

การกำจัดเชื้อไวรัสที่ติดมากับเมล็ดพริก Disinfection of *Pepper chat fruit viroid* in Pepper Seeds

ลักษิกา ศรีเกษม^{1/} ชมาภร สิงห์พันธุ์^{1/} คณิงนิตย์ เจริญวรารกร^{1/*}
Luksika Srikasem^{1/} Samabhorn Sinhabandhu^{1/} Kanungnit Reanwarakorn^{1/*}

Received 15 Mar. 2024/Revised 14 May 2024/Accepted 20 May 2024

ABSTRACT

Pepper chat fruit viroid (PCFVd) can cause disease in pepper. This disease can be transmitted via seeds and mechanical means. The global pepper seed trade is an important channel for PCFVd dissemination from country to country. The effectiveness of seed disinfection methods for PCFVd ranging from chemical to physical ones was evaluated. The methods using sodium hypochlorite 3%, sodium bicarbonate 10%, hydrochloric acid 0.5 N, trisodium phosphate 10%, hot water and dry heat treatment in combinations at different temperatures and time periods were tested in pepper seed varieties P-74 and P-TV infected with PCFVd 100%. After treatment, the infection rate was inspected by the reverse transcription-polymerase chain reaction technique on the whole seeds, seed coats and seedlings and the germination rates were determined. The results showed that soaking pepper seeds in 50°C hot water for 25 min followed by 72°C dry heat for 24 hours was the best treatment regime. It could get rid of 100% PCFVd while the germination rates remained at 96-99%. This result can be used as a recommendation for seed disinfection for PCFVd.

Keywords: hot water treatment; dry heat treatment; seed viroid detection; seed transmission

^{1/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

^{1/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

* Corresponding author: agrknr@ku.ac.th

บทคัดย่อ

Pepper chat fruit viroid (PCFVd) เป็นไวรอยด์ที่ทำให้เกิดโรคในพริกและสามารถถ่ายทอดเชื้อทางเมล็ดโดยวิธีกล เชื้อนี้สามารถแพร่กระจายจากประเทศหนึ่งไปอีกประเทศหนึ่งผ่านทางการค้าเมล็ดพันธุ์ จึงทำการทดสอบเพื่อหาวิธีการใช้สารเคมีและความร้อนในการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริกที่มีประสิทธิภาพ โดยการใช้สาร sodium hypochlorite 3% sodium bicarbonate 10% hydrochloric acid 0.5 N trisodium phosphate 10% น้ำร้อน และลมร้อน ร่วมกันที่อุณหภูมิและช่วงเวลาต่างกันในการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริกพันธุ์ P-74 และ P-TV ที่มีการติดเชื้อไวรอยด์ PCFVd 100% หลังการทดสอบตรวจริบยีนย้อนอัตราการติดเชื้อในเมล็ดพริกด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction ในแบบทั้งเมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ด และต้นอ่อนรวมทั้งผลต่ออัตราการงอก ผลการทดสอบพบว่า กรรมวิธีที่ดีที่สุด คือ การแช่เมล็ดพริกในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50°C. เป็นเวลา 25 นาที ตามด้วยการอบด้วยลมร้อนที่ 72°C. เป็นเวลา 24 ชม. สามารถกำจัดเชื้อ PCFVd ได้ 100% โดยเมล็ดพริกมีอัตราการงอกที่ 96 - 99% ผลจากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นคำแนะนำเพื่อลดการติดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริกได้

คำสำคัญ: การฆ่าเชื้อด้วยน้ำร้อน; การฆ่าเชื้อด้วยลมร้อน; การตรวจเชื้อไวรอยด์ในเมล็ด; การถ่ายทอดทางเมล็ด

บทนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกและนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริกควบคุมค่อนข้างมาก ในปี พ.ศ. 2565 มีปริมาณการส่งออกเมล็ดพันธุ์พริกควบคุม 60,459 กก.

มูลค่า 856.1 ล้านบาท และนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริกควบคุม 26,064 กก. มูลค่า 140.3 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2566) มีรายงานเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ติดไปกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกส่งออก (Chambers et al., 2013; Verhoeven et al., 2021) ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ PCFVd ที่ติดไปกับเมล็ดไปยังประเทศต่าง ๆ ได้ หากไม่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเชื้อที่มีประสิทธิภาพ ไวรอยด์เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุด มีโครงสร้างเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยววงปิด ก่อให้เกิดโรคกับพืชปลูกหลายชนิด ทั้งพืชผัก ไม้ผล และไม้ประดับ ส่งผลให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ (Hammond and Owens, 2006) ไวรอยด์จำแนกได้เป็น 2 วงศ์ คือ *Pospiviroidae* และ *Avsunviroidae* (Serio et al., 2014) ไวรอยด์ในวงศ์ *Pospiviroidae* เข้าทำลายพืชในวงศ์ *Solanaceae* เป็นหลัก เช่น มะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง และมะเขือ ไวรอยด์ในสกุล *Pospiviroid* หลายชนิดมีรายงานการถ่ายทอดเชื้อผ่านเมล็ด (Matsushita and Tsuda, 2016) ละอองเกสร (Card et al., 2007) หรือแมลงบางชนิด (Hammond, 2017)

เชื้อ PCFVd เป็นไวรอยด์ที่จัดอยู่ในสกุล *Pospiviroid* มีขนาดจีโนมประมาณ 348 นิวคลีโอไทด์ พบครั้งแรกในพริกหวาน (*Capsicum annuum* L.) ที่ปลูกในโรงเรือนในประเทศเนเธอร์แลนด์ ทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง ขนาดของผลพริกลดลงถึง 50% และมีอาการเส้นใบไหม้ (Verhoeven et al., 2009) นอกจากนี้ ผลมะเขือเทศและหัวมันฝรั่งที่เชื้อ PCFVd เข้าทำลายมีขนาดลดลงเช่นกัน (Verhoeven et al., 2020) ประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ PCFVd ครั้งแรกในมะเขือเทศที่ จ.ลำปาง (Reanwarakorn et al., 2011) ทำให้พืชมีลักษณะ

อาการเตี้ยแคระ เส้นใบไหม้ ใบผิดปกติ และใบเปลี่ยนสี ต่อมาเครือข่ายรัฐออสเตรียได้รายงานการตรวจพบเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ส่งออกโดยประเทศไทย (Chambers et al., 2013) และรายงานการตรวจพบเชื้อ PCFVd ติดไปกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกจากหลายประเทศ (Verhoeven et al., 2021)

การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสสามารถดำเนินการได้หลายวิธี เช่น การป้องกันการนำเมล็ดหรือส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ติดเชื้อเข้าสู่แปลงหรือโรงเรือนปลูกพืช การปฏิบัติด้านสุขอนามัยที่เข้มงวดและการตรวจติดตามอาการผิดปกติของพืช จะช่วยให้การควบคุมโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีรายงานวิธีการกำจัดเชื้อไวรัสและไวรัสชนิดอื่น ๆ ได้แก่ การกำจัดเชื้อ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) ที่ปนเปื้อนบนเมล็ดและอุปกรณ์ต่าง ๆ ด้วยการแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite (NaOCl) (Garnsey and Whidden, 1971; Singh et al., 1989; Matsuura et al., 2010) การใช้สารละลาย 2% sodium hydroxide และ 2% formaldehyde ในการกำจัดเชื้อ *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), *Citrus exocortis viroid* (CEVd) และ *Hop stunt viroid* (HSVd) (Garnsey and Whidden, 1971) การแช่เมล็ดใน 10% trisodium phosphate เป็นเวลา 3 ชม. หรือการอบเมล็ดด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 80° ซ. เป็นเวลา 24 ชม. และ 74° ซ. นาน 48 ชม. เพื่อกำจัดเชื้อ *Pepino mosaic virus* (PepMV) ในเมล็ดมะเขือเทศ (Córdoba-Sellés et al., 2007) นอกจากนี้ Olivier et al. (2015) ได้ทดสอบสารหลายชนิดพบว่า ให้ผลไม่แตกต่างกับการใช้ 0.8% NaOCl ในการกำจัดเชื้อ PSTVd ต่อมา Sombat (2019) รายงานการใช้ 3% NaOCl ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50° ซ. เป็นเวลา 25 นาที

กับเมล็ดมะเขือเทศ ซึ่งพบว่า สามารถกำจัดเชื้อ PCFVd และ *Columnea latent viroid* (CLVd) ได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการงอกของเมล็ด จากรายงานที่กล่าวมาจะพบว่า ข้อมูลการกำจัดเชื้อ PCFVd ยังมีอย่างจำกัดนอกจากนี้ การกำจัดเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่าง ทั้งชนิดพืช พันธุ์พืช ชนิดของเชื้อ กรรมวิธีและระยะเวลาที่เหมาะสมในการกำจัดเชื้อ ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงได้นำข้อมูลการใช้สารเคมีและความร้อนที่มีรายงานในการใช้กำจัดเชื้อไวรัสและไวรัสมาทดสอบ และพัฒนาวิธีการกำจัดเชื้อ PCFVd ที่ติดมากับเมล็ดพริก เพื่อเป็นข้อมูลและแนวทางในการกำจัดเชื้อ PCFVd ในการผลิตเมล็ดพันธุ์พริกอย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การตรวจสอบเมล็ดพริกติดเชื้อ PCFVd

ใช้เมล็ดพันธุ์พริกติดเชื้อ PCFVd สองพันธุ์ ได้แก่ P-74 และ P-TV โดยเป็นพริกที่มีลักษณะผลยาว (elongated) ตามการจัดจำแนกของ IPGRI (1995) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก อ.ดร.ขมากร สิงห์พันธุ์ (งานวิจัยเรื่อง การศึกษาความต้านทานและลักษณะอาการโรคที่เกิดจากเชื้อ PCFVd บนมะเขือเทศ พริก และมะเขือสายพันธุ์ต่าง ๆ ภายใต้โครงการศูนย์เชื้อพันธุ์กรรมพืชแห่งประเทศไทย ปีงบประมาณ 2561 - 2563) เมล็ดที่นำมาใช้ไม่ได้ผ่านการแช่สารเคมีใด ๆ มาก่อน นำเมล็ดพริกพันธุ์ละ 100 เมล็ด/กรรมวิธี มาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Jeffries and Tina, 2004) จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RT-PCR โดยการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค

PCR ด้วย GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, USA) ทำปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการของ Kungwon et al. (2022) ด้วยไพรเมอร์ PCF-seq-F (5' CCG TCT TCT GAC AGG AGT AAT CCC 3') และ PCF-seq-R (5' ACC CGC ACG GCG CTT CTC 3') (Yanagisawa et al., 2017) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ PCFVd

ปฏิกิริยา Reverse transcription (RT) ประกอบด้วย 2 pmole PCF-seq-R 5.0 ไมโครลิตร RNA sample 1.75 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน 96° ซ. นาน 5 นาที จากนั้น นำมาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นใส่ RT buffer 2.0 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs 1.0 ไมโครลิตร 200 U/reverse transcriptase 0.25 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 50° ซ. เป็นเวลา นาน 1 ชม. และ 70° ซ. นาน 10 นาที ซึ่งขั้นตอนนี้จะได้ cDNA ที่สามารถนำไปเพิ่มปริมาณ ด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

ปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ในปฏิกิริยารวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจาก nuclease 3.0 ไมโครลิตร PCR master mix buffer 5 ไมโครลิตร 2 pmol/μl ไพรเมอร์ PCF-seq-F 0.5 ไมโครลิตร 2 pmol/μl ไพรเมอร์ PCF-seq-R 0.5 ไมโครลิตร cDNA 1.0 ไมโครลิตร จากนั้น นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมปฏิกิริยา PCR ดังนี้ อุณหภูมิ 94° ซ. นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ, denaturation temperature 94° ซ. นาน 40 วินาที annealing temperature 60° ซ. นาน 40 วินาที extension temperature 72° ซ. นาน 40 วินาที จำนวน 34 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72° ซ. นาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบขนาดของผลผลิตจาก

ปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis เพื่อดูแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 348 นิวคลีโอไทด์ ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation UV-transilluminator (SYNCENE U: Genius3)

2. การทดสอบกรรมวิธีการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริก

ทำการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 11 กรรมวิธี 4 ซ้ำ มีขนาดหน่วยทดลอง 200 เมล็ด ใช้เมล็ดพริกที่ติดเชื้อ PCFVd (เมล็ดพริกที่ตรวจสอบแล้วว่ามีเชื้อ) ทำ 2 พันธุ์ คือ P-74 และ P-TV ตามกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธี T1 แช่เมล็ดใน 3% sodium hypochlorite (NaOCl) เป็นเวลา 25 นาที ที่อุณหภูมิห้องที่ $25 \pm 2^{\circ}$ ซ.

กรรมวิธี T2 แช่เมล็ดใน 10% sodium bicarbonate (NaHCO_3) เป็นเวลา 25 นาที ที่อุณหภูมิห้องที่ $25 \pm 2^{\circ}$ ซ.

กรรมวิธี T3 แช่เมล็ดใน 3% NaOCl ในน้ำร้อนที่ 50° ซ. เป็นเวลา 25 นาที

กรรมวิธี T4 แช่เมล็ดใน 3% NaOCl ในน้ำร้อนที่ 50° ซ. เป็นเวลา 60 นาที

กรรมวิธี T5 แช่เมล็ดในน้ำร้อนที่ 50° ซ. เป็นเวลา 25 นาที ตามด้วยอบลมร้อน ที่ 72° ซ. เป็นเวลา 24 ชม.

กรรมวิธี T6 แช่เมล็ดในน้ำร้อนที่ 50° ซ. เป็นเวลา 25 นาที ตามด้วยอบลมร้อน ที่ 72° ซ. เป็นเวลา 48 ชม.

กรรมวิธี T7 แช่เมล็ดใน 0.5 N hydrochloric acid (HCl) เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 10% trisodium phosphate (TSP) เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง $25 \pm 2^{\circ}$ ซ. และ อบลมร้อนที่ 80° ซ. เป็นเวลา 24 ชม.

กรรมวิธี T8 วางเมล็ดบนกระดาษเพาะเมล็ดที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องที่ $25\pm 2^{\circ}$ ซ.

กรรมวิธี T9 แช่เมล็ดในน้ำที่อบฆ่าเชื้อแล้วนาน 25 นาที ที่อุณหภูมิห้องที่ $25\pm 2^{\circ}$ ซ.

กรรมวิธี T10 วางเมล็ดปกติ (เมล็ดพริกจากต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ PCFVd) บนกระดาษเพาะเมล็ดที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องที่ $25\pm 2^{\circ}$ ซ.

กรรมวิธี T11 แช่เมล็ดปกติ (เมล็ดพริกจากต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ PCFVd) ในน้ำที่อบฆ่าเชื้อแล้ว นาน 25 นาที ที่อุณหภูมิห้องที่ $25\pm 2^{\circ}$ ซ.

ในกรรมวิธี T1 T2 T7 T9 และ T11 นำเมล็ดบรรจุใส่ถุงตาข่าย (ถุงกรองชาทำมาจากกระดาษเยื่อไม้) ขนาด 9×10 ซม. แช่ถุงในน้ำหรือสารละลายของแต่ละกรรมวิธี ทั้งนี้ภาชนะที่ใส่น้ำหรือสารละลายจะตั้งบนเครื่องกวนสารแบบปรับอุณหภูมิได้ (magnetic stirrer hotplate) ที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm 2^{\circ}$ ซ.) สำหรับเมล็ดที่ทดสอบในกรรมวิธี T3 T4 T5 และ T6 นำเมล็ดใส่หลอดที่มีฝาปิดที่ภายในบรรจุน้ำหรือสารละลายของแต่ละกรรมวิธี นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water-bath shaker) เมื่อครบกำหนดเวลาของแต่ละกรรมวิธี นำเมล็ดมาตากแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบด้วยลมร้อนต่อไป สำหรับกรรมวิธี T5 T6 และ T7 ตามลำดับ หลังจากนั้น นำเมล็ดจากต้นติดเชื้อและต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องที่ $25\pm 2^{\circ}$ ซ. เพื่อนำไปตรวจสอบหาเชื้อ PCFVd ในเมล็ดและอัตราการงอก วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี least significant difference (LSD) ด้วยโปรแกรม R (R Core Team, 2021)

3. การประเมินประสิทธิภาพของกรรมวิธีการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพริก

นำเมล็ดที่ผ่านการทดสอบในแต่ละกรรมวิธีการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริกในข้อที่ 2 มาตรวจหาเชื้อ PCFVd โดยแบ่งเมล็ดเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ตรวจหาเชื้อไวรัสจากทั้งเมล็ด (whole seed) จำนวน 100 เมล็ด (จำนวน 25 เมล็ด/ซ้ำ) เพื่อตรวจสอบว่ายังมีเชื้อ PCFVd อยู่ที่เมล็ดพริกหรือไม่หลังผ่านกรรมวิธีการกำจัดเชื้อ และส่วนที่ 2 แยกตรวจหาเชื้อไวรัสจากส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) และต้นอ่อน (seedling) เพื่อตรวจสอบว่า เชื้อ PCFVd อยู่ที่ส่วนไหนของเมล็ดพริก และอัตราการงอกของเมล็ด โดยนำเมล็ดมาเพาะด้วยวิธี top of paper (TOP) (ISTA, 2016) ในจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษชั้นหนึ่งฆ่าเชื้อวางรองก้นจาน (จำนวน 25 เมล็ด/จาน) จำนวน 4 ซ้ำ นาน 14 วัน จดบันทึกจำนวนเมล็ดที่งอก หาอัตราการงอก โดยนับรวมต้นที่งอกเห็นใบเลี้ยงจาก 4 ซ้ำ (100 เมล็ด) นำมาคำนวณเป็นร้อยละของอัตราการงอก จากนั้นใช้ปากคีบ (forceps) แยกเก็บเปลือกหุ้มเมล็ด และต้นอ่อน (จำนวน 25 เปลือกหุ้มเมล็ด หรือ 25 ต้นอ่อน รวมเป็น 1 ตัวอย่าง) ป้องกันการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่าง โดยทำความสะอาดปากคีบด้วยแอลกอฮอล์และเผาไฟก่อนใช้กับตัวอย่างใหม่ แล้วนำแต่ละตัวอย่างมาแยกสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB และตรวจสอบหาเชื้อ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 1

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริกที่ติดเชื้อ

พบว่า เมล็ดพริกทั้ง 2 พันธุ์ ที่นำมาใช้ในการทดสอบครั้งนี้ติดเชื้อ PCFVd 100% โดยตรวจ

พบแถบดีเอ็นเอขนาด 348 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นขนาดของเชื้อ PCFVd จากการตรวจทั้งเมล็ด (whole seed) ทั้ง 4 ซ้ำ ของทั้งพันธุ์ P-74 (เลนช่องที่ 1 - 4) and P-TV (เลนช่องที่ 5 - 8) (Figure 1A)

2. ประสิทธิภาพของวิธีการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพริก

2.1 วิธีการกำจัดเชื้อด้วยสารเคมี

พบว่า เมล็ดที่นำมากำจัดเชื้อ PCFVd ในกรรมวิธี T1 และ กรรมวิธี T2 สามารถกำจัดเชื้อ PCFVd ได้ แต่วิธีการของ T1 ทำให้อัตราการงอกของเมล็ดพันธุ์ P-74 และ P-TV ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ มีอัตราการงอกเหลือ 49 และ 71% ตามลำดับ ส่วน T2 มีผลต่ออัตราการงอกเล็กน้อยพบว่า อัตราการงอกของพันธุ์ P-74 และ P-TV คิดเป็น 91 และ 94% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีควบคุมที่เมล็ดติดเชื้อแช่น้ำนาน 25 นาที ในกรรมวิธี T9 ที่มีอัตราการงอก 95% และวิธีควบคุมที่เมล็ดไม่ติดเชื้อแช่น้ำนาน 25 นาที ในกรรมวิธี T11 มีอัตราการงอก 100% (คำนวณรวมจาก 4 ซ้ำ = 100 เมล็ด) (Table 1) สอดคล้องกับงานทดสอบในเมล็ดมะเขือเทศของ Sombat (2019) และยังสอดคล้องกับรายงานที่ใช้ NaOCl ในการกำจัดเชื้อ *Pospiviroids* ได้ (Singh et al., 1989; Wang, 2022) ทั้งนี้ผลที่ได้ขึ้นกับสายพันธุ์ของพริกที่นำมาทดสอบด้วย (Wang, 2022) กรณีกรรมวิธีการกำจัดเชื้อด้วยสารเคมีจะใช้ได้ผลดีกับเชื้อที่อยู่ที่เซลล์ผิวของเมล็ด และไม่ค่อยมีประสิทธิภาพกับเชื้อที่อยู่ภายในเมล็ด (Nakamura, 1982) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่รายงานว่า NaOCl สามารถใช้กำจัดเชื้อไวรอยด์ที่ปนเปื้อนบนเครื่องมือต่าง ๆ ได้ (Singh et al., 1989) Matsuura et al. (2010) พบว่า NaOCl ที่ความเข้มข้น 0.5% หรือมากกว่าใช้กำจัดเชื้อ TCDVd ได้อย่างมี

ประสิทธิภาพโดยที่สารเคมีดังกล่าวจะย่อยสลายอาร์เอ็นเอของไวรอยด์ และยังพบอีกว่า ความเข้มข้นและค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของสารละลายมีผลในการย่อยสลายอาร์เอ็นเอของไวรอยด์ โดยถ้าสารละลาย NaOCl ที่ใช้มี pH ต่ำจะกำจัดเชื้อไวรอยด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า (Matsuura et al., 2010)

2.2 วิธีการกำจัดเชื้อด้วยสารเคมีร่วมกับความร้อน

การทดสอบการกำจัดเชื้อในเมล็ดด้วยสารเคมีร่วมกับการแช่น้ำร้อนในกรรมวิธี T3 และกรรมวิธี T4 พบว่า ทั้งสองวิธีมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ PCFVd ได้ จากการตรวจแบบทั้งเมล็ดไม่พบเชื้อ PCFVd (Table 1) แต่ส่งผลกระทบต่ออัตราการงอกในเมล็ดพริกทั้งสองสายพันธุ์อย่างมาก ทำให้อัตราการงอกเป็น 0% (Table 1) จึงไม่สามารถใช้วิธีการดังกล่าวนี้ในการกำจัดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพริกได้ ซึ่งให้ผลแตกต่างจากรายงานของ Sombat (2019) ที่พบว่า การใช้ 3% NaOCl ในน้ำอุณหภูมิ 50° ซ. นาน 25 นาที ในการกำจัดเชื้อ PCFVd หรือ CLVd ในเมล็ดมะเขือเทศติดเชื้อ จะไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการงอกของเมล็ด ทั้งนี้ในการทดสอบการฆ่าเชื้อในเมล็ดด้วยวิธีการต่าง ๆ อาจให้ผลที่เหมือนหรือแตกต่างกันได้ ขึ้นกับชนิดของพืช พันธุ์พืช และเชื้อสาเหตุ (Wang, 2022) นอกจากนั้น ความชื้นในเมล็ด อุณหภูมิ และระยะเวลาในการกำจัดเชื้อ ตลอดจนการทำให้เมล็ดลดอุณหภูมิได้อย่างรวดเร็วหลังกรรมวิธีการกำจัด มีผลกระทบต่ออัตราการงอกของเมล็ดด้วย (Nakamura, 1982)

2.3 วิธีการกำจัดเชื้อด้วยความร้อน

เมล็ดพริกที่ได้รับการทดสอบการกำจัดเชื้อ PCFVd ด้วยการแช่น้ำร้อนและการอบด้วยลมร้อน

ในกรรมวิธี T5 มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ PCFVd และไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการงอกของเมล็ดพริกทั้งสองพันธุ์ โดยตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอ ขนาด 348 นิวคลีโอไทด์ ของเชื้อ PCFVd ในทั้ง 2 พันธุ์ ในส่วนของทั้งเมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ด และต้นอ่อน (Figure 1B) และมีอัตราการงอกที่ 99 และ 96% ของพันธุ์ P-74 และ P-TV ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่ต่างจากกรรมวิธีควบคุมในเมล็ดติดเชื้อ (T9) และในเมล็ดไม่ติดเชื้อ (T11) ที่มีอัตราการงอกที่ 95% และ 100% ตามลำดับ (Table 1) ทั้งนี้การใช้ความร้อนมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อโรคพืชได้หลายชนิด และยังเหมาะสมกับการผลิตเมล็ดพันธุ์ในแบบเกษตรอินทรีย์ (Nakamura, 1982) อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มเวลาการอบเป็น 48 ชม. ในกรรมวิธี T6 พบว่าเวลาการอบที่เพิ่มขึ้นมีผลกระทบต่อความงอกของเมล็ดอย่างมาก (ความงอกเป็น 0% ทั้ง 2 พันธุ์) (Table 1) จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า การแช่น้ำร้อนเมล็ดที่ 50° ซ. นาน 20 - 30 นาที เป็นที่นิยมใช้ อย่างไรก็ตาม กรรมวิธีการแช่น้ำร้อนนั้นจะต้องควบคุมให้เมล็ดแห้งอย่างรวดเร็วหลังการแช่น้ำร้อน เนื่องจากมีผลกับความงอกของเมล็ด ซึ่งเป็นข้อที่ผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ต้องพึงระวัง นอกจากนั้นการเลือกใช้การอบด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมจะส่งผลให้ไม่เกิดอันตรายกับเมล็ด เนื่องจากความชื้นในเมล็ดมีผลต่อความงอกของเมล็ด (Nakamura, 1982)

2.4 วิธีการกำจัดเชื้อด้วยสารเคมีแล้วตามด้วยความร้อน

สำหรับกรรมวิธี T7 ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อ PCFVd ได้ เนื่องจากยังสามารถตรวจพบเชื้อ PCFVd ในทั้ง 2 พันธุ์ ในส่วนของทั้งเมล็ด (whole seed) โดยตรวจพบเชื้อในเมล็ดพริกพันธุ์ P-74 และ P-TV ในอัตรา 25% และ 50% ตามลำดับ

อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่ออัตราการงอกของเมล็ดอย่างมาก ทำให้มีความงอกเป็น 0% ทั้ง 2 พันธุ์ (Table 1) ในขณะที่ Antignus et al. (2007) พบว่า 10% TSP หรือ 2% sodium hypochlorite สามารถใช้ในการกำจัดเชื้อ *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) ที่ปนเปื้อนที่เซลล์ผิวของเมล็ดมะเขือเทศได้

จากรายงานการศึกษาของ Nakamura (1982) พบว่าความชื้นของเมล็ดก่อนเริ่มกรรมวิธีในการกำจัดเชื้อเป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการเลือกการกำจัดเชื้อที่ติดมากับเมล็ดด้วยความร้อน เนื่องจากส่งผลต่อความงอกของเมล็ด เช่น การอบด้วยลมร้อนจะส่งผลให้เป็นอันตรายกับเมล็ด โดยความงอกจะลดลงในกรณีที่เมล็ดมีความชื้นสูง พบว่าถ้าเมล็ดมีความชื้น 10% ใช้การอบด้วยลมร้อนที่ 75° ซ. แม้เพียงไม่กี่นาทีสามารถทำให้เมล็ดตายหรือไม่งอกทั้งหมด ในทางตรงกันข้ามถ้าเมล็ดมีความชื้นน้อยกว่า 5% สามารถใช้การอบด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิสูงได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อความมีชีวิตของเมล็ด (Nakamura, 1982)

เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้เก็บข้อมูลความชื้นของเมล็ดก่อนที่จะนำมาทดสอบ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลในส่วนนี้ได้ อย่างไรก็ตามจากกรรมวิธีควบคุมในเมล็ดติดเชื้อ (T8) และในเมล็ดไม่ติดเชื้อ (T10) ที่เมล็ดไม่ผ่านการแช่น้ำ จะเห็นได้ว่าอัตราการงอกในทั้ง 2 พันธุ์มีความแตกต่างกันในทั้ง 2 กรรมวิธีควบคุม เช่น ใน T8 มีอัตราการงอกที่ 77 และ 98% และใน T10 มีอัตราการงอกที่ 86 และ 95% ของพันธุ์ P-74 และ P-TV ตามลำดับ (Table 1) ซึ่งเห็นว่าความชื้นในเมล็ดเริ่มต้นของทั้งสองพันธุ์มีความแตกต่างกัน จึงส่งผลให้อัตราการงอกของทั้งสองพันธุ์มีความแตกต่างกันหลังเมล็ดผ่านกรรมวิธีในการกำจัดเชื้อ

Table 1 Evaluation of seed treatments for control of PCFVd in pepper seeds of variety P-74 and P-TV

Treatment	Seed variety	Viroid detection rate * (%)			Seed germination rate (%)
		Whole seed	Seed coat	Seedling	
T1: 3% NaOCl 25 min	P-74	0	0	0	49 f
	P-TV	0	0	0	71 cde
T2: 10% NaHCO ₃ 25 min	P-74	0	0	0	91 bcd
	P-TV	0	0	0	94 abc
T3: 3% NaOCl + 50° C HWT 25 min	P-74	0	NT	NT	0
	P-TV	0	NT	NT	0
T4: 3% NaOCl + 50° C HWT 60 min	P-74	0	NT	NT	0
	P-TV	0	NT	NT	0
T5: 50° C HWT 25 min + 72° C DHT 24 hr	P-74	0	0	0	99 a
	P-TV	0	0	0	96 ab
T6: 50° C HWT 25 min + 72° C DHT 48 hr	P-74	0	NT	NT	0
	P-TV	0	NT	NT	0
T7: 0.5 N HCl 15 min + 10% TSP 1 hr + 80° C DHT 24 hr	P-74	25	NT	NT	0
	P-TV	50	NT	NT	0
T8: No treatment	P-74	100	100	100	77 e
	P-TV	100	100	100	98 a
T9: H ₂ O 25 min	P-74	100	100	100	95 ab
	P-TV	100	100	100	95 ab
T10: healthy seed, no treatment	P-74	0	0	0	86 de
	P-TV	0	0	0	95 ab
T11: healthy seed, H ₂ O 25 min	P-74	0	0	0	100 a
	P-TV	0	0	0	100 a
CV (%)					5.21

Means in the same column followed by the different letters are significantly different at P<0.05 by LSD, CV = coefficient of variation, *100 seeds test (25 seeds/sample); HWT: hot water treatment; DHT: dry heat treatment, HCl: hydrochloric acid; TSP: trisodium phosphate; NaOCl: sodium hypochlorite; NaHCO₃: sodium bicarbonate; NT: no test

นอกจากนั้นการอบด้วยลมร้อนกับเมล็ดที่มีความชื้นสูงในขณะเริ่มกรรมวิธีการกำจัดเชื้อและใช้เวลากำจัดเชื้อที่ยาว ยังส่งผลให้เกิดความผิดปกติกับต้นกล้าที่งอกได้ เนื่องจากอุณหภูมิส่งผลต่อกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ อย่างไรก็ตามการอบด้วยลมร้อนที่เหมาะสมในเมล็ดพืชบางชนิดยังมี

ประโยชน์ช่วยในการกระตุ้นการงอกของเมล็ด ดังนั้น การเลือกใช้การกำจัดเชื้อด้วยความร้อนควรมีการตรวจวัดความชื้นของเมล็ดก่อนเริ่มต้นกรรมวิธีการกำจัดเชื้อ เพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับเมล็ด (Nakamura, 1982)

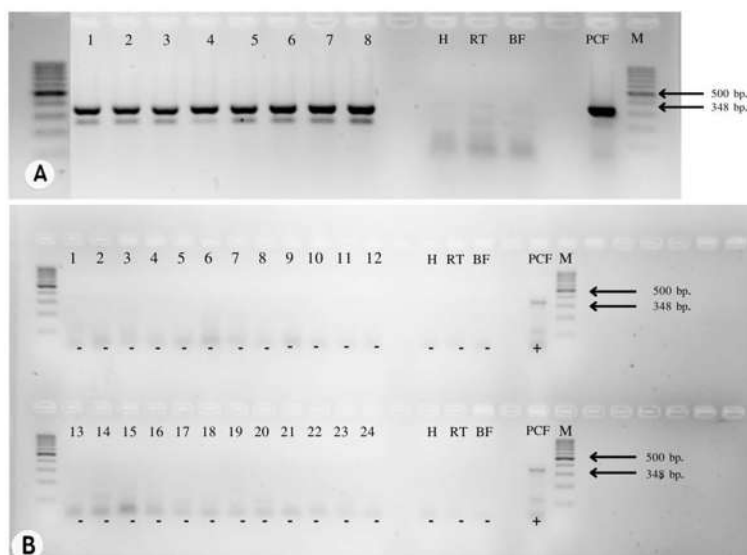


Figure 1 PCFVd detection by RT-PCR technique and the PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis; A = whole seed test of PCFVd-infected pepper seeds of P-74 (lane 1 - 4) and P-TV (lane 5 - 8); B = seed treatment no. 5 (T5) of PCFVd-infected pepper seeds of P-74 (lane 1 - 4 are whole seeds, lane 5 - 8 are seed coats and lane 9 - 12 are seedlings) and seed treatment no. 5 (T5) of PCFVd-infected pepper seeds of P-TV (lane 13 - 16 are whole seeds, lane 17 - 20 are seed coats and lane 21 - 24 are seedlings); H = healthy seeds; RT = rt reaction products; BF = buffer; and PCF = pepper chat fruit viroid used as control; M = 100 bp DNA ladder markers

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบวิธีการกำจัดเชื้อไวรัส PCFVd ที่มีการถ่ายทอดมาจากเมล็ดพันธุ์พริก โดยใช้สารเคมี หรือการใช้สารเคมีร่วมกับการแช่น้ำร้อน และ/หรืออบด้วยลมร้อน ที่อุณหภูมิและช่วงเวลาที่แตกต่างกัน กับเมล็ดพันธุ์พริก P-74 และ P-TV ที่มีการติดเชื้อไวรัส PCFVd 100% โดยในการทดลองทำการตรวจผลการติดเชื้อ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR และตรวจอัตราการงอกของเมล็ดหลังจากผ่านกรรมวิธีการกำจัดเชื้อในแบบต่าง ๆ พบว่า การแช่เมล็ดพันธุ์พริกในน้ำร้อนอุณหภูมิ 50° ซ. นาน 25 นาที ตามด้วยการอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 72° ซ. เป็นเวลา 24 ชม. มีประสิทธิภาพดีที่สุด สามารถกำจัดเชื้อ PCFVd จากเมล็ดได้ 100% ตรวจไม่พบการติด

เชื้อ PCFVd จากเมล็ดทั้งบริเวณเปลือกหุ้มเมล็ดและต้นอ่อน ทั้งนี้ไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการงอกของเมล็ดพริกในทั้งสองพันธุ์ ผลจากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นคำแนะนำเพื่อลดการติดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์พริกได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนเพื่อส่งเสริมและการผลิตนิสิตระดับบัณฑิตศึกษาจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ขอขอบคุณบุคลากรภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนสถานที่และเครื่องมือต่าง ๆ เพื่อใช้ในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2566. ข้อมูลการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุมเพื่อการค้า ปี 2566. แหล่งที่มา: https://www.doa.go.th/ard/?page_id=1443. สืบค้น: 20 เมษายน 2567.
- 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 Disease*. 91(1): 47-50.
- Card, S.D., M.N. Pearson and G.R.G. Clover. 2007. Plant pathogens transmitted by pollen. *Australasian Plant Pathology*. 36: 455-461.
- Chambers, G.A., A.M. Seyb, J. Mackie, F.E. Constable, B.C. Rodoni, D. 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: 1386.
- Córdoba-Sellés, M. C., A. García-Rández, A. Alfaro-Fernández and C. JordáGutiérrez. 2007. Seed transmission of *Pepino mosaic virus* and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease*. 91: 1250-1254.
- Garnsey, S.M. and R. Whidden. 1971. Decontamination treatments to reduce the spread of *Citrus exortis virus* (CEV) by contaminated tools. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 84: 63-67.
- Hammond, R.W. 2017. Seed, pollen, and insect transmission of viroids. pp. 521-529. In: *Viroids and Satellites*. A. Hadidi and R. Flores (eds). Elsevier Inc.
- Hammond, R.W. and R.A. Owens. 2006. Viroids: new and continuing risks for horticultural and agricultural crops. *APS Features*. Available at: <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2006-1106>. Accessed: January 19, 2023.
- International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). 1995. Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum spp.*). Available at: <https://cgspace.cgiar.org/items/ef0f3bcd-4878-4025-90ed-098a4c1b2918>. Accessed: February 1, 2024.
- ISTA. 2016. International Rules for Seed Testing 2016. The International Seed Testing Association (ISTA) Zürichstrasse 508303, Bassersdorf CH - Switzerland. 16. Available at: https://www.merconet.eu/files/SeedSampling_ISTA.pdf. Accessed: October 10, 2023.
- Jeffries, C. and J. Tina. 2004. Protocol for the Diagnosis of Quarantine Organism: *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). Scottish Agricultural Science Agency, East Craigs, Edinburgh, United Kingdom.
- 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. *International Journal of Agricultural Technology*. 18(4): 1601-1618.
- Matsuura, S., Y. Matsushita, T. Usugi and S. Tsuda. 2010. Disinfection of tomato *Chlorotic dwarf viroid* by chemical and biological agents. *Crop Protection*. 29(10): 1157-1161.
- Matsushita, Y and S. Tsuda. 2016. Seed transmission of *Potato spindle tuber viroid*, *Tomato*

- chlorotic dwarf viroid*, *Tomato apical stunt viroid* and *Columnea latent viroid* in horticultural plants. *European Journal of Plant Pathology*. 145: 1007–1011.
- Nakamura, H. 1982. Effects of dry heat treatment for seed disinfection on germination in vegetables. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 15: 243-247.
- Olivier, T., V. Sveikauskas, S. Grausgruber-Groger, M. VirscekMarn, F. Faggioli, M. Luigi, E. Pitchugina and V. Planchon. 2015. Efficacy of five disinfectants against *Potato spindle tuber viroid*. *Crop Protection*. 67: 257-260.
- R core team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. Available at: <https://www.r-project.org/>. Accessed: October 10, 2023
- Reanwarakorn, K., S. Klinkong and J. Porsoongnum. 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*. 24(6): 6.
- Serio, F.D., R. Flores, J.Th.J. Verhoeven, S.F. Li, V. Pallás, J.W. Randles, T. Sano, G. Vidalakis and R.A. Owens. 2014. Current status of viroid taxonomy. *Archives of Virology*. 159: 3467–3478.
- Singh, R.P., A. Boucher and T.H. Somerville. 1989. Evaluation of chemicals for disinfection of laboratory equipment exposed to *Potato spindle tuber viroid*. *American Journal of Potato Research*. 66: 239-245.
- Sombat, S. 2019. Multiplex Real-time RT-PCR and Seed Disinfection of *Pepper chat fruit viroid* and *Columnea latent viroid* in Tomato Seed. Thesis in Doctor of Philosophy of Science, Program in Plant Pathology. Kasetsart University. 82 p.
- 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 Research*. 144: 209-214.
- Verhoeven, J.T.J., H.M.S. Koenraad, A. Jodłowska, L. Hüner and J.W. Roenhorst. 2020. Pospiviroid infection in *Capsicum annuum*: Disease symptom and lack of seed transmission. *European Journal of Plant Pathology*. 156: 21-29.
- Verhoeven, J. T. J., M. Botermans, R. Schoen, H. Koenraad and J. W. Roenhorst. 2021. Possible overestimation of seed transmission in the spread of pospiviroids in commercial pepper and tomato crops based on large-scale grow-out trials and systematic literature review. *Plants*. 10(8): 1707.
- Wang, C.H. 2022. Evaluation of seed re-treatment efficiency for viroid positive seed lots. World Vegetable Center. Available at: <https://worldveg.tind.io/record/74713>. Accessed: December 9, 2023.
- Yanagisawa, H., Y. Shiki, Y. Matsushita, M. Ooishi, N. Takaue and S. Tsuda. 2017. Development of a comprehensive detection and identification molecular based system for eight pospiviroids. *European Journal of Plant Pathology*. 149: 11–23.