การตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) ที่ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ

Interception of *Columnea latent viroid* (CLVd) in Imported Tomato Seed

นายปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์[1/] นางสาววันเพ็ญ ศรีทองชัย[1/]
นางสาวกาญจนา วาระวิชะนี[1/] นางสาววันเพ็ญ ศรีชาติ[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) เป็นเชื้อโรคพืชกักกันตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๖) พ.ศ. ๒๕๕๐ ลำดับที่ ๑๗๗ ไวรอยด์ชนิดนี้เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญของมะเขือเทศ ทำให้ผลผลิตลดลงถึง ๔๙ เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังสามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อใช้ทำพันธุ์ในประเทศ และผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออกในปริมาณที่มาก จึงทำให้เชื้อไวรอยด์ดังกล่าวมีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าและแพร่ระบาดทำความเสียหายในประเทศไทยได้ และจากการกักกันพืชหลังการเข้ามาในปี ๒๕๕๑ ตรวจพบเชื้อไวรอยด์ดังกล่าวถึง ๑๑ ตัวอย่าง แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงที่เชื้อไวรอยด์ชนิดนี้จะปนเปื้อนติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าได้สูง ดังนั้นการนำวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Columnea latent viroid* ที่ได้พัฒนาแล้วมาใช้ตรวจสอบติดตามเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศจึงเป็นวิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อโรคศัตรูพืชกักกันที่มีประสิทธิภาพทางหนึ่งด้วย จากผลการตรวจสอบติดตามเพื่อการสกัดเชื้อ *Columnea latent viroid* กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ (interception) ในปี ๒๕๕๔ ด้วยวิธีการเพาะเพื่อสังเกตอาการในโรงเรือน Nucleic Hybridization และ RT-PCR จากตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจำนวน ๖ ครั้งจาก ๗ ประเทศ ปัจจุบันยังไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ CLVd ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว

คำนำ

เชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุดที่มีรายงาน มีองค์ประกอบเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นวงปิดไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม มีขนาดประมาณ 370 เบส โดยปกติแล้วอาร์เอ็นเอไวรอยด์จะอยู่ในสภาพโครงสร้างทุติยภูมิที่มีลักษณะเป็น rod-shape เนื่องจากการเกิดจับกันของเบสในสายอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรอยด์ด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรมากที่สุด ไวรอยด์เป็นเชื้อปรสิตถาวรในพืชที่ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้การเพิ่มปริมาณการเคลื่อนย้ายและการทำให้อาการผิดปกติจะใช้โปรตีนและสารเคมีต่าง ๆ

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-03-00-10-54

จากพืชอาศัย เชื้อ CLVd จัดจำแนกอยู่ในสกุล Pospiviroid วงศ์ Pospiviroidae เชื้อชนิดนี้เข้าทำลายพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ, มันฝรั่ง, แตงกวา, พริก, ต้นลิปสติก และพืชอื่น ๆ ในสกุล solanum spp. เชื้อ CLVd สามารถถ่ายทอดโรคได้หลายทาง ได้แก่ ทางกล เช่น ทางบาดแผล เมล็ดพันธุ์ และทางหัวพันธุ์ เชื้อชนิดนี้เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญของมะเขือเทศ, พริก และมันฝรั่ง มีรายงานการเข้าทำลายที่รุนแรงกับมะเขือเทศทำให้ผลผลิตลดลงสูงกว่า ๕๐ เปอร์เซ็นต์ ซึ่งรุนแรงกว่าเชื้อ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) มาก ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศพ่อแม่ในปริมาณที่มากเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออก ประกอบกับเชื้อชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโรคและเพิ่มปริมาณในพืชหลายชนิดในวงศ์ Solanaceae เช่น มะอึก มะเขือเปราะ แบบไม่แสดงอาการได้ ซึ่งยากแก่การตรวจวินิจฉัย และกำจัดให้หมดสิ้นไปได้ (Eradication) ซึ่งจากการตรวจกักกันพืชหลังการเข้ามา (Post entry quarantine) ในปี ๒๕๕๐ ตรวจพบเชื้อไวรอยด์ดังกล่าวจำนวน ๑๑ ตัวอย่าง แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่เชื้อชนิดนี้จะสามารถติดเข้ามาแพร่ระบาดและก่อให้เกิดความเสียหายในประเทศไทยได้ จากความเสี่ยงดังกล่าวจึงทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินการในการจัดการความเสี่ยงโดยการตรวจติดตามเชื้อ CLVd กับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

๑. โรงเรือนมุ้งกันแมลง
๒. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส
๓. ตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส
๔. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 3 ตำแหน่ง
๕. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
๖. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
๗. เครื่อง Thermal cycler (PCR)
๘. Gel electrophoresis
๙. Gel Documentation UV-transilluminator
๑๐. เอ็นไซม์ One-Step RT-PCR (SS III reverse transcriptase /PLATINUM Taq polymerase) (Invitrogen)
๑๑. เอ็นไซม์ Taq DNA polymerase
๑๒. 100 bp DNA Ladder
๑๓. DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche)
๑๔. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอน การสกัดอาร์เอ็นเอ การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา RT-PCR และ Nucleic Hybridization

๑๕. วัสดุการเกษตรต่าง ๆ ดินและปุ๋ยเคมี

วิธีการ

๑. สืบค้นข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศ

โดยตรวจเอกสารข้อมูลของเชื้อไวรอยด์ CLVd แหล่งประเทศที่มีรายงานการระบาดหรือพบโรค ข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ รายชื่อประเทศที่มีการนำเข้า/ส่งออกเมล็ดพันธุ์ เพื่อกำหนดแหล่งประเทศนำเข้าที่มีความเสี่ยงของโรค

๒. เตรียมวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ อุปกรณ์ทางการเกษตรที่จำเป็นในขั้นตอนต่าง ๆ

๒.๑ ขั้นตอนการเพาะเมล็ดในโรงเรือนเพื่อสังเกตอาการผิดปกติ

๒.๒ ขั้นตอนในการสกัดอาร์เอ็นเอ CTAB (Scottish Agricultural Science Agency)

๒.๓ ขั้นตอนในการตรวจสอบด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization

๒.๔ ขั้นตอนในการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR

๓. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศที่มีความเสี่ยง ณ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช

๔. นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศดังกล่าวมาเพาะเพื่อดูอาการเบื้องต้นในโรงเรือนทดลอง

โดยการปลูกเมล็ดพันธุ์ในถาดเพาะ สังเกตอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นและเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อไวรอยด์ CLVd ให้มากพอต่อการตรวจสอบ

๕. ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Columnea latent viroid* ในขั้นละเอียดด้วยวิธีการ Nucleic hybridization และ RT-PCR

๕.๑ หลังจากการเพาะเมล็ดพันธุ์ในถาดเพาะ นำต้นพืชที่แสดงอาการผิดปกติมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการ CTAB โดยการบดใบ Citron 100 มิลลิกรัม ด้วยสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 และ 2.0% PVP-40; Na_2SO_3 และ PVP-40 เติมก่อนใช้งาน) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบน เติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ isopropanol แช่เย็น ปริมาตรเท่ากับของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บ

ตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วย TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol แช่เย็นปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที

๕.๒ ตรวจสอบเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค Nucleic hybridization:

- เตรียมอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการผิดปกติ
- ตัดแผ่น nylon membrane ให้มีขนาดเหมาะสมกับจำนวนตัวอย่างที่จะตรวจสอบ หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ อาร์เอ็นเอจากพืชที่เป็นโรคจากเชื้อ CLVd (positive control) อาร์เอ็นเอจากพืชปกติ (negative control) และอาร์เอ็นเอจากตัวอย่าง ลงบนแผ่น nylon membrane หยดละ 1 ไมโครลิตร รอให้แห้ง จากนั้นหยดตามด้วยสารละลาย Denature solution (0.125 X SSC, 0.125 M NaOH) นำแผ่น nylon membrane ไปวางบน UV-transilluminator โดยหันด้านที่หยด DNA เข้ากับแสง UV นาน 2 – 3 นาที เพื่อตรึง DNA ให้ยึดกับแผ่น membrane
- อุ่นสารละลาย DIG Easy Hyb ในปริมาณที่เหมาะสมกับการใช้งาน (10 มิลลิลิตร / พื้นที่แผ่น membrane 100 ตารางเซนติเมตร) ที่อุณหภูมิ 37 – 42 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการ Prehybridize แผ่น membrane ด้วยสารละลาย DIG Easy Hyb ที่เตรียมไว้ โดยเขย่าเบา ๆ ในภาชนะที่ปิดฝาสนิท นาน 30 นาที
- ทำการ denature cDNA probe ที่สังเคราะห์ โดยต้ม cDNA probe ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร นาน 5 นาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้นาน 5 นาที จากนั้นเติม cDNA probe ที่ผ่านการต้มแล้วลงไปยัง สารละลาย DIG Easy Hyb ที่เตรียมเอาไว้ ในปริมาณ 3.5 มิลลิลิตร / พื้นที่แผ่น membrane 100 ตารางเซนติเมตร ผสมให้เข้ากันระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เท สารละลาย Prehybridization solution ทิ้ง เติมสารละลาย probe/hybridization ลงไปยังแผ่น membrane บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส โดยเขย่าเบา ๆ
- ล้างแผ่น membrane 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย 2 X SSC ที่มี 0.1% SDS ผสมอยู่ ที่อุณหภูมิ 15 – 25 องศาเซลเซียส เขย่านาน 5 นาที จากนั้นล้างแผ่น membrane 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย 0.5 X SSC ที่มี 0.1% SDS ผสม (ต้องอุ่นที่ 68 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งาน) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เขย่านาน 15 นาที
- ล้างแผ่น membrane ในสารละลาย Washing buffer เขย่า นาน 5 นาที แช่แผ่น membrane ในสารละลาย Blocking solution (ปริมาณ 1 มิลลิลิตร/พื้นที่แผ่น membrane 1 ตารางเซนติเมตร) นาน 30 นาที บ่มแผ่น membrane ในสารละลาย Antibody solution (ปริมาณ 1 มิลลิลิตร/พื้นที่แผ่น membrane 1 ตารางเซนติเมตร) นาน 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย Washing buffer (ปริมาณ 1 มิลลิลิตร/พื้นที่แผ่น membrane 1 ตารางเซนติเมตร) 2 ครั้ง นาน 15 นาที จากนั้นแช่แผ่น membrane ในสารละลาย Detection buffer (ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร / พื้นที่แผ่น

membrane 1 ตารางเซนติเมตร) นาน 5 นาที และบ่มแผ่น membrane ในสารละลาย Color substrate solution (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน) ทิ้งไว้ในที่มืดบนพื้นราบโดยไม่ต้องเขย่านาน 16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่น้ำกลั่นหรือสารละลาย TE buffer ตรวจสอบความเข้มของจุดสีที่เกิดขึ้น

๕.๓ ตรวจสอบเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค RT-PCR (one-step): โดยใช้ ไฟรเมอร์ PC-2 (ปริเชษฐ์, 2548) และ CLVd

4.3.1 ขั้นตอนของปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

2X one-step buffer	10.0 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	4.5 ไมโครลิตร
2 μM ไพรเมอร์ สาย c	2.0 ไมโครลิตร
2 μM 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 5 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 3	94 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 4	56 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 5	72 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	1 รอบ
	โดยในขั้นที่ 3 ถึง 5 จะซ้ำอีก 34 รอบ		
ขั้นที่ 6	72 องศาเซลเซียส	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 7	20 องศาเซลเซียส	นาน 15 นาที	1 รอบ

๖. หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อมีการตรวจพบเชื้อ

โดยการเชื่อมต่อ PCR product เข้ากับ pGEM-T easy vector และถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell (DH5-) เพื่อยืนยันผลการตรวจในขั้นสุดท้าย

๗. หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อมีการตรวจพบเชื้อ

โดยการเชื่อมต่อ PCR product เข้ากับ pGEM-T easy vector และถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell (DH5-) เพื่อยืนยันผลการตรวจในขั้นสุดท้าย

๘. เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้ รายงานผลการตรวจพบเชื้อไวรอยด์ต่อกลุ่มวิจัยการกักกันพืช และจัดทำรายงาน ผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา: ตั้งแต่ ตุลาคม ๒๕๕๓ ถึงกันยายน ๒๕๕๕ รวม ๒ ปี

สถานที่วิจัย : ๑. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

๒. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

๑. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ *Columnea latent viroid* ทางด้านชีววิทยา การถ่ายทอดโรค ลักษณะอาการ และข้อมูลการแพร่ระบาดของเชื้อในต่างประเทศ รวมถึงข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศ โดยพบว่า

๑.๑ เชื้อไวรอยด์ชนิดนี้ก่อให้เกิดอาการที่รุนแรงในมะเขือเทศ มันฝรั่ง และพริก และสามารถติดโรคโดยไม่แสดงอาการได้ในไม้ประดับหลายชนิด เช่น ต้นลิปสติก

๑.๒ สามารถในการถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ และแพร่กระจายโรคได้ง่ายด้วยวิธีกล

๑.๓ ประเทศที่มีรายงานการแพร่บาดของเชื้อ CLVd ได้แก่ Canada, Germany, Netherlands, UK และ USA ส่วนประเทศ China และ India เป็นประเทศในกลุ่มเสี่ยงที่อาจมีเชื้อชนิดนี้ระบาดในประเทศ

๒. ได้ไพรเมอร์ และ probe ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Columnea latent viroid* เพื่อใช้ในงานทดสอบ

๓. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ จำนวน ๖ ครั้ง ในปีงบประมาณ ๒๕๕๔ ได้แก่

๑. ประเทศจีน น้ำหนัก ๐.๐๕ Kg นำเข้าวันที่ ๔ มีนาคม ๒๕๕๔

๒. ประเทศอินเดีย น้ำหนัก ๒๔.๗ Kg นำเข้าวันที่ ๒๔ เมษายน ๒๕๕๔

๓. ประเทศจีน น้ำหนัก ๒๗๖.๘ Kg นำเข้าวันที่ ๔ พฤษภาคม ๒๕๕๔

๔. ประเทศอเมริกา เปรู ชิลี และเม็กซิโก น้ำหนัก ๑๔.๑๓๑ Kg นำเข้าวันที่ ๒๔ พฤษภาคม ๒๕๕๔

๕. ประเทศเนเธอร์แลนด์ น้ำหนัก ๐.๒๘๒ Kg นำเข้าวันที่ ๖ กรกฎาคม ๒๕๕๔

๖. ประเทศเนเธอร์แลนด์ น้ำหนัก ๐.๓๕๗ Kg นำเข้าวันที่ ๖ กรกฎาคม ๒๕๕๔

ซึ่งจากการสังเกตอาการบนพืชตัวอย่างพบว่า ไม่มีตัวอย่างพืชใดแสดงอาการของโรคที่จำเพาะของเชื้อไวรอยด์ แต่ตัวอย่าง no. ๑-๓ จะมีพืชบางต้นแสดงอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ใบหงิกและด่าง ส่วนตัวอย่าง no. อื่น ไม่พบอาการผิดปกติแต่อย่างใด และเมื่อทำการตรวจวินิจฉัยขั้นละเอียดด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization และ RT-PCR พบว่าให้ผลเป็น negative ในทุก ๆ ตัวอย่าง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการทดลองพบว่ายังไม่มีตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่สุ่มตรวจจากประเทศใดตรวจพบเชื้อ Columnea latent viroid จากทั้งการปลูกเพื่อสังเกตอาการ การตรวจด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization และ RT-PCR

ปัญหาและอุปสรรค

เนื่องจากงานวิจัยเรื่องนี้ไม่ได้รับเงินงบประมาณสนับสนุนงานวิจัยเท่ากับจำนวนที่ขอไว้แต่ต้น คือได้เพียงประมาณ ๑๒% ซึ่งในการตรวจติดตามเพื่อสกัดกั้นศัตรูพืชในกลุ่มไวรัสและไวรอยด์ จำเป็นต้องใช้เทคนิควิธีการที่ยุ่งยากซับซ้อนและใช้สารเคมีที่มีราคาแพง และในการตรวจสอบยังต้องมีการตรวจตัวอย่างในปริมาณมากเนื่องจากเพื่อให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อไวรอยด์ซึ่งมีระดับการปนเปื้อนในเมล็ดในระดับที่ต่ำได้ ซึ่งทำให้จะต้องมีการปรับเปลี่ยนวิธีการในงานทดลองเพื่อให้สอดคล้องกับงบประมาณที่ได้รับและยังสามารถดำเนินการทดลองได้

เอกสารอ้างอิง

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2551. **การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์กับเมล็ดมะเขือเทศที่เหมาะสมในงานกักกันพืช**. เอกสารประกอบการสัมมนาสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร.

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. **การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

Verhoeven, J.T.J., C.C.C. Jansen, T.M. Willemen, 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.