

Candidatus phytoplasma solani สาเหตุโรคของมะละกอที่เกิดจากไฟโตพลาสมาในประเทศไทย

Candidatus phytoplasma solani associated with papaya phytoplasma disease in Thailand

ศิริพร ดอนเหนือ^{1*}, บุญยาพร ภาควณิ¹ และ เกรียงศักดิ์ ไทยพงษ์²

Siriporn Donnua^{1*}, Boonyaporn Parkpoom¹ and Kriengsak Thaipong²

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ประเทศไทย 73140

¹ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Khamphaeng Saen, Kasetsart University, Khamphaeng Saen campus, Nakhonpathom province, Thailand, 73140

² ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ประเทศไทย 73140

² Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Khamphaeng Saen, Kasetsart University, Khamphaeng Saen campus, Nakhonpathom province, Thailand, 73140

บทคัดย่อ: โรคที่เกิดจากไฟโตพลาสมาของมะละกอเป็นโรคที่พบการแพร่ระบาดมากในหลายประเทศนานนับทศวรรษ ก่อให้เกิดอาการเหลืองไหม้จากปลายยอด และด่าง แต่ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย รายงานนี้เป็นารพบเชื้อ *Candidatus* Phytoplasma solani สาเหตุโรคของมะละกอในประเทศไทยเป็นครั้งแรก ทำการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในมะละกอที่แสดงอาการคล้ายโรคที่เกิดจากไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ P1/P7 และ R16F2n/R16R2 ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA พบเชื้อในตัวอย่างที่แสดงอาการ 6 ลักษณะ ได้แก่ 1) อาการใบเหลือง แผลไหม้จากขอบใบเข้าหาเส้นใบ 2) อาการคล้าย bunchy top 3) อาการแตกยอดข้างลำต้น ใบหนา ย่น ผิดรูป และเหลือง 4) อาการเส้นใบเขียว 5) อาการใบยอดเหลือง และ 6) อาการใบย่นและด่างเขียว เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบเซลล์ไฟโตพลาสมาภายในเซลล์ท่ออาหารของตัวอย่างมะละกอที่ตรวจพบเชื้อด้วย Nested PCR ทำการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA และส่งเก็บข้อมูลไปยัง GenBank, NCBI จำนวน 6 ไอโซเลท ได้รับหมายเลข accession ดังนี้ MT548611, MT548613, MT548614, MW464326, MW464330 และ MW533147 เมื่อทำการวิเคราะห์ Phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคมะละกอในต่างประเทศ จำนวน 17 ตัวอย่าง จากฐานข้อมูล พบว่า MT548614, MW464326 และ MW464330 จัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกับเชื้อ *Ca. Phytoplasma solani* สาเหตุโรคในมะละกอของไต้หวัน และจากการวิเคราะห์ pairwise distance พบว่ามีค่าความเหมือน 100% ส่วน MT548611, MT548613 และ MW533147 จัดได้เป็นกลุ่มย่อยอื่น ส่วนการเปรียบเทียบความเหมือนในระหว่างเชื้อทั้ง 6 ไอโซเลท พบว่ามีค่า 99.86-100%

คำสำคัญ: มะละกอ; ไฟโตพลาสมา; ยอดเหลือง; ไหม้; ตรวจวินิจฉัย

ABSTRACT: Papaya disease caused by phytoplasma has been found severely epidemic in several countries for decades. The disease symptoms include yellows, dieback and mosaic types are similarly seen but has never been reported in Thailand. This is the first report of diseased papaya arisen by *Candidatus* Phytoplasma solani in Thailand. Detection of phytoplasma in symptomatic papayas by Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR) using P1/P7 and R16F2n/R16R2 to amplify 16Sr RNA gene. Results showed positive in different six symptoms including; 1) yellow necrosis, 2) bunchy top-like, 3) yellow crinkle, 4) green vein, 5) yellow shoot, and 6) crinkle & mosaic/ mottle. The pleomorphic cells of phytoplasma in sieve cells of Nested PCR positive papaya samples were

* Corresponding author: fagrspd@ku.ac.th

clearly visualized using transmission electron microscopy. Nucleotides of phytoplasma six isolates were sequenced and submitted as accession no. MT548611, MT548613, MT548614, MW464326, MW464330 and MW533147 in GenBank, NCBI database. Phylogenetic tree analysis of nucleotide sequences was analyzed to compared with 17 papaya phytoplasma sequences that found in foreign countries from GenBank database. Results showed that MT548614, MW464326 and MW464330 were clustered in the same subgroup with *Ca. Phytoplasma solani*, of papaya in Taiwan due to their 100% similarity by pairwise distance analysis, while MT548611, MT548613 and MW533147 were clustered in different subgroup. A close relation among these six isolates was also shown to be 99.86 – 100 % by similarity comparison.

Keywords: papaya; phytoplasma; yellow shoot; necrosis; diagnosis

บทนำ

ไฟโตพลาสมา (*Candidatus Phytoplasma* spp.) เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ใน Class Mollicutes เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อาศัยและเจริญอยู่ภายในท่ออาหารพืชบริเวณ sieve cell ถ่ายทอดผ่านกิ่งพันธุ์ ท่อนพันธุ์ และแมลงพาหะจำพวกแมลงปากดูด ในประเทศไทยมีการค้นคว้าวิจัยด้านต่างๆ เกี่ยวกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น โรคใบขาวอ้อย โรคแตกพุ่มฝอยงา โรคใบสีแสดของข้าว เพื่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคได้อย่างรวดเร็ว การลดการแพร่ระบาดและหาแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคอย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพ (สุภาพร, 2552) มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ นิยมปลูกในหลายประเทศทั่วโลกแถบพื้นที่เขตร้อนและกึ่งร้อน เช่น ทวีปเอเชีย อเมริกากลาง ออสเตรเลีย และแอฟริกาเพื่อการบริโภคอุตสาหกรรมยา และเครื่องสำอาง ถึงแม้ว่ายังไม่พบรายงานโรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาในพื้นที่ปลูกมะละกอในประเทศไทยอย่างเป็นทางการแต่นับว่ามีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและแพร่ระบาด เนื่องจากมีรายงานการพบไฟโตพลาสมาที่เข้าทำลายมะละกอในหลายประเทศ เช่น ในพื้นที่ปลูกมะละกอของประเทศออสเตรเลียพบโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไฟโตพลาสมา 3 ลักษณะอาการ ได้แก่ ใบเหลืองย่น (yellow crinkle) ไหม้หรือตายจากปลายยอด (dieback) และใบด่าง (mosaic) ทำให้เกิดความเสียหายของผลผลิตได้ถึง 100% โดยลักษณะอาการดังกล่าวนี้พบที่ใบ ก้านใบ และยอดของมะละกอ เชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคนี้อยู่ในกลุ่มเดียวกับไฟโตพลาสมาที่ก่อให้เกิดโรคยอดเหลืองของแอสเตอร์ (Gibb et al., 1998) รายงานเชื้อสาเหตุโรคของมะละกอที่แสดงอาการไหม้หรือตายจากปลายยอดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA เหมือนกับเชื้อ *Ca. Phytoplasma australiense* 99.7% (White et al., 1998) มีการสำรวจโรคในอ้อย ข้าวฟ่าง มะละกอ และพืชวงศ์หูกวาง ในประเทศคิวบาตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาจากมะละกอที่แสดงอาการคล้ายโรค bunchy top และจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาเป็น *Ca. Phytoplasma caricae* (Arocha et al., 2005) มีการตรวจพบการเข้าทำลายมะละกอร่วมกันของเชื้อไวรัสจุดวงแหวน และไฟโตพลาสมา *Ca. Phytoplasma aurantifolia* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrII (Arocha et al., 2009) พบการเกิดโรคของมะละกอที่มีอาการเหลืองที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาในแถบภาคกลางของไต้หวัน มีสาเหตุจากเชื้อ *Ca. Phytoplasma solani* กลุ่มย่อย 16SrXII-A โดยพบ 30-35% ในบางช่วงของฤดูปลูกระหว่างปี ค.ศ. 2006-2010 (Bau et al., 2011) โรคตายจากปลายยอดของมะละกอ (Papaya dieback) โรคปลายยอดไหม้ ม้วนงอของมะละกอ หรือ Papaya apical curl necrosis (PACN) ทำให้พืชแสดงอาการใบเหลือง ปลายใบม้วนงอ ปล้องสั้น ยอดแตกเป็นพุ่ม ยอดอ่อนเกิดอาการไหม้ ใบร่วง และเกิดอาการไหม้จากปลายยอด เมื่อนำมาตรวจด้วยวิธี PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA แล้วจัดจำแนกด้วยวิธี RFLP และวิเคราะห์ Phylogenetic tree พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrXIII-E ในขณะที่หลายประเทศรายงานไว้ว่าเชื้อไฟโตพลาสมาที่เข้าทำลายมะละกอจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI, 16SrII, 16SrX, 16SrXII, 16SrXVII (Melo et al., 2013) มีรายงานโรคที่เกิดจากไฟโตพลาสมาของมะละกอในอินเดียที่ทำให้เกิดอาการแตกตาข้างบริเวณลำต้น (axillary shoot proliferation) เกิดจากเชื้อ *Ca. Phytoplasma aurantifolia* จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrII (Verma et al., 2012) มีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในมะละกอที่แสดงอาการใบเหลืองด้วยปฏิกิริยา Nested PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ P1/P7 และ R16F2n/R16R2 ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอประมาณ 1.2 kb ในมะละกอที่แสดงอาการแต่ตรวจไม่พบในมะละกอที่ไม่แสดงอาการ (Abeyasinghe et al., 2014) มีการศึกษามะละกอที่แสดงอาการไหม้จากปลายยอดอาการเหลืองและไหม้ในประเทศอินเดีย โดยใช้เทคนิค Nested PCR พบแถบดีเอ็นเอประมาณ 1.2 kb เมื่อวิเคราะห์ RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* และ *RsaI* พบว่าเป็นเชื้อ *Ca. Phytoplasma aurantifolia*

จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrII (Rao et al., 2011) และพบไฟโตพลาสมาเข้าทำลายมะละกอในทางตอนเหนือของเปรู ในช่วงปี ค.ศ. 2015-2016 ก่อให้เกิดอาการแตกพุ่มบริเวณยอดคล้ายโรค bunchy top คือ แตกตาข้างจำนวนมากใกล้ๆ บริเวณยอด ปล้องสั้น ใบเหลือง เส้นใบไหม้ ผลจากการตรวจด้วย Nested PCR และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยืนยันว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อ *Ca. Phytoplasma brasiliense* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานว่าเชื้อสปีชีสนี้เข้าทำลายมะละกอมาก่อน และเป็นสปีชีส์เดียวกันกับเชื้อที่เข้าทำลายองุ่นในเปรู (Wei et al., 2017) เนื่องจากประเทศไทยมีการปลูกมะละกอทั้งเพื่อบริโภคในครัวเรือน เพื่อจำหน่ายทั้งในและนอกประเทศ โดยบริโภคผลสุก ผลดิบ และเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรม มีการปลูกกระจายในทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ ซึ่งมีความเสี่ยงในการพบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรค และหากมีการแพร่ระบาดจะส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมปลูกมะละกออย่างมาก งานวิจัยครั้งนี้จึงทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างใบมะละกอที่มีความผิดปกติคล้ายอาการของโรคที่เกิดจากไฟโตพลาสมานำมาตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค Nested PCR แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA เปรียบเทียบกับเชื้อในฐานข้อมูลเพื่อจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุและยืนยันด้วยการตรวจดูเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคที่ถูกต้องจะนำไปสู่การควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพเพื่อลดความเสียหายจากการแพร่ระบาดของโรคนี้อีกต่อไป

วิธีการศึกษา

การสำรวจและเก็บตัวอย่างมะละกอ

เก็บตัวอย่างมะละกอที่แสดงอาการคล้ายโรคที่เกิดจากไฟโตพลาสมา ได้แก่ ใบเหลือง ยอดเหลือง ยอดไหม้ เส้นใบเขียว ยอดแตกเป็นกระจุกและใบด่าง ในแปลงปลูกมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ในช่วงเดือนเมษายน ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2563 โดยเก็บประมาณใบที่ 3 นับจากยอดแล้วห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์หรือใส่ในกล่องขึ้นเพื่อให้ตัวอย่างคงสภาพธรรมชาติมากที่สุดก่อนนำมาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Nested PCR

ตัดเอาเส้นกลางใบมะละกอและชั่งให้ได้ประมาณ 0.1 กรัม นำมาบดในไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งบดตัวอย่างจนเป็นผงละเอียด แล้วนำมาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธี CTAB (Sambrook et al., 1989) จากนั้นนำมาตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธี Nested PCR โดยใช้ universal primers สำหรับตรวจยีน 16S-23S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา คือ ใช้คู่ไพรเมอร์ P1: 5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3' / P7: 5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3' (Christensen et al., 2013) ในการทำปฏิกิริยารอบแรก มีดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 1.8 kb โดยใช้ชุดปฏิกิริยา KOD FX Neo (Toyobo, Japan) ในปฏิกิริยารวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2x PCR buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร 25 mM dNTPs (Toyobo, Japan) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร จีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 20 mM P1 (forward primer) และ 20mM P7 (reverse primer) ปริมาตรอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร 4 unit/ul KOD FX Neo (DNA polymerase) ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร dH₂O ปริมาตร 4.1 ไมโครลิตร ใช้ dH₂O และตัวอย่างมะละกอที่เพาะจากเมล็ดโดยปลูกไว้ในโรงเรือนกันแมลงเป็น negative control และตัวอย่างอ้อยที่เป็นโรคใบขาวที่เกิดจากไฟโตพลาสมาเป็น positive control สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม T-Professional (Thermocycler, Germany) โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาเป็นวงจรลูกโซ่ 35 รอบ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาในรอบแรกมาเจือจาง 10 เท่า แล้วนำมาทำปฏิกิริยาต่อในรอบที่สองเพื่อสังเคราะห์ยีน 16S rRNA ด้วยไพรเมอร์ R16F2n: 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3' / R16R2: 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3' (Christensen et al., 2013) ซึ่งมีดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 1.2 kb โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับในรอบแรก แต่ต่างที่อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส จากนั้น

ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาดัวยวิธี gel electrophoresis บน 1.0% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที ตรวจแถบดีเอ็นเอของผลจากปฏิกิริยาทั้งในรอบแรกและรอบที่สองและบันทึกผล

การตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM)

เตรียมตัวอย่างใบมะละกอ ไอโซเลท NKT015 ที่แสดงอาการใบเหลือง แผลไหม้จากขอบใบเข้าหาเส้นใบ และมีผล Nested PCR เป็นบวกและตัวอย่างใบมะละกอกปกติ (C1) และมีผล PCR เป็นลบเพื่อใช้เป็น negative control เตรียมตัวอย่างโดยตัดเอาเนื้อเยื่อบริเวณเส้นกลางใบมาทำการดอง (fixation) ใน glutar และ paraformaldehyde ล้างตัวอย่างด้วย buffer solution จากนั้นนำไปแช่ใน 1% Osmium tetroxide (OsO_4) และล้างออกด้วย buffer solution กำจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ด้วย ethanol series จากนั้นหล่อเนื้อเยื่อในพลาสติก (embedding) โดยแช่ตัวอย่างใน resin นำตัวอย่างไปตัดเนื้อเยื่อในพลาสติกให้เป็นแผ่นบาง (ultrathin section) ด้วยเครื่อง ultramicrotome ของบริษัท Leica UltraCut UCT Microtome รุ่น Model 70620 วางแผ่นเนื้อเยื่อบน copper grid และย้อมแผ่นเนื้อเยื่อแบบ positive staining ด้วย Uranyl acetate และ Lead solution (ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน) จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ของบริษัท Hitachi รุ่น HT7700 (ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA และวิเคราะห์ Phylogenetic tree

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA เชื้อไฟโตพลาสมา จำนวน 6 ไอโซเลท โดยเลือกตัวแทนจากมะละกอที่แสดงอาการแตกต่างกัน ได้แก่ TH-NKT015 (yellow necrosis), TH5-2 (yellow crinkle), TH7-2 (bunchy top-like), TH9-11 (green vein), TH-NKT-PK21 (crinkle & mosaic/ mottle) และ TH-NKT-P26 (yellow shoot) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ R16F2n/R16R2 ดังที่กล่าวข้างต้น แล้วส่งให้บริษัท Solgent ประเทศเกาหลีใต้เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มา edit และ align โดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 (MEGA 6.0) จากนั้นทำการ Blast เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์เชื้อในฐานข้อมูล GenBank, NCBI และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาจากฐานข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ Phylogenetic tree และ Pairwise distance เพื่อหาความสัมพันธ์และจัดกลุ่มเชื้อ

ผลการศึกษา

การสำรวจและเก็บตัวอย่างมะละกอ

สำรวจและเก็บตัวอย่างใบมะละกอที่แสดงลักษณะอาการผิดปกติทั้งหมด 81 ต้น แสดงอาการ 6 ลักษณะ ได้แก่ 1) อาการใบเหลืองแผลไหม้จากขอบใบเข้าหาเส้นใบ (yellow necrosis) พบบริเวณใบที่ 3-4 นับจากยอด (Figure 1a) จำนวน 9 ตัวอย่าง 2) อาการแตกยอดเป็นกระจุกปล้องสั้น ใบหนา ผิดรูป (bunchy top-like) (Figure 1b) จำนวน 11 ตัวอย่าง 3) อาการแตกยอดบริเวณข้างลำต้นเป็นกระจุกใบหนา ย่น ผิดรูป และเหลือง (yellow crinkle) (Figure 1c) มักพบในระยะฟื้นฟูต้น (recovery stage) ของอาการแบบที่ 2 จำนวน 27 ตัวอย่าง 4) อาการเส้นใบเขียว (green vein) คล้ายอาการขาดธาตุอาหาร ใบหนา ผิดรูป แตกยอดบริเวณข้างลำต้น (Figure 1d) จำนวน 18 ตัวอย่าง 5) อาการใบยอดเหลือง (yellow shoot) (Figure 1e) จำนวน 8 ตัวอย่าง และ 6) อาการใบย่นและด่างเขียว (crinkle & mosaic/ mottle) คล้ายอาการที่เกิดจากไวรัส (Figure 1f) จำนวน 8 ตัวอย่าง และมะละกอกปกติที่ไม่แสดงอาการของโรคในแปลงปลูก (Figure 1g) จำนวน 10 ตัวอย่าง รวมทั้งมะละกอที่เพาะจากเมล็ดและปลูกไว้ในโรงเรือนกันแมลงที่ไม่แสดงอาการทั้ง 6 ลักษณะดังกล่าว จำนวน 2 ตัวอย่าง (Figure 1h)

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Nested PCR

ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างมะละกอที่แสดงอาการผิดปกติ จำนวน 81 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ P1/P7 และ R16F2n/R16R2 ซึ่งเป็น universal primers พบเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างมะละกอที่แสดงอาการผิดปกติ ทั้ง 6 ลักษณะที่กล่าวในข้างต้น จำนวน 78 ตัวอย่าง คิดเป็น 96.30% ของตัวอย่างที่แสดงอาการผิดปกติ โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.8 kb (Figure 2a) และ 1.2 kb (Figure 2b) เมื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้ไพรเมอร์ P1/P7 และ R16F2n/R16R2 ตามลำดับ และพบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างอ้อยที่เป็นโรคใบขาวที่เกิดจากไฟโตพลาสมาที่ใช้เป็น positive control แต่ตรวจไม่พบในตัวอย่างมะละกอที่ไม่แสดงอาการที่เก็บมาจากแปลงทั้ง 10 ตัวอย่าง รวมถึงต้นที่เพาะจากเมล็ดที่ปลูกไว้ในโรงเรือนกันแมลงทั้ง 2 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบในมะละกอที่แสดงอาการผิดปกติ จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ไอโซเลท NKT-P4 (yellow crinkle) NKT-P7 (bunchy top-like) และ 15-14 (yellow necrosis)

การตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM)

ตรวจพบเซลล์เชื้อไฟโตพลาสมาที่มีรูปร่างหลายแบบ (pleomorphic cells) ภายในเซลล์ท่ออาหารบริเวณ sieve cell ของตัวอย่างใบมะละกอ ไอโซเลท NKT015 ที่มีผล Nested PCR เป็นบวก แต่ไม่พบในตัวอย่างใบมะละกอปกติ (C1) ที่ไม่แสดงอาการโรค และมีผล Nested PCR เป็นลบ และพบว่าบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์ท่ออาหารที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมามีความหนาแน่นของออร์แกเนลล์ต่างๆ มากกว่าเซลล์ท่ออาหารของต้นปกติ เนื่องจากบริเวณท่ออาหารของต้นที่ติดเชื้อเกิดการรั่วไหล (leakage) ของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้นเหตุให้ของเหลวในไซโตพลาสซึม (ไซโตซอล; cytosol) ไหลซึมออกมา จึงเป็นอาหารให้เชื้อเจริญได้มากกว่าปกติด้วย (Figure 3)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA และวิเคราะห์ Phylogenetic tree

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA ของเชื้อตัวแทน จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ TH5-2, TH9-11, TH-NKT-P26, TH7-2, TH-NKT-PK21 และ TH-NKT015 และส่งเก็บข้อมูลไปยัง GenBank, NCBI ได้รับหมายเลข accession เรียงตามลำดับ ดังนี้ MT548611, MT548613, MT548614, MW464326, MW464330 และ MW533147 จากผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree (Figure 4) และ Pairwise distance (Figure 5) เทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่เข้าทำลายมะละกอในต่างประเทศและเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย พุ่มแจ่มในลำปาง หลังแตกพุ่มฝอยงาของไทย รวมจำนวน 17 ตัวอย่าง และเชื้อ *Acholeplasma morum* เพื่อใช้เป็น outgroup (Figure 4) พบว่าเชื้อทั้ง 6 ไอโซเลทจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อให้เกิดโรคของมะละกอในต่างประเทศ โดยไอโซเลท TH7-2, TH-NKT-PK21 และ TH-NKT-P26 จัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกับเชื้อ *Ca. Phytoplasma solani* ที่เข้าทำลายมะละกอในไต้หวัน (AJ919994.2) และมีค่าความเหมือน (%similarity) 100% ส่วนไอโซเลท TH5-2, TH9-11 และ TH-NKT015 จัดอยู่ในกลุ่มย่อยอื่น โดยมีค่าความเหมือนระหว่างเชื้อทั้ง 6 ไอโซเลท มีค่าระหว่าง 99.86-100% โดยมีค่าความเหมือนกับไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคมะละกอในออสเตรเลีย (Y10095.1) และ นิวซีแลนด์ (FJ943262.1) ระหว่าง 99.84-99.98% มีค่าความเหมือนกับไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคมะละกอในบราซิล (JQ792171.1) 99.81-99.88% มีค่าความเหมือนกับไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคมะละกอในอินเดีย (JQ346525.1) 99.47-99.50% มีค่าความเหมือนกับไฟโตพลาสมาพุ่มแจ่มในลำปางของไทย (LN897456.1) และแตกพุ่มฝอยงา (JN006079.1) 97.02-97.28% มีค่าความเหมือนกับไฟโตพลาสมาใบขาวอ้อย (FM208257.1) 96.82-97.02%



Figure 1 Symptomatic papaya plants which infected by phytoplasma compared to healthy plants; (a) yellow necrosis, (b) bunchy top-like, shortening of internodes, (c) excessive proliferation of axillary shoots, (d) green vein, (e) yellow shoot, (f) crinkle & mosaic/ mottle, (g) healthy plant in open field, (h) healthy plant in screenhouse

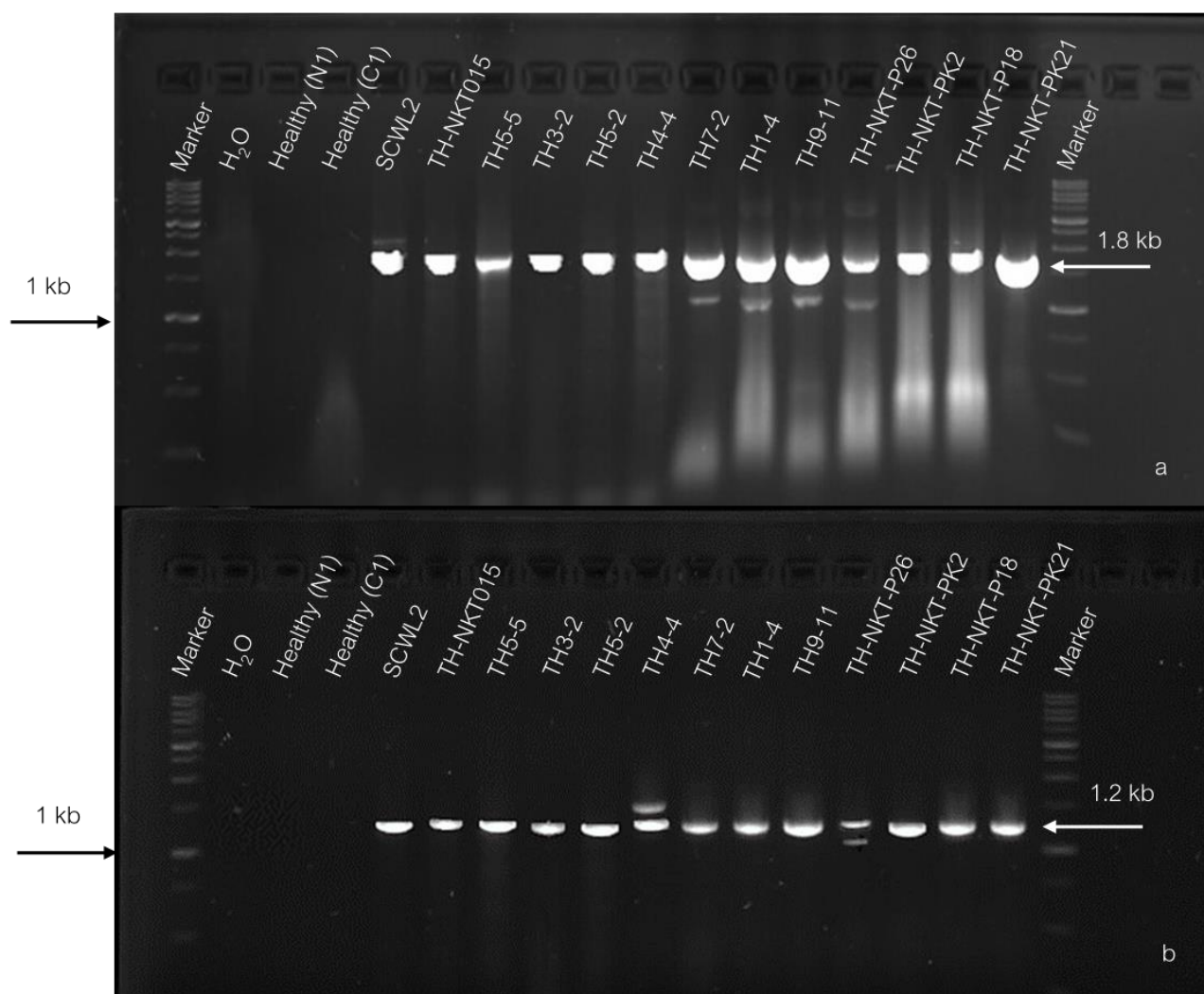


Figure 2 Nested PCR by using phytoplasma universal primers, (a) P1/P7 and (b) R16F2n/R16R2: Marker = 1 kb DNA ladder, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ExcelBandTM (SMOBio, Taiwan); dH₂O = negative control; Healthy (N1) = asymptomatic papaya from orchard; Healthy (C1) = asymptomatic papaya in screenhouse; SCWL2 = sugarcane white leaf phytoplasma (positive control); TH-NKT015 and TH5-5 (yellow necrosis), TH3-2 and TH5-2 (yellow crinkle), TH4-4 and TH7-2 (bunchy top-like), TH1-4 and TH9-11 (green vein), TH-NKT-P26 and TH-NKT-PK2 (yellow shoot), TH-NKT-P18 and TH-NKT-PK21 (crinkle & mosaic/ mottle)

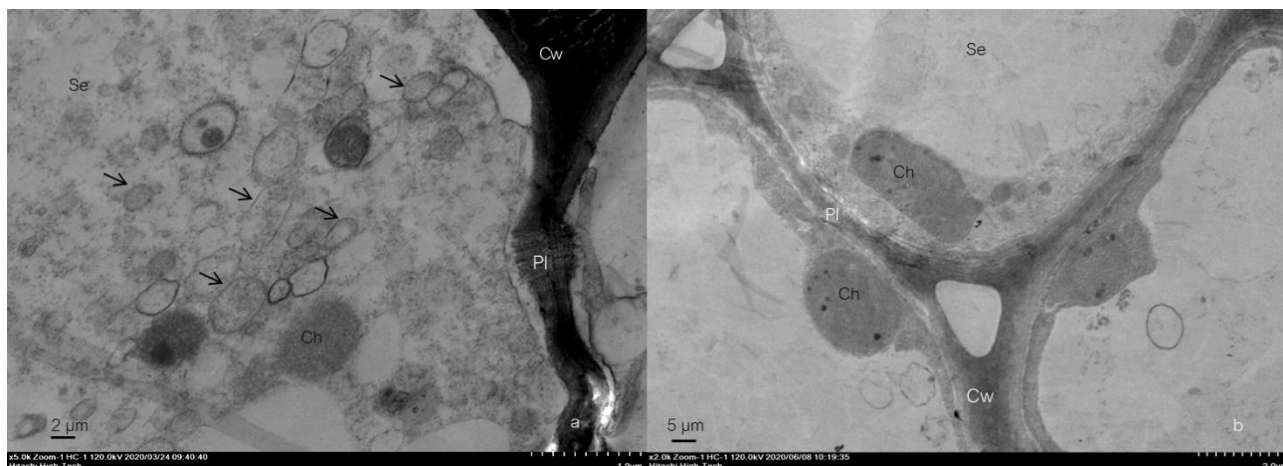


Figure 3 Electron micrograph of sieve cells of phytoplasma infected papaya compared to healthy plant; (a) phytoplasma infected papaya isolate TH-NKT015 (yellow necrosis). Black arrows indicated pleomorphic cells of phytoplasma within sieve cell of infected papaya, bar = 2 μ m and (b) healthy papaya cells, bar = 5 μ m (Se = sieve cell, Pl = plasmodesmata, Ch = chloroplast, Cw = cell wall)

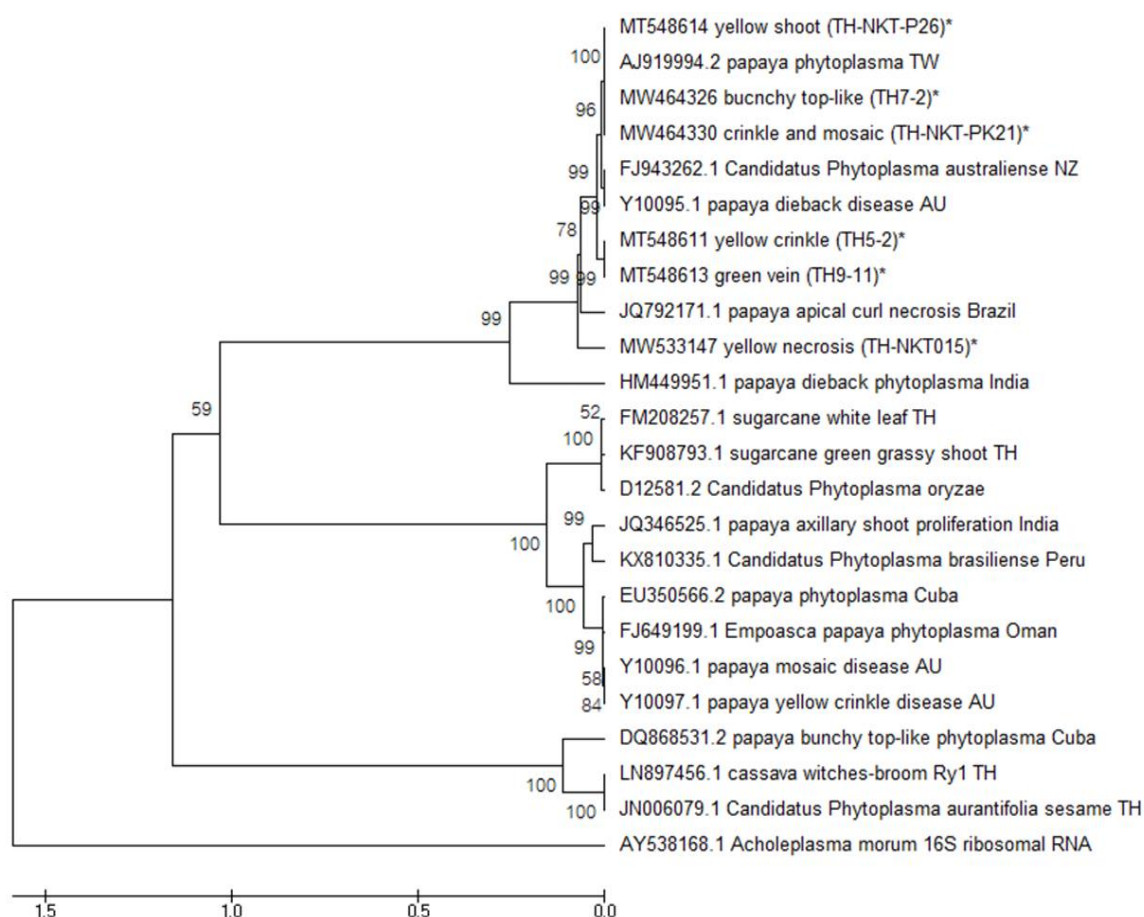


Figure 4 A constructed phylogenetic tree with UPGMA of 16S rDNA sequences of six phytoplasma isolates that infected papaya in Thailand (stars) in comparison to seventeen reference phytoplasma strains from GenBank, NCBI using *Acholeplasma morum* as an outgroup strain. A bootstrap analysis was performed with 1,000 replicates with MEGA 6.0 software

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1. MT548611_yellow_crinkle_(TH5-2)*																							
2. MT548613_green_vein_(TH9-11)*	100.00																						
3. MT548614_yellow_shoot_(TH-NKT-P26)*	99.97	99.97																					
4. MW464326_bunchy_top-like_(TH7-2)*	99.97	99.97	100.00																				
5. MW464330_crinkle_and_mosaic_(TH-NKT-PK21)*	99.97	99.97	100.00	100.00																			
6. MW533147_yellow_necrosis_(TH-NKT015)*	99.89	99.89	99.86	99.86	99.86																		
7. AJ919994_2_papaya_phytoplasma_TW	99.97	99.97	100.00	100.00	100.00	99.86																	
8. FJ943262_1_Ca_Phytoplasma_australiense_NZ	99.95	99.95	99.98	99.98	99.98	99.84	99.98																
9. Y10095_1_papaya_dieback_disease_AU	99.95	99.95	99.98	99.98	99.98	99.84	99.98	100.00															
10. Y10096_1_papaya_mosaic_disease_AU	98.45	98.45	98.43	98.43	98.43	98.53	98.43	98.46	98.46														
11. Y10097_1_papaya_yellow_crinkle_disease_AU	98.45	98.45	98.43	98.43	98.43	98.53	98.43	98.46	98.46	100.00													
12. HM449951_1_papaya_dieback_phytoplasma_India	99.50	99.50	99.49	99.49	99.49	99.47	99.49	99.50	99.50	98.57	98.57												
13. JQ346525_1_papaya_axillary_shoot_proliferation_India	98.53	98.53	98.51	98.51	98.51	98.53	98.51	98.53	98.53	99.90	98.86	98.86											
14. JQ792171_1_papaya_apical_curl_necrosis_Brazil	99.88	99.88	99.87	99.87	99.87	99.81	99.87	99.88	99.88	98.50	98.50	99.46	98.45										
15. DQ868531_2_papaya_bunchy_top-like_Cuba	98.37	98.37	98.30	98.30	98.30	98.25	98.30	98.33	98.33	98.86	98.86	99.41	99.16	98.22									
16. EU350566_2_papaya_phytoplasma_Cuba	98.45	98.45	98.43	98.43	98.43	98.53	98.43	98.46	98.46	100.00	100.00	98.55	99.89	98.50	98.88								
17. FJ649199_1_Empoasca_papaya_phytoplasma_Oman	98.44	98.44	98.41	98.41	98.41	98.51	98.41	98.44	98.44	100.00	100.00	98.54	99.90	98.48	98.88	99.99							
18. KX810335_1_Ca_Phytoplasma_brasiliense_Peru	98.58	98.58	98.53	98.53	98.53	98.57	98.53	98.55	98.55	99.88	99.88	98.86	99.94	98.47	99.08	99.88	99.88						
19. FM208257_1_sugarcane_white_Leaf_TH	96.85	96.85	96.82	96.82	96.82	97.02	96.82	96.79	96.79	99.74	99.74	97.19	99.61	96.86	97.64	99.74	99.74	99.60					
20. KF908793_1_sugarcane_green_grassy_shoot_TH	96.72	96.72	96.70	96.70	96.70	96.88	96.70	96.67	96.67	99.74	99.74	97.18	99.61	96.73	97.77	99.74	99.74	99.60	99.99				
21. D12581_2_Ca_Phytoplasma_oryzae	96.77	96.77	96.75	96.75	96.75	96.88	96.75	96.72	96.72	99.74	99.74	97.10	99.60	96.79	97.63	99.73	99.74	99.60	99.99	99.99			
22. LN897456_1_cassava_witches-broom_Ry1_TH	97.28	97.28	97.06	97.06	97.06	97.02	97.06	97.03	97.03	97.01	97.01	99.23	98.36	96.86	99.78	97.12	97.06	98.25	96.97	97.10	96.95		
23. JN006079_1_Ca_Phytoplasma_aurantifolia_sesame_TH	97.28	97.28	97.06	97.06	97.06	97.02	97.06	97.03	97.03	97.01	97.01	99.23	98.36	96.86	99.78	97.12	97.06	98.25	96.97	97.10	96.95	100.00	
24. AY538168_1_A_morum_16S_ribosomal_RNA	95.95	95.95	96.80	96.80	96.80	96.66	96.80	96.91	96.91	96.95	96.95	96.69	97.00	96.76	96.96	96.86	96.99	96.84	97.01	97.06	97.11	97.08	97.08

Figure 5 Similarity percentage matrix of six phytoplasma isolates (stars) which infected papaya in Thailand compared to seventeen phytoplasma reference strains and *A. morum*. Pairwise distance analysis was calculated by MEGA 6.0 software

วิจารณ์

การทดลองนี้ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในมะละกอที่แสดงอาการผิดปกติ 6 ลักษณะ พบว่าสอดคล้องกับรายงานของ Bau et al. (2011) ที่กล่าวว่าอาการใบเหลืองย่น ตายจากปลายยอด ที่พบในได้หวั่นเกิดจากเชื้อ *Ca. Phytoplasma solani* โดยจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrXII-A ส่วนในออสเตรเลีย White et al. (1998) รายงานว่าเชื้อ *Ca. Phytoplasma australiense* และ *Ca. Phytoplasma australasia* เป็นสาเหตุโรคของมะละกอที่แสดงอาการใบเหลืองย่นตายจากปลายยอด และใบต่าง Verma et al. (2012) พบไฟโตพลาสมาในอินเดียที่ทำให้เกิดอาการแตกตาข้างบริเวณลำต้น (axillary shoot proliferation) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Ca. Phytoplasma aurantifolia* จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrII จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่ามีเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคของมะละกอที่สามารถจัดกลุ่มและกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่มสอดคล้องกับรายงานของ Melo et al. (2013) ที่พบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคตายจากปลายยอดของมะละกอ และโรคปลายยอดไหม้ม้วนของมะละกอ จัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrXIII-E และกล่าวว่าในหลายประเทศพบเชื้อไฟโตพลาสมาที่เข้าทำลายมะละกอซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI, 16SrII, 16SrX, 16SrXII และ 16SrXVII ทั้งนี้จากการสำรวจในระหว่างการทดลองนี้พบอาการเหลืองบริเวณยอดแล้วพัฒนาเป็นอาการไหม้จากขอบใบซึ่งมีการพัฒนาอาการของโรคค่อนข้างเร็วแล้วยืนต้นตายในที่สุด บางครั้งเกิดการตายจากยอดแล้วอาจมีการแตกยอดบริเวณข้างลำต้น แต่ไม่สามารถเจริญและให้ผลผลิตได้ซึ่งจะส่งผลกระทบต่ผู้ปลูกมะละกค่อนข้างมากเนื่องจากเชื้อไฟโตพลาสมาสามารถแพร่ระบาดโดยแมลงพาหะ ฉะนั้นการศึกษาชนิดของแมลงที่สามารถถ่ายทอดเชื้อ พดติกรรมและวงจรชีวิตของแมลง เพื่อให้สามารถควบคุมแมลงพาหะจะสามารถช่วยควบคุมการแพร่ระบาดของโรคได้

สรุป

การศึกษครั้งนี้เป็นการพบเชื้อ *Ca. Phytoplasma solani* ก่อโรคในมะละกอในประเทศไทยเป็นครั้งแรก โดยตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างมะละกอที่แสดงอาการผิดปกติ 6 ลักษณะ ได้แก่ อาการใบเหลือง แผลไหม้จากขอบใบเข้าหาเส้นใบ (yellow necrosis) อาการใบหนา ผิดรูป ปล้องสั้น ยอดเป็นกระจุก (bunchy top-like) อาการแตกยอดข้างลำต้น ใบหนา ย่น ผิดรูป และเหลือง (yellow crinkle) อาการเส้นใบเขียว (green vein) อาการใบยอดเหลือง (yellow shoot) และอาการใบย่นและต่างเขียว (crinkle & mosaic/ mottle) จากการตรวจด้วยเทคนิค Nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ P1/P7 และ R16F2n/R16R2 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.8 kb และ 1.2 kb ตามลำดับ และตรวจพบเชื้อภายในท่ออาหารของเส้นกลางใบมะละกอที่ติดเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมามีความสัมพันธ์ใกล้ชิด

กับเชื้อ *Ca. Phytoplasma solani* ซึ่งพบระบาดในมะละกอที่รายงานในไต้หวันโดยมีค่าความเหมือนระหว่าง 99.86-100% โดยอาการที่พบมากและระบาดรวดเร็วคือกลุ่มอาการเหลือง และสร้างความเสียหายต่อผู้ปลูกมะละกอชัดเจนเนื่องจากทำให้มะละกอยืนต้นตายในที่สุด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายเกษตร ที่สนับสนุนเงินทุนในการวิจัย ภายใต้โครงการ “การเพิ่มศักยภาพการผลิตมะละกอ” เลขที่สัญญา RDG6220016

เอกสารอ้างอิง

- สุภาพร กลิ่นคง. 2552. ไฟโตพลาสมาสาเหตุโรครดพิษ. โรงพิมพ์บริษัทศูนย์การพิมพ์เพชรรุ่ง จำกัด, นนทบุรี.
- Abeyasinghe, S, W.G.S.M. Kumari, I.M.M. Arachchi, and M. Dickinson. 2014. First report of the molecular identification of a phytoplasma associated with dieback disease of papaya in Sri Lanka. *New Disease Reports*. 29: 13.
- Arocha, Y., B. Pinol, K. Acosta, R. Almeida, J. Devonshire, A. Van de Meene, E. Boa, and J. Lucas. 2009. Detection of phytoplasma and potyvirus pathogens in papaya (*Carica papaya* L.) affected with “Bunchy Top Symptom” (BTS) in eastern Cuba. *Journal of Plant Protection Research*. 28: 640-646.
- Arocha, Y., M. Lopez, B. Pinol, M. Fernandez, B. Picornell, R. Almeida, I. Palenzuela, M. R. Wilson, and P. Jones. 2005. '*Candidatus* Phytoplasma graminis' and '*Candidatus* Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55(6): 2451-2463.
- Bau, H. J., S. C. Hung, W. C. Chang, and Y. K. Chen. 2011. First report of group 16SrXII phytoplasma associated with papaya yellows in Taiwan. *Plant Disease*. 95(12): 1581.
- Christensen, N.M., H. Nyskjold, and M. Nicolaisen. 2013. Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification. P. 245-252. In: M. Dickinson and J. Hodgetts. *Phytoplasma: Methods and Protocols*. Humana Press, London.
- Gibb, K. S., B. Schneider, and A.C. Padovan. 1998. Differential detection and genetic relatedness of phytoplasmas in papaya. *Plant Pathology*. 47: 325-332.
- Melo, L., E. Silva, D. Flôres, J. Ventura. H. Costa, and I. Bedendo. 2013. A phytoplasma representative of a new subgroup, 16SrXIII-E, associated with Papaya apical curl necrosis. *European Journal of Plant Pathology*. 137: 445-450.
- Rao, P. G., Y. Chaturved, M. Priya, and S. mall. 2011. Association of a 16SrII group phytoplasma with dieback disease of papaya in India. *Bulletin of Insectology*. 64: 105-106.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Verma, R., D. Munekar, P. Gaikwad, S.P.S. Tomer, and V. V. Datar. 2012. First report of a phytoplasma associated with an axillary shoot proliferation disease in papaya in India. *New Disease Reports*. 25: 18.
- Wei, W., E. Perez-Lopez, R.E. Davis, L. Bermúdez-Díaz, C. Granda-Wong, J. Wang, and Y. Zhao. 2017. '*Candidatus* Phytoplasma brasiliense'-related strains associated with papaya bunchy top disease in northern Peru represent a distinct geographic lineage. *Crop Protection*. 92: 99-106.
- White, D.T., L.L. Blackall, P.Y. Scott, and K.B. Walsh. 1998. Phylogenetic positions of phytoplasmas associated with dieback, yellow crinkle and mosaic diseases of papaya, and their proposed inclusion in '*Candidatus* Phytoplasma australiense' and a new taxon, '*Candidatus* Phytoplasma australasia'. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48: 941-951.