การระบาดและวินิจฉัยโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอในประเทศไทย
Distribution and Diagnosis of Papaya Ringspot Disease in Thailand

บุญชาติ คติวัฒน์[1], ศรีเมฆ ชาวโพงพาง[1] และอำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์[1*]
Boonchart Kativat[1], Srimek Chowpongpang[1] and Ampaiwan Paradornuwat[1*]

Abstract

Papaya ringspot disease was found in several growing areas in Thailand. The disease occurs randomly and distribute from infected plants. The papayas nearby the symptomatic plant were infected and showed symptom rapidly. Typical symptoms on all papaya varieties were yellow leaf, leaf curl, and ringspot on fruits and petioles. However, The “Plak Mai Lai” (or so-called “Holland”) variety and hybrid of Plak Mai Lai× Kagdam were infected lately but the percentage of disease incidence were lower. Insect surveys were investigated in papaya planting areas both in the open field and the screenhouse. Few numbers of aphids (*Myzus persicae*) were recorded. Virus detection by PCR-based technique was carried. Using designed primer pair of PRSV-CP-F (5' AAT GAA GCT GTG GAT GCT GG 3') and PRSV-CP-R (5' CTA AGA GGC TCA AAT AAC ACG TGG G 3') which was specific to coat protein gene (CP gene) of *Papaya ringspot virus* (PRSV) was analyzed. A single DNA band of CP gene1,058 bp, was found from Papaya ringspot disease samples, but not from collected aphid and other insects.

Keywords: Papaya ringspot virus, disease distribution and diagnosis, PCR-based technique

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพ 10900
[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, 10900
รับเรื่อง : เมษายน 2559
รับตีพิมพ์ : พฤษภาคม 2559
* Corresponding author: agrapp@ku.ac.th

บทคัดย่อ

พบการระบาดของโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอในหลายพื้นที่ปลูกของประเทศไทย มีลักษณะการกระจายตัวของโรคแบบสุ่มกระจายและกระจายออกโดยรอบต้นเป็นโรค ต้นที่อยู่ใกล้กับต้นที่แสดงอาการของโรคจะแสดงอาการของโรคได้รวดเร็วกว่าต้นอื่นๆ ลักษณะอาการสำคัญของโรคที่ปรากฏบนมะละกอพันธุ์ต่างๆ จะคล้ายคลึงกัน คือ อาการยอดหงิกเหลือง อาการด่างเหลือง อาการด่างจุดวงแหวนบนผลและก้านใบ มะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายและพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ปลักไม้ลายและพันธุ์แขกดำ ถูกโรคระบาดเข้าทำลายได้ช้ากว่าและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยกว่ามะละกอสายพันธุ์อื่นๆที่ปลูกในแปลงปลูกเดียวกัน เมื่อสุ่มตรวจแมลงในแปลงปลูกมะละกอที่ปลูกกลางแจ้งและปลูกภายในโรงเรือน พบประชากรของเพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae*) ในปริมาณที่น้อยมาก สำหรับการตรวจสอบไวรัสเพื่อการวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิคด้านชีวโมเลกุล โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ PRSV-CP-F (5' AAT GAA GCT GTG GAT GCT GG 3') และ PRSV-CP-R (5' CTA AGA GGC TCA AAT AAC ACG TGG G 3') ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene) ของเชื้อไวรัส PRSV-Pสามารถตรวจพบดีเอ็นเอขนาด 1,058 bp ของ CP gene จากตัวอย่างมะละกอที่แสดงอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวน และตรวจไม่พบในเพลี้ยอ่อนและแมลงอื่นๆ ทุกชนิด

คำสำคัญ: โรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ การแพร่ระบาดของโรคและการวินิจฉัย เทคนิคพีซีอาร์

คำนำ

มะละกอ จัดเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีพื้นที่ปลูกทั่วประเทศระหว่างปี 2545 - 2549 เฉลี่ย 152,313 ไร่ ให้ผลผลิตเฉลี่ยต่อปี 358,592 ตัน หรือปริมาณ 2,584 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ในขณะที่ความต้องการของตลาดอยู่ในระดับสูง แต่พื้นที่การผลิตมะละกอกลับมีแนวโน้มลดลง ทำให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ทั้งนี้สาเหตุสำคัญของการผลิตมะละกอ คือปัญหาการเข้าทำลาย และการแพร่ระบาดของโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) ซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่ม Potyvirus มีรูปร่างเป็นท่อนยาวคด (Flexuous rod) ยาว 780 – 800 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมเป็นแบบ Single-Stranded RNA (Lee, 2001) สามารถถ่ายทอดได้โดยเพลี้ยอ่อนหลายชนิดเช่น *Myzus persical*, *Aphis nerii*, *Aphis gossypii* และ *Aphis spiraecola* (Jensen, 1949) โดยมีลักษณะการถ่ายทอดแบบ non-persistent มีพืชอาศัยอยู่ในวงศ์ Caricaceae, Chenopodiaceae และ Cucurbitaceae (Purcifull, 1972) และยังสามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีการติดตา/ต่อกิ่ง โรคสามารถเข้าทำลายมะละกอได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะให้ผลผลิต ปัจจุบันพบว่ามีการแพร่ระบาดอย่างรุนแรงทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งถือว่าเป็นโรคที่มีความสำคัญที่มีผลทำให้เกิดความเสียหายอย่างมากกับมะละกอ (Singh *et al.*, 2010) ทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ดังนั้นการศึกษาด้านการระบาดและการวินิจฉัยโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอที่เกิดจากไวรัส *Papaya ringspot virus* (PRSV) เพื่อให้ได้มาซึ่ง

ข้อมูลสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการระบาดตลอดจนการวินิจฉัยโรคนี้ จึงเป็นแนวทางสำคัญอีกประเด็นหนึ่งเพื่อนำไปสู่การวางแผนและแนวทางการผลิตมะละกอที่ถูกต้อง เพื่อป้องกันและแก้ปัญหาของโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ลักษณะอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอในสภาพแปลงปลูก

คัดเลือกพื้นที่ปลูกมะละกอที่มีอายุต้นหลังย้ายปลูกลงแปลงไม่เกิน 1 เดือน ในจังหวัดปทุมธานี และจังหวัดเพชรบุรี วางแผนและดำเนินงานทดลองระหว่างเดือนมิถุนายน 2554 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2555 ทำแผนผังของแปลงปลูกและติดป้ายระบุตำแหน่งมะละกอทุกต้น เข้าสำรวจลักษณะอาการของโรคและบันทึกข้อมูลทุกๆ 30 วันมีรายละเอียดพื้นที่ปลูกดังนี้

1. แปลงปลูกของเกษตรกรอำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี พันธุ์ที่ปลูกคือมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลาย(พันธุ์ฮอลล์แลนด์)และมะละกอพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ปลักไม้ลายและพันธุ์แขกดำ ปลูกแบบยกร่องสูง 50 เซนติเมตร แบ่งพื้นที่ทดลองเป็น 3 แปลง **แปลงปลูกที่ 1** มะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายปลูกในโรงเรือนมุ้งกันแมลงขนาด 32 ช่องต่อตารางนิ้ว (mesh) (โรงเรือนขนาด กว้าง ยาว สูง 30 × 70 × 4 เมตร) ระยะปลูก 2.5 × 3.0 เมตร จำนวน 100 ต้น **แปลงปลูกที่ 2** มะละกอพันธุ์ปลักไม้ลาย ปลูกปกติกลางแจ้ง(ไม่มีมุ้งกันแมลง) ระยะปลูก 2 × 4 เมตร จำนวน 70 ต้น **แปลงปลูกที่ 3** มะละกอพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ปลักไม้ลายและพันธุ์แขกดำ ปลูกปกติกลางแจ้ง ระยะปลูก 2 × 4 เมตร จำนวน 260 ต้นสำรวจและศึกษาบันทึกข้อมูลรายละเอียดของการพบโรคระหว่างเดือนมิถุนายน 2554 ถึง เดือนตุลาคม 2554

2. แปลงปลูกของเกษตรกรอำเภอแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี พันธุ์ที่ปลูกคือมะละกอพันธุ์แขกนวล ปลูกปกติกลางแจ้ง (ไม่มีมุ้งกันแมลง) ระยะปลูก 2 × 2.5 เมตร พื้นที่ปลูกเป็นบนเนินเขาปลูกแบบไม่ยกร่องจำนวน 200 ต้น สำรวจและศึกษาบันทึกข้อมูลรายละเอียดของการพบโรคระหว่างเดือนเมษายน 2555 ถึง เดือนพฤศจิกายน 2555

3. เลือกแปลงปลูกมะละกอเพื่อการค้าในพื้นที่ต่างๆ 6 จังหวัด คือ 1) อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี 2) อำเภอเขาย้อยและอำเภอแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี 3) อำเภอวัดสิงห์ จังหวัดชัยนาท 4) อำเภอบ้านค่าย จังหวัดระยอง 5) อำเภอเมือง จังหวัดอุทัยธานี 6) อำเภอแม่อายและอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ กำหนดศึกษากับมะละกอ 2 พันธุ์ คือ มะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายและมะละกอพันธุ์แขกนวล ดำเนินการศึกษาวิจัยระหว่างเดือนมกราคม 2556 ถึง เดือนมกราคม 2557 สำรวจศึกษาการระบาดของโรคโดยตรวจดูต้นมะละกอทุกต้นในแต่ละพื้นที่แปลงปลูก บันทึกข้อมูลต้นที่เป็นโรคที่แสดงอาการของโรคเก็บตัวอย่างส่วนที่แสดงอาการของโรคและตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ความสัมพันธ์ของปัจจัยสภาพแวดล้อมที่ส่งเสริมการเกิดโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอในสภาพแปลงปลูก

สำรวจลักษณะอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวนที่เกิดจากไวรัส PRSV บนยอดอ่อน ใบ ก้าน

ใบ ผล และลำต้น ของมะละกอทุกต้นในแต่ละแปลงปลูก บันทึกข้อมูลและอาการของโรค และเก็บตัวอย่างมะละกอที่แสดงอาการทั้งหมดที่พบ ตรวจยืนยันการพบเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR-basedtechnique)บันทึกข้อมูลสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณน้ำฝน และแสง (โดยใช้ข้อมูลจากกรมอุตุนิยมวิทยา) เพื่อนำมาหาความสัมพันธ์ต่ออัตราการเกิดโรด ดำเนินการทดลองวิจัยระหว่างเดือนมิถุนายน 2554 ถึง เดือนตุลาคม 2554 และระหว่างเดือนเมษายน 2555 ถึง เดือนพฤศจิกายน 2555

การสำรวจจำนวนประชากรเพลี้ยอ่อน/แมลงพาหะถ่ายทอดโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

เก็บตัวอย่างแมลงทุกชนิดที่พบในแปลงปลูกมะละกอจังหวัดปทุมธานีระหว่างเดือนมิถุนายน 2554 ถึง เดือนตุลาคม 2554 แปลงปลูกมะละกอในจังหวัดเพชรบุรีระหว่างเดือนเมษายน 2555 ถึง เดือนพฤศจิกายน 2555 และแปลงปลูกมะละกอในจังหวัดเพชรบูรณ์ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2557 ถึง เดือนธันวาคม 2558 ดักจับแมลงโดยใช้แผ่นแถบกาวเหลือง ขนาด 20 × 20 เซนติเมตร และสวิงโฉบจับแมลงทำด้วยตาข่ายไนล่อนสีขาวที่มีขนาด 32 ช่องต่อตารางนิ้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางสวิง 30 เซนติเมตร สุ่มโฉบจับแมลง 3 ช่วงเวลา คือ 6.00 น. 8.00 น. และ 10.00 น. ศึกษาจำแนกชนิดและจำนวนของแมลง ภายใต้กล้อง compound microscope และนำตัวอย่างไปตรวจหาเชื้อไวรัส PRSV ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุลเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

ออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (Coat protein gene, CP gene) ของเชื้อไวรัส PRSV-P จากลำดับนิวคลีโอไทป์ซึ่งรายงานจากประเทศต่างๆ คือ สหรัฐอเมริกา ไต้หวัน และเม็กซิโก ในฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อการตรวจสอบตัวอย่างของมะละกอที่แสดงอาการของโรคและแมลง/แมงในแต่ละพื้นที่แปลงปลูก ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% TBE agarose gel

ผลและวิจารณ์

ลักษณะอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอในสภาพแปลงปลูก

อาการของโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร บนมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลาย พันธุ์แขกนวล และมะละกอพันธุ์ลูกผสมระหว่างปลักไม้ลายและพันธุ์แขกดำ ทั้งลักษณะการปลูกในมุ้งกันแมลงและแปลงปลูกปกติกลางแจ้ง พบว่ามีลักษณะอาการของโรคที่ไม่แตกต่างกัน คือ อาการยอดและใบอ่อนเหลือง ต่อมาใบมีอาการด่าง หงิกและใบมีขนาดเล็กลงหรือลดรูป และในระยะภายหลังจากการติดผลอ่อน จะพบอาการที่ผลเป็นแผลจุดฉ่ำน้ำขนาดเล็ก แผลจุดฉ่ำน้ำจะเปลี่ยนเป็นจุดวงแหวนเมื่อผลมีขนาดใหญ่มากขึ้น และพบอาการแผลจุดฉ่ำน้ำและแผลจุดวงแหวนที่ก้านใบและลำต้นเช่นเดียวกัน (Figure 1) จากนั้นอาการจะแพร่กระจายตามส่วนต่างๆ ของต้นมะละกอ (Systemiclesions) (Sutabutra, 1989) แปลงปลูกจังหวัดปทุมธานีพบต้นมะละกออายุ 2

เดือน ภายหลังการหลังย้ายลงแปลงปลูกไม่แสดงอาการของโรค เริ่มพบอาการของโรคเมื่อต้นมะละกออายุ 3 เดือน ในทุกแปลงปลูกมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสะสมในมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายที่ปลูกในมุ้ง 27.0 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ปลักไม้ลายปลูกนอกมุ้ง 57.2 และพันธุ์ลูกผสมปลูกนอกมุ้ง 5.0 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) ส่วนแปลงปลูกมะละกอพันธุ์แขกนวลที่ปลูกแบบปกติกลางแจ้ง ในพื้นที่อำเภอแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี พบต้นมะละกอแสดงอาการของโรคตั้งแต่ช่วงเดือนแรกภายหลังย้ายกล้าลงแปลงปลูก และพบโรคทุกเดือนระบาดกระจายทุกเดือนตั้งแต่เดือนแรกภายหลังการย้ายกล้าลงปลูกซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเพิ่มขึ้นในแต่ละเดือน คือ 2.5 1.5 5.5 4.0 4.0 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ จากเดือนพฤษภาคม มิถุนายน กรกฎาคม สิงหาคม กันยายน และ ตุลาคม 2555 ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสะสม เท่ากับ 21 เปอร์เซ็นต์ (Table 2)

จากการเข้าสำรวจแปลงปลูกมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายและพันธ์แขกนวลของเกษตรกรในพื้นที่ 6 จังหวัด ที่ใช้ศึกษาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบด่างจุดวงแหวน พบต้นมะละกอที่แสดงอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวนในทุกในพื้นที่แปลงปลูก พบการเกิดโรคในมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลาย ระดับตั้งแต่ 22.5 – 35.0 เปอร์เซ็นต์ และพบการเกิดโรคในมะละกอพันธุ์แขกนวล ระดับตั้งแต่ 31.3 – 43.3 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) ซึ่งจะเห็นได้ว่าพบการเกิดโรคใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอพันธุ์แขกนวลมากกว่าพันธุ์ปลักไม้ลาย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมะละกอพันธุ์แขกนวลเป็นพันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อโรคใบด่างจุดวงแหวน มากกว่าพันธุ์ปลักไม้ลาย อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าการเกิดโรคนี้ในมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายมีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายเริ่มอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของไวรัสสาเหตุของโรคใบด่างจุดวงแหวน อาจเกิดจากการผสมข้ามของมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายกับมะละกอพันธุ์อื่นๆ เช่น พันธุ์แขกนวลและพันธุ์แขกดำ ซึ่งมีความอ่อนแอต่อโรคนี้ หรืออาจเป็นไปได้ว่าในช่วงแรกของการนำมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายมาปลูก ไวรัสสาเหตุของโรคใบด่างวงแหวนมะละกอยังไม่สามารถปรับตัวเข้าทำลายได้ แต่เมื่อปลูกต่อมานานเข้าเชื้อไวรัสอาจปรับตัวให้สามารถเข้าทำลายได้ง่ายแล้วในปัจจุบัน

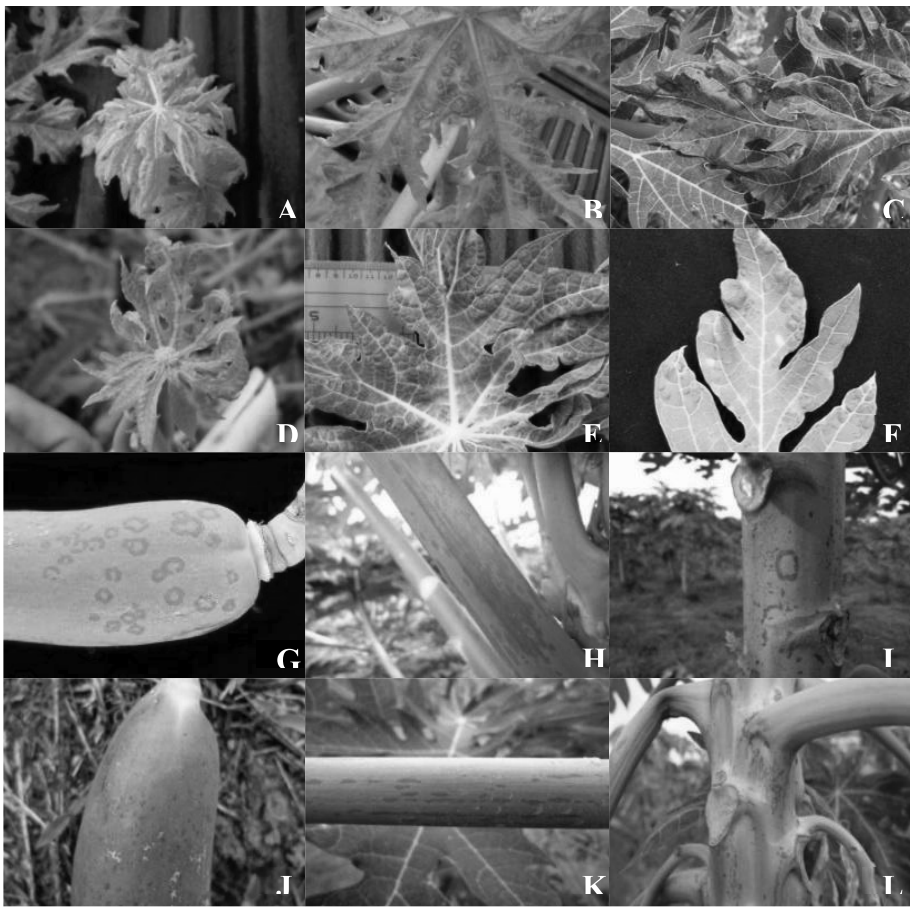

Figure 1 Symptom of papaya ringspot disease; leaf mosaic, yellow and leaf distortion in Plak Mai Lai variety (A, B and C) and Kagnuan (D, E and F), water soak and ringspot on fruit, petioles and stem in Plak Mai Lai variety (G, H and I) and Kagnuan variety (J, K and L).

Table 1 Percentage of PRSV disease in papaya field of Plak Mai Lai variety and Hybrid variety (Plak Mai Lai x Kagdam) in Lat Lum Kaeo district, Pathum Thani province in 2011

Treatment	Percentage of PRSV disease				
	Jul.	Aug.	Sept.	Oct.	Cumulative disease
Plak Mai Lai varietyin screenhouse	0.0	0.0	9.0	18.0	27.0 ab
Plak Mai Lai varietyin open field	0.0	0.0	17.2	40.0	57.2 a
Hybrid variety (Plak Mai Lai x Kagdam) in open field	0.0	0.0	1.2	3.8	5.0 b

Means in vertical at different alphabets weresignificant different at99% ($p<0.01$) byDuncan's New Multiple Range Test (DMRT)

Table 2 Percentage of PRSV disease in papaya field of Kagnuan variety in Kaeng Krachan district, Phetchaburi province in 2012

Treatment	Percentage of PRSV disease						
	May.	Jun.	Jul.	Aug.	Sept.	Oct.	Cumulative disease
Kagnuan	2.5 b	1.5 b	5.5 a	4.0 ab	4.0 b	3.5 ab	21

Means in vertical at different alphabets weresignificant different at99% ($p<0.01$) byDuncan's New Multiple Range Test (DMRT)

Table 3 Percentage of PRSV disease in papaya field of 6 provinces

Location*	Variety**	No. of collected samples	No. of diseased samples	Percentage of PRSV disease
Pbi1	K	90	39	43.3
Pbi 2	P	120	27	22.5
Pbi 2	K	80	25	31.3
Cnt	P	125	34	27.2
Ryg	P	120	42	35.0
Uti	K	75	37	33.6
Cmi 1a	P	120	29	24.2
Cmi 1b	P	135	39	28.9
Cmi 2	P	150	34	22.7

*Pbi 1 = Kaeng Krachan, Phetchaburi Pbi 2 = Khao Yoi, Phetchaburi
Cnt = Wat Sing, Chainat Ryg = Ban Khai, Rayong
Uti = Muang, Uthaithani Cmi 2 = Fang, Chiang Mai.
Cmi 1a = Mae Ai, Chiang Mai plot1 Cmi 1b = Mae Ai, Chiang Maiplot2
**variety P = Plak Mai Lai K = Kagnuan

ความสัมพันธ์ของปัจจัยสภาพแวดล้อมที่ส่งเสริมการเกิดโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอในสภาพแปลงปลูก

ตรวจพบการระบาดของโรคใบด่าง จุดวงแหวนมะละกอในหลายพื้นที่ปลูกในแบบสุ่มกระจายต้นที่อยู่ใกล้กับต้นที่แสดงอาการของโรคจะแสดงอาการของโรคได้รวดเร็วกว่าต้นอื่นๆ โดยต้นมะละกอในพื้นที่แปลงปลูกอำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี เริ่มแสดงอาการของโรคในเดือนกันยายน 2554 ต้นมะละกอที่มีอาการของโรคได้แก่ มะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายปลูกในมุ้ง จำนวน 9 ต้น พันธุ์ปลักไม้ลายปลูกนอกมุ้ง จำนวน 10 ต้น และพันธุ์ลูกผสมปลูกนอกมุ้ง จำนวน 3 ต้น และในเดือนตุลาคมพบต้นมะละกอแสดงอาการของโรคเพิ่มเป็น 18 30 และ 10 ต้น ตามลำดับ (Figure 2) ส่วนต้นมะละกอพันธุ์แขกนวลในแปลงปลูกอำเภอแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี เริ่มแสดงอาการของโรคตั้งแต่เดือนแรกของการย้ายกล้าลงปลูก คือ เดือนพฤษภาคม 2555 จนถึงเดือนตุลาคม 2555 โดยพบต้นที่แสดงอาการของโรคในแต่ละเดือนจำนวน 5 3 11 8 5 และ 7 ต้น ตามลำดับ (Figure 3) ลักษณะการกระจายของโรคเกิดแบบกระจายตัวออกไปรอบๆ ต้นที่พบเป็นโรคเริ่มต้นเพราะแมลงเพลี้ยอ่อน ถ่ายทอดโรคแบบ stylet borne เชื้อไวรัสติดอยู่ที่ stylet ของแมลง เมื่อทดลองดูดกินต้นเป็นโรคแล้วไม่ใช่พืชอาศัยก็บินไปยังต้นใกล้สุดและทดลองดูดกินอีก เชื้อที่ปลาย stylet ถูกปล่อยลงบนต้นที่อยู่ใกล้ แล้วก็บินไปอีก ดังนั้นต้นที่อยู่ไกลออกไปจึงยังไม่ได้รับเชื้อเพราะ stylet ของเพลี้ยอ่อนสะอาดจากไวรัสแล้ว การเกิดโรคจึงเป็นลักษณะการกระจายตัวออกไปรอบๆ ต้นเป็นโรคขยายวงออกไปเรื่อย และอาจจะเกิดในแปลงขนาดใหญ่หลายๆ กลุ่มจนเต็มพื้นที่

จากการนำข้อมูลการเกิดโรคทั้งในพื้นที่จังหวัดปทุมธานี และจังหวัดเพชรบุรี มาหาความสัมพันธ์กับข้อมูลสภาพแวดล้อม พบว่าการเกิดโรคที่มากขึ้นสอดคล้องและ/หรือมีความสัมพันธ์กับ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณน้ำฝน โดยพบว่าอุณหภูมิมีความสอดคล้องและ/หรือมีความสัมพันธ์ตรงกันข้ามกับการเกิดโรค สอดคล้องกับ Gonsalves and Ishii (1980) กล่าวว่าในช่วงอุณหภูมิต่ำจะมีอิทธิพลต่อการแสดงอาการของโรค ส่วนความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณน้ำฝนที่มากขึ้นมีความสอดคล้องและ/หรือมีความสัมพันธ์ ในทิศทางเดียวกันต่อการเกิดโรคที่มากขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามจากงานทดลองพบว่าในช่วงที่มะละกอแสดงอาการของโรคมากขึ้นนั้น ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าต้นมะละกอชลอการเจริญทางต้นและใบแต่เชื้อไวรัสนั้นเจริญ และเพิ่มปริมาณตลอดเวลา ทำให้ต้นมะละกอแสดงอาการรุนแรงมากขึ้นในระยะที่มีการพัฒนาของผล แต่โดยทั่วไปพืชที่มีอายุน้อยหรืออยู่ในระยะต้นกล้าจะมีความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายมากกว่าต้นพืชที่เติบโตเต็มที่ (Attathom, 2009) อีกทั้งยังเป็นช่วงที่มีความชื้นสัมพัทธ์และปริมาณน้ำฝนสูง ซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชอาจส่งผลให้มะละกอไม่สามารถดูดน้ำ ดูดธาตุอาหารและสังเคราะห์แสงได้ตามปกติ ทำให้กระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ผิดปกติและทำให้ง่ายต่อการเกิดโรค (Disease incident) หรือทำให้ง่ายต่อการเข้าทำลาย (Disease infection) ของโรค

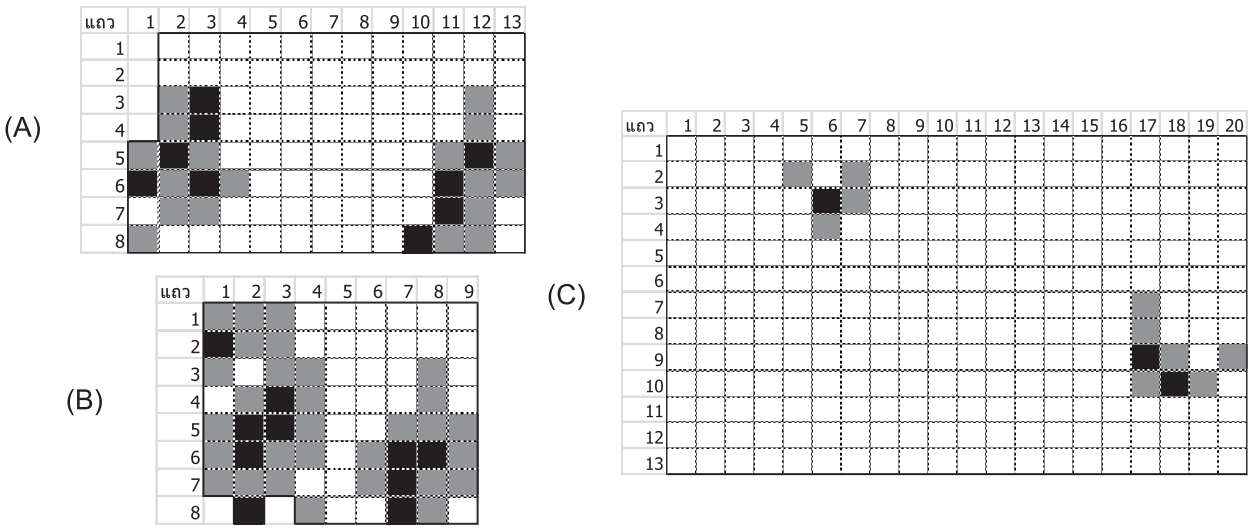

Figure 2 Epidemic of Papaya ringspot disease and disease distribution within papaya field in Lat Lum Kaeo district, Pathum Thani province in 2011

(A) Plak Mai Lai varietyin screenhouse (B) Plak Mai Lai variety in open field

(C) Hybrid variety (Plak Mai Lai x Kagdam) in open field

■ = diseased papaya plants in September ■ = diseased papaya plants in October

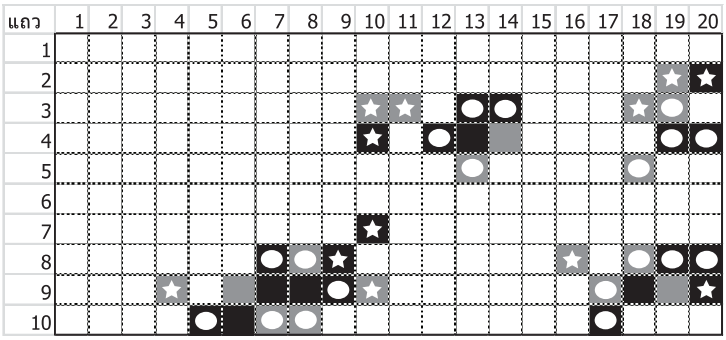

Figure 3 Epidemic of Papaya Ringspot disease and disease distribution within papaya field of Kagnuan in Petchaburi province in 2012

■ = diseased papaya plants in May ■ = diseased papaya plants in June

● = diseased papaya plants in July ● = diseased papaya plants in August

★ = diseased papaya plants in September ★ = diseased papaya plants in October

การสำรวจจำนวนประชากรเพลี้ยอ่อน/แมลงพาหะถ่ายทอดโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

ในพื้นที่แปลงปลูกมะละกอ อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี พบแมลง/แมงชนิดเดียวกันได้ทั้งการปลูกในมุ้งกันแมลงและแปลงปลูกปกติ จำนวน 8 ชนิด แต่จำนวนแมลง/แมงที่พบในมุ้งกันแมลง มีจำนวนน้อยกว่าแปลงปลูกปกติ 3.0 – 3.5 เท่า ส่วนในพื้นที่แปลงปลูกมะละกอ อำเภอแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี พบแมลง/แมงจำนวน 5 ชนิด ตัวอย่างแมลง/แมงทั้งหมดที่พบได้ถูกนำมาจำแนกชนิด (Table 4, 5) ในการศึกษาสำรวจแปลงปลูกมะละกอทั้ง 2 จังหวัด ไม่พบเพลี้ยอ่อนซึ่งมีรายงานว่าเป็นแมลงพาหะในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส PRSV (Bayot *et al.,* 1990) แต่ในพื้นที่แปลงปลูกมะละกอของเกษตรกรในอำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ตรวจพบแมลง/แมง จำนวน 7 ชนิด และพบเพลี้ยอ่อนซึ่งมีรายงานว่าเป็นแมลงพาหะ หากแต่พบในปริมาณที่น้อยมาก (Table 4, 5) และเมื่อนำมาตรวจสอบไวรัสสาเหตุของโรค คือ PRSV ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลการทดลองพบว่าตรวจไม่พบเชื้อไวรัส PRSV ซึ่งทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเพลี้ยอ่อนมีความสัมพันธ์กับเชื้อไวรัส PRSV ในลักษณะ non-persistent ทำให้ตรวจไม่พบเชื้อในตัวแมลงพาหะได้ การที่ไม่พบเพลี้ยอ่อนแมลงพาหะของโรคจึงอาจมีความเป็นไปได้ว่ามะละกอไม่ใช่พืชอาศัยของแมลงพวกเพลี้ยอ่อน จึงลงดูดกินในลักษณะการชิม เมื่อพบว่าไม่สามารถกินได้ก็จะบินไปที่อื่น ไม่อยู่อาศัย ไม่สร้าง colony จึงไม่พบตัวเพลี้ยอ่อนบนต้นมะละกอ ซึ่งแตกต่างกันมาก หากเพลี้ยอ่อนพบพืชอาศัยจะอยู่บนต้นนั้นเลย จะถอดปีกสร้าง colony ออกลูกหลานและเพิ่มปริมาณอยู่บนต้นพืชนั้นไม่เคลื่อนย้ายไปไหนหากไม่ถูกรบกวน

การใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุลเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

สามารถออกแบบคู่ไพร์เมอร์ที่มีความให้มีความจำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene) ของเชื้อไวรัส PRSV-P ดังนี้ คือ PRSV-CP -F (5' AAT GAA GCT GTG GAT GCT GG 3') และ PRSV-CP-R (5' CTA AGA GGC TCA AAT AAC ACG TGG G 3') เมื่อนำมาตรวจสอบตัวอย่างมะละกอที่แสดงอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวนจากแต่ละแหล่งปลูก ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) และตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% TBE agarose gel ผลการทดลองพบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวและมีขนาด 1,058 bp ซึ่งเป็นแถบและขนาดของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene) ของเชื้อไวรัส PRSV-P (Figure 4)

Table 4 Types and mean of numbers of insect which founded in papaya growing areas: Lat Lum Kaeo district, Pathum Thani province in June - October, 2011, Kaeng Krachan district, Phetchaburi provincein April –November, 2012, and Wang Chomphu district, Phetchabun provincein November –December, 2015

Location (province)/variety	No. of insects										
	Myzus persicae	*Thrip* sp.	*Bemisia tabaci*	*Orseolia oryzae*	*Aedes albapictus* (Skuse.)	*Lepthocerus indicus*	*Oecophylla smaragdina* Fabricus	*Bracon* sp.	*Oxyopes lineatipes*	*Empoasca* sp.	*Oxya japonica*	*Blattella germanica*
Pathum Thani/Plak Mai Lai varietyin screenhouse	-	8.7	19.6	10.9	17.2	0.2	2.3	5.0	1.4	-	-	-
Pathum Thani/Plak Mai Lai varietyin open field	-	22.1	21.3	10.5	9.4	44.6	45.5	44.8	12.3	-	-	-
Pathum Thani/Hybrid variety (Plak Mai Lai x Kagdam) in open field	-	17.9	20.5	8.8	8.1	47.5	49.8	44.7	13.6	-	-	-
Phetchaburi/Kagnuan varietyin open field	-	-	8.3	-	5.3	-	-	-	-	2.8	1.3	1.9
Phetchabunplot 1/Plak Mai Lai varietyin open field	0.7	6.3	11.8	0.2	-	-	-	4.0	0.2	1.2	-	-
Phetchabunplot 2/Plak Mai Lai varietyin open field	1.9	5.5	13.6	0.3	-	-	-	7.3	0.3	2.0	-	-
Phetchabunplot 3/Plak Mai Lai varietyin open field	0.5	6.7	11.0	1.7	-	-	-	5.1	0.6	2.8	-	-
Phetchabunplot 4/Plak Mai Lai varietyin open field	0.2	6.5	7.0	-	-	-	-	5.5	0.6	1.7	-	-

Table 5 List of insects which found in papaya fields of Pathum Thani, Petchaburi and Pecthabun provinces

Common name	Scientific name	Family
Thrips	*Thrip* sp.	Thripidae
White fly	*Bemisia tabaci*	Aleyrodidae
Gall Midges	*Orseolia oryzae* (Wood-Mason)	Cecidomyiidae
Aedes	*Aedes albapictus (Skuse.)*	Culicidae
Water Striders	*Lepthocerus indicus*	Gerridae
Weaver ant	*Oecophylla smaragdina* Fabricus	Formicidae
Parasitoids	*Bracon* sp.	Braconidae
Lynx spider	*Oxyopes lineatipes*	Oxyopes
Green leafhopper	Empoasca sp.	Cicadellidae
Small Rice Grasshoppers	*Oxya japonica*	Acrididae
Cockroach	*Blattella germanica*	Blattellidae
Aphids	*Myzus persicae*	Aphididae

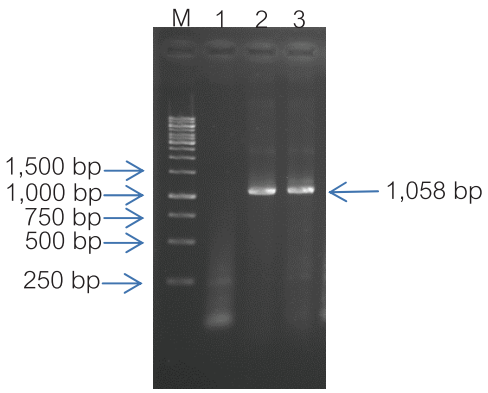

Figure 4 Results of RT-PCR amplification to detect PRSV: M = 1kb ladder, lane 1 = negativecontrol, lane 2 =positive control (PRSV), lane 3 =PRSV symptomatic diseased of papaya 1,058 bp

สรุป

การศึกษาวิจัยโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอที่มีการระบาดรุนแรงมากในประเทศไทยในปัจจุบัน พบว่าอาการของโรคที่เกิดจากการทำลายของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนของมะละกอ *Papaya ringspot virus* (PRSV) มีอาการสำคัญ คือ อาการยอดและใบอ่อนเหลือง ต่อมาใบมีอาการด่าง หงิก และใบมีขนาดเล็กลงหรือลดรูป และในระยะภายหลังจากการติดผลอ่อน จะพบอาการที่ผลเป็นแผลจุดฉ่ำน้ำขนาดเล็ก แผลจุดฉ่ำน้ำจะเปลี่ยนเป็นจุดวงแหวนเมื่อผลมีขนาดใหญ่มากขึ้น และพบอาการแผลจุดฉ่ำน้ำและแผลจุดวงแหวนที่ก้านใบและลำต้น และไม่แตกต่างกันในมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายและแขกนวล การเกิดโรคเกิดในลักษณะแบบสุ่มกระจายทั่วพื้นที่แปลงปลูกและระบาดสู่ต้นที่อยู่ใกล้เคียงกับต้นที่เป็นโรคได้รวดเร็ว ทั้งนี้พบว่าในมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายและมะละกอพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ปลักไม้ลายและแขกดำ มีการเกิดโรคเข้าทำลายได้ช้ากว่ารวมทั้งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยกว่ามะละกอพันธุ์แขกนวลในแปลงปลูกเดียวกัน ในด้านความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคกับสภาพแวดล้อม จากการวิจัยพบว่าอุณหภูมิที่ลดต่ำลงมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคที่มากขึ้น ส่วนความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณน้ำฝนที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคที่มากขึ้น สำหรับการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Coat protein gene (CP gene) ของเชื้อไวรัส PRSV-P สามารถตรวจตัวอย่างพืชเป็นโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งให้ผลการวิเคราะห์พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด1,058 bp เพียงแถบเดียว

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนทุนในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Attathom, S. 2009. Virus Diseases of Plants. Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom. 216 pages.(In Thai)

Bayot, R.G., V.N. Villegas, P.M. Magdalita, M.D. Jovellana, T.M. Espono and S.B. Exconde. 1990. Seed transmissibility of *Papaya ringspot virus*. Philipp. J. Crop Sci. 15 (2): 107 – 111.

Gonsalves, D. and M. Ishii. 1980. Purification and serology of *papaya ringspot virus*. Phytopathology, 70, 1028 – 1032.

Jensen, D.D. 1949. *Papaya ringspot virus* and its insect vector relationships. Phyto-pathology isolate of Dasheen mosaic virus. Phytopathology 75: 1355 (Abstr).

Lee, R.F. 2001. *Citrus tisteza virus*. In O.C. Maloy and T.D. Murray. Encyclopedia of Plant Pathology Volume 1. John Wiley and Son. Inc. New York, USA. 598: 244 – 246.

Purcifull, D.E. 1972. *Papaya ringspot virus*. No. 84 in: Descriptions of plant viruses. Common W. Mycol. Inst., Assoc. Appl. Biologist, Kew, Surrey, England.

Singh, S.K., P.K. Jha and P.K. Ray. 2010. Integrated Management of *Papaya ringspot virus* (PRSV) in Agro Ecological Conditions of Bihar. Proc. 2nd IS on Papaya. 487-493.

Sutabutra, T. 1989. Virus and virus-like diseases of important crops in Thailand. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok. P. 302. (in Thai)