

การติดเชื้อ การถ่ายทอดทางเมล็ด และความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์
ของเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* ในพริกและมะเขือ

Infection, Seed Transmission and Sequence Variation of
Pepper chat fruit viroid in Pepper and Eggplant

กัญญารัตน์ อุบลรัตน์^{1/} ษมากร สิงห์พันธุ์^{1/*}

Kanyarat Aubonrat^{1/} Samabhorn Singhabandhu^{1/*}

Received 5 Nov. 2024/Revised 27 Mar. 2025/Accepted 27 Mar. 2025

ABSTRACT

Pepper chat fruit viroid (PCFVd) is a significant quarantine pest impacting the production of pepper and tomato crops for exportation. This study aimed to evaluate the pathogenicity, disease symptoms, seed transmission rate, and nucleotide sequence variation of PCFVd. Mechanical inoculation was conducted on 13 pepper accessions and 16 eggplant accessions. Reverse transcription-polymerase chain reaction was used to detect viroid infection. The results showed 100% infection in all pepper samples, which led to reduced fruit size, though seeds were still produced. Among the eggplant samples, 12 showed infection rates of 10-100%, while 4 accessions were not infected. Infected leaves and flowers of eggplant exhibited reduced sizes but still produced viable seeds. Seedlings from infected plants exhibited transmission rates of 48.9 and 2% in pepper accessions CA1181 and CA1220, respectively, and 1.2% in eggplant accessions SM021B. The RNA from the infected seeds and seedlings was also pathogenic when reinoculated into a susceptible tomato variety, Seedatip4. The nucleotide sequence comparison of the DNA products obtained in this study with the database of GenBank confirmed the species as PCFVd. Nucleotide sequence variation was identified in the terminal right domain, exhibiting 96–99% sequence identity to the LPng20-11c1 isolate (accession no. JF446893). This study demonstrated that PCFVd can induce disease and be transmitted through seeds of both pepper and eggplant plants.

Keywords: reverse transcription-polymerase chain reaction; *Pepper chat fruit viroid*; seed transmission; quarantine pest

^{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: fagsab@ku.ac.th

บทคัดย่อ

เชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) เป็น ศัตรูพืชกักกันของหลายประเทศ มีผลกระทบต่อ การส่งออกเมล็ดพันธุ์และการผลิตพริกและมะเขือเทศ จึงได้ศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ PCFVd ลักษณะอาการโรค อัตราการถ่ายทอดเชื้อผ่านทาง เมล็ด และความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อ PCFVd โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล บนพริกจำนวน 13 accessions และมะเขือจำนวน 16 accessions ตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction พบว่า พริกทุก accessions ติดเชื้อ 100% และมีขนาด ผลลดลงแต่ติดเมล็ดได้ ในมะเขือติดเชื้อ 10-100% โดยพบการติดเชื้อ 12 accessions และไม่ติดเชื้อ 4 accessions ใบและดอกมะเขือที่ติดเชื้อมีขนาด ลดลงแต่ติดเมล็ดได้ เมื่อนำเมล็ดพริกและมะเขือ มาศึกษาการถ่ายทอดเชื้อทางเมล็ดในสภาพโรงเรือน พบอัตราการติดเชื้อในต้นกล้าที่งอกจากเมล็ดที่ได้จาก ต้นพริกติดเชื้อ 2 accessions ได้แก่ CA1181 และ CA1220 คิดเป็น 48.9 และ 2% ตามลำดับ และจาก มะเขือ 1 accession ได้แก่ SM021B มีอัตราต้นกล้า ติดเชื้อ 1.2% อาร์เอ็นเอจากเมล็ดและต้นกล้าที่ตรวจ พบเชื้อ PCFVd สามารถก่อโรคบนพืชทดสอบมะเขือเทศ อ่อนแอพันธุ์สีดาทิพย์ 4 การเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank ยืนยันชนิดเชื้อไวรอยด์ว่าเป็น PCFVd โดย ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณโดเมน ฝั่งขวาของเชื้อ PCFVd มีความเหมือนกับไอโซเลต LPng20-11c1 (accession no. JF446893) 96–99% ผลการศึกษานี้ชี้ว่าเชื้อ PCFVd สามารถก่อโรคและ ถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดพันธุ์พริกและมะเขือได้

คำสำคัญ: ปฏิกริยาปลูกโซโพลิเมอร์เรสแบบย้อนกลับ; การถ่ายทอดทางเมล็ด; ความผันแปรของลำดับ นิวคลีโอไทด์; ศัตรูพืชกักกัน

บทนำ

เชื้อไวรอยด์เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุด ลักษณะโครงสร้างเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นวงปิด ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ และไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม สามารถเพิ่มปริมาณตัวเองได้ในเซลล์ที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลาย และก่อโรคกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลก (Diener, 1987) การแพร่กระจายและการถ่ายทอดเชื้อจะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อไวรอยด์ และวิธีการถ่ายทอด ซึ่งเชื้อไวรอยด์สามารถถ่ายทอดด้วยวิธีกลได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การสัมผัสน้ำคั้นจากต้นเป็นโรคที่เข้าทำลายโดยเชื้อ PSTVd, *Citrus exocortis viroid* (CEVd), CLVd (Hadidi et al., 2003) และ PCFVd (Verhoeven et al., 2009; Yanagisawa and Matsushita, 2017) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการถ่ายทอดเชื้อไวรอยด์ผ่านทางเมล็ดและละอองเกสร เช่น PSTVd ในมะเขือเทศ (Matsushita and Tsuda, 2016) และ CLVd ในพริก (ขมากรและคณะ, 2562) เป็นต้น มีรายงานการพบเชื้อไวรอยด์ชนิดใหม่ในประเทศเนเธอร์แลนด์ ได้แก่ เชื้อ PCFVd พบครั้งแรกในฤดูใบไม้ร่วงภายในโรงเรือนปลูกพริกหวาน (*Capsicum annuum* L.) อาการที่เกิดจากเชื้อ PCFVd คือ ขนาดของผลลดลงถึง 50% และพืชมีการเจริญเติบโตลดลง (Verhoeven et al., 2009) เชื้อ PCFVd ยังก่อโรครุนแรงกับมะเขือเทศและมันฝรั่ง โดยทำให้เกิดอาการเส้นใบไหม้ (vein necrosis) ขนาดผลลดลงในมะเขือเทศและขนาดหัวลดลงในมันฝรั่ง

ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ PCFVd ในมะเขือเทศที่ จ.ลำปาง โดยพบว่า มีลำดับ

เดี่ยวแคะ เส้นใบไหม้ ใบบิดเบี้ยวผิดปกติและใบเปลี่ยนสี ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่พบอนุภาคไวรัส แต่ตรวจพบด้วยเทคนิค RT-PCR มีความเหมือนกับเชื้อ PCFVd ที่ได้มีรายงานจากประเทศเนเธอร์แลนด์ 99% (คณิงนิตย, 2556; Reanwarakorn et al., 2011) การเข้าทำลายของเชื้อไวรอยด์ส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ดังนั้น เชื้อ PCFVd จึงถูกกำหนดให้เป็นศัตรูพืชกักกันของหลายประเทศ (กรมวิชาการเกษตร, 2564ก; 2564ข) มีผลกระทบต่อ การส่งออกเมล็ดพันธุ์พืช ดังเช่น การตรวจพบเชื้อ PCFVd ติดไปกับเมล็ดมะเขือเทศที่ส่งจากประเทศไทยไปประเทศออสเตรเลีย ทำให้ประเทศไทยถูกระงับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์และมีมาตรการตรวจสอบที่เข้มข้มขึ้น (Chambers et al., 2013) และจากรายงานการตรวจเชื้อไวรอยด์จากเมล็ดมะเขือเทศและพริกพันธุ์การนำเข้าของประเทศไทยออสเตรเลียจำนวน 49 lots พบเชื้อ PCFVd ปนเปื้อนในเมล็ดมะเขือเทศและพริก 8 และ 36% ตามลำดับ (Dall et al., 2019) การเข้าทำลายของเชื้อยากต่อการสังเกตด้วยตาเปล่า การตรวจวินิจฉัยโรคต้องใช้เทคนิคที่แม่นยำและนำเชื้อถือ นอกจากนี้ข้อมูลความแตกต่างอัตราการติดเชื้อ และการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพันธุ์ของเชื้อ PCFVd ในพริกและมะเขือ accessions ต่าง ๆ ยังขาดรายละเอียด ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการเข้าทำลายและการถ่ายทอดเชื้อ PCFVd ผ่านทางเมล็ดพริก (*C. annuum*) และมะเขือ (*Solanum melongena*) และความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ PCFVd เพื่อเป็นประโยชน์ในการหาแนวทางควบคุมโรคจากเชื้อ PCFVd ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นข้อมูลเพื่อตรวจหาเชื้อในระบบการผลิตพืชระดับแปลง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมพืชทดสอบ

นำเมล็ดพันธุ์พริก และมะเขือ 13 และ 16 accessions ตามลำดับ (Table 1-2) จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพาะในกระถางขนาด 2.5 นิ้ว และย้ายกล้าลงกระถางขนาด 10 นิ้ว ในโรงเรือนตาข่ายป้องกันแมลง พืชทดสอบ 10 ต้น/accession และเตรียมพืชปกติควบคุม 4 ต้น/accession

2. การปลูกเชื้อและการเก็บข้อมูล

นำเชื้อ PCFVd ไอโซเลต LPng20-11c1 (accession no. JF446893) ที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.คณิงนิตย เจริญวรารากร ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์4 เมื่อครบ 4 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อ บดใบมะเขือเทศติดเชื้อ PCFVd อัตรา 1 ก. ต่อบัฟเฟอร์ (0.1M phosphate buffer, pH 8.0 ที่เติม 0.1% w/v Na₂SO₃) 20 มล. จนละเอียดและกรองเอาเศษพืชออก เติมนงคาร์โบรันตัม 0.1% w/v ปลูกเชื้อด้วยวิธีกล โดยทาน้ำคั้นลงบนใบต้นกล้าพริกและมะเขือที่มีใบจริง 3-4 ใบ ทิ้งไว้ 5 นาที และล้างด้วยน้ำสะอาด และปลูกเชื้ออีกครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ และทาบัฟเฟอร์บนพืชปกติควบคุม จากนั้นสังเกตอาการและตรวจสอบการติดเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR เมื่อครบ 8 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อ ปล่อยให้ติดเมล็ดตามธรรมชาติในสภาพโรงเรือนตาข่ายป้องกันแมลง เก็บผลพริกและมะเขือที่สุกแก่เต็มที่ นำมาผ่าผลเพื่อเก็บเมล็ด ล้างเมล็ดด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง ตากเมล็ด

ให้แห้งในสภาพอุณหภูมิห้อง แยกเมล็ดที่มีความสมบูรณ์ซึ่งจะมีลักษณะเมล็ดสีเหลืองอ่อน นูนเล็กน้อยเนื่องจากมีเอ็มบริโออยู่ด้านใน ออกจากเมล็ดผิดปกติที่มีลักษณะดำหรือแบนลึบ นับจำนวนและบรรจุใส่ซอง บันทึกข้อมูลกำกับไว้ และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

3. การตรวจสอบการติดเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบและเมล็ดพืชทดสอบปลูกเชื้อและจากต้นปกติควบคุม โดยใช้สาร TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต โดยดัดแปลงวิธีการด้วยการใช้ตัวอย่างพืชทดสอบที่บดละเอียดปริมาณ 50 มก. ผสมให้เข้ากันกับสาร TRIzol 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมหคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 15 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบน 350 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.7 มล. และเติม isopropanol 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมา 20 ครั้ง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้งและเก็บตะกอน ล้างตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 5 นาที (ล้างตะกอนซ้ำ 2 ครั้ง) เก็บตะกอนและใช้ปิเปตดูดของเหลวที่เหลือออกให้หมด ตากตะกอนในตู้ดูดควันเป็นเวลา 10 นาที และละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 0.1X TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง และนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปหรือเก็บตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ -20 °ซ.

นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบหาเชื้อ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR กับคูไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ PCFVd ประกอบด้วยไพรเมอร์ PCF-seq-F (5' CCGTCTTCTGACAGGAGTA ATCCC 3') และ PCF-seq-R (5'ACCCGCACGGCGCT TCTC 3') ที่ให้ผลผลิตขนาด 348 คู่เบส (Yanagisawa and Matsushita, 2017) โดยมีขั้นตอนดังนี้ การทำ reverse transcription (RT) เพื่อสร้างสาย cDNA จาก RNA ปฏิกริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยไพรเมอร์ PCF-seq-R ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ 10 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างอาร์เอ็นเอ 3.5 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยใช้โปรแกรม 96 °ซ. นาน 5 นาที 1 รอบ จากนั้นนำมาแช่แข็งทันทีที่ 5 นาที และเติมส่วนผสมของ reverse transcriptase buffer ความเข้มข้น 1X ปริมาตร 4 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs 2 ไมโครลิตร และเอนไซม์ reverse transcriptase 100 ยูนิต นำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยใช้โปรแกรม 49 °ซ. นาน 1 ชั่วโมง และตามด้วยอุณหภูมิ 70 °ซ. นาน 10 นาที จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยขั้นตอน PCR จาก cDNA ที่ได้ โดยปฏิกริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย GO tag green master mix (Promega) 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ PCF-seq-F และ PCF-seq-R ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครลิตร น้ำนิ่งฆ่าเชื้อที่ปราศจาก nuclease 6 ไมโครลิตร และ cDNA จากปฏิกริยา RT 2 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยใช้โปรแกรมนี้นี้: 92 °ซ. นาน 3 นาที 1 รอบ จากนั้นตามด้วย 92 °ซ. นาน 40 วินาที 62 °ซ. นาน 40 วินาที และ 72 °ซ. นาน 40 วินาที 35 รอบ และ 72 °ซ. นาน 7 นาที 1 รอบ ตามลำดับ

ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE เติมสีย้อม (staining dye) Red safe™ (intron BIOTECHNOLOGY) อัตรา 1 ไมโครลิตร/เจล

20 มล. แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยความต่างศักย์ของกระแสไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที และตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตกับเครื่อง gel documentation และบันทึกภาพเพื่อยืนยันชนิดของไวรอยด์ที่ตรวจพบด้วยเทคนิค RT-PCR ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอผลผลิตขนาด 348 คู่เบส จากเจล โดยใช้ชุดสกัด FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit (FAVOGEN® BIOTEC CORP.) ตามขั้นตอนของบริษัทส่งตัวอย่าง DNA วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger (Sanger sequencing) กับ BIONICS (South Korea Co., Ltd.) และเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลใน NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST

4. การถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อ PCFVd ในเมล็ดพริกและมะเขือ

4.1 การตรวจสอบการติดเชื้อเบื้องต้นเปรียบเทียบกับต้นปกติควบคุม

สุ่มเมล็ดจากต้นติดเชื้อทุกต้น 100 เมล็ดต่อ accession และต้นปกติของแต่ละ accession สกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ดที่บดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว น้ำหนัก 50 มก. ด้วยสาร TRIzol® (1 ตัวอย่าง RNA สกัดจาก 100 เมล็ด/accession) และตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ PCF-seq ดังวิธีการที่กล่าวไว้ในข้างต้น ตัวอย่าง RNA จากเมล็ดของ accession ที่ให้ผลผลิต DNA ขนาดประมาณ 350 คู่เบส เท่ากับขนาดผลผลิต DNA ของเชื้อ PCFVd (positive control) จะให้ผลตรวจตัวอย่างดังกล่าวเป็นบวกหรือตรวจพบเชื้อ PCFVd และยืนยันความสามารถในการ

ก่อโรคของเชื้อ PCFVd ที่ตรวจพบจากเมล็ดพริกและมะเขือด้วยการนำเมล็ดที่บดละเอียดในชั้นตอนนี้ อัตรา 100 มก. ผสมกับบัฟเฟอร์ (0.1M phosphate buffer, pH 8.0 ที่เติม 0.1% (v/w) Na₂SO₃) ปริมาตร 1 มล. และปลูกเชื้อด้วยการป้ายน้ำคั้นจากเมล็ดกลับไปบนมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 (biological assay) จำนวน 3 ต้น/accession สังเกตอาการบนมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อและตรวจหาเชื้อ PCFVd หลังการปลูกเชื่อนาน 4 สัปดาห์ ด้วยเทคนิค RT-PCR มะเขือเทศสีดาทิพย์ 4 ที่แสดงอาการและตรวจพบเชื้อ PCFVd อย่างน้อย 1 ต้น จาก 3 ต้น ใช้ยืนยันว่าเชื้อ PCFVd จากเมล็ดยังมีความสามารถในการก่อโรค

4.2 การถ่ายทอดเชื้อไปสู่ต้นกล้าจากเมล็ดที่ได้จากต้นติดเชื้อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ได้จากต้นปกติ

นำเมล็ดพริกและมะเขือที่ได้จากต้นปกติและเมล็ดที่ได้จากต้นติดเชื้อ PCFVd 100 เมล็ด/accession เพาะในกระถางขนาด 2.5 นิ้ว ที่มีพีทมอสเป็นวัสดุเพาะกล้า 1 เมล็ด/กระถาง ในสภาพโรงเรือนตาข่ายป้องกันแมลง เก็บข้อมูลอัตราการงอก ลักษณะการเจริญเติบโต และอาการผิดปกติต่าง ๆ และเก็บตัวอย่างใบเมื่อต้นพริกและมะเขืออายุ 12 สัปดาห์ เพื่อนำไปสกัด RNA และตรวจสอบหาเชื้อ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR คำนวณหาอัตราการถ่ายทอดเชื้อ PCFVd ผ่านทางเมล็ดไปสู่ต้นกล้า จากสูตร (1) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลผลิต DNA ที่ได้เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อไวรอยด์

$$\text{อัตราการถ่ายทอดเชื้อ PCFVd ผ่านทางเมล็ดไปสู่ต้นกล้า} = \frac{\text{จำนวนต้นกล้าติดเชื้อ PCFVd}}{\text{จำนวนต้นกล้าที่ออกทั้งหมด}} \times 100 \quad (1)$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การติดเชื้อและอาการผิดปกติที่เกิดจากเชื้อ PCFVd

พริกทั้ง 13 accessions หลังได้รับการปลูกเขื่อนาน 8 สัปดาห์ พบว่า มีอัตราการติดเชื้อทุก accessions

หรือ 100% และพบอาการผิดปกติ คือ พริกมีความสูงของต้นลดลง ยอดเป็นกระจุก และบางพันธุ์ผลพริกมีขนาดเล็กลง (Table 1 และ Figure 1) แต่พืชทดสอบยังสามารถเจริญเติบโตมีการติดผลและเมล็ดได้

Table 1 The infectivity and seed transmission rate of PCFVd on pepper (*C. annuum*)

No.	Accession	Fruit type	PCFVd infection in mother plants			PCFVd infection in seed		
			% Plant infection	Symptom	100 seeds bulked / Bioassay ^a	by Grow-out test		
						% G ^b	% G ^c	% Inf ^d , (Bioassay)
1	CA1106	elongate	100	BS, RF	+/+	50	39	0 (0/39), (-)
2	CA1110	elongate	100	RF	+/+	65	70	0 (0/70), (-)
3	CA1113	elongate	100	RF	+/+	90	92	0 (0/92), (-)
4	CA1168	elongate	100	RF	+/+	65	87	0 (0/87), (-)
5	CA1172	elongate	100	NS	+/+	87	65	0 (0/65), (-)
6	CA1179	elongate	100	RF	+/+	87	61	0 (0/61), (-)
7	CA1181	triangular	100	RF	+/+	95	90	48.9 (+44/90), (+)
8	CA1182	blocky	100	RF	+/+	85	73	0 (0/73), (-)
9	CA1194	blocky	100	RF	+/+	80	51	0 (0/51), (-)
10	CA1199	blocky	100	RF	+/+	68	72	0 (0/72), (-)
11	CA1200	elongate	100	RF	+/+	90	72	0 (0/72), (-)
12	CA1210	blocky	100	RF	+/+	70	15	0 (0/15), (-)
13	CA1220	blocky	100	RF	+/+	90	50	2 (+1/50), (+)

Remark: BS = Bushy; RF = Reduced fruit size; NS = No symptom

(+) = PCFVd-infected sample was found by RT-PCR; (-) = PCFVd-infected sample was not found by RT-PCR

^a Bioassay as mechanical inoculation on Seedathip4 tomato

^b Germination rate of seed from healthy plant = (number of germinated seedling/total seed) x 100

^c Germination rate of seed from PCFVd-infected plant = (number of germinated seedling/total seed) x 100

^d PCFVd infected rate = (number of PCFVd-infected seedling /total germinated seedling) x 100

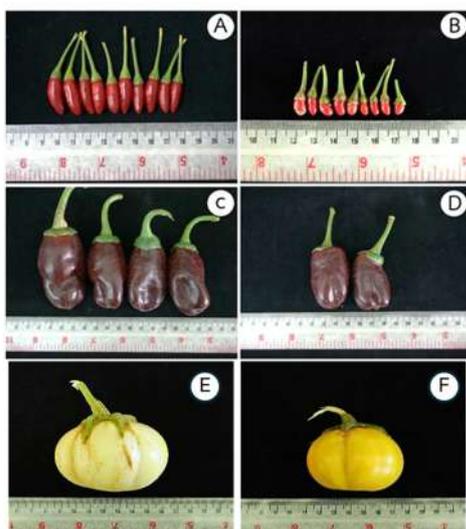


Figure 1 Characteristics of *C. annuum* two accessions; CA1181 (A, B) and CA1220 (C, D) and *S. melongena* accession SM021B (E, F); Fruits from healthy plants (A, C, E) and fruits from PCFVd-infected plants (B, D, F)

ส่วนมะเขือ 16 accessions พบว่า 12 accessions มีอัตราการติดเชื้อ 10-100% และไม่ติดเชื้อ 4 accessions นอกจากนี้ ยังพบอาการผิดปกติ ได้แก่ ใบและดอกของต้นติดเชื้อมีขนาดลดลง แต่ดอกยังสามารถพัฒนาเป็นผลและติดเมล็ดได้ โดยมีตัวอย่างมะเขือ 8 accessions ที่มีอัตราการติดเชื้อ PCFVd 100% ได้แก่ SM006 SM264 SM244 SM004 SM013 SM099

SM021B และ SM112 มี 3 accessions ที่อัตราการติดเชื้อ 83-85.7% ได้แก่ SM252-36 SM252-49 และ SM110A มี 1 accession ที่อัตราการติดเชื้อ 10% ได้แก่ SM103B และมี 4 accessions ที่อัตราการติดเชื้อ 0% ได้แก่ มะเขือยาว 1 accession คือ SM057 และมะเขือจาน 3 accessions คือ SM474 SM474B และ SM477 (Table 2, Figure 2-3)

Table 2 The infectivity and seed transmission rate of PCFVd on eggplants (*S. melongena*)

No.	Accession	Fruit type	PCFVd infection in mother plants			PCFVd infection in seed		
			% Plant infection	Symptom	100 seeds bulked/Bioassay ^a	by Grow-out test		
						% G ^b	% G ^c	% Inf ^d , (Bioassay)
1	SM006	long green	100	RL, RFL	+/+	100	100	0 (0/100), (-)
2	SM252-36	long green	85.7	NS	+/+	80	84	0 (0/84), (-)
3	SM264	long green	100	RL, RFL	+/+	97	93	0 (0/93), (-)
4	SM057	long purple	0	NS	-/-	90	90	0 (0/90), (-)
5	SM244	long purple	100	ST, RL, RFL	+/+	90	90	0 (0/90), (-)
6	SM252-49	long purple	85.7	ST, RL, RFL	-/-	100	100	0 (0/100), (-)
7	SM004	round green	100	RL, RFL	-/-	100	100	0 (0/100), (-)
8	SM013	round green	100	RL, RFL	-/-	100	64	0 (0/64), (-)
9	SM099	round green	100	RL, RFL	+/+	32	5	0 (0/5), (-)
10	SM103B	round green	10	RL, RFL	+/+	100	96	0 (0/96), (-)
11	SM110A	round green	83	RL, RFL	+/+	100	92	0 (0/92), (-)
12	SM021B	white ribbed	100	RL, RFL	+/+	80	77	1.2 (+1/77), (+)
13	SM112	white ribbed	100	RL, RFL	+/+	92	80	0 (0/80), (-)
14	SM474	white ribbed	0	NS	-/-	80	85	0 (0/85), (-)
15	SM474B	white ribbed	0	NS	-/-	90	90	0 (0/90), (-)
16	SM477	white ribbed	0	NS	-/-	100	98	0 (0/98), (-)

Remark: ST = Stunt; RL = Reduced leaf size; RFL = Reduced flower size; NS = No symptom

(+) = PCFVd-infected sample was found by RT-PCR; (-) = PCFVd-infected sample was not found by RT-PCR

^a Bioassay as mechanical inoculation on Seedathip4 tomato

^b Germination rate of seed from healthy plant = (number of germinated seedling/total seed) x 100

^c Germination rate of seed from PCFVd-infected plant = (number of germinated seedling/total seed) x 100

^d PCFVd infected rate = (number of PCFVd-infected seedling /total germinated seedling) x 100

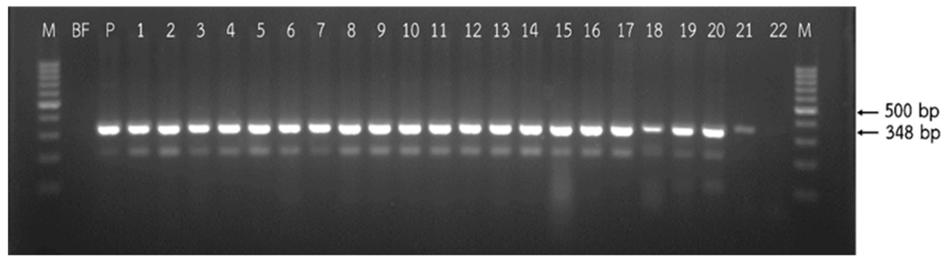


Figure 2 Results of PCFVd infection detected by RT-PCR technique using PCF-seq primers with target DNA of 348 bp (PCFVd-infected plant) from RNA extracted from *S. melongena*, 8 weeks after inoculation; M = 100 bp. Molecular weight marker, BF = buffer, P = PCFVd positive control, 1-5 = SM006 plant no. 1 to 5, 6-10= SM252-36 plant no. 1 to 5, 11-15 = SM264 plant no. 1 to 5, 16-19 = SM244 plant no. 1 to 4 and 20-22 = SM252-49 plant no. 1 to 3, respectively

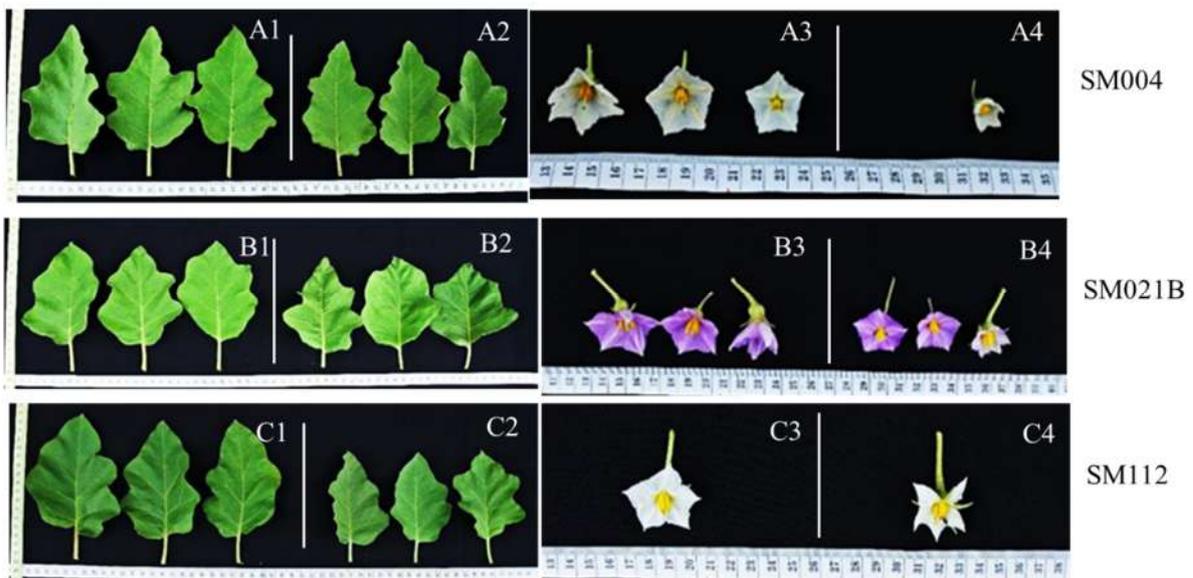


Figure 3 Comparison on healthy and PCFVd-infected plants of *S. melongena* three accessions, SM004 (A1-A4), SM021 (B1-B4) and SM112 (C1-C4): healthy leaves (A1, B1, C1); infected leaves (A2, B2, C2); healthy flowers (A3, B3, C3) and infected flowers (A4, B4, C4)

การศึกษานี้สอดคล้องกับ Verhoeven et al. (2009; 2011; 2020) ที่พบว่า เชื้อ PCFVd สามารถเข้าทำลายในพริกชนิด *C. annuum* และส่งผลให้ผลพริกมีขนาดเล็กลง และ Matsushita and Tsuda (2015) ที่พบว่า เชื้อ PCFVd สามารถเพิ่มปริมาณในพริกชนิด *C. annuum* และพบอาการผลเล็กลงเช่นเดียวกัน การศึกษาของ Keyata et al (2024) พบว่า

พริกพันธุ์การค้าทั้ง *C. annuum* และ *C. frutescense* L. ที่ติดเชื้อ PCFVd มีอาการต้นเตี้ยแคระ ทรงพุ่มแคบลง พริกบางพันธุ์ไม่มีการติดผลและเมล็ดเมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติในพันธุ์เดียวกัน โดยในพันธุ์ที่ติดเมล็ดตรวจพบเชื้อ PCFVd แต่ไม่พบการถ่ายทอดเชื้อไปยังต้นกล้าพริก เมื่อเปรียบเทียบกับอาการโรคที่เกิดจากเชื้อ PCFVd ในมะเขือเทศพันธุ์ Money-

maker (Verhoeven et al., 2009) และมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers (Reanwarakorn et al., 2011) พบมีอาการโรครุนแรงกว่าพริกและมะเขือมาก ได้แก่ ต้นเตี้ยแคระ ใบหงิกกลดรูป แผลไหม้ที่เส้นใบ ก้านใบและลำต้นอย่างรุนแรง จากที่กล่าวมาจึงสรุปได้ว่า ความรุนแรงของอาการโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ PCFVd ในพืชชนิดต่าง ๆ ขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อไวรอยด์ ชนิดและพันธุ์ของพืช ระยะเวลาการติดเชื้อ และสภาพแวดล้อม (Hadidi et al., 2003; Ding, 2009; Hadidi et al., 2017) อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้พบมะเขือที่ติดเชื้อ PCFVd แสดงอาการผิดปกติเพียงเล็กน้อย ได้แก่ ขนาดของใบและดอกลดลง อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมะเขือเทศพริก และมะเขือเป็นพืชในวงศ์เดียวกัน ดังนั้น จึงเป็นพืชอาศัยที่ไวรอยด์ชนิดนี้เข้าทำลายได้ แต่มีระดับการเข้าทำลายของเชื้อ PCFVd ที่แตกต่างกัน

2. การถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ด

ตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ที่สะสมอยู่ในเมล็ดพริกด้วยเทคนิค RT-PCR พบการติดเชื้อ PCFVd ในเมล็ดทั้ง 13 accessions ได้แก่ CA1106 CA1110 CA1113 CA1168 CA1172 CA1179 CA1181 CA1182 CA1194 CA1199 CA1200 CA1210 และ CA1220 (Table 1) และในมะเขือพบเมล็ดติดเชื้อ PCFVd 9 accessions จากทั้งหมด 16 accessions ได้แก่ SM006 SM252-36 SM264 SM244 SM099 SM103B SM110A SM021B และ SM112 (Table 2) ยืนยันความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ PCFVd จากเมล็ดพริกและมะเขือที่ได้จากต้นติดเชื้อ พบว่า มะเขือเทศติดเชื้อ PCFVd จากน้ำคั้นเมล็ดพริกทั้ง 13 accessions และมะเขือเทศติดเชื้อ PCFVd จากน้ำคั้นเมล็ดมะเขือจำนวน 12 accessions จากทั้งหมด 16 accessions (Table 2) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ PCFVd ที่ตรวจพบใน

เมล็ดยังคงความสามารถในการก่อโรคได้ และมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมระหว่างการเก็บและทำความสะอาดเมล็ดพันธุ์ ผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับ Verhoeven et al. (2009) ที่พบอาการเส้นใบไหม้ และขนาดของผลลดลงในมะเขือเทศหลังได้รับการปลูกเชื้อ PCFVd เพื่อทดสอบการเข้าทำลายของเชื้อไวรอยด์บนพืชทดสอบอ่อนแอ และยังสอดคล้องกับ ปรีเชษฐ์และคณะ (2556) Reanwarakorn et al. (2011) และ Kungwon et al. (2022) ที่พบลักษณะอาการต้นเตี้ย เส้นใบไหม้ ใบผิดปกติ และใบเปลี่ยนสีในมะเขือเทศ จากการศึกษา พบว่า อาการโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ PCFVd บนมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 สังเกตเห็นตั้งแต่ 14 วันหลังการปลูกเชื้อไวรอยด์สามารถทำให้เกิดอาการต้นแคระแกร็นอาการบนใบ ได้แก่ บิดม้วนงอ หดเล็กลงและผิดปกติอาการเหลืองซีด (chlorosis) อาการเซลล์ตายที่กิ่งก้าน และเส้นใบ ผลเล็กลงและผิดปกติ เป็นต้น (Flores et al., 2005)

การถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดของเชื้อ PCFVd ของเมล็ดพริกและมะเขือที่ได้จากต้นที่ได้รับการปลูกเชื้อ PCFVd เปรียบเทียบกับเมล็ดที่ได้จากต้นปกติควบคุม โดยการปลูกทดสอบในสภาพโรงเรือนนาน 12 สัปดาห์ พบว่า พริก 2 accessions ได้แก่ CA1181 ตรวจพบต้นกล้าติดเชื้อ 44 ต้น จากต้นกล้าที่งอกทั้งหมด 90 ต้น และ CA1220 ตรวจพบต้นกล้าติดเชื้อ 1 ต้น จากต้นกล้าที่งอกทั้งหมด 50 ต้น คิดเป็นการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดของ CA1181 และ CA1220 มีอัตรา 48.9 และ 2% ตามลำดับ (Table 1 และ Figure 4-5) และพบว่า มะเขือ 1 accession ได้แก่ SM021B ตรวจพบต้นกล้าติดเชื้อ 1 ต้น จากต้นกล้าที่งอกทั้งหมด 77 ต้น คิดเป็นอัตราการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด 1.2% (Table 2 และ Figure 6)

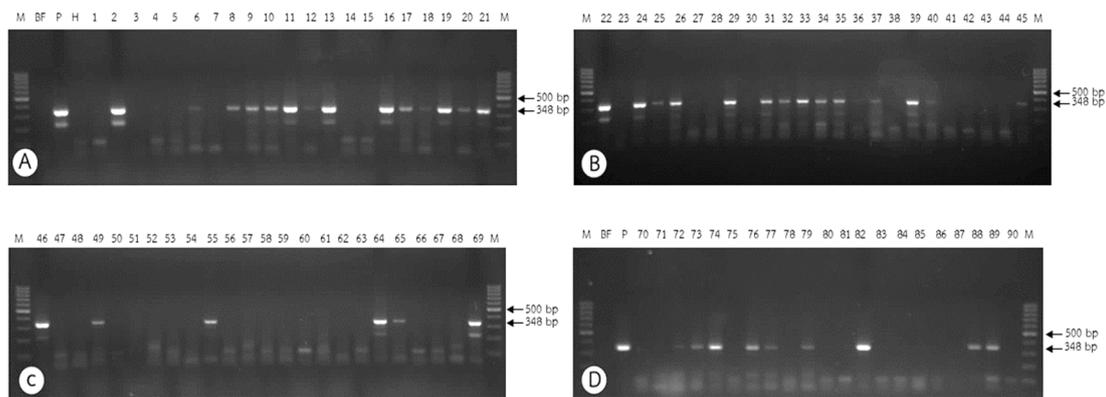


Figure 4 PCFVd detected by RT-PCR using PCF-seq primers with target DNA of 348 bp (PCFVd-infected seedling) on 12-week-old seedling of *C. annuum* accession CA1181 from the Grow-out test; M = 100 bp. molecular weight marker, BF = buffer, P = PCFVd positive control, H = healthy, lane 1-90 = seedling no.1 to 90 (A, B, C, D)

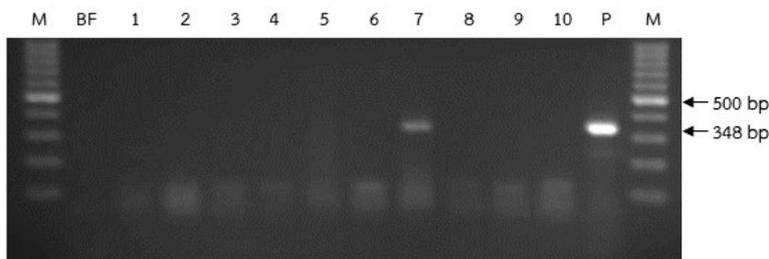


Figure 5 PCFVd detected by RT-PCR using PCF-seq primers with target DNA of 348 bp (PCFVd-infected seedling) on 12-week-old seedling of *C. annuum* accession CA1120 from the Grow-out test; M = 100 bp. molecular weight marker, BF = buffer, 1 = seedling no. 26, 2 = seedling no. 27, 3 = seedling no. 28, 4 = seedling no. 29, 5 = seedling no. 30, 6 = seedling no. 41, 7 = seedling no. 42, 8 = seedling no. 43, 9 = seedling no. 44, 10 = seedling no. 45 and P = PCFVd positive control

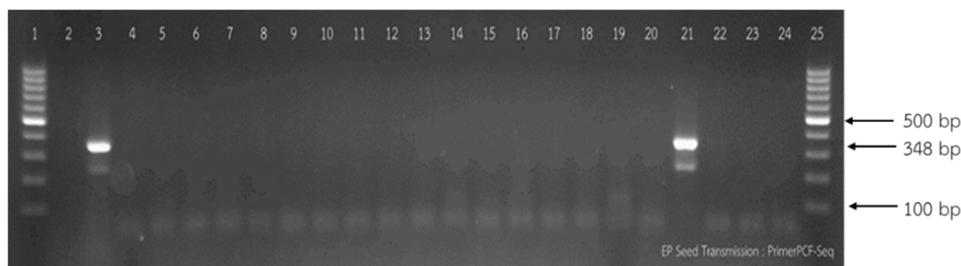


Figure 6 PCFVd detected by RT-PCR using PCF-seq primers with target DNA of 348 bp (PCFVd-infected seedling) on 12-week-old seedling of *S. melongena* accession SM021B from the Grow-out test; lane 1 and 25 = 100 bp. molecular weight marker, 2 = buffer, 3 = PCFVd positive control and 4-24 = seedling no. 1 to 20, respectively

จากข้างต้น พริก 2 accessions ที่ติดเชื้อ PCFVd ได้แก่ CA1181 เป็นพริกต้นเตี้ย มีทรงพุ่มแน่น ใบเล็ก เรียว ออกดอกเป็นช่อจำนวนมาก ขนาดผลสั้นและ เล็กคล้ายกับพริกขี้หนูประดับ และ CA1220 เป็นพริก ที่มีต้นสูงขนาดกลาง ทรงพุ่มโปร่ง ใบใหญ่ ผลยาวและ ใหญ่คล้ายพริกหวาน สามารถเจริญให้ผลผลิตและ เมล็ดพันธุ์ติดเชื้อ PCFVd ที่ถ่ายทอดไปยังต้นกล้า ที่งอกใหม่ได้ จึงยืนยันได้ว่าเชื้อ PCFVd สามารถ ถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดพริกไปยังต้นกล้าที่ใช้ใน การศึกษารั้งนี้ อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้แตกต่าง จากการรายงานของ Verhoeven et al. (2020) ที่ตรวจ พบเชื้อ PCFVd จากเมล็ดพริก แต่ไม่พบการถ่ายทอด เชื้อ PCFVd ผ่านทางเมล็ดไปสู่ต้นกล้าพริกที่งอกจาก เมล็ดชุดเดียวกันนี้ เช่นเดียวกับการศึกษาพีชอัสย และการถ่ายทอดเชื้อ PCFVd ผ่านทางเมล็ดของ Yanagisawa and Matsushita (2017) พบการถ่ายทอด เชื้อผ่านทางเมล็ดไปสู่ต้นกล้าในพิทูเนียสูงถึง 65.3– 91.9% และถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดไปสู่ต้นกล้า มะเขือเทศ (*S. lycopersicum*) พันธุ์ Yellow Pare 1.4% แต่ไม่พบการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพริก (*C. annuum*) พันธุ์ Miyoki

มะเขือที่ติดเชื้อใน accession SM021B เป็น มะเขือจาน ที่มีลักษณะต้นสูงปานกลาง ออกดอก เดี่ยว กลีบดอกสีขาว ผลมีลักษณะกลมแบนและมีร่อง ยุบเล็กน้อยด้านข้างของผล หลังติดเชื้อไวรอยด์ยังสามารถเจริญให้ผลผลิตและเมล็ดติดเชื้อ PCFVd และถ่ายทอดเชื้อไปยังต้นกล้าที่งอกใหม่ได้ จึงยืนยัน ได้ว่าเชื้อ PCFVd สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด มะเขือที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ และยังไม่พบรายงาน การถ่ายทอดเชื้อ PCFVd ผ่านทางเมล็ดในมะเขือชนิด อื่น ๆ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การติดเชื้อ PCFVd ของคัพภะ (embryo) พริกและมะเขือ อาจเกิดได้จาก

2 เหตุผล คือ 1) ต้นแม่ติดเชื้อและมีรังไข่ (ovary) ที่ติดเชื้อด้วย เมื่อเชื้อจากรังไข่มีการเคลื่อนที่ระหว่าง เซลล์ (cell-to-cell) จนเข้าถึงเซลล์ของคัพภะที่อยู่ ภายในและงอกเป็นต้นกล้าติดเชื้อ หรือ 2) ระหว่างที่ ต้นแม่มีการติดเชื้อ PCFVd และเมื่อถึงระยะออกดอก และสร้างละอองเกสร (pollen) ที่มีการติดเชื้อ เมื่อ เกิดการผสมตัวเอง (self-pollination) ละอองเกสรที่ ติดเชื้อไวรอยด์สามารถเข้าปฏิสนธิได้คัพภะที่ติดเชื้อ และงอกเป็นต้นกล้าที่ติดเชื้อได้ ซึ่งกลไกการถ่ายทอดนี้ Bhuvitarkom and Reanwarakorn (2019) ได้รายงาน การถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อ CLVd ในมะเขือว่า ไวรอยด์สามารถติดไปกับละอองเกสรและเกิดการ ปฏิสนธิได้คัพภะติดเชื้อที่สามารถเจริญและงอกเป็น ต้นกล้าที่ติดเชื้อได้ในอัตราที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับ พันธุ์พีช อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อ ยืนยันว่าเชื้อ PCFVd สามารถติดไปกับละอองเกสร และทำให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อไวรอยด์ไปสู่คัพภะใน รังไข่ได้ เพื่อเป็นข้อมูลให้เกิดความระมัดระวังการใช้ ละอองเกสรที่ไม่มีการติดเชื้อ PCFVd ในการผลิต เมล็ดพันธุ์ เนื่องจาก Yanagisawa and Matsushita (2017) ศึกษาการถ่ายทอดของเชื้อ PCFVd ในพิทูเนีย พบว่า การถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดเกิดจากการผสม ของละอองเกสรติดเชื้อไวรอยด์กับไข่ในรังไข่ และ ส่งผลให้เชื้อถ่ายทอดเข้าไปในคัพภะซึ่งเจริญต่อไป เป็นเมล็ดและงอกเป็นต้นกล้าติดเชื้อ PCFVd ในอัตรา ที่สูงมากกว่า 65%

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่างที่นำมา ศึกษา มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ PCFVd ไอโซเลต LPng20-11c1 (accession no. JF446893) โดยมีค่าความเหมือนกันของลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ 96% ถึง 99% (Table 3) และจากการ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ multiple sequence

alignment ด้วย Clustal OMEGA (version 1.2.4) ของเชื้อ PCFVd ที่ได้จากพริก มะเขือ และมะเขือเทศ ติดเชื้อในการศึกษานี้กับเชื้อ PCFVd ไอโซเลต LPng20-11c1 (accession no. JF446893) พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับ นิวคลีโอไทด์บางตำแหน่ง บริเวณลำดับที่ 160 ถึง 190 ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวอยู่ในบริเวณโดเมนฝั่งขวา (terminal right domain; TR domain) ของเชื้อ PCFVd โดยพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ PCFVd

ที่ศึกษาจากพริก accession CA1181 ได้แก่ accession no. PQ872184 (จากต้นพริกติดเชื้อ) จำนวน 12 ตำแหน่ง accession no. PQ872186 (จากเมล็ดของพริกติดเชื้อ) 10 ตำแหน่ง accession no. PQ872188 (มะเขือเทศจากการทดสอบ biological assay) 3 ตำแหน่ง และ accession no. PQ872194 (ต้นกล้าพริกติดเชื้อจากการทดสอบปลูกในสภาพโรงเรือน) 3 ตำแหน่ง (Table 3 และ Figure 7)

Table 3 Results of sequence similarity of PCFVd infected plant, whole seeds, biological assay and Grow-out test seedling of the *C. annuum*, *S. melongena* and *S. lycopersicum* compared to the isolate LPng20-11c1 (accession no. JF446893)

Plant accession no.	NCBI accession no.	Sample ID	Host	Source	Score (bits)	E Value	% Identity	No. of nucleotide changing at TR-domain
CA1181	PQ872184	SB_Pe_PC1	pepper	Infected pepper plant	571	2e-158	96	12
	PQ872186	SB_Pe_PC5	pepper	100 whole seeds	588	2e-163	97	10
	PQ872188	SB_Pe_PC8	tomato	biological assay	627	4e-175	99	3
	PQ872194	SB_Pe_PC18	pepper	GOT seedling	627	4e-175	99	2
CA1220	PQ872185	SB_Pe_PC3	pepper	Infected pepper plant	593	4e-165	97	7
	PQ872187	SB_Pe_PC6	pepper	100 whole seeds	627	4e-175	99	3
	PQ872189	SB_Pe_PC10	tomato	Biological assay	627	4e-175	99	3
	PQ872193	SB_Pe_PC17	pepper	GOT seedling	621	2e-173	99	3
SM021B	PQ872174	SB_Eg_PC28	eggplant	Infected eggplant plant	627	4e-175	99	3
	PQ872179	SB_Eg_PC53	eggplant	100 whole seeds	621	2e-173	99	3
	PQ872180	SB_Eg_PC76	eggplant	GOT seedling	627	4e-175	99	3

Note: Length 348 (nucleotide)

จำนวนการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ PCFVd จำนวน 3 ตำแหน่ง ที่ศึกษาในพริก accession CA1220 ได้แก่ accession no. PQ872185 (จากต้นพริกติดเชื้อ) จำนวน 7 ตำแหน่ง accession no. PQ872187 (จากเมล็ดของพริกติดเชื้อ) accession no. PQ872189 (จากมะเขือเทศทดสอบ biological assay) และ accession no. PQ872193 (ต้นกล้าพริกติดเชื้อจากการทดสอบปลูกในสภาพโรงเรือน) (Table 3 และ Figure 7)

จำนวนการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ PCFVd จำนวน 3 ตำแหน่ง ที่ศึกษาในมะเขือ accession SM021B ได้แก่ accession no. PQ872174 (จากต้นมะเขือติดเชื้อ) accession no. PQ872179 (จากเมล็ดมะเขือติดเชื้อ) และเชื้อ accession no. PQ872180 (จากต้นกล้ามะเขือติดเชื้อจากการทดสอบปลูกในสภาพโรงเรือน) (Table 3)

CLUSTAL OMEGA (1.2.4) multiple sequence alignment

```

JF446893.1      CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCFCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAA 60
PQ872184      CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCFCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAA 60
PQ872186      CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCFCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAA 60
PQ872188      CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCFCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAA 60
PQ872194      CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCFCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAA 60
PQ872185      CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCFCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAA 60
PQ872187      CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCFCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAA 60
PQ872189      CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCFCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAA 60
PQ872193      CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCFCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAA 60
*****

JF446893.1      GGGGAAGCAAGCATCTCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAACCTGAACAGATCGGGCGGAG 120
PQ872184      GGGGAAGCAAGCATCTCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAACCTGAACAGATCGGGCGGAG 120
PQ872186      GGGGAAGCAAGCATCTCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAACCTGAACAGATCGGGCGGAG 120
PQ872188      GGGGAAGCAAGCATCTCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAACCTGAACAGATCGGGCGGAG 120
PQ872194      GGGGAAGCAAGCATCTCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAACCTGAACAGATCGGGCGGAG 120
PQ872185      GGGGAAGCAAGCATCTCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAACCTGAACAGATCGGGCGGAG 120
PQ872187      GGGGAAGCAAGCATCTCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAACCTGAACAGATCGGGCGGAG 120
PQ872189      GGGGAAGCAAGCATCTCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAACCTGAACAGATCGGGCGGAG 120
PQ872193      GGGGAAGCAAGCATCTCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAACCTGAACAGATCGGGCGGAG 120
*****

JF446893.1      AAGCGCCGTGCGGGTCCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCAGTAGAAACAGGGTTTTCACC 180
PQ872184      AAGCGCCGTGCGGGTCCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCAGTCCATCAAAGTCCGCCACC 180
PQ872186      AAGCGCCGTGCGGGTCCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCATCATAAACAATGCCAGCACC 180
PQ872188      AAGCGCCGTGCGGGTCCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCAGCTGAAACAGGGTTTTCACC 180
PQ872194      AAGCGCCGTGCGGGTCCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCAGCTGAAACAGGGTTTTCACC 180
PQ872185      AAGCGCCGTGCGGGTCCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCAGCGAATCAGGGCAGCCACC 180
PQ872187      AAGCGCCGTGCGGGTCCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCAGCTGAAACAGGGTTTTCACC 180
PQ872189      AAGCGCCGTGCGGGTCCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCAGCTGAAACAGGGTTTTCACC 180
PQ872193      AAGCGCCGCGCGGGTCCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCAGCTGAAACAGGGTTTTCACC 180
*****

JF446893.1      CTTCCTTTCTTCGGGTTTCCTTCTCAGTCGACCGGACCGCGTCGGCCTTCTCGGCACT 240
PQ872184      CTTCCTTTCTTCGGGTTTCCTTCTCAGTCGACCGGACCGCGTCGGCCTTCTCGGCACT 240
PQ872186      CTTCCTTTCTTCGGGTTTCCTTCTCAGTCGACCGGACCGCGTCGGCCTTCTCGGCACT 240
PQ872188      CTTCCTTTCTTCGGGTTTCCTTCTCAGTCGACCGGACCGCGTCGGCCTTCTCGGCACT 240
PQ872194      CTTCCTTTCTTCGGGTTTCCTTCTCAGTCGACCGGACCGCGTCGGCCTTCTCGGCACT 240
PQ872185      CTTCCTTTCTTCGGGTTTCCTTCTCAGTCGACCGGACCGCGTCGGCCTTCTCGGCACT 240
PQ872187      CTTCCTTTCTTCGGGTTTCCTTCTCAGTCGACCGGACCGCGTCGGCCTTCTCGGCACT 240
PQ872189      CTTCCTTTCTTCGGGTTTCCTTCTCAGTCGACCGGACCGCGTCGGCCTTCTCGGCACT 240
PQ872193      CTTCCTTTCTTCGGGTTTCCTTCTCAGTCGACCGGACCGCGTCGGCCTTCTCGGCACT 240
*****

```

Figure 7 Multiple sequence alignment using Clustal Omega of *Pepper chat fruit viroid* sequences from PCFVd-infected plant, whole seeds and GOT seedling of the *C. annuum* CA1181 and CA1220 and biological assay on *S. lycopersicum* ‘Seedathip4’ compared to the isolate LPng20-11c1 (accession no. JF446893.1). Blue highlights show the original sequences and yellow highlights show the changed sequences

ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ตลอดการทดลองยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อ PCFVd และมีความเหมือนกับไอโซเลต LPng20-11c1 (accession no. JF446893) ที่ 96 ถึง 99% และความแตกต่างของลำดับ นิวคลีโอไทด์ของเชื้อ PCFVd ทั้ง 11 accessions จากการศึกษาที่อยู่ในบริเวณลำดับที่ 160 ถึง 190 เป็นลำดับ นิวคลีโอไทด์ในบริเวณโดเมนฝั่งขวา (right terminal domain; TR-domain) ของเชื้อ PCFVd การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบในการศึกษายังไม่สามารถสรุปได้ว่า เกิดจากความสัมพันธ์ของเชื้อ PCFVd กับชนิดของพืชทดสอบ

ในด้านใด อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาความสำคัญของโดเมนบนเชื้อไวรอยด์ในวงศ์ *Pospiviroidae* และพบว่า TR domain ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเชื้อไวรอยด์ภายในเซลล์พืชไปยังนิวเคลียสพืช อาจอาศัยโปรตีนของพืชที่มีคุณสมบัติในการจับกับ TR domain ของเชื้อไวรอยด์และพาไปยังนิวเคลียสพืชและเกิดการจำลองตัวของเชื้อไวรอยด์ และเคลื่อนที่ไปตามระบบท่อลำเลียง (systemic trafficking) ในพืชอาศัยเพื่อเข้าทำลายเซลล์ในเซลล์บริเวณอื่นๆ (Kalantidis et al., 2007; Zhong et al., 2008; Steger, 2017) และรายงานของ ปรีเชษฐ์และคณะ

(2567) ได้ศึกษา quasi-species ของเชื้อ CLVd ในมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers และสีกดา50 มะอึก และมะเขือเปราะ และสรุปว่า พบจำนวน variant ทั้งสิ้น 22 variant และมี single-nucleotide polymorphisms เฉลี่ย 3 ตำแหน่งต่อจีโนม อยู่ในบริเวณ TR และ pathogenic domain (P domain) และพบอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยของ CLVd Solanum-1 ที่ 8.15×10^{-3} เพื่อพิสูจน์การเกิด quasi-species ของ CLVd และพบว่าชนิดของ dominant variant มีความเกี่ยวข้องกับชนิดพืชอาศัย

สรุปผลการทดลอง

การศึกษ้อัตราการติดเชื้อและการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพันธุ์ของเชื้อ PCFVd โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล พบว่า พริก 13 accessions มีอัตราการติดเชื้อ 100% และการเข้าทำลายของเชื้อทำให้มีขนาดของผลเล็กลง มะเขือ 16 accessions มีอัตราการติดเชื้อระหว่าง 0-100% และพบอาการผิดปกติ ได้แก่ ใบและดอกของต้นติดเชื้อมีขนาดลดลง เมื่อศึกษ้อัตราการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดโดยเพาะกล้าในสภาพโรงเรือน พบอัตราการถ่ายทอดเชื้อ PCFVd ผ่านทางเมล็ดพันธุ์ในพริก accession CA1181 และ CA1120 ที่ 48.9 และ 2% ตามลำดับ และมะเขือ accession SM021B ที่ 1.2% การศึกษานี้พบการถ่ายทอดของเชื้อ PCFVd ผ่านทางเมล็ดพันธุ์พริกและมะเขือจากต้นที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล ผลการศึกษานี้เป็นข้อมูลในการสังเกตอาการผิดปกติที่เกิดจากไวรัสในแปลงพริกและมะเขือ และชี้ว่าการใช้เมล็ดที่ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส การสำรวจโรคอย่างสม่ำเสมอ การกำจัดพืชที่เป็นโรคออกจากแปลง จะช่วยให้การผลิตเมล็ดพันธุ์พริกและมะเขือปลอดภัยจากเชื้อไวรัส

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Kasetsart University Research and Development Institute, KURDI) และขอขอบคุณโครงการศูนย์เชื้อพันธุกรรมพืชแห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้การสนับสนุนเมล็ดพันธุ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2564ก. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องเงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริก พ.ศ. 2563. แหล่งข้อมูล: <https://www.doa.go.th/ard/wp-content/uploads/2021/01/ประกาศกรมวิชาการเกษตร-เรื่อง-เงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริก-พ.ศ.-2563.pdf>. สืบค้น: 1 ตุลาคม 2567.
- กรมวิชาการเกษตร. 2564ข. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องเงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือ พ.ศ. 2563. แหล่งข้อมูล: <https://www.doa.go.th/ard/wp-content/uploads/2021/01/ประกาศกรมวิชาการเกษตร-เรื่อง-เงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือ-พ.ศ.2563-1.pdf>. สืบค้น: 1 ตุลาคม 2567.
- คณินนิตย์ เจริญวรารกร. 2556. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 164 หน้า.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ คณินนิตย์ เจริญวรารกร และวิภา เกิดพิพัฒน์. 2556. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) และ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ในพืชวงศ์ *Solanaceae*. วารสารวิชาการเกษตร. 31(2): 108-122.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ กาญจนา วาระวิชณี A. Haegeman M. Höfte และ K. De Jonghe. 2567. วิวัฒนาการของเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) ในพืชอาศัย โดยการศึกษา quasi-species population. วารสารวิชาการเกษตร. 42(3): 272-286.
- ชมภาร ภูวิธกรณ จิราพร ปอสูงเนิน สุภาพร กลิ่นคง และคณินนิตย์ เจริญวรารกร. 2562. การเข้าทำลายและการถ่ายทอดทางเมล็ดของ *Columnea latent viroid* ในพริก. วารสารเกษตร. 35(1): 101-111.

- Bhuvitarkorn, S and K. Reanwarakorn. 2019. Pollen and seed transmission of *Columnea latent viroid* in eggplants. *European Journal of Plant Pathology*. 154(4): 1067-1075.
- 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(10): 1386.
- Dall, D., L. Penrose, A. Daly, F. Constable and M. Gibbs. 2019. Prevalences of pospiviroid contamination in large seed lots of tomato and capsicum, and related seed testing considerations. *Viruses*. 11(11): 1034.
- Diener, T.O. 1987. *The Viroids*. Plenum Press, Inc., New York. 366 p.
- Ding, B. 2009. The biology of viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 47(1): 105-131.
- Flores, R., C. Hernandez, A.E. Emilio Martínez de Alba, J.A. Daros and F.D. Serio. 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 43(1): 117-139.
- Hadidi, A., R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik. 2003. *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 370 p.
- Hadidi, A., R. Flores, J.W. Randles and P. Palukaitis, 2017. *Viroids and Satellites*. Academic Press. 716 p.
- Kalantidis, K., M.A. Denti, S. Tzortzakaki, E. Marinou, M. Tabler and M. Tsagris. 2007. Virp1 is a host protein with a major role in *Potato spindle tuber viroid* infection in Nicotiana plants. *Journal of Virology*. 81(23): 12872-12880.
- Keyata, T., S. Sinhabandhu and K. Reanwarakorn. 2024. Symptoms and disease virulence assessment in commercial pepper cultivars caused by *Pepper chat fruit viroid*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 131(6): 1935-1944.
- 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.
- Matsushita, Y. and S. Tsuda. 2015. Host ranges 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*. 141(1): 193-197.
- 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(4): 1007-1011.
- Reanwarakorn, K., S. Klinkong and J. Porsoongnurn. 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plant in Thailand. *New Disease Reports*. 24(6): 2044-0588.
- Steger, G., 2017. Modelling the three-dimensional structure of the right-terminal domain of pospiviroids. *Scientific Reports*. 7(1): 711.
- Verhoeven, J.T., 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(1-2): 209-214.
- Verhoeven, J.T.J., M. Botermans, C.C.C. Jansen and J.W. Roenhorst. 2011. First report of *Pepper chat fruit viroid* in capsicum pepper in Canada. *New Disease Reports*. 23(1): 15.
- Verhoeven, J.T.J., H.M.S. Koenraad, A. Jodlowska, L. Hüner and J.W. Roenhorst. 2020. Pospiviroid infections in *Capsicum annuum*: disease symptoms and lack of seed transmission. *European Journal of Plant Pathology*. 156(1): 21-29.
- Yanagisawa, H. and Y. Matsushita. 2017. Host ranges and seed transmission of *Tomato planta macho viroid* and *Pepper chat fruit viroid*. *European Journal of Plant Pathology*. 149(1): 211-217.
- Zhong, X., A.J. Archual, A.A. Amin and B. Ding. 2008. A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *The Plant Cell*. 20(1): 35-47.