อาการโรคและการถ่ายทอดเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* ด้วยวิธีกล ในมะเขือเทศ Rutgers

Disease Symptoms and Mechanical Transmission of *Pepper chat fruit viroid* in Rutgers Tomato

ชนกฉัตร ปอสูงเนิน[1/] คนึงนิตย์ เหรียญวรากร[1/*]

Schanokchatr Porsoongnoen[1/] Kanungnit Reanwarakorn[1/]

Received 19 Sept. 2022/Revised 8 Nov. 2022/Accepted 15 Dec. 2022

ABSTRACT

Pepper chat fruit viroid (PCFVd) is a mechanical and seed transmissible viroid. This work was to study mechanical inoculation methods and symptoms of PCFVd on Rutgers tomato. Seven mechanical inoculation methods were used, 1) PCFVd crude sap inoculation on leaves, 2) pressing on a leaf with PCFVd contaminated glove, 3) leaving contaminated glove 24 hrs under greenhouse condition before inoculation, 4) cutting an apical healthy stem with a PCFVd contaminated razor blade then take the cut-stem to plant, 5) cutting off an apical healthy stem with a PCFVd contaminated razor blade, 6) dipping a razor blade into PCFVd crude sap and doing a single slash in healthy plant stem, and 7) slashing the healthy plant stem 3-times with a PCFVd contaminated razor blade, uninoculated plants were used as control. The infected Rutgers tomato expressed apical shoot and plant stunt, necrosis of leaf vein, petiole and stem, yellow leaf tissue next to vein necrosis, leaf malformation, distorted petiole, small apical leave and some leaf-tip necrosis. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique was used to confirm PCFVd infection at 4 and 8 weeks post-inoculation. Results showed that the transmission percentage of the 1st to 7th methods were 100, 100, 90, 20, 20, 20 and 70%, respectively. From this work, the 1st and 2nd inoculation methods were the best ones.

Keywords: *Pepper chat fruit viroid*, PCFVd, tomato, viroid, mechanical transmissible

---

[1/] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1/] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140,

*** Corresponding author: agrknr@ku.ac.th**

บทคัดย่อ

เชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) สามารถถ่ายทอดด้วยวิธีกลและผ่านทางเมล็ด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอาการโรคและการถ่ายทอดเชื้อ PCFVd ด้วยวิธีกลในมะเขือเทศพันธุ์ “Rutgers” เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนให้นักโรคพืช นักปรับปรุงพันธุ์พืช และผู้สนใจ สามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ต่อไป ทำการทดลองถ่ายทอดเชื้อ PCFVd ผ่านทาง 7 วิธีการปลูกเชื้อ คือ 1) ทาใบด้วยน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ PCFVd 2) กดใบด้วยถุงมือปนเปื้อนเชื้อ PCFVd 3) กดใบด้วยถุงมือปนเปื้อนเชื้อ PCFVd หลังวางไว้ในโรงเรือนปลูกพืชนาน 24 ชม. 4) ตัดลำต้นบริเวณยอดด้วยใบมีดปนเปื้อนเชื้อ PCFVd และนำยอดที่ตัดออกไปปักชำ 5) ตัดลำต้นบริเวณยอดทิ้งด้วยใบมีดปนเปื้อนเชื้อ PCFVd 6) กรีดลำต้น 1 ครั้ง ด้วยใบมีดจุ่มน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ PCFVd 7) กรีดลำต้น 3 ครั้ง ด้วยใบมีดปนเปื้อนเชื้อ PCFVd โดยวิธีการควบคุม คือ มะเขือเทศไม่ปลูกเชื้อ ผลการทดลองพบว่า มะเขือเทศพันธุ์ “Rutgers” แสดงอาการโรคโดยรวมคือ ต้นเตี้ยแคระ ข้อปล้องส่วนยอดหดสั้น มีเนื้อเยื่อเซลล์ตายบริเวณเส้นใบ ก้านใบ และลำต้น มีอาการเหลืองของเนื้อใบรอบ ๆ เส้นใบ ที่แสดงอาการเซลล์ตาย ใบหดหงิกงอ เสียรูปร่าง ก้านใบคดงอ บางต้นแสดงอาการใบยอดลดรูปและอาการปลายใบยอดไหม้ร่วมด้วย การตรวจสอบการติดเชื้อด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ที่ 4 และ 8 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อ พบว่า วิธีการปลูกเชื้อ 7 วิธีการ มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อ PCFVd คือ 100, 100, 90, 20, 20, 20 และ 70% ตามลำดับ จากการทดสอบในครั้งนี้ การปลูกเชื้อด้วยวิธีการที่ 1 และวิธีการที่ 2 เป็นวิธีที่ดีที่สุด

คำสำคัญ: เชื้อ *Pepper chat fruit viroid*, มะเขือเทศ, ไวรอยด์, การถ่ายทอดเชื้อด้วยวิธีกล

บทนำ

มะเขือเทศ (tomato) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Lycopersicon esculentum* Mill. จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมชนิดหนึ่ง ในปี พ.ศ. 2564 มีพื้นที่เพาะปลูก 39,050 ไร่ ผลผลิตรวม 134,084 ตัน เป็นมะเขือเทศส่งโรงงานอุตสาหกรรม 90,324 ตัน และรับประทานผลสด 43,760 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) ทำให้มีการใช้เมล็ดพันธุ์อย่างกว้างขวางทั้งภายในประเทศและการส่งออก สำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก กรมวิชาการเกษตรได้กำหนดการดำเนินงานไว้หลายขั้นตอน รวมถึงการตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในช่วงที่มีการเจริญเติบโตในแปลงปลูก 2 ระยะ คือ ระยะตอนดอกผสมเกสรและระยะโตเต็มที่ก่อนเก็บเกี่ยว (ศรีวิเศษ และคณะ, 2553) นอกจากนี้มะเขือเทศยังอ่อนแอต่อเชื้อโรคพืชที่สำคัญหลายชนิด เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัส และเชื้อไวรอยด์ โดยพบว่า มีอาการหลายอย่างที่คล้ายอาการจากเชื้อไวรอยด์ เช่น เตี้ยแคระ ดอกและผลผิดรูปร่าง ใบยอดหย่นและมีขนาดเล็ก เส้นใบและก้านใบมีสีน้ำตาล เป็นต้น (Hadidi *et al*., 2003)

เชื้อไวรอยด์สาเหตุโรคพืช มีโครงสร้างเป็น อาร์เอ็นเอสายเดี่ยววงปิด (a single-stranded circular RNA molecule) ไม่มีโปรตีนห่อหุ้มและไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนเองได้ เพิ่มปริมาณภายในเซลล์ของพืชอาศัย อาการโรคที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์พบได้ตั้งแต่ไม่มีอาการโรคจนถึงแสดงอาการโรคอย่างรุนแรงขึ้นกับชนิดของเชื้อไวรอยด์และชนิดของพืชอาศัย เชื้อไวรอยด์ที่มีรายงานในมะเขือเทศ ได้แก่ PSTVd (Diener, 1987) *Tomato apical stunt viroid* (TASVd)

(Diener, 1987) *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) (Singh *et al*., 1999) *Tomato planta macho viroid* (TPMVd) (Galindo *et al.,* 1982) *Columnea latent viroid* (CLVd) (Hammond *et al*.1989) *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) (Reanwarakorn *et al.,* 2011; Verhoeven *et al*., 2009; Yanagisawa and Matsushita, 2017) *Citrus exocortis viroid* (CEVd) (Mishra *et al*., 1991; Fagoaga and Duran-Vila, 1996; Verhoeven *et al.,* 2004) *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) (Diener, 1987) *Hop stunt viroid* (HSVd) (Diener, 1987) และ *Tomato bunchy top viroid* (TBTVd) (Mishra *et al*., 1991) การแพร่กระจายของเชื้อไวรอยด์พบได้หลากหลายวิธี เช่น การถ่ายทอดผ่านทางละอองเกสร เมล็ด ส่วนขยายพันธุ์อื่น ๆ ผ่านทางวิธีกล และการปฏิบัติการทางเขตกรรมต่าง ๆ (Hadidi *et al*., 2003; Flores *et al*., 2005) ผ่านทางพาหะ เช่น แมลง พืชกาฝาก และเชื้อราบางชนิด (Cohen *et al*., 2005; Antignus *et al*., 2007; Matsuura *et al*., 2010; Walia *et al*., 2015; Wei *et al*., 2019; Leichtfried *et al*., 2020; Serra *et al*., 2020; Hadidi *et al*., 2022)

เชื้อ PCFVd มีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 2006 ประเทศเนเธอร์แลนด์ ในพริกหวาน (sweet pepper: *Capsicum annuum* L.) ที่ปลูกในโรงเรือน โดยทำให้พริกหวานมีการเจริญเติบโตลดลงและมีขนาดของผลลดลงถึง 50% มีการถ่ายทอดเชื้อทางวิธีกล และผ่านทางเมล็ดพริก ในพืชกลุ่ม Solanaceous หลายชนิด เชื้อ PCFVd ทำให้มะเขือเทศมีอาการเส้นใบไหม้ (vein necrosis) และขนาดผลลดลง ในมันฝรั่งทำให้ขนาดของหัวลดลง และการทดลองในมะเขือเทศ ประมาณ 2-3 สัปดาห์หลังปลูก เชื้อใบอ่อนของมะเขือเทศแสดงอาการจุดไหม้ (necrotic spots) และขีดไหม้ (necrotic streaks) ตามบริเวณเส้นใบและก้านใบ (Verhoeven *et al.*, 2009) และในฤดูร้อน ปี ค.ศ. 2009 ตรวจพบเชื้อนี้ในพริกหวานที่ประเทศแคนาดา โดยทำให้พริกหวานมีการเจริญเติบโตลดลงเล็กน้อยและผลมีขนาดเล็กผิดปกติ (Verhoeven *et al*., 2011) เชื้อ PCFVd มีจีโนมเป็นชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยววงปิด (single-stranded circular RNA) ขนาด 348 นิวคลิโอไทด์ อยู่ในสกุล *Pospiviroid* วงศ์ *Posipiviroidea* (Verhoeven *et al*., 2009; Di Serio *et al*., 2021) ในประเทศไทย คนึงนิตย์และคณะ (2554) ได้รายงานว่า พบเชื้อ PCFVd ในแปลงปลูกมะเขือเทศของเกษตรกรใน จ. ลำปาง ในช่วงปลายปี พ.ศ. 2552 โดยมะเขือเทศแสดงอาการต้นเตี้ย ใบแสดงอาการเนื้อเยื่อตาย ใบและสีใบผิดปกติ (Reanwarakorn *et al.,* 2011) และทำให้ผลมีขนาดลดลงและไม่มีเมล็ด (ปริเชษฐ์ และคณะ, 2556) ปี พ.ศ. 2553 ตรวจพบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศใน จ. ขอนแก่น และต่อมาพบในหลายพื้นที่ของภาคเหนือ และภาคกลาง (ปริเชษฐ์ และคณะ, 2555; Reanwarakorn *et al*., 2011) นอกจากนี้ ประเทศออสเตรเลียได้ตรวจพบเชื้อ PCFVd จากเมล็ดที่นำเข้าจากประเทศไทย (Chambers *et al*., 2013; Constable *et al*., 2019)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอาการโรคและการถ่ายทอดเชื้อ PCFVd ด้วยวิธีกล ในมะเขือเทศ เพื่อเป็นการเพิ่มความเข้าใจและการตระหนักถึงความสำคัญในแง่ของลักษณะอาการโรคและการถ่ายทอดเชื้อด้วยวิธีกลผ่านทางเครื่องมืออุปกรณ์ทางการเกษตรและการจับสัมผัสต้นพืชที่มีเชื้อไวรอยด์นี้ ผู้เกี่ยวข้องสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ ในการตรวจสอบโรคในแปลงปลูกและการระมัดระวังการปนเปื้อนเชื้อจากภายนอกเข้ามาสู่แปลงผลิต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. มะเขือเทศทดสอบ

เพาะเมล็ดมะเขือเทศสายพันธุ์ Rutgers ในถาดเพาะและย้ายกล้าอายุ 3 สัปดาห์ ลงกระถางขนาด 6 นิ้ว ดูแลรดน้ำวันละ 1 ครั้ง ในโรงเรือนกันแมลง และนำไปใช้ทดสอบเมื่ออายุครบ 5 สัปดาห์

2. เชื้อ PCFVd ทดสอบ

เชื้อ PCFVd ไอโซเลต LPng20-11c1 ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่ห้องปฏิบัติการโรคพืชระดับโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน ในลักษณะใบมะเขือเทศติดเชื้อ PCFVd ที่ทำให้แห้งก่อนการทดสอบนำตัวอย่างแห้งไปเพิ่มปริมาณในมะเขือเทศสายพันธุ์ Rutgers จากนั้นตรวจยืนยันชนิดของเชื้ออีกครั้ง ดูแลรักษาไว้ในโรงเรือนกันแมลง และนำไปใช้สำหรับทดสอบเมื่ออายุครบ 1 เดือนหลังการปลูกเชื้อ

การเตรียมน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ PCFVd สำหรับทดสอบ โดยใช้อัตราส่วนใบพืชสดติดเชื้อจำนวน 1 ก. ต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M ความเป็นกรดด่าง 9.0 (ประกอบด้วยสาร $NaH_2PO_4.2H_2O$ และสาร $Na_2HPO_4.12H_2O$) ผสมด้วยสาร Na_2SO_3 ปริมาณ 0.2% ของสารละลาย ปริมาตร 20 มล. แช่เย็น บดจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวด้วยโกร่งและส่วนที่ใช้บดแช่เย็น กรองแยกกาก เติมผงคาร์โบรันดัม 1% ของปริมาตรน้ำคั้น นำไปปลูกเชื้อลงในพืชทดสอบด้วยการจุ่มสำลีก้านลงในน้ำคั้นทาลงบนใบยอดบนสุด 2-3 ใบให้ทั่ว ทิ้งไว้สักครู่และล้างออกด้วยน้ำสะอาด

3. การทดสอบวิธีการปลูกเชื้อ PCFVd

เมื่อมะเขือเทศทดสอบอายุครบ 5 สัปดาห์หลังเพาะเมล็ด ซึ่งมีใบจริง 4-5 ใบ ทดสอบจำนวน 10 ต้นต่อวิธีการ โดยมีการปลูกเชื้อทดสอบด้วยวิธีการ ดังนี้

วิธีการที่ 1 ทาใบด้วยน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ PCFVd

วิธีการที่ 2 กดใบด้วยถุงมือปนเปื้อนเชื้อ PCFVd

วิธีการที่ 3 กดใบด้วยถุงมือปนเปื้อนเชื้อ PCFVd หลังวางไว้ในโรงเรือนปลูกพืชนาน 24 ชม.

วิธีการที่ 4 ตัดลำต้นบริเวณยอดด้วยใบมีดปนเปื้อนเชื้อ PCFVd และนำยอดที่ตัดออกไปปักชำ

วิธีการที่ 5 ตัดลำต้นบริเวณยอดทิ้งด้วยใบมีดปนเปื้อนเชื้อ PCFVd

วิธีการที่ 6 กรีดลำต้น 1 ครั้ง ด้วยใบมีดจุ่มน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ PCFVd

วิธีการที่ 7 กรีดลำต้น 3 ครั้ง ด้วยใบมีดปนเปื้อนเชื้อ PCFVd

วิธีการที่ 8 มะเขือเทศไม่ปลูกเชื้อ

โดยวิธีการที่ 1 ทำตามข้อ 2 วิธีการที่ 2 และ 3 ใช้ปลายนิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ที่สวมถุงมือปนเปื้อนเชื้อ PCFVd ที่เกิดจากการขยี้ใบพืชติดเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 ซม. กดใบพืชนาน 2 วินาที ให้เกิดแผลขนาดเล็ก ๆ บนใบยอดนับจากบนสุดลำดับที่ 2 หรือ 3 จำนวน 1 ครั้ง/ต้น ต่อเนื่องกันจนครบทั้ง 10 ต้น วิธีการที่ 4 และ 5 ใช้ใบมีดสะอาดตัดที่ยอดของมะเขือเทศติดเชื้อ PCFVd จำนวน 1 ครั้ง แล้วนำใบมีดปนเปื้อนเชื้อดังกล่าวตัดยอดของต้นพืชปกติ ส่วนยอดที่ตัดออกนำไปปักชำในกระถางใหม่ ส่วนของต้นที่ถูกตัดยอดออกไปเก็บและดูแลไว้ในกระถางเดิม โดยตัดยอดพืชทดสอบต่อเนื่องจนครบ 10 ต้น วิธีการที่ 6 ใช้ใบมีดสะอาดจุ่มในน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ PCFVd จำนวน 1 ครั้งและกรีดทำแผลบนลำต้นพืชปกติบริเวณใกล้ยอด 1 ครั้ง ทำแบบเดียวกันนี้จนครบ 10 ต้น และวิธีการที่ 7 ใช้ใบมีดสะอาดตัด

ลำต้นส่วนยอดของต้นพืชติดเชื้อ PCFVd จำนวน 1 ครั้ง และกรีดทำแผล จำนวน 3 ครั้ง บนลำต้นพืชปกติบริเวณใกล้ยอดบนต้นเดียวกัน ทำแบบเดียวกันนี้จนครบ 10 ต้น

4. การสังเกตอาการโรค เก็บตัวอย่างใบ และการสกัดอาร์เอ็นเอ

สังเกตอาการโรคทุกสัปดาห์หลังปลูกเชื้อ และเก็บตัวอย่างใบมะเขือเทศทดสอบที่ 8 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อทุกต้น ๆ ละ 2 ใบ ในตำแหน่งใบย่อยสุดท้ายของใบประกอบลำดับที่ 2 และ 3 นับจากใบยอดบนสุด โดยการตัดชิ้นเนื้อใบผ่านเส้นใบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ซม. จำนวนใบละ 1 ชิ้น ทำตัวอย่างใบพืชทดสอบให้แห้งสนิทด้วยซิลิกาเจล หลังจากนั้นบดตัวอย่างใบแห้งจนละเอียดเป็นผง สกัดอาร์เอ็นเอโดยนำตัวอย่างใบแห้งที่บดละเอียดแล้วใส่หลอด เติม CTAB extraction buffer (2% CTAB, 0.1M Tris-HCl, 0.02M EDTA, 1.4M NaCl, 1% Na_2SO_3 และ 2% PVP-40) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 65 ºซ. นาน 30 นาที และสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีการของปริเชษฐ์ และคณะ (2548)

5. การตรวจสอบยืนยันเชื้อ PCFVd ด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ PCFVd ชนิดอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ด้วย GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, USA) โดยทำปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการของ Kungwon *et al*. (2022) ด้วยไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบเชื้อ PCFVd แบบครบจีโนม มี reverse primer คือ PCF-seq_R ลำดับเบสประกอบด้วย 5' ACCCGCACGGCGCTTCTC 3' และ forward primer คือ PCF-seq_F ลำดับเบสประกอบด้วย 5' CCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCC 3' (Yanagisawa and Matsushita, 2017)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. อาการโรคที่เกิดจากเชื้อ PCFVd ในมะเขือเทศ

มะเขือเทศพันธุ์ "Rutgers" ที่ได้รับการปลูกเชื้อที่ระยะกล้าเริ่มแสดงอาการผิดปกติที่ 11 วันหลังการปลูกเชื้อ โดยแสดงอาการใบหดย่นม้วนเข้าหาเส้นกลางใบและก้านใบ หรือมีเนื้อเยื่อตายเล็กน้อยบริเวณเส้นใบเริ่มสังเกตได้จากใต้ใบที่ 14 วันหลังการปลูกเชื้อ มะเขือเทศแสดงอาการโรคชัดเจนมากขึ้น โดยมีอาการเนื้อเยื่อตายบริเวณเส้นใบเพิ่มมากขึ้น ข้อปล้องส่วนยอดหดสั้น ที่ 21 วันหลังการปลูกเชื้อ อาการของโรคแสดงชัดเจนและรุนแรงมากขึ้น ยอดชะงักการเจริญ ข้อปล้องส่วนยอดหดสั้นลง เนื้อเยื่อตาย บริเวณเส้นใบ ก้านใบ และลำต้นมากขึ้น ที่ 28 วันหลังการปลูกเชื้อ มะเขือเทศแสดงอาการต้นเตี้ยแคระเด่นชัดกว่าต้นไม่ปลูกเชื้อ มีอาการเหลืองของเนื้อใบรอบ ๆ เส้นใบที่แสดงอาการเนื้อเยื่อตาย ก้านใบคดงอ ใบยอดลดรูปและมีอาการปลายใบยอดไหม้ร่วมด้วย (Figure 1) นอกจากนี้ พบว่า มะเขือเทศทดสอบจะมีจำนวนต้นที่แสดงอาการโรคและระยะเวลาการพัฒนาอาการโรคได้แตกต่างกันในแต่ละวิธีการ (Table 1) แต่มีการพัฒนาลักษณะอาการโรคและความรุนแรงของโรคไปในแนวทางเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากเป็นเชื้อทดสอบและพืชทดสอบชนิดเดียวกัน

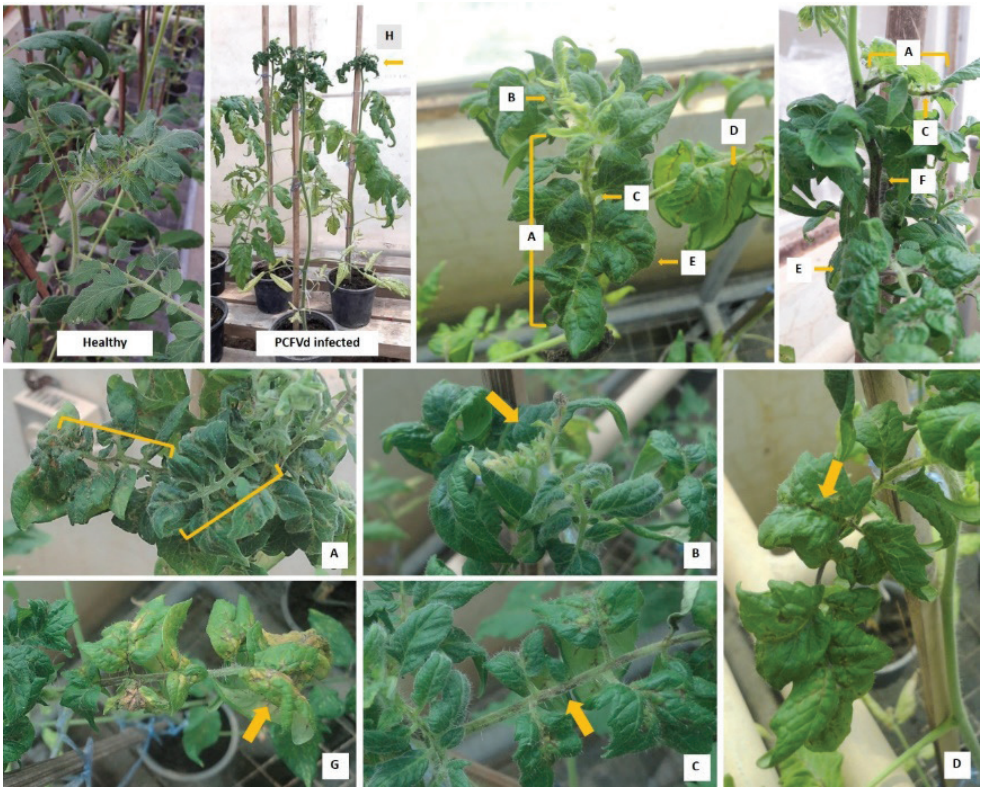

Figure 1 Symptom expression of PCFVd-infected Rutgers tomato, A = distorted petiole, B = small and necrotic apical leaves, C, D, F = necrosis of leaf vein, petiole and stem, E = leaf malformation, G = yellow leaf tissue next to vein necrosis, H = apical shoot and plant stunt

Table 1 Symptomatic express plant number in each week post inoculation, PCFVd detection by RT-PCR technique and infected plant percentage at 8 weeks post inoculation of Rutgers tomato

Method[1/]	symptomatic express plant number (infected plants/tested plants) at wpi[2/]								RT-PCR	
	1	2	3	4	5	6	7	8	8 wpi.	% infection
1	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	100
2	0/10	4/10	8/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	100
3	0/10	2/10	7/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	90
4	0/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	20
5	0/10	0/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	20
6	0/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	20
7	0/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10	70
8	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0

[1/] 1) PCFVd crude sap inoculation on leaves, 2) pressing on a leaf with PCFVd contaminated grove, 3) leaving contaminated grove 24 hr. under greenhouse condition before pressing on a leaf, 4) cutting an apical healthy stem with a PCFVd contaminated razor blade then take the cut-stem to plant, 5) cutting off an apical healthy stem with a PCFVd contaminated razor blade, 6) dipping a razor blade into PCFVd crude sap and doing a single slash in healthy plant stem, 7) slashing in healthy plant stem 3-times with a PCFVd contaminated razor blade, and 8) uninoculated plants used as control,

[2/] wpi = week post inoculation

ลักษณะอาการโรคที่แสดงออกของมะเขือเทศ สอดคล้องกับรายงานของ ปริเชษฐ์ และคณะ (2556) Kungwon *et al*. (2022) และ Reanwarakorn *et al*. (2011) พบว่า ระยะเวลาการแสดงอาการโรค จะเริ่มสังเกตได้ตั้งแต่ 11 วันหลังการปลูกเชื้อ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์เชื้อไวรอยด์ ระยะการเจริญเติบโตของพืช สายพันธุ์พืช สภาพอากาศและสิ่งแวดล้อมในขณะที่เชื้อเข้าทำลาย (Vazquez Prol *et al.,* 2021) และสุดท้ายคือ ประสบการณ์และความเชี่ยวชาญของผู้สังเกตอาการโรค โดยเฉพาะในช่วงแรกของการแสดงอาการโรคของต้นพืช ซึ่งถ้าตรวจพบอาการพืชผิดปกติได้รวดเร็วก็สามารถกำจัดแหล่งของโรคออกจากแปลงปลูกพืชจะช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อได้

2. ตรวจสอบยืนยันเชื้อ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR

หลังการปลูกเชื้อด้วยวิธีกลทั้ง 7 วิธี และตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ 8 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อ สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 350 คู่เบส ของเชื้อ PCFVd ในตัวอย่างใบมะเขือเทศจากแต่ละกรรมวิธีทดลองได้อย่างชัดเจน โดยพบว่า วิธีการที่ 1) ทาใบด้วยน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ PCFVd สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ PCFVd ทั้ง 10 ตัวอย่าง (แถบ/ตัวอย่าง) แสดงว่า มีการติดเชื้อทุกตัวอย่างที่ทดสอบ (Figure 2A) และวิธีการที่ 2) กดใบด้วยถุงมือปนเปื้อนเชื้อ PCFVd สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอทุกตัวอย่าง เช่นกัน (Figure 2B) รองลงมาคือ วิธีการที่ 3) กดใบด้วยถุงมือปนเปื้อนเชื้อ PCFVd หลังวางไว้ในโรงเรือนปลูกพืชนาน 24 ชม. พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 9 แถบ แสดงว่าเกิดการติดเชื้อ 90% (Figure 2C) วิธีการที่ 7) กรีดลำต้น 3 ครั้งด้วยใบมีดปนเปื้อนเชื้อ PCFVd ตรวจพบแถบดีเอ็นเอ 7 แถบ เป็นโรค 70 % (Figure 2G) และมีจำนวนต้นพืชทดสอบเป็นโรค 20 % เท่ากัน 3 วิธีการ ได้แก่ วิธีการที่ 4 ตัดลำต้นบริเวณยอดด้วยใบมีดปนเปื้อนเชื้อ PCFVd และนำยอดที่ตัดออกไปปักชำ วิธีการที่ 5 ตัดลำต้นบริเวณยอดทิ้งด้วยใบมีดปนเปื้อนเชื้อ PCFVd และวิธีการที่ 6 กรีดลำต้น 1 ครั้ง ด้วยใบมีดจุ่มน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ PCFVd โดยเปรียบเทียบกับวิธีการที่ 8 มะเขือเทศไม่ปลูกเชื้อ จากผลการตรวจสอบทั้งการสังเกตอาการโรคและเทคนิค RT-PCR จะให้ผลสอดคล้องกัน (Table 1 และ Figure 2)

จากผลการทดลองพบว่า พืชทดสอบมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อที่แตกต่างกัน การปลูกเชื้อด้วยการทาใบด้วยน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการปลูกเชื้อทั้งไวรัสและไวรอยด์ที่สามารถถ่ายทอดเชื้อได้โดยวิธีกล สำหรับวิธีกดใบด้วยถุงมือปนเปื้อนเชื้อซึ่งเลียนแบบการสัมผัสต้นมะเขือเทศแบบที่เกษตรกรทำขณะปฏิบัติงานต่าง ๆ เช่น การตอนดอก การผสมเกสร และการเกิดบาดแผลจากเครื่องมือที่ใช้ในแปลงต่าง ๆ ทั้ง 2 วิธีนี้เหมาะสมสำหรับการปลูกเชื้อในงานทดลองต่าง ๆ เนื่องจากทำให้ต้นมะเขือเทศทดสอบเป็นโรค 100% โดยเฉพาะวิธีการกดใบให้เกิดแผลแม้เพียงเล็กน้อยบนพืชทดสอบสามารถทำให้พืชทดสอบเกิดโรคได้ครบทั้ง 10 ต้น อีกทั้งวิธีการปลูกเชื้อทำได้สะดวกและรวดเร็ว โดยใช้เชื้อต้นตอจากใบพืชติดเชื้อ PCFVd ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. จำนวน 1 ชิ้น สามารถปลูกเชื้อได้ถึง 10 ต้น และได้ผลดีเท่ากับวิธีการทาใบพืชที่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมน้ำคั้นพืชติดเชื้อก่อนการปลูกเชื้อ สอดคล้องกับการศึกษาของเชื้อ PSTVd ในมะเขือเทศพันธุ์ “Sheyenne” โดยการใช้นิ้วปนเปื้อนเชื้อ 3 นิ้ว คือ นิ้วหัวแม่มือ นิ้วชี้ และนิ้วกลาง ทาเบา ๆ ที่ใบของพืชทดสอบโดยไม่มีสิ่งที่ช่วยทำแผล (non-carborundum-dust) พบว่ามะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ PSTVd ที่ได้มาจากพืช *Solanum jasminoides* แสดงการเป็นโรคครบทุกต้น (Verhoeven *et al*., 2010) นอกจากนี้

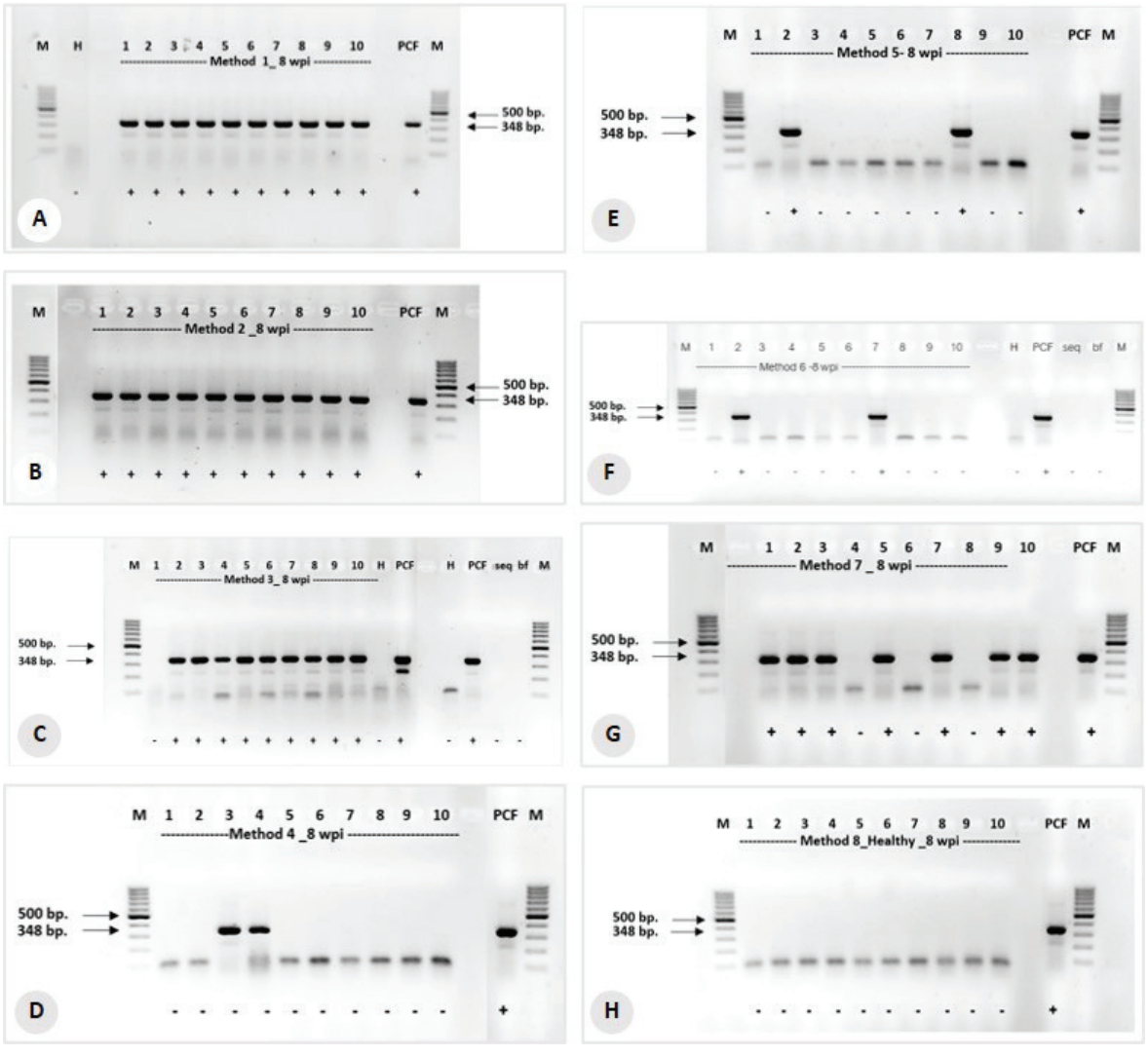

Figure 2 2% agarose gel electrophoresis of reverse transcription-polymerase chain reaction products of PCFVd detection at 8 week post inoculation. A = 1st method, PCFVd crude sap inoculation on leaves, B =2nd method, pressing on a leaf with PCFVd contaminated grove, C = 3rdmethod, leaving contaminated grove 24 hrs under greenhouse condition before pressing on a leaf, D = 4thmethod, cutting an apical healthy stem with a PCFVd contaminated razor blade then take the cut-stem to plant, E = 5thmethod, cutting off an apical healthy stem with a PCFVd contaminated razor blade, F = 6thmethod, dipping a razor blade into PCFVd crude sap and doing a single slash in healthy plant stem, G = 7thmethod, slashing in healthy plant stem 3-times with a PCFVd contaminated razor blade, and H = 8thmethod, uninoculated plants used as control

วิธีกดใบด้วยถุงมือปนเปื้อนเชื้อหลังเก็บไว้ 24 ชม. ในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง พบเป็นโรค 90 % ก็สอดคล้องกับ Mackie *et al*. (2015) ที่ทดลองเก็บเชื้อ PSTVd ไว้บนวัสดุต่าง ๆ เช่น ยาง (rubber - inner tube) นาน 24 ชม. ยังคงทำให้มะเขือเทศ “Grosse Lisse” เป็นโรคได้ สำหรับการกรีดทำแผลบนต้นพืชทดสอบด้วยใบมีดปนเปื้อนเชื้อ ซึ่งเลียนแบบจากการตัดแต่งต้นพืชหรือการตัดขณะเก็บเกี่ยวผลผลิตของเกษตรกร ซึ่งก่อให้เกิดบาดแผลได้ แม้ว่าวิธีการเหล่านี้จะได้ผลดีในระดับหนึ่ง โดยเป็นโรค 20-70% ทั้งนี้ชนิดของวัสดุที่เชื้อปนเปื้อน มีส่วนทำให้การคงสภาพของเชื้อแตกต่างกัน เช่นเดียวกับการทดลองในเชื้อ CLVd ที่ใช้ใบมีดปนเปื้อนเชื้อกรีดตามยาวทำแผลบนต้นมะเขือเทศทำให้มะเขือเทศเป็นโรค 30-70% (สุวิมล และคนึงนิตย์, 2562) สำหรับเชื้อไวรอยด์ที่ทำให้เกิดโรคในส้ม ได้แก่ *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Citrus viroid* III (CVd-III), and *Citrus viroid* IV (CVd-IV) พบว่าใบมีดสามารถช่วยแพร่กระจายเชื้อไวรอยด์ดังกล่าวไปยังพืชต้นใหม่ได้เช่นกันโดยมีอัตราการติดเชื้อแตกต่างกันไป (Barbosa *et al*. 2005) การศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อ CSVd โดยการใช้ใบมีดปนเปื้อนเชื้อตัดต้นเบญจมาศพบการถ่ายทอดเชื้ออยู่ระหว่าง 29.4-58.8% ขึ้นอยู่กับจำนวนครั้งของการตัด (Chung *et al*., 2009) จากการทดลองข้างต้นนอกจากจะได้วิธีการปลูกเชื้อ PCFVd ที่เหมาะสม ยังชี้ให้เห็นว่าการปนเปื้อนของเชื้อบนอุปกรณ์ที่เกษตรกรใช้สามารถเป็นเครื่องมือในการแพร่กระจายเชื้อในระบบการผลิตพืชได้

สรุปผลการทดลอง

มะเขือเทศพันธุ์ “Rutgers” หลังได้รับการปลูกเชื้อ PCFVd 8 สัปดาห์ แสดงอาการต้นเตี้ย แคระ ข้อปล้องส่วนยอดหดสั้น เนื้อเยื่อตายบริเวณเส้นใบ ก้านใบ และลำต้น ส่วนใบมีอาการเหลืองของเนื้อใบรอบ ๆ เส้นใบที่แสดงอาการเนื้อเยื่อตาย ใบหดหงิกงอ ก้านใบคดงอ ใบยอดลดรูปและอาการปลายใบยอดไหม้ การทดสอบการถ่ายทอดเชื้อด้วยวิธีกล 7 วิธีการปลูกเชื้อ และตรวจสอบผลการติดเชื้อด้วยการสังเกตอาการโรคด้วยสายตา และตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า การถ่ายทอดเชื้อด้วยวิธีการที่ 1 คือทาใบด้วยน้ำคั้นใบพืชติดเชื้อ PCFVd และวิธีการที่ 2 กดใบด้วยถุงมือปนเปื้อนเชื้อ PCFVd ทำให้การเกิดโรคสูงที่สุด คือ 100% รองลงมาคือ วิธีการที่ 3 และวิธีการที่ 7 สามารถทำให้เกิดโรค 90 และ 70% ตามลำดับ ดังนั้น ผู้เกี่ยวข้องสามารถนำวิธีการดังกล่าวไปใช้ในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ เพื่อสามารถนำไปใช้กับงานปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานโรค และเป็นแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคในแปลงผลิตพืชด้วย

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือเพื่อใช้ในงานศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ คนึงนิตย์ เหรียญวรากร เสริมศิริ จันทร์เปรม และรัชนี ฮงประยูร. 2548. ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศ 6 ชนิด ในกลุ่ม Pospiviroid ด้วยเทคนิค RT-PCR. *ว.โรคพืช*. 19(1-2): 13-21.

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ คนึงนิตย์ เหรียญวรากร และวิภา เกิดพิพัฒน์. 2556. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) และ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ในพืชวงศ์ Solanaceae. *ว.วิชาการเกษตร*. 31(2): 108-122.

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย กาญจนา วาระวิชะนี และวันเพ็ญ ศรีชาติ. 2555. การตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) ที่ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ. หน้า 1859-1889. *ใน:* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564. ข้อมูลการผลิตมะเขือเทศบริโภค. แหล่งข้อมูล: https://mis-app.oae.go.th/product/ มะเขือเทศบริโภค. สืบค้น 15 กันยายน 2564.

สุวิมล เหล่าม่โนธรรม และคนึงนิตย์ เหรียญวรากร. 2562. การเคลื่อนที่และการถ่ายทอดด้วยวิธีกลของเชื้อ *Columnea latent viroid. ว.เกษตรพระจอมเกล้า.* 37(1): 32-42.

ศรีวิเศษ เกษสังข์ ชลธิชา รักใคร่ นงพร มาอยู่ดี ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ วันเพ็ญ ศรีชาติ วานิช คำพานิช โสภา พิศวงปราการ ณัฏฐพร อุทัยมงคล และสุรพล ยินอัศวพรรณ. 2553. การตรวจสอบและรับรองการปลอดศัตรูพืชในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. แหล่งข้อมูล: https:// www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=837 สืบค้น: 16 กันยายน 2564.

Antignus, Y., O. Lachman and M. Pearlsman. 2007. Spread of tomato apical stunt viroid (TASVd) in greenhouse tomato crops is associated with seed transmission and bumble bee activity. *Plant Dis*. 91: 47-50.

Barbosa, C.J., J.A. Pina, J. Pérez-Panadés, L. Bernad, P. Serra and L. Navarro. 2005. Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Dis.* 89: 749-754.

Chambers, G.A., A.M. Seyb, J. Mackie, F.E. Constable, B. Rodoni, D.S. Letham, K. Davis, and M.J. Gibbs. 2013. First Report of Pepper chat fruit viroid in Traded Tomato Seed, an Interception by Australian Biosecurity. *Plant disease.* 97(10): 1386.

Chung, B.N., J. Cho, I.S. Cho and G.S. Choi. 2009. Transmission of Chrysanthemum Stunt Viroid in Chrysanthemum by Contaminated Cutting Tool. *Hortic Environ Biotechnol.* 50: 536-538.

Cohen, O., O. Batuman, Y. Moskowits, A. Rozov, E. Gootwine, M. Mawassi and M. Bar-Joseph. 2005. Goat horns: Platforms for viroid transmission to fruit trees. *Phytoparasitica*. 33(2): 141-148.

Constable F., G. Chambers, L. Penrose, A. Daly, J. Mackie, K. Davis, B. Rodoni and M. Gibbs. 2019. Viroid-infected Tomato and Capsicum Seed Shipments to Australia. *Viruses* 11(2): 98.

Diener, T.O. 1987. *The Viroids*. Plenum Press, Inc., New York. 344 p.

Di Serio, F., R.A. Owens, S. Li, J. Matoušek, V. Pallás, J.W. Randles, T. Sano, J. Th. J. Verhoeven, G. Vidalakis and R. Flores. 2021. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Pospiviroidae*, *J. General Virol*. 102(2): 001543.

Fagoaga, C. and N. Duran-Vila. 1996. Naturally occurring variants of *Citrus exocortis viroid* in vegetable crops. *Plant Pathol*. 45(1): 45-53.

Flores, R., C. Hernández, A.E. Martínez de Alba, J.A. Daròs and F. Di Serio. 2005. Viroids and Viroid-Host Interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.*43(1): 117-139.

Galindo, J.A., D.R. Smith and T.O. Diener. 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology*. 72: 49-54.

Hadidi, A., R, Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik. 2003. *Viroids*, CSIRO Publishing, Collingwood VIC, Australia. 370 p.

Hadidi, A., L. Sun and J.W. Randles. 2022. Modes of Viroid Transmission. *Cells*. 11(4): 719.

Hammond, R., D.R. Smith and T.O. Diener. 1989. Nucleotide sequence and proposed secondary structure of *Columnea latent viroid*: a natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Res.* 17(23): 10083-10094.

Kungwon, P., C. Netwong, S. Porsoongnoen and K. Reanwarakorn. 2022. Chrysanthemum stunt viroid as a protective viroid isolate against *Columnea latent viroid* and Pepper chat fruit viroid in tomato plants. *Int. J. Agri. Tech.* 18(4): 1601-1618.

Leichtfried, T., H. Reisenzein, S. Steinkellner and R.A. Gottsberger. 2020. Transmission studies of the newly described apple chlorotic fruit spot viroid using a combined RT-qPCR and droplet digital PCR approach. *Arch. Virol*. 165: 2665-2671.

Mackie, A.E., B. A. Coutts, M. J. Barbetti, B. Rodoni, S.J. McKirdy and R. A. C. Jones. 2015. Potato spindle tuber viroid: Stability on common surfaces and inactivation with disinfectants. *Plant Dis*. 99 (6): 770-775.

Matsuura, S., Y. Matsushita, R. Kozuka, S. Shimizu and S. Tsuda. 2010. Transmission of *Tomato chlorotic dwarf viroid* by bumblebees (Bombus ignites) in tomato plants. *Eur. J. Plant Pathol*. 126: 111-115.

Mishra M.D, R.W. Hammond, R.A. Owens, D.R. Smith and T.O. Diener. 1991 Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of *Citrus exocortis viroid*. *J Gen Virol* 72: 1781-1785.

Reanwarakorn K, S. Klinkong and J. Porsoongnurn. 2011. First Report of Natural Infection of *Pepper chat fruit viroid* in Tomato Plants in Thailand. *New Disease Reports*. 24: 6.

Serra, P., A. Carbonell, B. Navarro, S. Gago-Zachert, S. Li, F. Di Serio and R. Flores. 2020. Symptomatic plant viroid infections in phytopathogenic fungi: A request for a critical reassessment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 117: 10126-10128.

Singh, R.P. X. Nie and M. Singh. 1999. *Tomato chlorotic dwarf viroid*: an evolutionary link in the original of *Pospiviroids*. *J. General Virol.* 80: 2823-2828.

Vazquez Prol, F., J. Marquez-Molins, I. Rodrigo, M.P. Lopez-Gresa, J.M. Belles, G. Gomez, V. Pallas and P. Lison. 2021. Symptom Severity, Infection Progression and Plant Responses in Solanum Plants Caused by Three Pospiviroids Vary with the Inoculation Procedure. *Int. J. Mol. Sci.* 22(12): 6189.

Verhoeven J.T.J., C.C.C Jansen, T.M. Willemen, L.F.F. Kox, R.A. Owens and J.W. Roenhorst. 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *Eur J Plant Pathol.* 110: 823-831.

Verhoeven, J.T.J., C.C.C. Jansen, J.W. Roenhorst, R. Flores and M. de la Peña. 2009. *Pepper chat fruit viroid*: Biological and molecular properties of a proposed new species of the genus *Pospiviroid*. *Virus Res.* 144(1–2): 209-214.

Verhoeven, J.Th.J., R. A. Owens and J.W. Roenhorst, 2011. *Mexican papita viroid* and *Tomato planta macho virid* belong to a single species in genus *Pospiviroid*. *Arch. Virol.* 156: 1433-1437.

Verhoeven, J.T.J., L. Hunter, M. M. Virscek, P. I. Mavric and J. W. Roenhorst. 2010. Mechanical transmission of potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveoles*, *Solanum jasminoides* and potato and tomatoes. *Eur. J. Plant Pathol*. 128: 417-421.

Walia, Y. S. Dhir, A. A. Zaidi and V. Hallan. 2015. *Apple scar skin viroid* naked RNA is actively transmitted by the whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *RNA Biol*. 12: 1131-1138.

Wei, S., R. Bian, I. B. Andika, E. Niu, Q. Liu, H. Kondo, L. Yang, H. Zhou, T. Pang, Z. Lian and et al. 2019. Symptomatic plant viroid infections in phytopathogenic fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 116: 13042-13050.

Yanagisawa, H. and Y. Matsushita. 2017. Host ranges and seed transmission of *Tomato planta macho viroid* and *Pepper chat fruit viroid*. *Eur J. Plant Pathol.* 149: 211-217.