั่งทั้งหมด 700 ตัวอย่าง ที่เก็บในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งของ อ.ฝาง อ.ไชยปราการ อ.แม่อาย อ.สันทราย อ.เจดีย์แม่ครัว อ.แม่สรวย จ.เชียงใหม่ อ.แจ้ห่ม จ.ลำปาง และ อ.พบพระ อ.แม่สอด จังหวัดตาก ในปี 2554 นั้นพบเชื้อไวรัส PVX และ PVS ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งอ.ฝาง จ.เชียงใหม่ แต่ในปริมาณน้อยโดยพบ PVX จำนวน 5 ตัวอย่าง (0.71%) และ PVS จำนวน 5 ตัวอย่าง (0.71%) ส่วนเชื้อไวรัส PVA, PVM, PVT และ PLRV นั้นไม่พบการระบาดในพื้นที่ที่ได้เก็บตัวอย่าง ซึ่งขณะนี้กำลังดำเนินการออกสำรวจและเก็บตัวอย่างใบมันฝรั่งของปี 2555 ในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง

เอกสารอ้างอิง

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

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

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.