426

ไมโครปิเปตเทคนิคในการประเมินระดับความต้านทานโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากแบคทีเรีย

Micropipette Technique in Evaluation for Bacterial Wilt Resistance of Tomato

ศศิธร วุฒิวณิชย์

Sasitorn Vudhivanich

บทคัดย่อ

ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* การปลูกเชื้อแต่ละระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 103-108 cfu/ml เข้าไปในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 10 พันธุ์ ในปริมาณที่เท่าๆ กัน สามารถทำได้โดยใช้ ไมโครปิเปตบรรจุ suspension เชื้อ 100 ไมโครลิตร ปักเข้าไปในต้นมะเขือเทศ อายุ 30 วัน ที่ตำแหน่งเหนือซอกตาของใบที่ 3 นับจากยอด แล้วปลดไมโครปิเปตทิปเสียบคาไว้ เพื่อปล่อยให้พืชดูดซึมเชื้อเข้าไปเองจนหมด ซึ่งจะใช้เวลาไม่เกิน 3-4 ชั่วโมง วิธีนี้พืชทดสอบแต่ละต้น จะได้รับเชื้อในอัตราความเข้มข้นที่กำหนดในปริมาณที่เท่า ๆ กัน จากการสังเกตการเกิดโรคทุกวันภายในเวลา 3 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าพันธุ์ที่แสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรค ได้แก่ พันธุ์ L 245, L 373, L 390 และ L 4077 พันธุ์ที่แสดงลักษณะต้านทานโรค ได้แก่ พันธุ์ L 285 สำหรับพันธุ์ L 8, L 15 และ L 366 แสดงลักษณะค่อนข้างต้านทานถึงค่อนข้างอ่อนแอ ส่วนพันธุ์ L 95 มีระดับความต้านทานโรคที่สัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของเชื้อ ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อต่ำมะเขือเทศพันธุ์นี้จะแสดงลักษณะต้านทานต่อโรค แต่ระดับความต้านทานโรคจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อความเข้มข้นของเชื้อเพิ่มขึ้น ในขณะที่พันธุ์ L 96 ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเชื้อกับเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ไมโครปิเปตเทคนิคเป็นวิธีการปลูกเชื้อที่เหมาะสำหรับการทดสอบพันธุ์ต้านทานในระดับเรือนทดลองที่ต้องการความละเอียด สม่ำเสมอ และมีจำนวนพืชทดสอบในแต่ละครั้งไม่มากนัก โดยวิธีนี้จะสามารถดูการตอบสนองของ มะเขือเทศแต่ละพันธุ์ต่อระดับความเข้มข้นของเชื้อที่เปลี่ยนไปได้ ทำให้การประเมินระดับความต้านทานโรคถูกต้องยิ่งขึ้น

ABSTRACT

In screening for bacterial wilt resistant of tomato, the dose of *Pseudomonas solanacearum* was controlled by injecting various numbers of bacteria directly into the plant. Ten varieties of tomato

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaengsaen, Nakorn Pathom 73140, Thailand.

(30 days old) were injected with 6 levels of *Pseudomonas solanacearum* (103 - 108 cfu/ml) by a micropipette containing 100 microliter . Each inoculum was inserted diagonally into stem at the third leaf axil from the top and left the micropipette tip on the plant. The uptake of the inoculum by the stem normally was complete in 3-4 hours. Disease index rating was recorded everyday for 3 weeks. The results indicated that the varieties L245, L373, L390 and L4077 were susceptible (S). On the opposite variety L285 was resistant (R). The varities L8, L15 and L366 were moderately resistant (MR) to moderately susceptible (MS). The degree of resistance of variety L95 is correlated to the concentration of the inoculum. At low concentrations of bacteria, this variety showed resistant but became more susceptible rapidly when the concentration of bacteria was increased. On the other hand the variety L96 had little or no correlation between concentration of bacteria and percent wilt. This experiment showed that micropipette technique was high accuracy in evaluating bacterial wilt resistance because it could determine the effect of dose on the degree of wilt in each tomato varieties. This technique was recommended for intensive work.

Key words : *Pseudomonas solanacearum*, screening for bacterial wilt resistant of tomato, micropipette technique, infectivity titration

คำนำ

โรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* เป็นปัญหาสำคัญในการเพิ่มผลผลิตมะเขือเทศทั้งในเขตร้อนชื้นและกึ่งร้อนชื้น เชื้อสาเหตุโรคมีพืชอาศัยกว้างขวาง แต่สายพันธุ์ที่เข้าทำลายพืชในตระกูล Solanaceous ดูเหมือนว่าจะรุนแรงและทำความเสียหายมากในแถบเอเชียตะวันตกเฉียงใต้ การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคนี้ได้รับความสำเร็จน้อยหรือไม่คุ้มกับค่าใช้จ่าย การผลิตมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานต่อโรคดูว่าจะเป็นวิธีที่ได้ผลดีที่สุดในการควบคุมโรคนี้ ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ จำเป็นต้องมีการศึกษาวิธีการทดสอบโรคและประเมินระดับความต้านทานของโรคที่มีประสิทธิภาพ วิธีการปลูกเชื้อแก่พืชในสภาพเรือนทดลอง มีอยู่ด้วยกันหลายวิธี เช่น clipping technique [ใช้กรรไกรจุ่ม suspension เชื้อตัดก้านใบที่ 3 นับจากยอด (Mc, Carter, 1973)] stem inoculation technique [ใช้เข็มฉีดยาจิ้มทำแผลที่เหนือซอกตาของใบที่ 3 นับจากยอด 5 แผลต่อต้น แล้วหยด suspension เชื้อ ลงบนแผลทันที ใช้เชื้อ 10 ไมโครลิตรต่อต้น suspension เชื้อจะค้างอยู่ที่ซอกใบบริเวณแผลพอดี] root inoculation technique [ใช้มีดคม ๆ ตัดปลายรากแถบใดแถบหนึ่งเพื่อทำแผล ราด suspension เชื้อลงบนรากที่ถูกตัดทันที ใช้เชื้อ 20 มิลลิลิตรต่อต้น (ดัดแปลงจาก Winstead และ Kelman, 1952)] scalpel leaf clip method [ใช้มีดโกน (scalpel blade No.10) คม ๆ จุ่ม suspension เชื้อ แล้วตัดก้านใบให้ชิดลำต้นที่ตำแหน่งก้านใบที่ 3 นับจากยอดทันที (ศศิธร และศักดิ์, 2538) วิธีการปลูกเชื้อแต่ละวิธีที่กล่าวมาข้างต้นไม่สามารถทราบปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่เข้าสู่ต้นพืชแต่ละต้นได้ มะเขือเทศพันธุ์อ่อนแอบางต้นอาจไม่แสดงอาการเหี่ยวหลังจากปลูกเชื้อ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเข้าสู่พืชได้หรือเข้าสู่พืชได้ในปริมาณที่น้อยจนไม่สามารถก่อให้เกิดโรคแก่พืช ซึ่งจะทำให้ผลการประเมินระดับความต้านทานของพืชผิดพลาดได้ การทดลองนี้จะเป็นการใส่เชื้อที่ระดับความเข้มข้น

ต่าง ๆ ในอัตราที่กำหนดเข้าไปในพืชโดยตรง โดยพืชแต่ละต้นจะได้รับเชื้อในปริมาณที่เท่ากัน เพื่อหาอัตราความเข้มข้นของเชื้อเหมาะสมในการก่อให้เกิดอาการเหี่ยวในมะเขือเทศแต่ละพันธุ์ ซึ่งจะช่วยให้การประเมินระดับความต้านทานโรคเหี่ยวของมะเขือเทศพันธุ์ต่าง ๆ ทำให้ละเอียด และถูกต้องยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง

มะเขือเทศ 10 สายพันธุ์ ได้แก่พันธุ์ L 8 (VC 91 VG_1) , พันธุ์ L15 (8-1-2-9), พันธุ์ L 95 (Venus), พันธุ์ L 96 (Saturn), พันธุ์ L 245 (KL-1), พันธุ์ L 285 (Changs), พันธุ์ L 366 (Ohio MR-13), พันธุ์ L 373 (East-North), พันธุ์ L 390 (Nan-Tzu) และพันธุ์ L 4407 (TK-70) กล้ามะเขือเทศอายุ 30 วันปลูกในดินอบฆ่าเชื้อในกระถางพลาสติก พันธุ์ละ 140 ต้น

การเตรียมเชื้อ

เชื้อ *Pseudomonas solanacearun* แยกได้จากมะเขือเทศที่เป็นโรคเหี่ยว โดยใช้อาหาร TZC medium (Kelman, 1954) เลือก virulent colony ที่มีลักษณะเล็กไม่กลม สีขาวขุ่นมีจุดสีชมพูอ่อนอยู่ที่กลางโคโลนี่ กระจายตัวได้ดีในน้ำ นำไปเพิ่มปริมาณบนอาหาร TZC-X (TZC medium ที่ไม่เติม 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride หรือ TTC ส่วนที่เป็น basal medium นั่นเอง) บ่มเชื้อที่ 30°C 36 ชั่วโมง นำมาทำ suspension ในน้ำกลั่นนึ่งปรับค่าความขุ่นของเซลล์ (O.D.) = 0.2 (2.17×10^8 cfu/ml) ทำการเจือจางตามลำดับ เพื่อเตรียมเชื้อ 6 ระดับความเข้มข้นคือ 10^3 - 10^8 cfu/ml

วิธีการปลูกเชื้อ

การปลูกเชื้อใช้micropipette technique (AVRDC, 1974) เพื่อสามารถควบคุมอัตราความเข้มข้นของเชื้อที่จะใส่เข้าไปในต้นพืชได้ และเพื่อให้พืชทดลองแต่ละต้นได้รับเชื้อในปริมาณที่เท่า ๆ กัน ทำโดยใช้ Micropipette ขนาด 100 ไมโครลิตร ดูด suspension เชื้อแล้วปักลงในต้น ที่ตำแหน่งเหนือซอกตาของใบที่ 3 เล็กน้อยปลด Micropipette tip ที่มี suspension เชื้อเสียบคาไว้ ปล่อยให้พืชดูดซึมเชื้อเข้าไปเองจนหมด ซึ่งจะใช้เวลาไม่เกิน 3-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงดึง tip ออก ในการปลูกเชื้อให้กับมะเขือเทศแต่ละพันธุ์แต่ละระดับความเข้มข้นของเชื้อใช้มะเขือเทศ 20 ต้น หลังการปลูกเชื้อ เก็บพืชทดลองไว้ในเรือนระแนงซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 26-36°C สังเกตอาการและบันทึกผลทุกวันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยมีพันธุ์ L 390 เป็น susceptible check การวิเคราะห์ข้อมูลใช้ probit analysis และ probit line โดยใช้ BASIC computer program

ผลและวิจารณ์

จากการปลูกเชื้อ P. solanacearum แต่ละระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10^3 - 10^8 cfu/ml เข้าไปในต้นกล้ามะเขือเทศ อายุ 30 วัน จำนวน 10 พันธุ์ ด้วย micropipette technique ผลในตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่า พันธุ์ L 245, พันธุ์ L 373, พันธุ์ L 390 และพันธุ์ TK-70 แสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรค โดยมีค่า ED_{50} ประมาณ 10^2 - 10^4 cfu/ml พันธุ์ L 245, พันธุ์ L 390 และพันธุ์ TK-70 มีค่า chi-square กว้าง (bad fit) และ slope สูง (ประมาณ 4) ส่วนพันธุ์ L 373 มีค่า good fit และ slope ต่ำ ในขณะที่พันธุ์ L 285 แสดงลักษณะต้านทานต่อโรค โดยมีค่า slope ต่ำ และ maximum wilt อยู่ที่ 0 - 0.05 พันธุ์ L8, พันธุ์ L15 และพันธุ์ L366 แสดงลักษณะค่อนข้างต้านทานถึงค่อนข้างอ่อนแอ โดยมีค่า slope ต่ำ ค่า intercept มากกว่า 3 minimum wilt-maximum wilt อยู่ในช่วง 0.05 - 0.5 ส่วนพันธุ์ L95 ให้ค่า intercept ต่ำ slope สูง (ประมาณ 4.4) maximum wilt 0.2 ซึ่งบ่งบอกว่าระดับความต้านทานโรคของมะเขือเทศพันธุ์นี้มีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของเชื้อ ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อต่ำมะเขือเทศพันธุ์นี้จะแสดงลักษณะต้านทานโรคได้ดี แต่เมื่อระดับความเข้มข้นของเชื้อสูงขึ้น ความต้านทานโรคจะลดลงอย่างรวดเร็ว พันธุ์L 96 ที่มีค่า intercept

Table 1 Tomato varieties and probit analysis

AVRDC acc. no.	Varietal name	Intercept	Slope	Chi-square (4 dif.)	Max. LD_{50}	Min. prop.	Disease[1] prop.	reaction
8	VC 91 VG1	3.011346283	2.691540969	3.422159109	7.388532	0.4	0.05	MR-MS
15	8-1-2-9	3.568728726	1.327434043 E-01	3.49701602	10.78224	0.3	0.05	MR-MS
95	Venus	1.091512321	4.475172642 E-01	1.76886722	8.733713	0.2	0	R-S
96	Saturn	3.962015854	0.36560638 E-02	5.232832061	28.39075	0.3	0.1	MR
245	KL-1	2.945701294	4.801566469 E-01	21.36444754	4.278392	0.8	0	S
285	Changs	1.490323379	2.631328616 E-01	2.637306853	13.33803	0.05	0	R
366	Ohio MR-13	3.879196103	0.144863298	6.896335399	7.736976	0.5	0.15	MR-MS
373	East-North	4.432539449	2.344850267 E-01	2.831802119	2.420028	0.8	0.35	S
390	Nan-Tzu (local var.)	3.374312864	0.44425453	18.24912896	3.659359	1	0.15	S
4077	TK-70	2.820441317	0.923550789 E-01	13.5416676	4.426802	0.85	0.05	S

[1] R = Resistant, MR = Moderately resistant, MS = Moderately susceptible, S = Susceptible

สูงใกล้เคียงกับพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค แต่มีค่า slope ต่ำเพียง 0.36 และ maximum wilt เพียง 0.3 แสดงว่าการตอบสนองของมะเขือเทศพันธุ์นี้ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเชื้อกับเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค Micropipette technique เป็นวิธีการปลูกเชื้อที่สามารถกำหนดปริมาณและความเข้มข้นเชื้อที่ต้องการใส่เข้าไปในพืชได้ พืชแต่ละต้นจะได้รับเชื้อสม่ำเสมอในปริมาณที่เท่า ๆ กัน ทำให้สามารถหาอัตราความเข้มข้นของเชื้อต่ำสุดที่สามารถก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศแต่ละพันธุ์ได้ และสามารถดูปฏิกิริยาของมะเขือเทศแต่ละพันธุ์ว่าตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของเชื้อหรือไม่ ซึ่งจะช่วยให้การประเมินระดับความต้านทานโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย ทำให้ละเอียดถูกต้องยิ่งขึ้น แต่การปลูกเชื้อโดยวิธีนี้ ต้องทำด้วยความปราณีต ผู้ปฏิบัติต้องมีความชำนาญ และใช้เวลาในการปลูกเชื้อค่อนข้างมาก วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับงานที่ต้องการความละเอียดถูกต้อง และมีจำนวนพืชทดสอบในแต่ละครั้งไม่มากนัก (ไม่

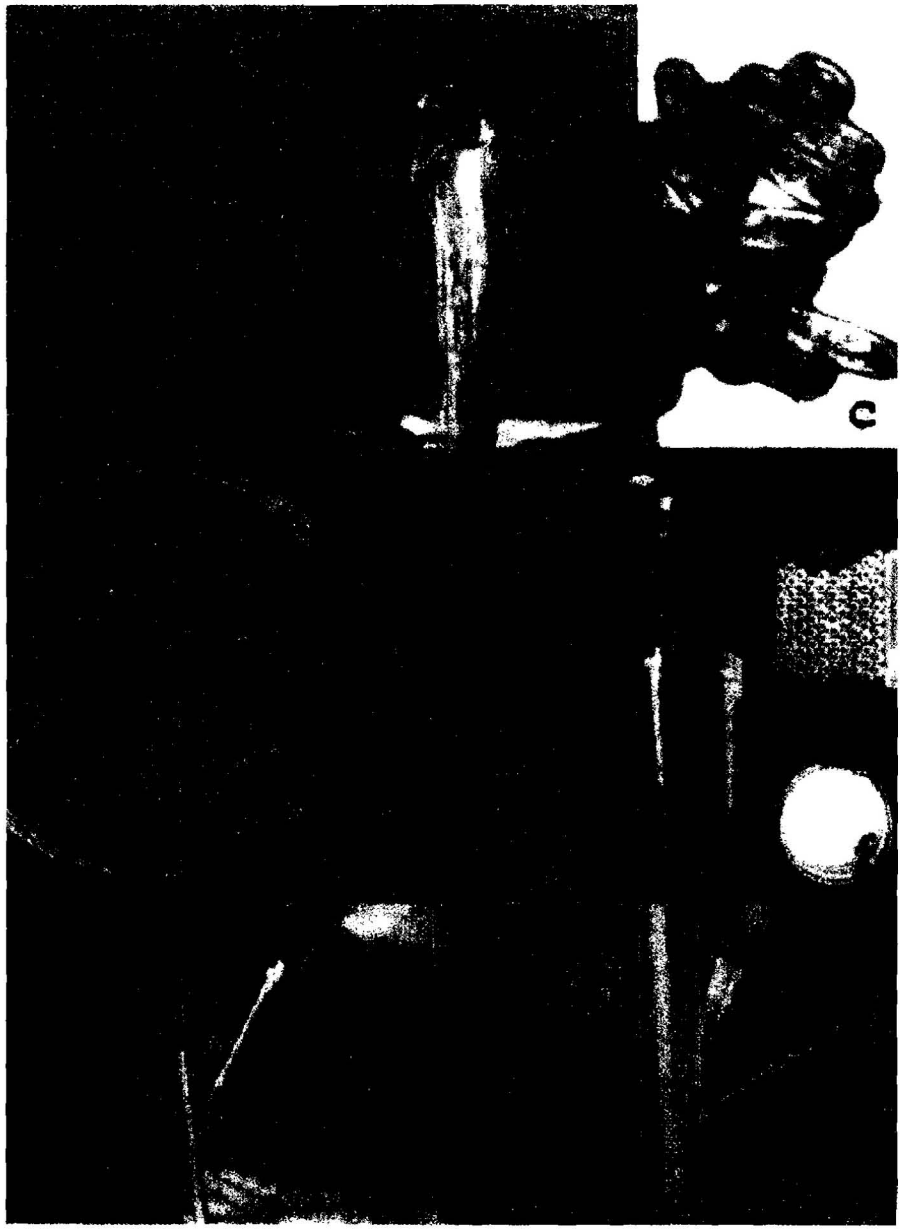

Figure 1 a. Diseased tomato shows leaf epinasty and wilting symptom while leave still green.

b. Bacterial exudate from diseased tomato.

c. Sylender short rod of *P. solanacearum*.

d. Virulent colony (wild type) of *P. solanacearum* on TZC medium formed an irregularly-round, fluidal, white colony with a pink center.

e. Non-virulent colony (mutant type) of *P. solanacearum* on TZC medium formed a round, butyrous, deep red colony with a narrow bluish border.

f. Micropipette, plastic tip and bacterial suspension for use in micropipette technique.

g. Bacterial suspension was inserted diagonally into stem at the third leaf axil from the top.

h. Uptake of the inoculum by the stem normally was complete in 3-4 hrs.

เกิน 1000 ต้น) วิธีนี้ไม่เหมาะสำหรับการปลูกเชื้อในแปลงขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามเราสามารถนำ micropipette technique ไปประยุกต์ใช้ในการปลูกเชื้ออื่น ๆ ในระดับเรือนทดลองได้

สรุป

Micropipette technique เป็นวิธีการปลูกเชื้อที่สามารถกำหนดปริมาณและความเข้มข้นของเชื้อที่ต้องการใส่เข้าไปในพืชได้ โดยพืชแต่ละต้นจะได้รับเชื้อสม่ำเสมอในปริมาณที่เท่า ๆ กัน ทำให้สามารถหาอัตราความเข้มข้นของเชื้อต่ำสุดที่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศแต่ละพันธุ์ได้ และสามารถดูปฏิกิริยาของมะเขือเทศแต่ละพันธุ์ว่าตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของเชื้อหรือไม่ ซึ่งจะช่วยให้การประเมินระดับความต้านทานโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากแบคทีเรีย ทำได้ละเอียดถูกต้องยิ่งขึ้น วิธีนี้เหมาะสำหรับงานทดสอบความต้านทานโรคในระดับเรือนทดลองที่ต้องการข้อมูลที่ละเอียด และมีจำนวนพืชทดสอบในแต่ละครั้งไม่มากนัก

คำขอบคุณ

ดิฉันใคร่ขอขอบคุณ Dr. Jonathan E. Yuen ที่ช่วยให้คำปรึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณ AVRDC ที่สนับสนุนทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ศศิธร วุฒิวณิชย์ และ ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2538. Micropipette Technique และ Scalpel eaf-Clip ในการทดสอบพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากแบคทีเรีย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ 4 เล่มที่ 1 เดือน พฤษภาคม - ตุลาคม 2538. หน้า 91-103.

Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC). 1974. The Tomato, pp. 63-67 In Annual Report for 1974. Shanhua, Taiwan.

Kelman, A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. N.Carolina Agric. Expt. Sta. Tech. Bull. 99 : 5-194.

Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693-695.

Mc. Carter, S.M. 1973. A procedure for infesting field soils with *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 63:799-800.

Winstead, N.N., and A. Kelman. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 42 : 628-634.