

ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* กับ
ชนิดของเพลี้ยแป้งในการก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในสับปะรด

Relationships between strains of *Pineapple mealybug wilt-associated virus*
and mealybug species in causing pineapple wilt disease

วันเพ็ญ ศรีทองชัย ปรีเชษฐ ตั้งกาญจนภาสน์ กาญจนา วาระวิชนี

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจและเก็บเพลี้ยแป้งสีชมพูจากแปลงที่ จ. เพชรบุรี มาเลี้ยงให้ปลอดไวรัสในกรงกันแมลง จากนั้นนำหน่อสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ผ่านการตรวจสอบว่าปลอดไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 โดยเทคนิค RT-PCR มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน จากนั้นจึงย้ายเป็นต้นเดี่ยวลงเลี้ยงบนอาหาร สูตรชักนำให้เกิดราก (MS+IBA 0.5 ppm) และย้ายปลูกลงดิน จนมีอายุประมาณ 5 เดือน จึงนำมา ถ่ายทอดโรคโดยใช้เพลี้ยแป้ง 10 ตัว/ต้น มีระยะเวลาในการรับเชื้อและถ่ายทอดเชื้อ 3 และ 5 วัน ตามลำดับ เก็บใบสับปะรดมาตรวจหาไวรัสทุก 30 วันโดยเทคนิค RT-PCR โพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-1 ได้แก่ Pa222-F1 (5'-ACA GGA AGG ACA ACA CTC AC-3') และ Pa223-R (5'-CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC-3') จะให้แถบ band ของดีเอ็นเอ ขนาด 589 คู่เบส สำหรับโพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-2 คือ Pa224-F2 (5'-CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG-3') และ Pa225-R2 (5'-CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC-3') ให้แถบ band ของดีเอ็นเอ ขนาด 609 คู่เบส พบว่า ต้นสับปะรดที่รับเชื้อไวรัส strain เดี่ยว (PMWaV-2) และ strain ผสม (PMWaV-1 + PMWaV-2) เริ่มตรวจพบ แถบ band ของดีเอ็นเอของ PMWaV-2 ขนาด 609 คู่เบส หลังการถ่ายทอดโรคแล้ว 8-10 สัปดาห์ แต่ต้นสับปะรดเริ่มแสดงอาการใบอ่อนนิ่ม สีเหลืองซีด และ ลู่ลง หลังจากถ่ายทอดเชื้อแล้ว 4 เดือน สำหรับ PMWaV-1 เริ่มตรวจพบแถบ band ของดีเอ็นเอ หลังการถ่ายทอดโรคแล้ว 4 เดือน และแสดงอาการเหี่ยวไม่รุนแรงเท่ากับต้นที่มีไวรัส PMWaV-1 + PMWaV-2

รหัสการทดลอง 01-18-54-02-00-01-54

คำนำ

สับปะรด [*Ananas comosus* (L.) Merr.] อยู่ในวงศ์ Bromeliaceae มีถิ่นกำเนิดในประเทศบราซิลและปารากวัย เริ่มมีการนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยโดยชาวโปรตุเกสตั้งแต่ปี พ.ศ. 2223 และปลูกกระจายไปทั่วทุกภาคของประเทศ ตามความเหมาะสมของพื้นที่และชนิดพันธุ์ สับปะรดจัดเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย สามารถปลูกและเก็บผลผลิตได้ตลอดปี เพื่อใช้บริโภคสดภายในประเทศและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น สับปะรดกระป๋อง น้ำสับปะรด สับปะรดกวน สับปะรดแช่แข็งและสับปะรดอบแห้ง มีมูลค่าส่งออกประมาณปีละ 13,000-15,000 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2545) โดยประเทศไทยครองความเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกสับปะรดเป็นอันดับหนึ่งของโลก เป็นเวลานานกว่า 10 ปีจนถึงปัจจุบัน โดยมีตลาดผู้นำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐประชาชนจีน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547)

ศัตรูพืชเป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกสับปะรด ทำให้ผลผลิตและคุณภาพสับปะรดเสียหายอย่างรุนแรง จนบางครั้งไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ศัตรูสำคัญที่สุดที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญต่อการปลูกสับปะรดของไทยในปัจจุบัน คือ “โรคเหี่ยว” ซึ่งพบระบาดเป็นครั้งแรกในรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อต้นปี พ.ศ. 2443 และปัจจุบันโรคนี้อัปเดตระบาดทั่วไปในประเทศที่มีการปลูกสับปะรดเป็นการค้า เช่น ออสเตรเลีย ไทย และคิวบา เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่าพบการระบาดของโรคเหี่ยวในแหล่งปลูกสับปะรดของจังหวัดชลบุรีตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตอย่างสูง (Dilokkunanant *et al.*, 1996) ด้วยเหตุที่เกษตรกรมีการนำหน่อพันธุ์จากแหล่งที่มีโรคระบาด ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส PiWV (Pineapple wilt virus) ไปปลูก จึงทำให้โรคเหี่ยวแพร่ระบาดมายังภาคตะวันตก ในปี พ.ศ. 2546 โรคนี้อัปเดตรุนแรงในแปลงปลูกสับปะรดของภาคตะวันตกบริเวณจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และเพชรบุรี ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสำคัญของประเทศ โดยมีพื้นที่ปลูกสับปะรดเป็นอันดับ 1 และ 3 ของประเทศ คือ 492,058 และ 56,192 ไร่ ตามลำดับ จากพื้นที่ปลูกทั้งประเทศ 962,693 ไร่ โดยพบการแพร่ระบาดของโรคสูงถึง 90% ของพื้นที่ในเขต ตำบลหนองพลับ อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พันธุ์ที่พบว่ามีอาการระบาดของโรคเหี่ยว คือ พันธุ์ปัตตาเวียหรือรู้จักแพร่หลายในนามสับปะรดศรีราชา เป็นพันธุ์ที่ปลูกมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 70 ของผลผลิตรวมของสับปะรด จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ Smooth Cayenne เป็นพันธุ์ที่นอกจากนิยมปลูกเพื่ออุตสาหกรรมแปรรูปแล้ว ยังเป็นพันธุ์หลักเพียงพันธุ์เดียวมาโดยตลอด นอกจากนี้ยังเป็นพันธุ์ที่นิยมใช้บริโภคผลสดอีกด้วย (วันเพ็ญ, 2546)

โรคเหี่ยว เกิดจากไวรัส Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaVs ได้แก่ PMWaV-1 และ PMWaV-2) ซึ่งมีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ 1,200 X 12 นาโนเมตร จัดอยู่ในสกุล คลอสเตอร์ไวรัส (*Closterovirus*) กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหารของพืช (Van Regenmortel, 2000; Sether *et al.*, 2001) โดยมีเพลี้ยแป้ง [pink pineapple mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ gray pineapple mealybug,

D. neobrevipes (Beardsley)] เป็นพาหะ โดยทั่วไปพบ *D. brevipipes* ในแทบทุกแห่งที่มีการปลูก สับปะรด รวมทั้งประเทศไทย และมีมด ได้แก่ มดคันไฟ (*Solenopsis* sp.) และมดหัวโต (*Pheidole* sp.) เป็นตัวพาเพลี้ยแป้งให้กระจายจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง (ชำนาญ พิทักษ์ และคณะ, 2540; Beardsley, 1993) ทั้งยังมีวัชพืชชนิดต่างๆเป็นแหล่งหลบซ่อนของมดและเพลี้ยแป้ง ลักษณะอาการ ของโรคที่เด่นชัด คือใบเริ่มแสดงอาการอ่อนนุ่ม มีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง ปลายใบแห้งตายเป็นสี น้ำตาลหรือสีแดงลามเข้าสู่โคนใบ (die back) ใบลู่ลงและแผ่แบนไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ ต่อมาต้น เที่ยวและแห้งตายในที่สุด รากมีขนาดสั้นและแตกแขนงน้อยมาก ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ง่าย ซึ่งตรง ข้ามกับต้นปกติที่มีรากจำนวนมากยึดเกาะดินแน่น ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ยาก ผลมีขนาดเล็กมากจนไม่ สามารถเก็บเกี่ยวได้ และโรคนี้นี้ไม่สามารถถ่ายทอดโดยวิธีกล (mechanical inoculation) (German *et al.*, 1992; สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2546)

ปัจจัยสำคัญในการแพร่ระบาดของโรคเหี่ยวในแปลงปลูกคือ เพลี้ยแป้ง ซึ่งในประเทศไทย พบว่า มีเพลี้ยแป้งสีชมพูในแปลงปลูกสับปะรด ฉะนั้นจึงเห็นควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดโรค เหี่ยวโดยเพลี้ยแป้ง เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดโรคนี้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ต้นสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยว
2. หน่อพันธุ์สับปะรดที่ปลอดโรค
3. เพลี้ยแป้งสีชมพู
4. โรงเรือนทดลอง และกรงกันแมลง
5. ดินและกระถางสำหรับปลูกสับปะรด
6. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิคอณูชีววิทยา

วิธีการ

1. เพลี้ยแป้งที่ใช้เป็นพาหะในการทดสอบ

สำรวจและเก็บเพลี้ยแป้งทั้งสีชมพูจากแปลงปลูกสับปะรดใน จ. เพชรบุรี มาเลี้ยงให้ ปลอดจากไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดบนผลฟักทองในกล่องกันแมลง โดยย้ายเพลี้ยแป้งไปบน ฟักทองผลใหม่ทุกเดือน อย่างน้อย 3 รุ่น (generation) เพื่อให้เพลี้ยแป้งปลอดไวรัส ก่อนจะนำไปใช้ เป็นพาหะในการถ่ายทอดโรค

2. การเตรียมแหล่งของไวรัส

นำต้นสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวจากแปลงปลูกมาตรวจสอบว่าเป็นไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* (PMWaV-1) หรือ 2 (PMWaV-2) โดยเทคนิคอณูชีววิทยา และ เก็บไว้ในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นแหล่งของไวรัส

2.1 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอของของไวรัสจากใบสับปะรด

โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (MasterPure™ RNA Purification Kit ของบริษัท EPICENTRE)

1. เก็บตัวอย่างพืช 1 – 5 มิลลิกรัม ใช้ทำได้ทันที หรือจะแช่เก็บที่ -70°C
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. นำไปปั่นที่ 65°C 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°C แล้วพลิกหลอดขึ้นลง 30-40 ครั้ง
10. นำสารละลายข้อ 9 มาปั่น 10,000 รอบ/นาที ที่ 4°C นาน 10 นาที
11. ล้างตะกอนด้วย 75 % ethanol 500 ไมโครลิตร แล้ว quick spin (ล้าง 2 ครั้ง)
12. dry ตะกอนใน 37°C นานประมาณ 2 ชั่วโมง
13. ละลายตะกอนของ RNA ที่ได้ใน TE buffer 15-20 ไมโครลิตร

2.2 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

20 μ l. Reaction (ใช้ชุดของ Bioneer)

dH ₂ O	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

20 μ l. Reaction

GoTaq [®] Green Master Mix (Promega)	10.0 ไมโครลิตร
Primer R (100 พิโคโมล)	0.5 ไมโครลิตร
Primer F (100 พิโคโมล)	0.5 ไมโครลิตร
dH ₂ O	6.0 ไมโครลิตร
Template (ที่ได้จาก RT-PCR)	3.0 ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ cDNA ตาม program ดังนี้

94 °ซ	5 นาที	} 35 รอบ
94 °ซ	1.30 นาที	
55 °ซ	1.30 นาที	
72 °ซ	1.30 นาที	
72 °ซ	10 นาที	

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 2 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

3. การเตรียมหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดไวรัส

นำต้นอ่อนสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ปลอดโรค มานำมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2546) กอและย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน จากนั้นจึงย้ายเป็นต้นเดี่ยวลงเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก (MS+IBA 0.5 ppm) เมื่อนำมาเก็บรักษาในโรงเรือนกันแมลง และใส่ปุ๋ยบำรุงต้นให้มีอายุประมาณ 4-5 เดือน ก่อนจะนำไปใช้เป็นพืชทดลองในการทดสอบการถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยเปลี้ยแป้ง

4. การถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยเปลี้ยแป้งสีชมพู

นำตัวอ่อนเปลี้ยแป้งสีชมพู (instar ที่ 2-3) ที่ปราศจากไวรัส มาปล่อยบนใบสับปะรดจากต้นที่เป็นโรคซึ่งตรวจสอบแล้วว่าไม่มีไวรัสเหี่ยว (PMWaV-1 หรือ PMWaV-2) และ ต้นที่มีไวรัสทั้ง 2 strain (PMWaV-1+ PMWaV-2) โดยเก็บในกล่องขึ้นเพื่อรับเชื้อไวรัส PMWaV-1, PMWaV-2 และ PMWaV-1+ PMWaV-2 เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงนำไปปล่อยบนหน่อสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียปกติ นาน 5 วัน โดยใช้เปลี้ยแป้ง 10 ตัว/ต้น (Dilokkunanant *et al.*, 1996) จำนวน 5 ต้น/ชนิดของไวรัส จากนั้นเก็บต้นสับปะรดไว้ในโรงเรือนกันแมลง เพื่อสังเกตอาการของโรค ใส่ปุ๋ยและฉีดยาป้องกันกำจัดเปลี้ยแป้งบนต้นสับปะรด ทุก 2 สัปดาห์ ตรวจสอบหาไวรัสในหน่อสับปะรดปกติหลังจากได้รับเชื้อไวรัสจากเปลี้ยแป้ง ทุก 30 วันหลังการถ่ายทอดโรคแล้ว โดยใช้เทคนิคอณูชีววิทยา (RT-PCR)

เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2553 – กันยายน 2555

สถานที่ - กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เปลี้ยแป้งที่ใช้เป็นพาหะในการทดสอบ

เปลี้ยแป้งทั้งสีชมพูจากแปลงปลูกสับปะรด สามารถขยายพันธุ์ได้ดีบนผลฟักทอง และถ้าให้เปลี้ยแป้งอยู่ในที่มืด โดยนำกล่องกระดาษมาครอบกล่องเลี้ยงอีกชั้นหนึ่ง เปลี้ยแป้งจะขยายพันธุ์ได้ดีกว่าการเลี้ยงในที่สว่าง ทั้งนี้เพราะในธรรมชาติเปลี้ยแป้งสีชมพูมักอาศัยอยู่ตามซอกกาบใบโคนต้นหรือบริเวณรากสับปะรด

2. การเตรียมแหล่งของไวรัส

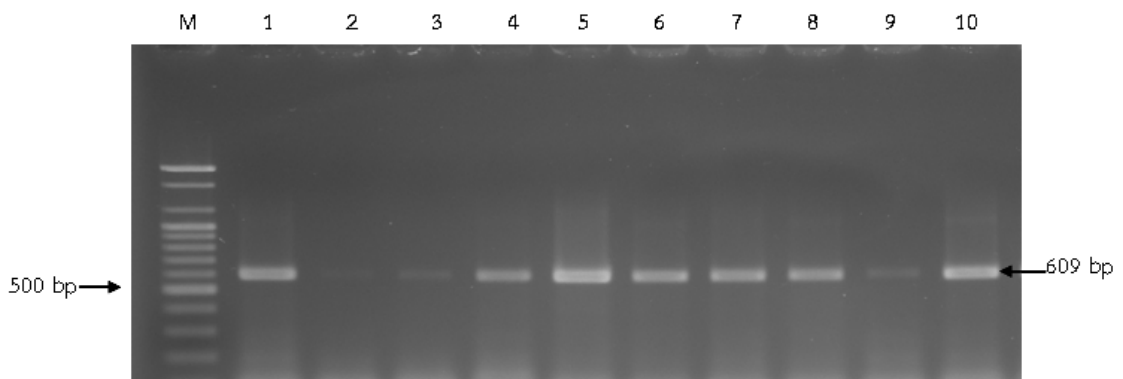
นำหน่อสับปะรดที่แสดงอาการเหี่ยว จากแหล่งปลูก มาตรวจสอบว่าเกิดจากไวรัสเดียว ได้แก่ PMWaV-1 หรือ PMWaV-2 และต้นที่มีไวรัสทั้ง 2 strain อยู่ร่วมกัน โดยเทคนิค RT-PCR จากนั้นนำมาปลูกในกระถาง อย่างละ 3 กระถาง และเก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง เพื่อใช้เป็นแหล่งของไวรัสในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมหน่อพันธุ์สับประรดปลอดไวรัส

หน่อสับประรดปลอดโรคที่ได้จากต้นอ่อนในเขตเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 20 หน่อ ได้นำมาปลูกในกระถาง ดูแลใส่ปุ๋ย พ่นยากำจัดแมลงและเก็บไว้ในกรงกันแมลง พบว่า หน่อสับประรดมีการเจริญเติบโตดี ฉะนั้นเมื่อต้นสับประรดอายุ ประมาณ 5 เดือน จึงเหมาะที่จะนำไปทดสอบการถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยเพลี้ยแป้งสีชมพู

4. การถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยเพลี้ยแป้งสีชมพู

หลังจากถ่ายทอดโรคเหี่ยวที่เกิดจากไวรัส PMWaV-1, PMWaV-2 และ PMWaV-1 + PMWaV-2 โดยใช้เพลี้ยแป้ง 10 ตัว/ต้น มีระยะเวลาในการรับเชื้อและถ่ายทอดเชื้อ 3 และ 5 วัน ตามลำดับ เก็บใบสับประรดมาตรวจหาไวรัสโดยเทคนิค RT-PCR พบว่า ต้นสับประรดที่รับเชื้อไวรัส strain เดี่ยว (PMWaV-2) และ strain ผสม (PMWaV-1 + PMWaV-2) เริ่มตรวจพบ แถบ band ของดีเอ็นเอของ PMWaV-2 ขนาด 609 คู่เบส หลังการถ่ายทอดโรคแล้ว 8-10 สัปดาห์ แต่ต้นสับประรดเริ่มแสดงอาการใบอ่อนนิ่ม สีเหลืองซีด และ กิ่งงอ หลังจากถ่ายทอดเชื้อแล้ว 4 เดือน ต้นที่ได้รับไวรัสทั้งสอง strain แสดงอาการแคะแกระเกินกว่าต้นที่ได้รับไวรัส PMWaV-2 สำหรับ PMWaV-1 เริ่มตรวจพบแถบ band ของดีเอ็นเอ ขนาด 589 คู่เบส หลังการถ่ายทอดโรคแล้ว 4 เดือน และแสดงอาการเหี่ยวไม่รุนแรงเท่ากับต้นที่มีไวรัส PMWaV-1 + PMWaV-2 แสดงว่า ถ้าไวรัสเข้าทำลายต้นสับประรดทั้งสอง strain มีผลทำให้พืชแสดงอาการเหี่ยวรุนแรงกว่าการเข้าทำลายโดยไวรัส strain เดี่ยว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sether และคณะ (2001)



ภาพที่ 1. ผลวิเคราะห์การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV-2 ของสับประรดโดยใช้ไพรเมอร์ Pa224-F1 และ Pa225-R1

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp. DNA Ladder)

1 : ต้นเป็นโรคที่เกิดจาก PMWaV-2

2 : ต้นปกติ

3-6 : ต้นสับประรดที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อ PMWaV-2

7-10 : ต้นสับประรดที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อ PMWaV-1 + PMWaV-2

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สำรวจและเก็บเพลี้ยแป้งสีชมพูจากแปลงที่ จ. เพชรบุรี มาเลี้ยงให้ปลอดไวรัสในกรงกันแมลง จากนั้นนำหน่อสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมาตรวจสอบว่าปลอดไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 โดยเทคนิค RT-PCR ไพรมเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-1 ได้แก่ Pa222-F1 (5'-ACA GGA AGG ACA ACA CTC AC-3') และ Pa223-R (5'-CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC-3') จะให้แถบ band ของดีเอ็นเอ ขนาด 589 คู่เบส สำหรับไพรมเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-2 คือ Pa224-F2 (5'-CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG-3') และ Pa225-R2 (5'-CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC-3') ให้แถบ band ของดีเอ็นเอ ขนาด 609 คู่เบส มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน จากนั้นจึงย้ายเป็นต้นเดี่ยวลงเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก (MS+IBA 0.5 ppm) และย้ายปลูกลงดิน จนมีอายุประมาณ 4-5 เดือน จึงนำมาถ่ายทอดโรคโดยใช้เพลี้ยแป้ง 10 ตัว/ต้น มีระยะเวลาในการรับเชื้อและถ่ายทอดเชื้อ 3 และ 5 วัน ตามลำดับ เก็บใบสับปะรดมาตรวจหาไวรัสโดยเทคนิค RT-PCR พบว่า ต้นสับปะรดที่รับเชื้อไวรัส strain เดี่ยว (PMWaV-2) และ strain ผสม (PMWaV-1 + PMWaV-2) เริ่มตรวจพบ แถบ band ของดีเอ็นเอของ PMWaV-2 ขนาด 609 คู่เบส หลังการถ่ายทอดโรคแล้ว 2 เดือน แต่ต้นสับปะรดเริ่มแสดงอาการใบอ่อนนิ่ม สีเหลืองซีด และ ลู่ลง หลังจากถ่ายทอดเชื้อแล้ว 4 เดือน สำหรับ PMWaV-1 เริ่มตรวจพบแถบ band ของดีเอ็นเอ หลังการถ่ายทอดโรคแล้ว 4 เดือน และแสดงอาการเหี่ยวไม่รุนแรงเท่ากับต้นที่มีไวรัส PMWaV-1 + PMWaV-2

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ยุทธศาสตร์สับปะรด Pineapple National Strategy 2547-2551. 51 หน้า.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2546. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/2545. เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ 3/2545 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 51 หน้า.
- สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 2546. ศัตรูสับปะรด เอกสารวิชาการ กรมวิชาการเกษตร. 44 หน้า.
- ชำนาญ พิทักษ์ อนุวัฒน์ จันทรสวรรณ และอรนุช กองกาญจนะ. 2540. การป้องกันกำจัดมดในไร่สับปะรด. รายงานผลงานวิจัย กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่นๆ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. โรเนียว 21 หน้า.
- วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุลชัย และ จารุวรรณ คุณาบุตร. 2546. เทคโนโลยีการผลิตและการแปรรูปสับปะรด. เทคโนโลยีการผลิตสับปะรดรับรองคุณภาพ. หน้า 1-22.
- 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 Research* vol. 9. pp. 241-258 ed. by K.F. Harris. Springer-Verlag New York.
- Sether, D.M., A.V. Karasev, C. Okumura, C. Arakawa, F. Zee, M.M. Kislán, J.L. Busto and J.S. Hu. 2001. Differentiation, distribution, and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. *Plant Disease* 85: 856-864.
- 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 associated virus-2 and mealybug wilt of pineapple in Hawaii. *Plant Dis.* 86: 867-874.
- Van Regenmortel, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. Mc Geoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner. 2000. *Virus Taxonomy seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press, San Diego. 1162 p