

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนากារอารักขาพืช

2. โครงการวิจัย : โครงการวิจัยกักกันพืช

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การตรวจติดตามเชื้อ *Cummea latent viroid* (CLVd) ที่ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Interception of *Cummea latent viroid* (CLVd) in Imported Tomato Seed

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายปรีเชษฐ ตั้งกาญจนภาสน์ สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : นางสาววันเพ็ญ ศรีทองชัย สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

: นางสาวกาญจนา วาระวิชนะนี สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

: นางสาววันเพ็ญ ศรีชาติ สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

: เชื้อ *Cummea latent viroid* (CLVd) เป็นเชื้อโรคพืชกักกันตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๖) พ.ศ. ๒๕๕๐ ลำดับที่ ๑๗๗ ไวรอยด์ชนิดนี้เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญของมะเขือเทศ ทำให้ผลผลิตลดลงถึง 49 เปอร์เซ็นต์ เชื้อชนิดนี้มีพืชอาศัยที่กว้าง เช่น มะเขือเทศ, มันฝรั่ง, แดงกวา, พริก, มะเขือชนิดต่าง ๆ และไม้ประดับ อีกทั้งยังสามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อใช้ทำพันธุ์ในประเทศ และผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออกในปริมาณที่มาก จึงทำให้เชื้อไวรอยด์ดังกล่าวมีโอกาสดูดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้า และแพร่ระบาดทำความเสียหายในประเทศไทยได้ และจากการกักกันพืชหลังการเข้ามาในปี 2551 ตรวจพบเชื้อไวรอยด์ดังกล่าวถึง 11 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงที่เชื้อไวรอยด์ชนิดนี้จะปนเปื้อนติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าได้สูง ดังนั้นการนำวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Cummea latent viroid* ที่ได้พัฒนาแล้วมาใช้ตรวจสอบติดตามเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้ามาจากต่างประเทศจึงเป็นวิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อโรคศัตรูพืชกักกันที่มีประสิทธิภาพทางหนึ่งด้วย จากผลการตรวจสอบติดตามเพื่อการสกัดเชื้อ *Cummea latent viroid* กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ (interception) ในกลุ่มประเทศที่มีความเสี่ยง ตั้งแต่ปี 2554 ถึง 2555 ด้วย

วิธีการเพาะในโรงเรือน (seedling symptom test) เพื่อสังเกตอาการ, การสุ่มตรวจด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization และ RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) โดยสุ่มตรวจตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในปี 2554 จำนวน 6 ครั้ง จาก 7 ประเทศ และในปี 2555 จำนวน 10 ครั้ง จาก 12 ประเทศ พบว่าไม่มีตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ใดแสดงอาการผิดปกติที่เป็นลักษณะจำเพาะของเชื้อไวรัสโรยด์ให้พบ (seedling symptom test) และเมื่อทำการสุ่มตรวจวินิจฉัยขั้นละเอียดด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization และ RT-PCR เพื่อยืนยัน พบว่าไม่มีตัวอย่างใดให้ผลตรวจพบเชื้อ CLVd และจากการสำรวจและตรวจสอบเชื้อไวรัสโรยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ที่ใช้เมล็ดพันธุ์พ่อแม่ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ด้วยวิธีการปลูกเชื้อในพืชทดสอบ(Biological indexing) และเทคนิค RT-PCR ตรวจพบเชื้อ CLVd จำนวน 4 ตัวอย่าง และเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) จำนวน 4 ตัวอย่าง ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่เชื้อไวรัสโรยด์ทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวอาจเข้ามาตั้งรกรากในประเทศไทยแล้ว (establish) หรือวิธีการในการตรวจติดตามการปนเปื้อนของเชื้อกับเมล็ดพันธุ์นำเข้ายังไม่เหมาะสม ทั้งนี้อาจเนื่องด้วยอัตราการปนเปื้อนของเชื้อที่ต่ำ

## 6. คำนำ

: เชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุดที่มีรายงาน มีองค์ประกอบเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นวงปิดไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม มีขนาดประมาณ 370 เบส โดยปกติแล้วอาร์เอ็นเอไวรัสโรยด์จะอยู่ในสภาพโครงสร้างทุติยภูมิที่มีลักษณะเป็น rod-shape เนื่องจากการเกิดจับกันของเบสในสายอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสโรยด์ด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรมากที่สุด ไวรัสโรยด์เป็นเชื้อปรสิตถาวรในพืชที่ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ การเพิ่มปริมาณ การเคลื่อนย้าย และการก่อโรคในพืชจะใช้โปรตีนและสารเคมีต่าง ๆ จากพืชอาศัย เชื้อ CLVd จัดจำแนกอยู่ในวงศ์ *Pospiviroidae* สกุล *Pospiviroid* เชื้อชนิดนี้เข้าทำลายพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ, มันฝรั่ง, แดงกวา, พริก, ต้นลิปstick และพืชอื่น ๆ ในสกุล *solanum* spp. เชื้อ CLVd สามารถถ่ายทอดโรคได้หลายทาง ได้แก่ ทางกล เช่น ทางบาดแผล, เมล็ดพันธุ์, และทางหัวพันธุ์ เชื้อชนิดนี้เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญของมะเขือเทศ, พริก และมันฝรั่ง มีรายงานการเข้าทำลายที่รุนแรงกับมะเขือเทศทำให้ผลผลิตลดลงสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งรุนแรงกว่าเชื้อ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) มาก ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ด

พันธุ์มะเขือเทศพอมเมในปริมาณที่มากเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออก ประกอบกับเชื้อชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโรคและเพิ่มปริมาณในพืชหลายชนิดในวงศ์ *Solanaceae* เช่น มะอึก และ มะเขือเปราะ แบบไม่แสดงอาการได้ (latent) ซึ่งยากแก่การตรวจวินิจฉัยและการกำจัดให้หมดสิ้นไปได้ (Eradication) ซึ่งจากการตรวจกักกันพืชหลังการเข้ามา (post entry quarantine) ในปี 2550 ตรวจพบเชื้อไวรัสออยด์ดังกล่าวจำนวน 11 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่เชื้อชนิดนี้จะสามารถติดเข้ามาแพร่ระบาดและก่อให้เกิดความเสียหายในประเทศไทยได้ จากความเสี่ยงดังกล่าวจึงทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินการในการจัดการความเสี่ยงโดยการตรวจติดตามเชื้อ CLVd กับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

## 7. วิธีดำเนินการ

### - อุปกรณ์

:

1. โรงเรือนมุ้งกันแมลง
2. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส
3. ตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส
4. เครื่องซั่งละเอียด ทศนิยม 3 ตำแหน่ง
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
7. เครื่อง Thermal cycler (PCR)
8. Gel electrophoresis
9. Gel Documentation UV-transilluminator
10. เอ็นไซม์ One-Step RT-PCR (SS III reverse transcriptase /PLATINUM *Taq* polymerase) (Invitrogen)
11. เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase
12. สารละลายไพรมเมอร์ที่จำเพาะ
13. 100 bp DNA Ladder
14. ชุด kit สกัด agarose gel: QIAquick Gel Extraction Kit
15. pGEM-T easy vector (Promega)
16. competent cell (*E. coli* DH5 $\alpha$ )
17. สารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-galactoside (X-gal)
18. สารละลาย isopropyl-6-D thio galactopyranoside (IPTG)
19. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการปลูกเชื้อบนพืชด้วยวิธีกล

20. DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche)
21. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอน การสกัดอาร์เอ็นเอ การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา RT-PCR และ Nucleic Hybridization
22. พีชทดสอบชนิดต่าง ๆ
23. วัสดุการเกษตรต่าง ๆ ดินและปุ๋ยเคมี

- วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศ โดยตรวจเอกสารข้อมูลของเชื้อไวรัส CLVd แหล่งประเทศที่มีรายงานการระบาดหรือพบโรค ข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ รายชื่อประเทศที่มีการนำเข้า/ส่งออกเมล็ดพันธุ์ เพื่อกำหนดแหล่งประเทศนำเข้าที่มีความเสี่ยงของโรค
2. เตรียมวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ อุปกรณ์ทางการเกษตรที่จำเป็น
3. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อ CLVd ณ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช ได้แก่ แคนาดา, เยอรมนี, เนเธอร์แลนด์, สหราชอาณาจักร และ สหรัฐอเมริกา นอกจากนี้ยังสุ่มตรวจในกลุ่มประเทศที่มีความเสี่ยงในด้านมาตรฐานสุขอนามัยพืชด้วยเช่น ประเทศจีน, อินเดีย และอินโดนีเซีย รวมถึงกลุ่มประเทศในแถบอเมริกากลางและใต้ด้วย
4. นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศดังกล่าวมาเพาะเพื่อดูอาการเบื้องต้นในโรงเรือนทดลอง โดยการปลูกเมล็ดพันธุ์ในถาดเพาะ ประมาณ 100 – 200 เมล็ดต่อ consignment เป็นระยะเวลา 1 จนถึง 6 สัปดาห์ สังเกตอาการผิดปกติที่เกิดขึ้น และเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส CLVd ให้มากพอต่อการตรวจสอบ
5. สุ่มตรวจเชื้อไวรัสในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ใช้เมล็ดพันธุ์พ่อแม่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ในพื้นที่จังหวัดสกลนคร ขอนแก่น อุดรธานี มุกดาหาร กาฬสินธุ์ และมหาสารคาม เก็บตัวอย่างมะเขือเทศที่แสดงอาการโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไวรัส คือมีลักษณะอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ยอดแตกเป็นพุ่ม ก้านใบ ใบหดลรูป ย่น และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ ก้านใบ กิ่ง และลำต้น จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวปลูกถ่ายเชื้อบนพีชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ด้วยวิธีกล เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค สังเกตลักษณะอาการที่ปรากฏ โดยอาการของโรคจะแสดงในระยะเวลาตั้งแต่ 2 อาทิตย์ ถึง 1 เดือน หลังจากปลูกถ่ายเชื้อ

6. ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Columnea latent viroid* ในชั้น  
ละเอียดด้วยวิธีการ Nucleic hybridization

6.1 ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการ CTAB

6.2 การผลิต cDNA probe ที่จำเพาะต่อเชื้อ CLVd

6.2.1 นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ของเชื้อ CLVd ไปเพิ่ม  
ปริมาณให้มากพอด้วยเทคนิค PCR และนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด  
agarose gel (QIAquick Gel Extraction Kit) (QIAGEN) (วิธีการทำตาม  
คู่มือ)

6.2.2 สังเคราะห์ cDNA probe ด้วย DIG High Prime DNA  
Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) (วิธีการทำตามคู่มือ)

6.3 การตรวจสอบความเข้มข้นและประสิทธิภาพของ cDNA probe  
ที่ผลิตได้ (วิธีการทำตามคู่มือ)

6.4 นำ cDNA probe ที่ผลิตได้ มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์  
ด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization โดยนำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่  
นำเข้าจากต่างประเทศ จำนวน 50 เมล็ดต่อ 1 รายการ มาปลูก รอจนต้น  
กล้าอายุได้ประมาณ 2 อาทิตย์ จึงสกัดอาร์เอ็นเอจากใบและของต้นมะเขือ  
เทศดังกล่าว จากนั้นตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค Nucleic  
Hybridization (วิธีการทำตามคู่มือ)

7. ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Columnea latent viroid* ในชั้น  
ละเอียดด้วยวิธีการ RT-PCR

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการ ตรวจสอบหาการ  
ปนเปื้อนของเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค RT-PCR (one-step): โดยใช้ ไพร  
เมอร์ PC-2, CLVd (ปริเชษฐ, 2548) และ NAD (internal control)

7.1 ขั้นตอนของปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

2X one-step buffer	10.0	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	4.5	ไมโครลิตร
2 $\mu$ M ไพรเมอร์ สาย c	2.0	ไมโครลิตร
2 $\mu$ M ไพรเมอร์ สาย h	2.0	ไมโครลิตร
Superscript RT/Platinum Taq polymerase	0.5	ไมโครลิตร
อาร์เอ็นเอตัวอย่าง	1.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

ขั้นที่ 1      48 องศาเซลเซียส      นาน 50 นาที      1 รอบ

ชั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส	นาน 3 นาที	1 รอบ
ชั้นที่ 3	94 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	1 รอบ
ชั้นที่ 4	56 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	1 รอบ
ชั้นที่ 5	72 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	1 รอบ
	โดยในชั้นที่ 3 ถึง 5 จะซ้ำอีก 34 รอบ		
ชั้นที่ 6	72 องศาเซลเซียส	นาน 10 นาที	1 รอบ
ชั้นที่ 7	20 องศาเซลเซียส	นาน 15 นาที	1 รอบ

7.2 ตรวจสอบขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ ด้วยวิธีการอิลีคโตรโฟรีซิสโดยใช้ 2% agarose gel ละลายในสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ agarose gel ย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

8. หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อมีการตรวจพบเชื้อ โดยการนำ PCR product ที่ได้จากในหัวข้อที่ 7 เชื่อมต่อเข้ากับ pGEM-T easy vector และถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell (DH5 $\alpha$ ) แล้วนำไปหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันผลการตรวจในขั้นสุดท้าย

8.1 ทำการโคลนผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ของไวรอยด์ ด้วยการเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega) (วิธีการทำตามคู่มือ) และถ่ายโอนเข้าไปยังเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 $\alpha$  โดยใช้วิธีการ heat shock transformation (Fristch *et al.*, 2001) และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อไวรอยด์ โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

8.2 วิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรอยด์ที่ได้กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานใน GenBank โดยอาศัยโปรแกรม Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด ในการจำแนกชนิดของไวรอยด์ จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อไวรอยด์ด้วยโปรแกรม mfold RNA-Folding-Form (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/ RNA-Folding-Form>) เพื่อยืนยันคุณลักษณะที่สำคัญของไวรอยด์ และทำการจัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

9. เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้ รายงานผลการตรวจพบเชื้อไว  
รอยด์ต่อกลุ่มวิจัยการกักกันพืช และจัดทำรายงาน ผลการวิจัย

- เวลาและสถานที่

ตั้งแต่ ตุลาคม 2553 ถึงกันยายน 2555 รวม 2 ปี

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง : 1. ผลการสืบค้นข้อมูลพบว่า เชื้อไวรอยด์ชนิดนี้ก่อให้เกิดอาการที่รุนแรง  
ในมะเขือเทศ มันฝรั่ง และพริก และสามารถติดโรคโดยไม่แสดงอาการได้ใน  
ไม้ประดับหลายชนิด เช่น ต้นลิปสติก สามารถในการถ่ายทอดโรคผ่านทาง  
เมล็ดพันธุ์ และแพร่กระจายโรคได้ง่ายด้วยวิธีกล แต่ไม่มีข้อมูลการถ่ายทอด  
โรคผ่านทางละอองเกสรและแมลง ปัจจุบันประเทศที่มีรายงานการแพร่บาด  
ของเชื้อ CLVd ได้แก่ แคนาดา, เยอรมนี, เนเธอร์แลนด์, สหราชอาณาจักร  
และ สหรัฐอเมริกา ส่วนประเทศจีนและอินเดียเป็นประเทศที่มีความเสี่ยงที่  
อาจมีเชื้อชนิดนี้ระบาดในประเทศ
2. ได้สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ ดังต่อไปนี้
- 2.1 จำนวน 6 ครั้ง ในปีงบประมาณ 2554 ได้แก่
1. ประเทศจีน น้ำหนัก 0.05 Kg นำเข้าวันที่ 4 มีนาคม 2554
  2. ประเทศอินเดีย น้ำหนัก 24.7 Kg นำเข้าวันที่ 24 เมษายน  
2554
  3. ประเทศจีน น้ำหนัก 276.8 Kg นำเข้าวันที่ 4 พฤษภาคม 2554
  4. ประเทศอเมริกา เปรู ชิลี และเม็กซิโก น้ำหนัก 14.131 Kg  
นำเข้าวันที่ 24 พฤษภาคม 2554
  5. ประเทศเนเธอร์แลนด์ น้ำหนัก 0.282 Kg นำเข้าวันที่ 6 กรกฎาคม  
2554
  6. ประเทศเนเธอร์แลนด์ น้ำหนัก 0.357 Kg นำเข้าวันที่ 6 กรกฎาคม  
2554
- 2.2 จำนวน 10 ครั้ง ในปีงบประมาณ 2555 ได้แก่
1. ประเทศฝรั่งเศส น้ำหนัก 0.84 Kg นำเข้าวันที่ 30 ธันวาคม  
2554

2. ประเทศอินโดนีเซีย น้ำหนัก 11.768 Kg นำเข้าวันที่ 23 มกราคม 2555
3. ประเทศพม่า น้ำหนัก 4.83 Kg นำเข้าวันที่ 23 มกราคม 2555
4. ประเทศแอฟริกาใต้ น้ำหนัก 0.022 Kg นำเข้าวันที่ 23 มกราคม 2555
5. ประเทศญี่ปุ่น น้ำหนัก 7.5 Kg นำเข้าวันที่ 23 มกราคม 2555
6. ประเทศจีน น้ำหนัก 70.55 Kg นำเข้าวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2555
7. ประเทศสหรัฐอเมริกา เปรู ซิลี เม็กซิโก และอิสราเอล น้ำหนัก 9.078 Kg นำเข้าวันที่ 4 พฤษภาคม 2555
8. ประเทศสหรัฐอเมริกา เปรู ซิลี เม็กซิโก และอิสราเอล น้ำหนัก 4.322 Kg นำเข้าวันที่ 4 พฤษภาคม 2555
9. ประเทศเปรู น้ำหนัก 2.0 Kg นำเข้าวันที่ 14 พฤษภาคม 2555
10. ประเทศอินเดีย น้ำหนัก 30.3 Kg นำเข้าวันที่ 25 พฤษภาคม 2555

4. เมื่อนำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศดังกล่าวมาเพาะเพื่อดูอาการเบื้องต้นในโรงเรือนทดลอง พบว่าไม่มีตัวอย่างใดแสดงอาการของโรคที่จำเพาะของเชื้อไวรอยด์ มีเพียงบางตัวอย่างที่แสดงลักษณะอาการผิดปกติคล้ายกับไวรัสเท่านั้น

5. ผลการตรวจสอบตัวอย่างมะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศทั้งที่แสดงอาการผิดปกติดังกล่าว และที่ไม่แสดงอาการผิดปกติ โดยการตรวจวินิจฉัยขั้นละเอียดด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization และ RT-PCR พบว่าให้ผลเป็น negative ในทุก ๆ ตัวอย่าง แสดงว่าไม่มีตัวอย่างไหนพบการปนเปื้อนของเชื้อ CLVd ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์ สำหรับการทดลองในส่วนนี้ อาจเป็นไปได้ที่วิธีการในการตรวจติดตามการปนเปื้อนของเชื้อกับเมล็ดพันธุ์นำเข้าอาจยังไม่เหมาะสม ทั้งนี้อาจเนื่องด้วยอัตราการปนเปื้อนของเชื้อที่ต่ำ จึงทำให้ตรวจไม่พบการปนเปื้อนกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวแต่กลับตรวจพบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ซึ่งหากเป็นกรณีนี้จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเมล็ดพันธุ์ตัวอย่างที่นำมาตรวจตรวจสอบให้มีปริมาณมากขึ้น (มากกว่า 200 เมล็ด)

6. ผลการสำรวจโรคและเก็บตัวอย่างอาการในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและตัวอย่างมะเขือ (*Solanum stramonifolium*) และนำมาปลูกเชื้อ



บนพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ด้วยวิธีกล พบว่าตัวอย่างมะเขือเทศจำนวน 7 ตัวอย่างและมะเขืออีก 1 ตัวอย่าง แสดงผลอาการจำเพาะบนพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ให้อาการลำต้นแคระแกร็น ใบหดลดรูป ก้านใบและยอดหดสั้นอย่างรุนแรง ใบบิดม้วนเสียรูปทรง ยอดใหม่มีขนาดเล็กผิดปกติ มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ กิ่ง ก้าน และลำต้น ซึ่งเป็นลักษณะอาการที่จำเพาะของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส (ภาพที่ 1) นอกจากนี้ยังมีบางตัวอย่าง (จำนวน 4 ตัวอย่าง) ทำให้พืชทดสอบมะเขือเทศแสดงอาการ ใบหดลดรูป เนื้อใบย่น และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อน้ำเลี้ยงของพืชเล็กน้อย แต่ไม่มีอาการแคระแกร็น (ภาพที่ 2, 3 และ 4) และมีตัวอย่าง 1 ตัวอย่างทำให้พืชทดสอบมะเขือเทศแสดงอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ยอดและใบหดลดรูป ใบมีอาการต่าง เนื้อใบหดย่น และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ (ภาพที่ 5) และใบข้างที่สร้างใหม่จะมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 6) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่ามีเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดอาการผิดปกติในพืชกลุ่มมะเขือได้ และเป็นลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อ *Columnea latent viroid* ซึ่งจะไม่แสดงอาการผิดปกติใด ๆ บนมะเขือ (latent) (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 1 อาการผิดปกติบนพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers



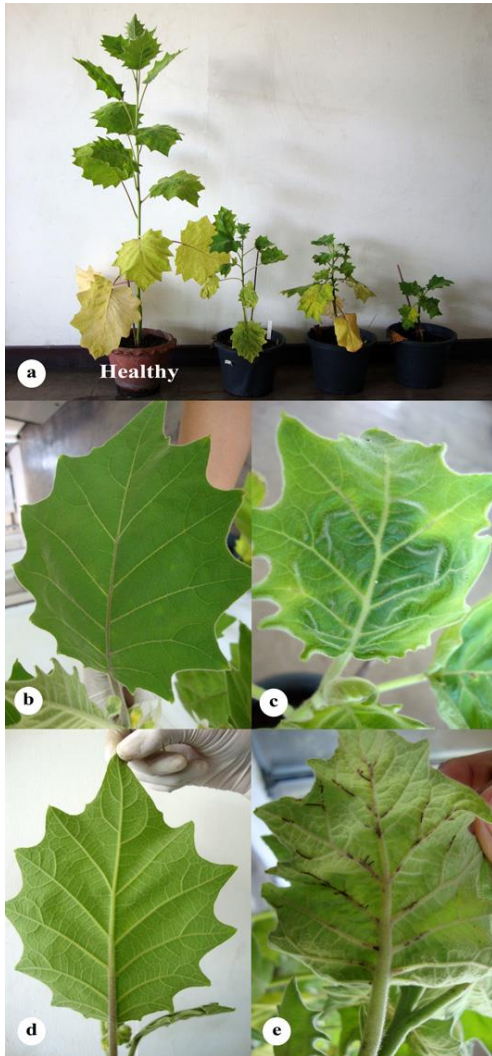
ภาพที่ 2 อาการใบเหี่ยวหดลรูปบนพืชทดสอบมะอึ๊ก เปรียบเทียบกับมะอึ๊กปกติ  
ด้านขวา



ภาพที่ 3 อาการผิตปกติบนพืชทดสอบมะอึ๊ก ซึ่งแสดงอาการใบหดลรูป เนื้อใบเหี่ยว



ภาพที่ 4 อาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ (necrosis vein) บนพืชทดสอบมะอึ๊ก



ภาพที่ 5 ลักษณะอาการผิดปกติของมะอึ๊กที่ได้รับการปลูกเชื้อ

a) เปรียบเทียบความสูงของต้นที่เป็นโรคกับต้นปกติ

b) หลังใบของต้นปกติ

c) หลังใบของต้นที่เป็นโรค: มีอาการต่าง เนื้อใบหด

ย่น d) ท้องใบของต้นปกติ

e) ท้องใบของต้นที่เป็นโรค: มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ

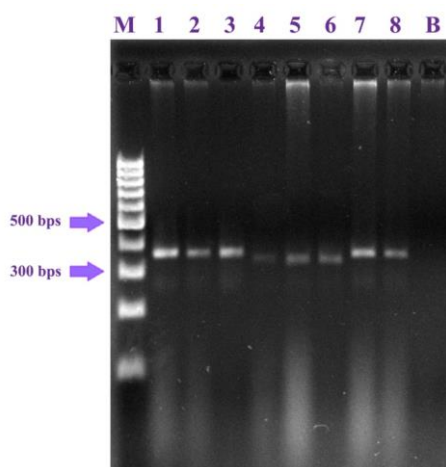


ภาพที่ 6 ลักษณะอาการผิดปกติของใบข้างมะอึกที่สร้างใหม่ มีอาการเล็กแกร็นและเนื้อใบ  
หดย่น

ตารางที่ 3 แสดงผลการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบมะเชื้อเทศพันธุ์ Rutgers และมะอึก

ตัวอย่างที่	ชื่อ clone	อาการในมะเชื้อเทศ	อาการในมะอึก
1	Solanum	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดรูป ใบบิดม้วนเสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ต้นแคระแกร็น ยอดและใบหดรูป ใบหดย่น ต่าง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ
2	Prayong-17	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดรูป ใบบิดม้วนเสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ไม่แสดงอาการผิดปกติ
3	Sathap	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดรูป ใบบิดม้วนเสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ไม่แสดงอาการผิดปกติ
4	Duenpen	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดรูป ใบบิดม้วนเสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ไม่แสดงอาการผิดปกติ
5	Pinit	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดรูป ใบบิดม้วนเสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ใบย่น หดรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อน้ำเลี้ยงของพืชเล็กน้อย
6	Prayong-19	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดรูป ใบบิดม้วนเสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ใบย่น หดรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อน้ำเลี้ยงของพืชเล็กน้อย
7	Supattha	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดรูป ใบบิดม้วนเสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ใบย่น หดรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อน้ำเลี้ยงของพืชเล็กน้อย
8	Aurai	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดรูป ใบบิดม้วนเสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ใบย่น หดรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อน้ำเลี้ยงของพืชเล็กน้อย

7. ผลการตรวจสอบตัวอย่างมะเชื้อเทศในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเชื้อเทศที่ใช้ที่ใช้เมล็ดพันธุ์พ่อแม่ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศด้วยเทคนิค RT-PCR พบตัวอย่างพืชจำนวน 8 ตัวอย่างให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 370 และ 350 เบส (ภาพที่ 7) โดยเป็นแถบขนาด 370 เบส 4 ตัวอย่าง และ 350 เบส 4 ตัวอย่าง



**ภาพที่ 7** ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR และ Gel electrophoresis โดยคู่มือ PC-2

M = 100 bps DNA Ladder

1-8 = อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างมะเขือเทศพันธุ์ทั้ง 8 ตัวอย่าง

B = buffer (blank)

8. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โครงสร้างทุติยภูมิ และการจัดกลุ่มของ แอปติเอ็นเอที่ตรวจได้

8.1 จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า แอปติเอ็นเอขนาด 370 เบสทั้ง 4 ตัวอย่างเป็นเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) และแอปติเอ็นเอขนาด 350 เบสทั้ง 4 ตัวอย่างเป็นเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) โดยตัวอย่างที่จำแนกได้เป็นเชื้อ CLVd มีขนาดตั้งแต่ 368 – 370 เบส มีค่า % identity (ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์) อยู่ในระดับ 97-99 เปอร์เซ็นต์ มีค่า score อยู่ในช่วง 612-665 bits และมีค่า expect value อยู่ในช่วง  $6e-172$  ถึง 0.0 และตัวอย่างที่จำแนกได้เป็นเชื้อ PCFVd มีขนาดตั้งแต่ 348 – 349 เบส มีค่า % identity (ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์) อยู่ในระดับ 96-99 เปอร์เซ็นต์ มีค่า score อยู่ในช่วง 549-634 bits และมีค่า expect value อยู่ในช่วง  $4e-153$  ถึง  $1e-178$  โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ได้แสดงในภาพที่ 8 ถึง 15 ซึ่งค่าทั้งหมดที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าแอปติเอ็นเอที่ได้เป็นเชื้อไวรัส CLVd และ PCFVd

(หมายเหตุ: % identity เป็นค่าบอกระดับความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับเชื้อไวรัสจะอยู่ที่ระดับตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจึงจะถือว่าเป็นเชื้อไวรัสชนิดเดียวกัน, ค่า score เป็นค่าที่เกิดจากการคำนวณเมตริกของโปรแกรมซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาเปรียบเทียบ โดยปกติแล้วจะต้องมีค่ามากกว่า 200 bits จึงจะถือว่ามีความน่าเชื่อถือ, และค่า expect value เป็นค่าที่ได้จากการค้นและเปรียบเทียบข้อมูลของ GenBank โดยที่ค่า expect value จะเป็นค่าที่บอกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับสิ่งที่เปรียบเทียบอย่างน้อยแค่ไหน โดยทั่วไปแล้วจะมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ และหากมีค่าเป็นศูนย์หมายความว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เดียวกัน)

>gi|333496614|gb|JF742633.1| Columnea latent viroid clone Solanum 4

```
CGGAACTAAACTCGTGGTTTCTGTGGTTTCACACCTGACCCATGCAAGAAAAAAGAACGGGAGGAAG
AGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGGCTTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGT
TCAGACAGGAGTAATCCCAGCAGAAACAGGGTTTTACCCCTTCTTTCTTCTGGTTTCTTCTCTGCTTCAGCG
GCCTCGCCCGGAGTCTTGACCAGCGCAGGTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCATACT
CTCCTTTTTTCTTCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGAACCGCAGTTGGTTTCTT
```

ภาพที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Columnnea latent viroid* ที่ตรวจพบ (clone Solanum 4)

```
>gi|432141095|gb|KC143295.1| Columnnea latent viroid clone Prayong-17, complete genome  
CGGAACTAAACTCGTGGTTTCCTGTGGTTACACCTGACCCTGCAGCCATGCGAAGAAAAAAGAACGGGAGGAAGA  
GCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGGTCTTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGTT  
CAGACAGGAGTAATCCCCGCAGAAACAGGGTTTTACCCCTTCCTTTCTTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGG  
CCTCGCCCGGAGTCTTGACCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGCTCGCTCAAGCCTCTACCT  
CCTTTTTTCTCTATCTAGCTCGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAAACCGCAGTTGGTTTCCT
```

ภาพที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Columnnea latent viroid* ที่ตรวจพบ (clone Prayong-17)

```
>gi|432141091|gb|KC143291.1| Columnnea latent viroid clone Sathap-3, complete genome  
CGGAACTAAACTCGTGGTTTCCTGTGGTTACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAAGAAAAAAGAACGGGAGGAAG  
AGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGGTCTTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGT  
TCAGACAGGAGTAATCCCCGCAGAAACAGGGTTTTACCCCTTCCTTTCTTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCG  
GCCTCGCCCGGAGTCTTGACCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCTACC  
TCCTTTTTTCTTCACTTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTTAGCCCGTGGAAACCGCAGTTGGTTTCCT
```

ภาพที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Columnnea latent viroid* ที่ตรวจพบ (clone Sathap-3)

```
>gi|333496622|gb|JF742641.1| Columnnea latent viroid clone Duenpen 8, complete genome  
CGGAACTAAACTCGTGGTTTCCTGTGCTTACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAAGAAAAAAGATCGGGAGGAAG  
AGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGGTCTTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGT  
TCAGACAGGAGTAATCCCCGCAGAAACAGGGTTTTACCCCTTCCTTTCTTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCG  
GCCTCGCCCGGAGTCTTGACCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCTACC  
TCCTTTTTTCTTCACTTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACTGCAGTTGGTTCCCT
```

ภาพที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Columnnea latent viroid* ที่ตรวจพบ (clone Duenpen 8)

```
>gi|432141105|gb|KC143305.1| Pepper chat fruit viroid clone Pinit-29, complete genome  
CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCTCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAAGAAAGGGGAAGCAAGCATC  
TCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACAGACCGGGCGGAGAAGCGCACGAGCGGGACCGTCTTCTGACAG  
GAGTAATCCCCGTTAATCGAGGGTTTTACCCCTTCCTTTCTTTCGGGTTTCCTTCCTCAGTCGACCGGTCCGCGTC  
GGCCTTCTCGCGCACTGCTGTCCGGTACTACCCGGTGGATACAACCTGACAGAGGTGCTTTTTCTTCCACCCGAC  
TTCTACCGACGCGCGGGGAGTGAAGCTACCCGGGACCCGAGAGGATCT
```

ภาพที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* ที่ตรวจพบ (clone Pinit-29)

```
>gi|432141099|gb|KC143299.1| Pepper chat fruit viroid clone Prayong-19, complete genome
```

CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCTCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAAGGGGAAGCAAGCATC  
TCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACAGACCGGGCGGAGAAGCGCACGAGCGGGACCGTCTTCTGACAG  
GAGTAATCCCAGTAGAAACAGGGTTTTACCCCTTCCCTTCTTCGGGTTTCCCTCCTCAGTCGACCGGTCCGCGTC  
GGCCTTCTCGCGCACTGCTGTCCGGCTACTACCCGGTGGATACAACCTGACAGAGGTGCTTTTTCTTCCACCCCTAC  
TTCTACCGACGCGGCCGGGAGTGAAGCTACCCGGGACCCGAGAGGATCT

ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* ที่ตรวจพบ (clone Prayong-19)

>gi|333496620|gb|JF742639.1| Pepper chat fruit viroid clone Supattha 3, complete genome

CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCTCCCCGTAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAAGGGGAAGCAAGCATC  
TCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACAGACCGGGCGGAGAAGCGCACGAGCGGGACCGTCTTCTGACAG  
GAGTAATCCCAGCAGAAACAGGGTTTTACCCCTTCCCTTCTTCGGGTTTCCCTCCTCAGTCGACCGGTCCGCGTC  
GGCCTTCTCGCGCACTGCTGTCCGGCTACTACCCGGTGGATACAACCTGACAGAGGTGCTTTTTCTTCCACCCGAC  
TTCTACCGACGCGGCCGGGAGTGAAGCTACCCGGGACCCGAGAGGATCT

ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* ที่ตรวจพบ (clone Supattha 3)

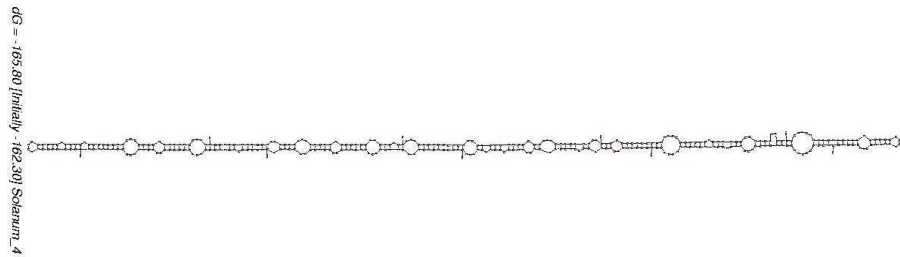
>gi|333496618|gb|JF742637.1| Pepper chat fruit viroid clone Aurai 2, complete genome

CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCTCCCCGACGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAAGGGGAAGCAAGCATC  
TCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACAGACCGGGCGGAGAAGCGCACGAGCGGGACCGTCTTCTGACAG  
GAGTAATCCCTGTAGAAACAGGGTTTTACCCCTTCCCTTCTTCGGGTTTCCCTCCTCAGTCGACCGGTCCGCGTC  
GGCCTTCTCGCGCACTACTGTCCGGCTACTACCCGGTGGATACAACCTGACAGAGGTGCTTTTTCTTCCACCCGAC  
TTCTACCGACGCGGCCGGGATGAAGCTACCCGGGACCCGAGAGGATCT

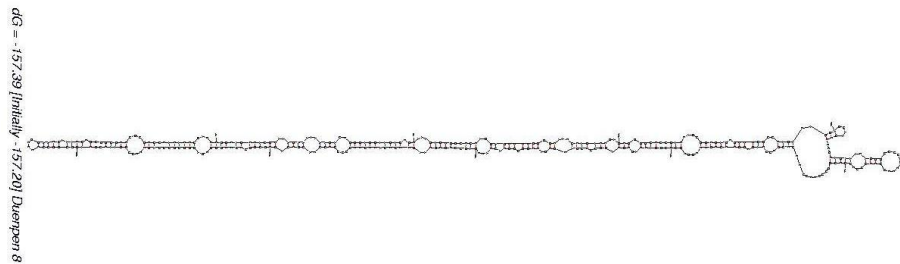
ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* ที่ตรวจพบ (clone Aurai 2)

8.2 จากการวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิ (โครงสร้างสองมิติ) ของอาร์เอ็นเอที่เป็นไปได้ โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนทั้ง 8 มาวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิที่มีค่าพลังงาน Gibb's free energy ต่ำสุดด้วยโปรแกรม mfold version 3.1 (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/ma>) เพื่อช่วยในการยืนยันผล พบว่าได้ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิที่มีลักษณะเป็นแท่ง (rod-like secondary structure) ที่มี hairpin loop เกิดขึ้นทั้ง 8 โคลน (ภาพที่ 16, 17 และ 18) เป็นการช่วยยืนยันผลการวิเคราะห์ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างพืชทั้ง 8 ตัวอย่าง เป็นเชื้อไวรอยด์ CLVd และ PCFVd

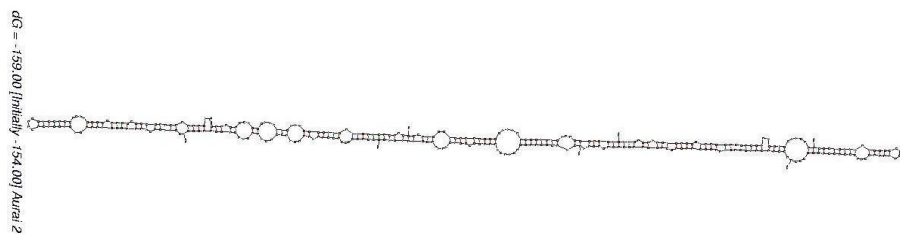




ภาพที่ 16 โครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อ CLVd โคลน (clone Solanum 4)



ภาพที่ 17 โครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อ CLVd โคลน (clone Duenpen 8)



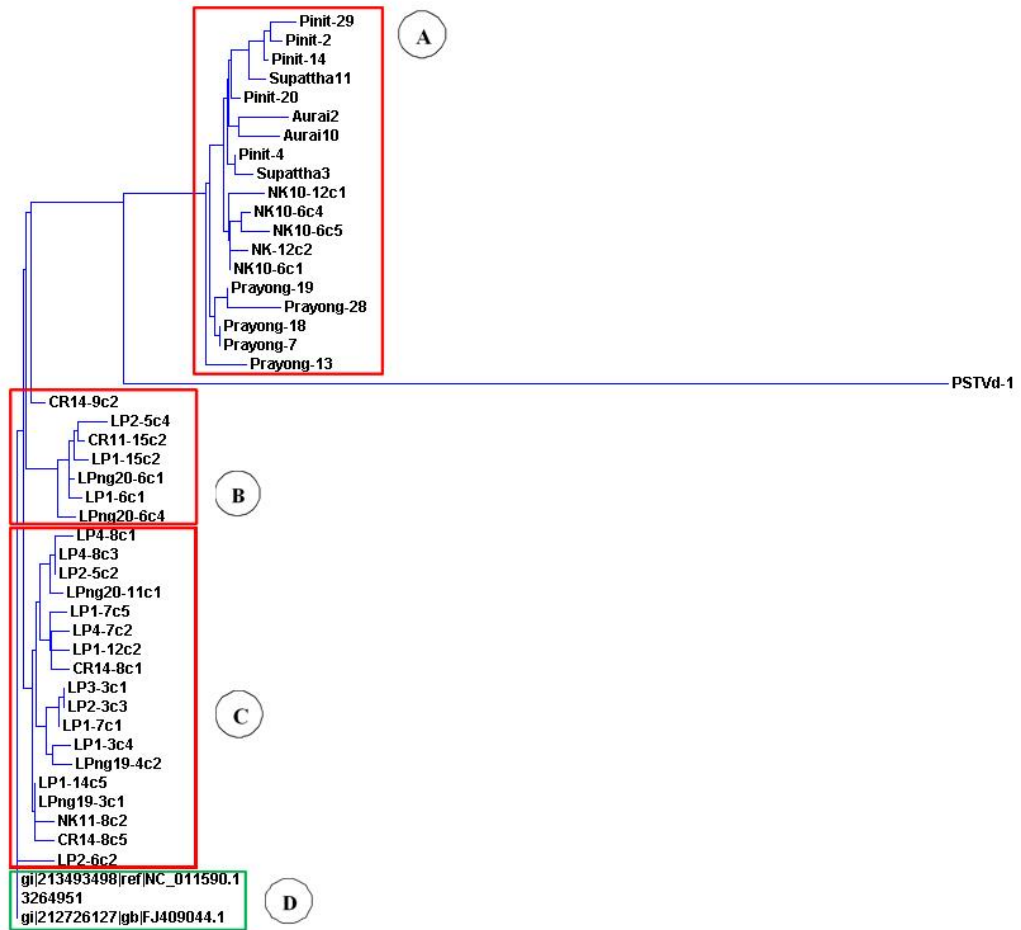
ภาพที่ 18 โครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อ CLVd โคลน (clone Aurai 2)

### 8.3 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์

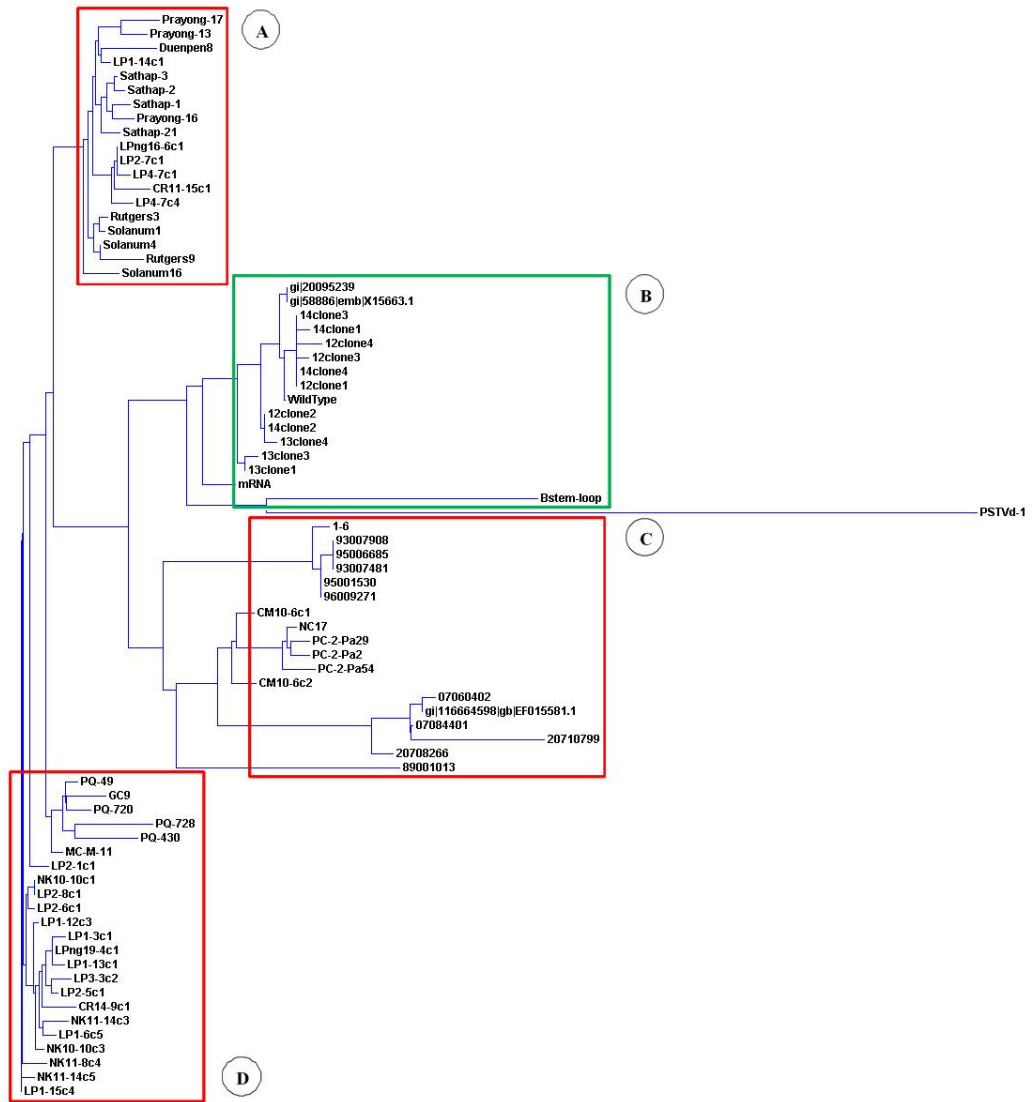
จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด คือ *Columnea latent viroid* และ *Pepper chat fruit viroid* ที่มีรายงานทั้งหมดใน NCBI ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) พบว่า



สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อ PCFVd สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์  
ได้เป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 19) และเชื้อ CLVd ได้เป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 19 การจัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อ PCFVd ด้วยโปรแกรม ClustalW2  
A, B และ C: เชื้อ PCFVd isolate ที่เข้าทำลายมะเขือเทศ  
D: เชื้อ PCFVd isolate ที่เข้าทำลายพริกและมะเขือเทศ



ภาพที่ 20 การจัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อ CLVd ด้วยโปรแกรม ClustalW2

A, C และ D: เชื้อ CLVd isolate ที่เข้าทำลายมะเขือเทศ

B: เชื้อ CLVd isolate ที่เข้าทำลายไม้ประดับ

เชื้อ PCFVd ในกลุ่ม A, B และ C เป็นเชื้อ PCFVd isolate ที่เข้าทำลายมะเขือเทศทั้งหมด ในขณะที่กลุ่ม D เป็นเชื้อ PCFVd isolate ที่เข้าทำลายพริกและ isolate แรกที่มีการค้นพบ โดยพบว่าเชื้อ PCFVd ทั้ง 4 โคลนใหม่ จำแนกอยู่ในกลุ่ม A เหมือนกันซึ่งเป็นกลุ่มที่มีรายงานการพบการเข้าทำลายในมะเขือเทศในประเทศไทยในปี 2553 (Reanwarakorn *et al.*, 2011) แต่แตกต่างจากเชื้อ PCFVd ที่มีรายงานในต่างประเทศ (กลุ่ม D) แสดงให้เห็นว่าเชื้อชนิดนี้อาจได้ติดเข้ามาพร้อมกับเมล็ดพ่อแม่พันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้ามาจากต่างประเทศในครั้งแรกในปี 2553 และเชื้อชนิดนี้อาจ

แพร่กระจายไปในพื้นที่ปลูกในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยแล้ว

สำหรับเชื้อ CLVd ในกลุ่ม A, C และ D เป็นเชื้อ CLVd isolate ที่เข้าทำลายมะเขือเทศ ในขณะที่กลุ่ม B จะเป็นเชื้อ CLVd isolate ที่เข้าทำลายไม้ประดับทั้งหมด โดยพบว่าเชื้อ CLVd ทั้ง 4 โคลนใหม่ จำแนกอยู่ในกลุ่ม A เหมือนกันซึ่งเป็นกลุ่มที่มีรายงานการพบการเข้าทำลายในมะเขือเทศ แต่มีความแตกต่างจากเชื้อ CLVd ที่เคยตรวจพบในประเทศไทยในปี 2548 (ปริเชษฐ์, 2548) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม C และแตกต่างจากเชื้อ CLVd ที่มีรายงานตรวจพบในประเทศไทยในปี 2551 (ปริเชษฐ์, 2551; ศศิประภา, 2551) ซึ่งส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม D และมีบางส่วนจัดอยู่ในกลุ่ม A และ C จึงมีความเป็นไปได้ว่า เชื้อดังกล่าวอาจเข้ามาตั้งรกรากในประเทศไทยแล้ว (establish) โดยเชื้อแพร่กระจายไปตามพื้นที่ปลูกในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยแล้ว

สำหรับเชื้อ CLVd isolate solanum (ปัจจุบันตั้งชื่อเป็น CLVd-bolo maka) เป็นเชื้อ *Columnea latent viroid* strain ใหม่ที่มีความแตกต่างจากชนิดที่ได้มีการรายงานไว้เดิมเนื่องจากมีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดโรคนะอิก (*Solanum stramonifolium*) ซึ่งโดยปกติแล้วเชื้อ CLVd จะไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในมะอิก (latent) ในขณะที่ CLVd isolate solanum จะก่อให้เกิดอาการที่ต้นเตี้ยแคระแกร็นที่รุนแรง อาการยอดและใบต่างและย่นหดลรูป รวมถึงมีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ และกิ่งก้าน (vein necrosis) ถึงแม้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จะมีความแตกต่างกันไม่มากนักก็ตาม และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CLVd-bolo maka มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CLVd ที่มีรายงานว่าไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในมะอิก [PC-2-Pa2 (DQ022677.1), PQ-728 (DQ923061.1) และ MC-M-11 (AM698095.1)] (ปริเชษฐ์, 2548; ปริเชษฐ์, 2551; ศศิประภา, 2551) พบการผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ P domain เป็นส่วนใหญ่ (บริเวณตำแหน่งที่ 39 – 91 และ 277 – 328) ซึ่งบริเวณดังกล่าวมีบทบาทหน้าที่เกี่ยวกับการทำให้พืชเป็นโรคและการควบคุมความรุนแรงของโรค โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ CLVd MC-M-11 พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน 9 ตำแหน่ง [เปลี่ยนเบส 2 ตำแหน่ง และเกิดช่องว่าง (gap) 7 ตำแหน่ง] ซึ่งช่องว่างทั้ง 7 ตำแหน่งอยู่บริเวณ P domain ทั้งหมด ในขณะที่ CLVd PQ-728 มีนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน 14 ตำแหน่ง (เปลี่ยนเบส 10 ตำแหน่ง และเกิดช่องว่าง 4 ตำแหน่ง) ซึ่งการเปลี่ยนเบส 2 ตำแหน่งและการเกิดช่องว่างทั้ง 4 ตำแหน่งอยู่

บริเวณ P domain ส่วน CLVd PC-2-Pa2 มีนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน 28 ตำแหน่ง (เปลี่ยนเบส 9 ตำแหน่ง และเกิดช่องว่าง 19 ตำแหน่ง) ซึ่งการเปลี่ยนเบส 4 ตำแหน่งและการเกิดช่องว่างทั้ง 5 ตำแหน่งอยู่บริเวณ P domain (ภาพที่ 21) ซึ่งทั้ง MC-M-11, PQ-728 และ PC-2-Pa2 ไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในมะอึ๊ก แต่อย่างไร ในขณะ CLVd-bolo maka ก่อให้เกิดอาการที่รุนแรงในมะอึ๊ก นอกจากนี้การวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ PC-2-Pa2, PQ-728 และ MC-M-11 กับ CLVd-bolo maka ด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ 2 ตำแหน่งเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงตามอาการบนมะอึ๊ก คือที่บริเวณตำแหน่ง 83 และ 292 (มีการเติมเบส A เพิ่มขึ้น 1 เบส ที่ตำแหน่ง 83 และ มีการเปลี่ยนจากเบส A หรือ T เป็นเบส G ที่ตำแหน่ง 292) โดยความแตกต่างดังกล่าวจะแปรผันตามลักษณะอาการที่ปรากฏกับพืชทดสอบ (ภาพที่ 21 และตารางที่ 4) ดังนั้นจึงน่าจะอนุมานได้ว่าตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันบน P domain 2 ตำแหน่งดังกล่าว เป็นส่วนควบคุมความรุนแรงของอาการที่เกิดขึ้นในมะอึ๊ก

```

Solanum1      CGGAACATAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTACACCTGACCCCTGCAGCCATGCAGAAAGAAAA 60
Solanum4      CGGAACATAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTACACCTGACCCCTGCAGCCATGCAGAAAGAAAA 60
Solanum16     CGGAACATAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTACACCTGACCCCTGCAGCCATGCAGAAAGAAAA 60
PC-2-Pa2     CGGAACATAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTACACCTGACCCCTGCAGCCATGCAGAAAGAAAA 60
PQ-728      -GGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTACACCTGACCCCTGCAGCCATGCAGAAAGAAAA 59
MC-M-11      CGGAACATAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTACACCTGACCCCTGCAGCCATGCAGAAAGAAAA 60
*****

Solanum1      AAGAACGGGAGGAGAGCGCANAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG 120
Solanum4      AAGAACGGGAGGAGAGCGCANAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG 120
Solanum16     AAGAACGGGAGGAGAGCGCANAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG 120
PC-2-Pa2     A-GAACGGGAGGAGAGCGCANAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG 118
PQ-728      AAGAACGGGAGGAGAGCGCANAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG 118
MC-M-11      A-GAACGGGAGGAGAGCGCANAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG 118
*****

Solanum1      CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAAATCCCGCAGAAACA 178
Solanum4      CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAAATCCCGCAGAAACA 178
Solanum16     CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAAATCCCGCAGAAACA 178
PC-2-Pa2     CGGGGATCGCGGACCGAGGGCGGAAGCCCTGCTTCAGACAGGAGTAAATCCCGCAGAAACA 178
PQ-728      CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAAATCCCGCAGAAACA 176
MC-M-11      CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAAATCCCGCAGAAACA 176
*****

Solanum1      GGGTTTTCACCCCTTCCTTCTTCTGTGGTTTCCTTCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG 238
Solanum4      GGGTTTTCACCCCTTCCTTCTTCTGTGGTTTCCTTCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG 238
Solanum16     GGGTTTTCACCCCTTCCTTCTTCTGTGGTTTCCTTCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG 238
PC-2-Pa2     GGGTTTTCACCCCTTCCTTCTTCTGTGGTTTCCTTCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG 236
PQ-728      GGGTTTTCACCCCTTCCTTCTTCTGTGGTTTCCTTCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG 236
MC-M-11      GGGTTTTCACCCCTTCCTTCTTCTGTGGTTTCCTTCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG 236
*****

Solanum1      TCTT-GA--CCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATACCGAGTT-CGCTCAA-G-C 293
Solanum4      TCTT-GA--CCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATACCGAGTT-CGCTCAA-G-C 293
Solanum16     TCTT-GA--CCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATACCGAGTT-CGCTCAA-G-C 293
PC-2-Pa2     TCTTCGAATCCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCA-CGCGAGT--CGCTCAATCGC 293
PQ-728      TCTT-GA--CCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATACCGAGTTTCGCTCAA-G-C 292
MC-M-11      TCTT-GA--CCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATACCGAGTTTCGCTCAA-G-C 293
*****

Solanum1      CTCA-TCCCTCTTTTCTTCAATCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTGTTAGCCCTTGG 352
Solanum4      CTCA-TCCCTCTTTTCTTCAATCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTGTTAGCCCTTGG 353
Solanum16     CTCA-ACCTCCTTTTCTTCAATCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAAGGTGTGTTAGCCCTTGG 352
PC-2-Pa2     CTCA-ACCTCCTTTTCTTCAATCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTGTTAGCCCTTGG 351
PQ-728      CTCA-ATCTCCTTTTCTTCAATCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTGTTAGCCCTTGG 351
MC-M-11      CTCA-ATCTCCTTTTCTTCAATCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTGTTAGCCCTTGG 351
*****

Solanum1      AACCGCAGTTGGTTCCT- 369
Solanum4      AACCGCAGTTGGTTCCT- 370
Solanum16     AACCGCAGTTGGTTCCT- 369
PC-2-Pa2     AACCGCAGTTGGTTCCT- 368
PQ-728      AACCGCAGTTGGTTCCTC 369
MC-M-11      AACCGCAGTTGGTTCCT- 368
*****

```

ภาพที่ 21 ภาพเปรียบเทียบโครงสร้างแสดงโดเมนทั้ง 5 ของเชื้อ CLVd-bolo maka กับเชื้อ CLVd ที่ไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในมะอึ๊ก (PC-2-Pa2, PQ-728 และ MC-M-11)

หมายเหตุ สีเขียว = TL domain      สีม่วง = P domain      สีเหลือง = C domain  
สีน้ำเงิน = V domain      สีฟ้า = TR domain

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละโดเมนของเชื้อ CLVd-bolo maka กับสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดอาการในมะอึ๊ก

โดเมน	ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์	% ความเหมือนของเชื้อ CLVd-bolo maka			CLVd สายพันธุ์ที่ไม่ ก่อให้เกิดโรคในมะอึ๊ก
		Solanum 1    Solanum 4    Solanum 16			
Left terminal domain	329 - 39 (79 base)	96	96	95	PQ-728
		98	98	97	PC-2-Pa2
		100	100	98	MC-M-11
Upper pathogenic domain	40 - 91 (51-54 base)	96	96	96	PQ-728
		100	100	100	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Upper central domain	92 - 110 (19 base)	100	100	100	PQ-728
		100	100	100	PC-2-Pa2

		100	100	100	MC-M-11
Upper variable domain	111 - 153 (41-43 base)	100	100	100	PQ-728
		68	68	68	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Right terminal domain	154 - 215 (62 base)	95	97	95	PQ-728
		98	96	93	PC-2-Pa2
		96	98	96	MC-M-11
Lower variable domain	216 - 259 (43-44 base)	93	93	93	PQ-728
		90	90	90	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Lower central domain	260 - 276 (14-17 base)	100	100	100	PQ-728
		100	100	100	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Lower pathogenic domain	278 - 328 (54-56 base)	92	92	95	PQ-728
		88	80	90	PC-2-Pa2
		94	85	96	MC-M-11

ในปัจจุบันมีรายงานว่า การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์เพียงตัวเดียวก็ส่งผลกระทบต่อความรุนแรงของโรคและชนิดของพืชอาศัย (Wassenegger *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไวรอยด์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีอัตราการกลายของสารพันธุกรรมสูงสุด (Gago *et al.*, 2009) ทำให้โอกาสเป็นไปได้ที่จะเกิดเชื้อไวรอยด์ชนิดพันธุ์ใหม่ หรือชนิดพันธุ์เดิมที่มีความรุนแรงของโรคที่เปลี่ยนไป หรือเข้าทำลายพืชอาศัยต่างชนิดจากที่เคยมีรายงานมาได้ อย่างไรก็ตามการพิสูจน์ว่าเบสตำแหน่งที่ 83 และ 292 ซึ่งอยู่บริเวณ P domain มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของอาการโรคของเชื้อ *Cummea latent viroid* จำเป็นต้องมีการศึกษาและทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันข้อสมมุติฐานดังกล่าว หากตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ตำแหน่งมีบทบาทในเรื่องการควบคุมความรุนแรงของเชื้อ CLVd จริง ก็จะสามารถพัฒนาวิธีการควบคุมเชื้อไวรอยด์ดังกล่าวได้

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ : จากผลการทดลองพบว่ายังไม่มีตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่สุ่มตรวจจากประเทศใดตรวจพบเชื้อ *Cummea latent viroid* จากทั้งการปลูกเพื่อสังเกตอาการ การตรวจด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization และ RT-PCR
- ผลจากการสำรวจเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ที่ใช้เมล็ดพันธุ์พ่อแม่ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศตรวจพบเชื้อไวรอยด์ 2 ชนิดคือ *Cummea latent viroid* และ *Pepper chat fruit viroid* จำนวนชนิดละ 4 ตัวอย่าง ซึ่งไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทย

แล้วในปี 2548 และ 2553 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Cumena latent viroid strain* ใหม่ (CLVd- bolo maka) ที่แตกต่างจากเชื้อ CLVd strain อื่น ๆ ที่เคยมีรายงานมาก่อน โดยก่อให้เกิดอาการรุนแรงในมะอึก ทำให้เกิดอาการที่ต้นเตี้ยแคระแกร็นที่รุนแรง อาการยอดและใบต่างและย่น หดลรูป และมีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ และกิ่งก้าน

10. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์ : จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าปัจจุบันเชื้อไวรอยด์ 2 ชนิด คือ

*Cumena latent viroid* และ *Pepper chat fruit viroid* มีแนวโน้มหรือความเสี่ยงที่จะแพร่ระบาดในพื้นที่ปลูกมะอึกเทศและพริกในประเทศไทยทั้งในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกและพื้นที่ปลูกเพื่อใช้บริโภคในประเทศ นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Cumena latent viroid strain* ใหม่ (CLVd- bolo maka) ที่ก่อให้เกิดอาการรุนแรงในมะอึก

11. ปัญหาและอุปสรรค

: เนื่องจากงานวิจัยเรื่องนี้ไม่ได้รับเงินงบประมาณสนับสนุนงานวิจัยเท่ากับจำนวนที่ขอไว้แต่ต้น คือได้เพียงประมาณ 1๒% ซึ่งในการตรวจติดตามเพื่อสกัดกั้นศัตรูพืชในกลุ่มไวรัสและไวรอยด์จำเป็นต้องใช้เทคนิควิธีการที่ยุ่ยาก ซับซ้อนและใช้สารเคมีที่มีราคาแพง และในการตรวจสอบยังต้องมีการตรวจตัวอย่างในปริมาณมากเนื่องจากเพื่อให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อไวรอยด์ซึ่งมีระดับการปนเปื้อนในเมล็ดในระดับที่ต่ำได้ ซึ่งทำให้จะต้องมีการปรับเปลี่ยนวิธีการในงานทดลองเพื่อให้สอดคล้องกับงบประมาณที่ได้รับและยังสามารถดำเนินการทดลองได้

12. เอกสารอ้างอิง

: ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะอึกเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2551. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์กับเมล็ดมะอึกเทศที่เหมาะสมในงานกักกันพืช. เอกสารประกอบการสัมมนาสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร.

ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์, คณินนิตย์ เหมียวรากร, เสริมศิริ จันท์เปรม และ รัชณี ฮงประยูร. 2548. ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในมะอึกเทศ 6 ชนิด ในกลุ่ม *Pospiviroid* ด้วยเทคนิค RT-PCR. วารสารโรคพืช. 1-2: 13-21.

ศศิประภา มาราช. 2551. โคลนก่อโรคของเชื้อ *Columnea latent viroid* และผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์การค้า. วิทยานิพนธ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Fristch, E.F., J. Sambrook and T. Maniatis. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 186 p.

Gago, S., S. F. Elena, R. Flores and R. Sanjuan. 2009. Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid. *Science*. 323: 1308.

Hadidi, A., R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik. 2003. *Viroids*. Science Publishers, Inc., USA. P. 370.

Jeffries, C. and J. Tina. n.d. **PROTOCOL FOR THE DIAGNOSIS OF QUARANTINE ORGANISM: Potato spindle tuber viroid (PSTVd)**. Scottish Agricultural Science Agency, East Craigs, Edinburgh, EH 12 8NJ, United Kingdom. Available Source: <http://www.csl.gov.uk/science/organ/ph/diagpro/PSTVd.pdf>, August 20, 2004.

Reanwarakorn, K., S. Klinkong and J. Porsoongnurn. 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*. 24: 6 p.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Vol.1, 1.44-1.46.

Tangkanchanapas, P., W. Kirdpipat and K Reanwarakorn. The New Strain of *Columnea latent viroid* (CLVd) Causes Serious Symptoms on *Solanum* Plants. (2012, January) Poster session presented at The International Conference on Tropical and Sub-Tropical Plant Diseases 2012, Chiang Mai, Thailand.



Verhoeven, J.T.J., C.C.C. Jansen, J.W. Roenhorst, R. Flores and M. de la Pena. 2009. *Pepper chat fruit viroid*: Biological and molecular properties of a proposed new species of the genus *Pospiviroid*. **Virus Res.** 144 (1-2): 209-14.

Verhoeven, J.T.J., C.C.C. Jansen, T.M. Willemsen, L.F.F. Kox, R.A. Owens, and J.W. Roenhorst. 2004. Natural Infections of Tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. **Eur. J. Plant Pathol.** 110: 823-831.

Wassenegger M., R. L. Spieker, S. Thalmeir, F. U. Gast, L. Riedel and H. L. Sanger. 1996. A single nucleotide substitution converts *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *nicotiana tabacum*. **Virology.** 226: 191–197.

Zhu Y., Y. Qi, Y. Xun, R. Owens and Ding B. 2002. Movement of *Potato spindle tuber viroid* reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. **Plant Physiol.** 130: 138–146.