การคัดเลือกและขยายหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดจากไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยว

Selection and Propagation of Pineapple Suckers Free From *Pineapple mealybug wilt-associated virus*

วันเพ็ญ ศรีทองชัย มัลลิกา นวลแก้ว สาวิตรี เขมวงศ์ เขมิกา โขมพัตร
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการสำรวจและเก็บต้นสับปะรดที่มีลักษณะสมบูรณ์ในพื้นที่ปลูกสับปะรดจากศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตรัง จำนวน 109 100 และ 100 ต้น ตามลำดับ รวมเป็น 309 หน่อ หลังจากนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลปรากฏว่า มีหน่อสับปะรดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัสจำนวน 37 หน่อ จึงนำมาขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อสับปะรดปลอดไวรัส ด้วย 0.3% ไฟซาน , 10 % และ 5% คลอร็อกซ์ และ 70% แอลกอฮอล์ สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี หลังจากเลี้ยงหน่อปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) ตาเจริญเป็นหน่ออ่อนภายใน 6 สัปดาห์ จึงทำการตัดแยก (subculture) ลงเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดการแตกกอ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อน และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน ขณะนี้ขยายปริมาณต้นอ่อนสับปะรดให้ได้ปริมาณ 300 ขวด และส่งให้ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี 150 ขวด เพื่อดำเนินการขยายต้นอ่อนและเร่งรากในอาหารสูตร MS+IBA 0.5 ppm ให้ได้เป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ และได้ทำการย้ายปลูกในวัสดุปลูก (ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1) จำนวน 1,400 ต้น ดูแลรักษาภายใต้โรงเรือนอนุบาล และให้ปุ๋ยละลายน้ำสูตร 16-16-16 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และพ่นสารกำจัดเพลี้ยแป้งเดือนละ 1 ครั้ง พร้อมทั้งโรยยากำจัดมด พบว่าทุกต้นมีการเจริญเติบโตได้ดี และจะได้มีการสุ่มตรวจไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวในต้นสับปะรดเหล่านี้ต่อไป

รหัสการทดลอง 01 08 49 01 02 01 04 51

คำนำ

สับปะรด [*Ananas comosus* (L.) Merr.] อยู่ในวงศ์ Bromeliaceae เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สามารถปลูกและเก็บผลผลิตได้ตลอดปี เพื่อใช้บริโภคสดภายในประเทศและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ มีมูลค่าส่งออกประมาณปีละ13,000-15,000 ล้านบาท โดยประเทศไทยครองความเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกสับปะรดเป็นอันดับหนึ่งของโลก เป็นเวลานานกว่า 10 ปีจนถึงปัจจุบัน โดยมีตลาดผู้นำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐประชาชนจีน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547)

ศัตรูพืชเป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกสับปะรด ทำให้ผลผลิตและคุณภาพสับปะรดเสียหายอย่างรุนแรง จนบางครั้งไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ศัตรูสำคัญที่สุดที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญต่อการปลูกสับปะรดของไทยในปัจจุบัน ได้แก่ โรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple wilt disease หรือ Mealybug wilt of pineapple)โรคนี้เกิดจากไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaVs ได้แก่ PMWaV-1 และ PMWaV-2) ซึ่งมีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ 1,200 X 12 นาโนเมตร กรดนิวคลีอิคเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA, ssRNA) และมีน้ำหนักโมเลกุล 8.35 x 10^6 ดาลตัน (dalton) จัดอยู่ในสกุล คลอสเตอโรไวรัส (*Closterovirus*) วงศ์ คลอสเตอโรวิริดี (*Closteroviridae*) กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหารของพืช (Beardsley, 1993) สามารถตรวจสอบและจำแนกชนิดของ PMWaVs โดยเทคนิค RT-PCR (Sether and Hu, 2002a, 2002b)

ลักษณะอาการของโรค ใบเริ่มแสดงอาการอ่อนนิ่ม มีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง ปลายใบแห้งตายเป็นสีน้ำตาลหรือสีแดงลามเข้าสู่โคนใบ (die back) ใบลู่ลงและแผ่แบนไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ ต่อมาต้นเหี่ยวและแห้งตายในที่สุด รากมีขนาดสั้นและแตกแขนงน้อยมาก ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ง่าย ซึ่งตรงข้ามกับต้นปกติที่มีรากจำนวนมากยึดเกาะดินแน่น ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ยาก ผลมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ (Dilokkunanant *et al*., 1996) ในธรรมชาติพืชอาศัยที่สำคัญและอ่อนแอต่อไวรัส คือ สับปะรด และโรคนี้สามารถถ่ายทอดโดยมีเพลี้ยแป้ง [pink pineapple mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ gray pineapple mealybug, *D. neobrevipes* (Beardsley)] เป็นพาหะ (German *et al*, 1992)

โรคเหี่ยวสับปะรดสามารถติดไปกับหน่อพันธุ์ ในปัจจุบันมีการนำหน่อพันธุ์จากแหล่งที่มีโรคระบาดไปปลูกหรือขยายพันธุ์ในแหล่งที่ยังไม่มีโรคนี้ระบาด ทำให้โรคเหี่ยวแพร่ระบาดจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่งได้รวดเร็วยิ่งขึ้น เนื่องจากอาจมีไวรัสแฝงอยู่ในหน่อพันธุ์แม้ว่าจะไม่แสดงอาการของโรคให้ก็ตาม (วันเพ็ญ, 2546) ถ้าสับปะรดมีราคาสูงขึ้น ยิ่งทำให้เกิดความขาดแคลนหน่อพันธุ์ที่จะนำมาปลูก ทำให้เกษตรกรซื้อหน่อพันธุ์จากแหล่งที่มีโรคระบาดมาปลูกและเก็บหน่อพันธุ์เหล่านี้ไว้ใช้ในฤดูถัดไป ปัญหาดังกล่าวนี้เคยเกิดขึ้นในฮาวาย จึงได้มีการผลิตหน่อพันธุ์ปลอดโรค

โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อนำไปปลูกขยายในแปลงและใช้ในงานทดลองด้านการถ่ายทอดโรค (Sether *et al.*, 1998) ในประเทศไทยมีนักวิจัยทำการศึกษาเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหน่อพันธุ์สับปะรด (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2546) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในกระบวนการขยายพันธุ์สับปะรดปลอดโรคเหี่ยวได้ ฉะนั้นควรมีการดำเนินการคัดเลือกและขยายหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดโรค เพื่อปลูกทดแทนหน่อที่มีเชื้อไวรัสติดไปและแพร่ระบาดอย่างรุนแรงในแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญของประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. หน่อพันธุ์สับปะรดที่ปลอดโรค
2. อุปกรณ์และสารเคมีในการเพาะเลี้ยงเยื่อพืช
3. ห้องควบคุมอุณหภูมิสำหรับการเพาะเลี้ยงเยื่อพืช
4. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิคอณูชีววิทยา
5. สารเคมีสำหรับใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืชในโรงเรือนทดลอง

วิธีการ

1. การตรวจสอบหน่อพันธุ์สับปะรดที่ได้จากแหล่งปลูกที่ไม่มีโรคเหี่ยวระบาด โดยเทคนิคอณูชีววิทยา (RT-PCR)

สำรวจพื้นที่ปลูกสับปะรด ในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตรัง จากนั้นเก็บตัวอย่างต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่แสดงอาการของโรคเหี่ยวในพื้นที่ดังกล่าว และนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR
โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติ ดังนี้

1.1 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอของไวรัสจากใบสับปะรด

โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (MasterPure™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

1.2 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

การตรวจสอบหาไวรัส PMWaVs เริ่มตรวจสอบ PMWaV-1 ที่ติดมากับหน่อพันธุ์ก่อน หลังจากนั้นนำหน่อที่ตรวจไม่พบไวรัส PMWaV-1 มาตรวจหา PMWaV-2 อีกครั้ง

สำหรับการตรวจสอบไวรัส PMWaV1,2 ในจังหวัดสงขลา พัทลุง และตรัง ใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอของบริษัท Rochs และเพิ่มปริมาณ cDNA และอ่านค่าวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Real-time PCR

2. ขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำหน่อสับปะรดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัส มาฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อพันธุ์โดยแช่

หน่อใน 70% แอลกอฮอล์ นาน 15 นาที ก่อนย้ายไปแช่ใน 0.3% ไฟซาน (physan) นาน 30 นาที จากนั้นนำหน่อมาแช่ใน 10 % คลอร็อกซ์ (clorox) ที่มี 0.01% ทวีน 20 (Tween 20) ผสมอยู่ และเขย่าด้วยเครื่องเขย่า นาน 15 นาที ฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งใน 5% คลอร็อกซ์ ที่มี 0.01% ทวีน 20 ผสมอยู่ และเขย่าด้วยเครื่องเขย่า นาน 10 นาที ล้างหน่อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆละ 5 นาที ผึ่งให้แห้งพอหมาดๆ แล้วตัดแบ่งหน่อเป็น 4 ส่วน จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2546) นอกจากนี้ยังได้ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อ โดยเปลี่ยนขั้นตอนจากสาร คอปเปอร์ออสซีคลอไรด์ และ เมอร์คิวริค คลอไรด์ เป็นสาร ไฟซาน (physan) และ แอลกอฮอล์ (ethanol) โดยเริ่มจากการแช่หน่อใน 70% แอลกอฮอล์ นาน 15 นาที ก่อนย้ายไปแช่ใน 0.3% ไฟซาน นาน 30 นาที เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่ติดอยู่ในหน่อพันธุ์ หลังจากตาเจริญเป็นหน่อใหม่ ประมาณ 6 สัปดาห์ ทำการตัดแยก (subculture) ลงเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดการแตกกอ และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน จนได้จำนวนต้นอ่อนในปริมาณมากพอ ให้ย้ายเป็นต้นเดี่ยวลงเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก (MS+IBA 0.5 ppm) และสุ่มตรวจสอบว่าต้นเหล่านี้ยังปลอดไวรัสหรือไม่ โดยใช้เทคนิคอณูชีววิทยา (RT-PCR)

3. ปลูกขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำต้นอ่อนสับปะรดปลอดโรคที่ชักนำให้เกิดรากแล้วในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาปลูกในวัสดุปลูก (ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1) จำนวน 1400 ต้น ดูแลรักษาภายใต้โรงเรือนอนุบาลของศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี และให้ปุ๋ยละลายน้ำสูตร 16-16-16 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และพ่นสารกำจัดเพลี้ยแป้งเดือนละ 1 ครั้ง พร้อมทั้งโรยยากำจัดมด เพื่อขยายเพิ่มปริมาณหน่อสับปะรดปลอดโรคต่อไป

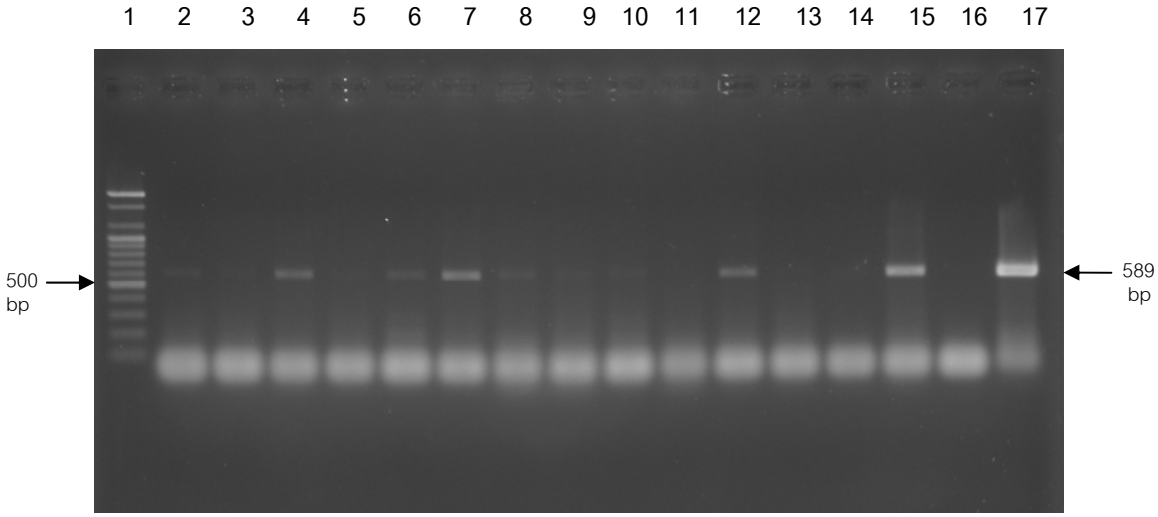
เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2550 - กันยายน 2553

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบหน่อพันธุ์สับปะรดที่ได้จากแหล่งปลูกที่ไม่มีโรคเหี่ยวระบาด โดยเทคนิคอณูชีววิทยา (RT-PCR)

จากการสำรวจพื้นที่ปลูกสับปะรด ในศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตรัง จากนั้นเก็บต้นสับปะรดที่มีลักษณะสมบูรณ์ในพื้นที่ดังกล่าว จำนวน 109 100 และ 100 ต้น ตามลำดับ จากนั้นนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลปรากฏว่า การตรวจสอบไวรัส PMWAV-1 โดยใช้ไพรเมอร์ Pa222-F1 และ Pa223-R1 จะให้แถบ band ขนาด 589 คู่เบส ในการวิเคราะห์ผลด้วย agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 1) และการตรวจหาไวรัส PMWAV-2 โดยใช้ไพรเมอร์ Pa224-F2 และ Pa225-R2 ให้แถบ band ขนาด 609 คู่เบส (ภาพที่ 2) พบว่า มีหน่อสับปะรดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัสทั้งสอง strain 23 จากหน่อที่เก็บจากศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี จากนั้นได้นำหน่อเหล่านี้มาขยายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียจากแปลงปลูกในศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และในศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตรัง แหล่งละ 100 ตัวอย่าง พบว่ามีต้นที่ปลอดไวรัสทั้งสอง strain จำนวน 46 และ 34 ต้น ตามลำดับ จากนั้นนำมาเลี้ยงให้แตกหน่อและเก็บหน่อพันธุ์เพื่อยืนยันผลวิเคราะห์อีกครั้ง ผลปรากฏว่า มีหน่อสับปะรดที่ปลอดไวรัสทั้ง 2 strain เพียง 14 หน่อ หลังจากนั้นส่งให้กลุ่มงานไวรัสวิทยานำไปขยายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป



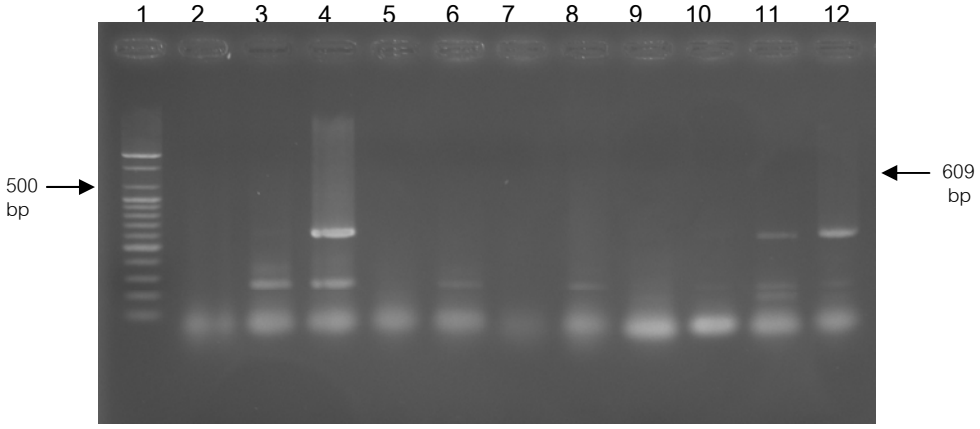
ภาพที่ 1. ผลวิเคราะห์การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV-1 ของสับปะรดโดยใช้ไพรเมอร์ Pa222-F1 และ Pa223-R1

1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp. DNA Ladder)

2-15 : ตัวอย่างสับปะรดที่เก็บจากแปลง

16 : ต้นปกติ

17 : ต้นเป็นโรคที่เกิดจาก PMWaV-1



ภาพที่ 2. ผลวิเคราะห์การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV-2 ของสับปะรดโดยใช้ ไพรเมอร์ Pa224-F1 และ Pa225-R1

1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp. DNA Ladder)

2-15 : ตัวอย่างสับปะรดที่เก็บจากแปลง

16 : ต้นปกติ

17 : ต้นเป็นโรคที่เกิดจาก PMWaV-2

2. ขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการทดลองพบว่า การฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อสับปะรดปลอดไวรัส ด้วย 0.3% ไฟซาน , 10 % และ 5% คลอร็อกซ์ และ 70% แอลกอฮอล์ สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี อาจเป็นเพราะว่า ไฟซาน สามารถใช้ในการฆ่าเชื้อรา แบคทีเรีย และสาหร่าย ซึ่งนิยมใช้กับกล้วยไม้ และเป็นสารไม่มีสีทำให้หน่อหลังฟอกดูสะอาด ไม่เหมือนกับการใช้คอปเปอร์ออสซีคลอไรด์ ซึ่งทำให้หน่อมีสีฟ้าปนเปื้อน

หลังจากเลี้ยงหน่อปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) ตาเจริญเป็นหน่ออ่อนภายใน 6 สัปดาห์ จึงทำการตัดแยก (subculture) ลงเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดการแตกกอ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อน และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน ขณะนี้ดำเนินการขยายหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดโรคในอาหารสูตรเร่งต้นอ่อน จำนวน 300 ขวด พร้อมมีการสุ่มตรวจหน่อสับปะรดในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่า ไม่มีการปนเปื้อนของไวรัสสาเหตุของโรคเหี่ยว จากนั้นได้ส่งหน่อพันธุ์ปลอดไวรัสจำนวน 150 ขวด ไปเลี้ยงในอาหารเร่งรากที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ด้วยอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 ppm ขณะนี้สามารถเพิ่มปริมาณหน่อปลอดโรคได้จำนวน 574 ขวด และต้นขนาดเล็กที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่มี BA 1 ppm จำนวน 228 ขวด เพื่อจะนำลงปลูกในดินต่อไป นอกจากนี้ได้นำหน่อปลอดโรคจากจังหวัด

สงขลาและตรังที่ผ่านการตรวจสอบเรียบร้อยแล้ว จำนวน 14 หน่อ มาฟอกฆ่าเชื้อและเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดต้นอ่อน พบว่า เริ่มมีหน่ออ่อนสีเขียวเจริญจากตา และมีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียประมาณ 10-15% ขณะนี้ได้ต้นอ่อนและกำลังเพิ่มปริมาณจำนวนต้นอ่อนในอาหารสูตรเร่งต้น

3. ปลูกขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ได้นำต้นอ่อนของสับปะรดปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 1400 ต้น ออกปลูกในวัสดุปลูก (ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1) ดูแลรักษาภายใต้โรงเรือนอนุบาล และให้ปุ๋ยละลายน้ำสูตร 16-16-16 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และพ่นสารกำจัดเพลี้ยแป้งเดือนละ 1 ครั้ง พร้อมทั้งโรยยากำจัดมด พบว่าทุกต้นมีการเจริญเติบโตได้ดี และจะได้มีการสุ่มตรวจไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวในต้นสับปะรดเหล่านี้ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บต้นสับปะรดที่มีลักษณะสมบูรณ์ในพื้นที่ปลูกสับปะรดจากศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตรัง จำนวน 109 100 และ 100 ต้น ตามลำดับ รวมเป็น 309 หน่อ หลังจากนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลปรากฏว่า มีหน่อสับปะรดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัสจำนวน 37 หน่อ จึงนำมาขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อสับปะรดปลอดไวรัส ด้วย 0.3% ไฟซาน , 10 % และ 5% คลอร็อกซ์ และ 70% แอลกอฮอล์ สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี หลังจากเลี้ยงหน่อปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) ตาเจริญเป็นหน่ออ่อนภายใน 6 สัปดาห์ จึงทำการตัดแยก (subculture) ลงเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดการแตกกอ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อน และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน ขณะนี้ขยายปริมาณต้นอ่อนสับปะรดให้ได้ปริมาณ 300 ขวด และส่งให้ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี 150 ขวด เพื่อดำเนินการขยายต้นอ่อนและเร่งรากในอาหารสูตร MS+IBA 0.5 ppm ให้ได้เป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ และได้ทำการย้ายปลูกในวัสดุปลูก (ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1) จำนวน 1,400 ต้น ดูแลรักษาภายใต้โรงเรือนอนุบาล และให้ปุ๋ยละลายน้ำสูตร 16-16-16 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และพ่นสารกำจัดเพลี้ยแป้งเดือนละ 1 ครั้ง พร้อมทั้งโรยยากำจัดมด พบว่าทุกต้นมีการเจริญเติบโตได้ดี และจะได้มีการสุ่มตรวจไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวในต้นสับปะรดเหล่านี้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

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

สถาบันวิจัยพืชสวน. 2546. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน เอกสารวิชาการ กรมวิชาการเกษตร. 156 หน้า.

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., D.E. Ullman and J.S. Hu. 1998. Transmission of pineapple mealybug wilt-associated virus by two species of mealybug (*Dysmicoccus* spp.). Phytopathology 88: 1224-1230.

Sether, D.M. and J.S. Hu. 2002a. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. Phytopathology 92: 928-935.

Sether, D.M. and J.S Hu. 2002b. Yield impact and spread of pineapple mealybug wilt assoiated virus-2 and mealybug wilt of pineapple in Hawii. *Plant Dis*. 86: 867-874.