

การคัดเลือกพันธุ์มะเขือเทศต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยว Screening for Bacterial Wilt Resistance in Tomato

รัชนี ศิริยาน¹ เสาวณี เขตสกุล¹ จิรภา ออสติน² วีรยุทธ ตัดตนรัมย์¹ รุ่งนภา ทองเครื่อง³ และ ญัญญิมา โฆษิตเจริญกุล³
Siriyan, R.¹, Ketsakul, S.¹, Austin, J.², Dadtonrum, W.¹, Thongkreg, R.³, and Kositcharoenkul, N.³

Abstract

Bacterial wilt is a serious cause disease in tomato. This study aimed to assess bacterial wilt resistance in good characteristic tomato with highly beta-carotene and lycopene. The inoculation method was used for resistant screening in 59 tomato lines. After 4 weeks, the result showed that all tomato lines were susceptible, ranged from 68-100 disease index percentage. The resistant tomato were collected, grown and self-pollinated. The seeds were sowed and repeated for bacterial wilt inoculation until the fifth generation (S_5). The result found that tomato had increased resistance to bacterial wilt in each generation. The first to the second generations (S_1 - S_2) showed 25-100 disease index percentage. The third to the fourth generations (S_3 - S_4) had 0-100 disease index percentage and the fifth generation (S_5) had 0-31 disease index percentage. The five disease resistant lines were selected. These lines will be used for bacterial wilt resistance breeding program.

Keywords: Bacterial wilt, Inoculation, Disease percentage, Resistant cultivars

บทคัดย่อ

โรคเหี่ยวเหี่ยวจากเชื้อแบคทีเรียเป็นโรคที่สำคัญต่อการปลูกมะเขือเทศ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกมะเขือเทศที่มีลักษณะดีทางการเกษตร มีสารเบต้าแคโรทีนและไลโคปีนสูง ให้มีลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยว โดยการปลูกเชื้อโรคเหี่ยวเหี่ยวให้แก่มะเขือเทศสายพันธุ์คัดเลือกจำนวน 59 สายพันธุ์ ตรวจสอบการตอบสนองต่อเชื้อโรคลงปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า ทุกสายพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อโรคเหี่ยวเหี่ยวโดยมีดัชนีเกิดโรค 68-100 เปอร์เซนต์ ส่วนต้นที่ไม่แสดงอาการจะคลุมดอกเพื่อเก็บเมล็ดผสมตัวเอง แล้วนำมาทดสอบความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหี่ยว ทำซ้ำจนกระทั่งถึงรุ่นที่ 5 (S_5) พบว่ามะเขือเทศมีความต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวเพิ่มขึ้นในแต่ละรุ่น โดยรุ่น S_1 - S_2 มีค่าดัชนีการเกิดโรค 25-100 เปอร์เซนต์ รุ่น S_3 - S_4 มีค่าดัชนีการเกิดโรค 0-100 เปอร์เซนต์ และรุ่น S_5 มีค่าดัชนีการเกิดโรค 0-31 เปอร์เซนต์สามารถคัดเลือกได้มะเขือเทศต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยว 5 สายพันธุ์ มะเขือเทศต้านทานเหล่านี้จะใช้ในการพัฒนาพันธุ์มะเขือเทศต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวต่อไป

คำสำคัญ: โรคเหี่ยวเหี่ยว, การปลูกเชื้อโรคเหี่ยวเหี่ยว, เปอร์เซนต์การเกิดโรค, พันธุ์ต้านทานโรค

คำนำ

โรคเหี่ยวเหี่ยว (Bacterial wilt) เป็นโรคที่สำคัญมากที่สุดของมะเขือเทศที่ปลูกในเขตร้อน เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ลักษณะโคโลนีบนอาหารค่อนข้างกลม ผิวของโคโลนีเรียบเป็นมัน สีค่อนข้างขาว สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อชนิดรุนแรงและไม่รุนแรงออกจากกันได้ โดยลักษณะของเชื้อชนิดรุนแรงบนอาหาร Triphenyltetrazolium chloride (TZC) อายุ 48 ชั่วโมง โคโลนีค่อนข้างกลม สีขาวขุ่น มีจุดสีชมพูตรงกลางโคโลนีเชื้อชนิดไม่รุนแรง จะมีโคโลนีขอบเรียบ คล้ายเนยเหลว กลางโคโลนีสีแดงเข้มขอบใส ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ (เย็นจิตร์, 2549) อาการโรคในมะเขือเทศ เริ่มจากใบล่างเหี่ยวและเกิดการเหี่ยวทั้งต้นอย่างรวดเร็ว หลังจากอาการเริ่มแรกปรากฏ 2-3 วัน อาจมีรากอากาศแตกออกจากส่วนลำต้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งพบมากในกรณีที่เกิดโรคมักมีการพัฒนาค่อนข้างช้า (เพชรรัตน์

¹ ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ ตำบลหนองไม้ อำเภอเมือง จังหวัดศรีสะเกษ 33000

Si Sa Ket Horticultural Research Center, Nong Phai, Mueang, Si Sa Ket 33000

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพังงา เลขที่ 52 หมู่ที่ 1 ต.บางม่วง อ.ตะกั่วป่า จ.พังงา 82110

Phangnga Research and Development Center, 52 Moo 1, Bang Muang, Ta Kua Pa, Phangnga 82110

³ สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

และ พิศาล, 2547) โรคนี้พบได้ทั่วไปในแหล่งปลูกมะเขือเทศของประเทศไทย อาการโรคในมะเขือเทศ เริ่มจากใบล่างเขียวแต่ใบยังเขียวอยู่ และพบว่าเชื้อโรคจะเข้าไปในต้นพืชผ่านทางรากและเพิ่มปริมาณในท่อน้ำ ทำให้รบกวนการลำเลียงน้ำและอาหารของพืช การควบคุมโรคทำได้ยาก เนื่องจากเชื้ออาศัยอยู่ในดิน วิธีการควบคุมที่ได้ผลดีที่สุด คือ การใช้พันธุ์ต้านทาน (Agrios, 2005) แต่มะเขือเทศพันธุ์ต้านทานมีความจำเพาะในบางพื้นที่และสูญเสียความต้านทานง่าย การเสียบยอดโดยใช้พันธุ์ต้านทานเป็นต้นตอ เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพ สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อโรคเหี่ยวเหี่ยวได้ (Laeshita และ Arwiyanto, 2017)

ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษดำเนินโครงการสำรวจและรวบรวมมะเขือเทศเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2557 ได้รวบรวมมะเขือเทศจากแหล่งต่างๆ นำมาปลูกศึกษาลักษณะทางการเกษตร และได้วิเคราะห์สารสำคัญ ได้แก่ เบต้าแคโรทีนและไลโคปีน หลายพันธุ์มีลักษณะต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหี่ยวในสภาพแปลง เหมาะสำหรันำมาใช้เป็นพันธุ์ต้านทานโรคหรือใช้เป็นพันธุ์ต้นตอ ดังนั้น จึงได้นำพันธุ์ที่มีศักยภาพเหล่านี้มาทดสอบความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหี่ยวในโรงเรือน เพื่อคัดเลือกพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคหรือใช้เป็นพันธุ์ต้นตอ สำหรับให้เกษตรกรปลูกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมต้นมะเขือเทศ

เพาะเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในกระบะเพาะ เมื่อมีใบจริง 1 คู่ ย้ายปลูกลงในกระถาง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 นิ้ว โดยใช้มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์เป็นพันธุ์อ่อนแอเปรียบเทียบกับ ส่วนพันธุ์ต้านทานใช้พันธุ์ H7996 และ BWR#1405 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ปลูกมะเขือเทศในเรือนปลูกพืชทดลองให้มีอายุ 30 วัน โดยใช้ต้นมะเขือเทศในการทดสอบจำนวน 20 ต้นต่อสายพันธุ์

2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum*

นำเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เก็บรักษาไว้ในศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาฟื้นฟูความมีชีวิตโดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร Wakimoto's medium (PSA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน หรือเลี้ยงบนอาหาร TZC เลือกลโคไลที่มีลักษณะเยิ้ม สีขาวขุ่น รูปร่างไม่แน่นอน ตรงกลางสีชมพู นำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหาร PSA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง นำเชื้อมาละลายด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ วัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความทึบแสง (Optical density, OD) เท่ากับ 0.3 มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

3. การทดสอบปฏิกิริยาพันธุ์มะเขือเทศต่อโรคเหี่ยวเหี่ยว

โดยนำเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เตรียมไว้ข้างต้น มาปลูกเชื้อลงบนต้นมะเขือเทศที่เตรียมไว้ โดยก่อนปลูกเชื้อต้องการให้น้ำมะเขือเทศเป็นเวลา 1 วัน ปลูกเชื้อลงบนมะเขือเทศโดยใช้มีดหรือคัตเตอร์ที่สะอาดตัดส่วนรากห่างจากต้น 1-2 เซนติเมตร ราดด้วยสารละลายเชื้อที่เตรียมทันที โดยใช้อัตราส่วนสารละลายต่อดินในกระถาง 1: 10 (v/v) (20 มิลลิลิตรต่อต้น) การบันทึกผล ตรวจสอบการทดลองหลังการปลูกเชื้อทุก 7 วัน โดยนับจำนวนต้นที่เกิดโรคหลังปลูกเชื้อ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นับจำนวนต้นที่แสดงอาการโรคแต่ละระดับคะแนน ตามระดับอาการต่อโรค 5 ระดับ (Winstead และ Kelman, 1952) คือ 0 พืชไม่แสดงอาการเหี่ยวหรือพืชปกติ (Healthy plant), 1 ใบพืชแสดงอาการเหี่ยว 1 ใบ/ต้น, 2 ใบพืชแสดงอาการเหี่ยว 2 ใบ/ต้น หรือ ¼ ของต้นแสดงอาการเหี่ยว, 3 ใบพืชแสดงอาการเหี่ยว 3 ใบ/ต้นหรือ ½ ของต้นแสดงอาการเหี่ยว, 4 ใบพืชแสดงอาการเหี่ยว 4-5 ใบ/ต้นหรือ ¾ ของต้นแสดงอาการเหี่ยว, 5 พืชแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้นหรือต้นตาย คำนวณค่าดัชนีการเกิดโรคตามสูตร

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค (\%)} = \frac{\text{ผลรวมของ (จำนวนต้นพืชแต่ละระดับอาการ} \times \text{ระดับอาการของโรค} \times 100)}{\text{จำนวนต้นพืชทดสอบทั้งหมด} \times \text{ระดับอาการสูงสุด}}$$

นำค่าดัชนีการเกิดโรคมาใช้จัดระดับความต้านทาน ดังนี้ 0 % = ต้านทานมาก (Highly resistant, HR), 1-10 % = ต้านทาน (Resistant, R), 11-20 % = ต้านทานปานกลาง (Moderate resistant, MR), 21-30 % = อ่อนแอปานกลาง (Moderately susceptible, MS), 31-70 % = อ่อนแอ (Susceptible, S), 71-100 % = อ่อนแอมาก (Highly susceptible, HS)

ผลการทดลอง

ผลการปลูกเชื้อโรคเหี่ยวเหี่ยวให้แก่ต้นกล้ามะเขือเทศ จำนวน 59 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ พบว่า มะเขือเทศทุกสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหี่ยว (Table 1) โดยมีค่า DI ตั้งแต่ 68-100 เปอร์เซ็นต์ มีเพียง 10 สายพันธุ์มีต้นที่ไม่แสดงอาการโรคเหี่ยวเหี่ยว ได้แก่ สายพันธุ์ 007 010 034 045-2 047 296 333-2 357-2 397 และ 399 โดยมีดัชนีการเกิดโรค 97, 87, 92, 96, 83, 87, 68, 79, 73 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Table 1 Reaction of tomato lines to *Ralstonia solanacearum*.

Disease index (%)	Number of line	Response
60-70	1	Susceptible
71-80	2	Highly susceptible
81-90	6	Highly susceptible
91-100	50	Highly susceptible
Total	59	

หลังจากนั้นนำต้นที่ไม่แสดงอาการเหี่ยว ย้ายปลูกในถุงดำขนาด 7x14 นิ้ว ปฏิบัติดูแลรักษา จนกระทั่งต้นมะเขือเทศ ออกดอก ใช้ถุงรีเมย์คลุมช่อดอกเพื่อป้องกันการผสมข้าม เมื่อผลมะเขือเทศสุกผ่าเก็บเมล็ด ตากเมล็ดให้แห้ง แล้วนำเมล็ดมา เพาะกล้าในถาดเพาะ ย้ายปลูกต้นกล้าใส่กระถางพลาสติกสีดำและปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ตามกรรมวิธีข้างต้น พบว่า การปลูกเชื้อให้ต้นกล้ามะเขือเทศที่ได้จากต้นต้านทานและผสมตัวเองรุ่นที่ 1 (S₁) และรุ่นที่ 2 (S₂) มีความต้านทานโรค เหี่ยวเหี่ยวเพิ่มขึ้น โดยมีค่า DI ระหว่าง 25-100 เปอร์เซ็นต์ โดยสายพันธุ์ 034 มีค่า DI 25 เปอร์เซ็นต์เท่ากับพันธุ์ H-7996 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานเปรียบเทียบ และ สายพันธุ์ 045 มีค่า DI 27 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหี่ยวในรุ่นที่ 3 (S₃) ซึ่งเก็บเมล็ดจากต้นต้านทานรุ่น S₂ พบว่ามีค่า DI ระหว่าง 3-97 เปอร์เซ็นต์ และความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหี่ยวในรุ่นที่ 4 (S₄) ซึ่งเก็บเมล็ดจากต้นต้านทานรุ่น S₃ พบว่ามีค่า DI ระหว่าง 0-100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นเก็บเมล็ดจากต้นมะเขือเทศที่แสดงความต้านทานในรุ่นที่ 5 (S₅) นำมาเพาะกล้าและทดสอบ ปฏิกริยาต่อโรคเหี่ยวเหี่ยวตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว พบว่า สายพันธุ์มะเขือเทศแสดงความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหี่ยว โดยมีค่า DI ระหว่าง 0-31 เปอร์เซ็นต์ (Table 2) และมีมะเขือเทศ 5 สายพันธุ์ที่มีค่า DI เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์หรือไม่แสดงอาการของ โรคเลย ได้แก่ สายพันธุ์ 034-5-1r, 034-5-1-2n, 045-3-1r, 045-3-1-5n และ 045-10-1-3n

วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาการคัดเลือกมะเขือเทศต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยว สามารถคัดเลือกสายพันธุ์มะเขือเทศที่มีความต้านทานได้ โดยในรุ่นแรกๆ มะเขือเทศมีความอ่อนแอต่อโรครวม แต่ยังคงมีบางต้นไม่แสดงอาการของโรค การแสดงความต้านทานและอ่อนแอของต้นมะเขือเทศโดยสังเกตอาการของโรคบนต้นมะเขือเทศ โดยพันธุ์ที่อ่อนแอจะแสดงอาการหลังปลูกเชื้อ 4 วัน และพันธุ์ที่มีความต้านทานจะแสดงอาการหลังปลูกเชื้อ 14 วันหรือมากกว่าและยังคงมีต้นไม่แสดงอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 4 สัปดาห์ เมื่อเก็บเมล็ดจากต้นต้านทานเหล่านั้นมาปลูกและทดสอบความต้านทานโรค โดยทำซ้ำๆหลายรุ่น พบว่า ความต้านทานของโรคเพิ่มขึ้นในรุ่นที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของยีนต้านทาน ความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียโรครุเหี่ยวเหี่ยวนี้ถูกควบคุมด้วยยีน ซึ่งในมะเขือเทศยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานนี้มีลักษณะถ่ายทอดเชิงปริมาณ (Quantitative trait loci) ทำให้การแสดงออกมีหลายระดับ และสภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงความต้านทาน (Ishihara และคณะ, 2012) นอกจากนี้ Hanson และ คณะ (1996) รายงานการตอบสนองของพันธุ์มะเขือเทศและเชื้อโรคเหี่ยวเหี่ยว พบว่ามีความแตกต่างกันในแต่ละแหล่งปลูก โดยสายพันธุ์มะเขือเทศที่มีความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหี่ยวในมาเลเซียและไต้หวัน เมื่อนำมาทดสอบที่ฟิลิปปินส์และอินโดนีเซีย แสดงความอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหี่ยวของฟิลิปปินส์และอินโดนีเซีย แสดงให้เห็นว่า แหล่งพันธุกรรมที่จะนำมาใช้ ประเมินความต้านทานควรอยู่ในพื้นที่เดียวกันกับเชื้อสาเหตุโรค จึงจะสามารถคัดเลือกพันธุ์ต้านทานให้ประสบผลสำเร็จ

สรุปผล

การคัดเลือกมะเขือเทศต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยว สามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์มะเขือเทศในรุ่นที่ 5 (S₅) ที่มีความต้านทานสูงจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 034-5-1r, 045-3-1r, 045-3-1-5n และ 045-10-1-3n โดยมีดัชนีการเกิดโรค 0

เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถนำมาพัฒนาต่อเพื่อให้ได้มะเขือเทศพันธุ์ใหม่ต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยว และใช้เป็นต้นตอสำหรับพันธุ์การค้าที่มีความอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหี่ยวได้

Table 2 Response of tomato to bacterial wilt infection after inoculation for 4 weeks.

Generation	Tomato lines	Total plants	Resistant percentage	Disease index (%)	Phenotype
S ₄	034-2-2	29	97	3	R
	034-5-1	30	93	7	R
	045-14-4	30	47	53	S
	045-3-1	30	63	37	S
	045-10-1	29	100	0.0	HR
	337-1-1	30	0	100	HS
	357-10-2	30	23	77	HS
	357-2-12	30	60	40	S
S ₅	034-2-2r	31	93	7	R
	034-2-2-2n	30	97	3	R
	034-2-2-1n	20	95	5	R
	034-5-1r	30	100	0	HR
	034-5-1-2n	25	100	0	HR
	045-3-1r	30	100	0	HR
	045-3-1-5n	30	100	0	HR
	045-10-1-3n	30	63	7	R
	045-10-1r	29	97	3	R
	045-10-1-3n	27	100	0	HR
	357-12-2r	27	70	30	MS
	357-12-2-1n	29	69	31	S

เอกสารอ้างอิง

- เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และพิศาล ศิริธร, 2547, รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ การพัฒนาเทคนิค ELISA สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเหี่ยวมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียต้องห้ามในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อส่งออก, ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 37 น.
- เย็นจิต เรือง, 2549, การคัดเลือกมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวโดยใช้แผนที่ละเอียดระดับโมเลกุลและการทดสอบมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียืนต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยว, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 140 น.
- Agrios, G.N., 2005, Plant Pathology (4th ed.), Academic Press, New York, 922 p.
- Hanson, P.M., Wang, J.F., Licardo, O., Hanudin, Mah, S.Y., Hartman, G.L., Lin, Y.C., and Chen, J.T., 1996, Variable Reaction of Tomato Lines to Bacterial Wilt Evaluated at Several Locations in Southeast Asia, HortScience, 31: 143–146.
- Ishihara, T., Takahashi, I., and Nakaho, K., 2012, Transcriptome Analysis of Quantitative Resistance-specific Response upon *Ralstonia solanacearum* Infection in Tomato, PLOS One, 7: e46763.
- Laeshita, P. and Arwiyanto, T., 2017, Resistance Test of Several Tomato Varieties to Bacterial Wilt Diseases Caused by *Ralstonia solanacearum*, J.P.T. Indonesia, 21: 51-53.
- Winstead, N.N. and Kelman, A., 1952, Inoculation Technique for Evaluating Resistance to *Pseudomonas solanacearum*, Phytopathology, 42: 628-634.