

การเข้าทำลายและการถ่ายทอดทางเมล็ดของ *Columnea latent viroid* ในพริก

Infection and Seed Transmission of *Columnea latent viroid* in Peppers

ษมาภร ภุวิทาร์กอร์^{1*} จิราพร ปอสูงเนิน¹ สุภาพร กลิ่นคง¹ และ คณิงนิตย์ เหรียญวรากร^{1, 2, 3}

Samabhorn Bhuvitarkorn^{1*}, Jiraporn Porsoongnum¹, Supaporn Klinkong¹

and Kanungnit Reanwarakorn^{1, 2, 3}

¹ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

¹Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

²ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

²Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์

และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

³Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author: Email: sbhuvitarkorn@gmail.com

(Received: 28 February 2018; Accepted: 12 July 2018)

Abstract: *Columnea latent viroid* (CLVd) could infect into six varieties of pepper plants in this study with 67-100% infection, detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. The infected pepper plants showed symptomless or delayed expression in bird chili (*Capsicum frutescens*) which expressed apical leaf distortion, epinasty and small leaves, abnormal flowers with light green petals, less fruit setting and seedless at 6 months post inoculation. For the sweet pepper 2, displayed 100% infected plants and seeds. The 100 seeds of the sweet pepper 2 variety were sown for grow-out test under plant nursery condition. The 26 seedlings germinated from 100 seeds (26% germination) and showed 16 of 26 pepper seedlings of CLVd infection (61.5% seed transmission) by RT-PCR technique at 10 weeks post sowing. Base on this work, the CLVd was seed transmission in sweet pepper. Its infection and transmission would be the risk of disease spreading in planting areas due to difficulty to eradicate the symptomless plants. Thus, control of pepper viroid disease should be using disease free seeds.

Keywords: Viroid, pepper, seed transmission

บทคัดย่อ: *Columnea latent viroid* (CLVd) สามารถเข้าทำลายพริก 6 พันธุ์ ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่ามีอัตราการเข้าทำลาย 67-100% โดยต้นพริกที่ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการ หรือแสดงอาการหลังการติดเชื้ออย่างช้า ๆ ได้แก่ พริกขี้หนู (*Capsicum frutescens*) มีลักษณะอาการใบยอดผิดปกติ ปลายใบม้วนพับไปด้านหลังและมีขนาดลดลง ดอกผิดปกติและกลีบดอกมีสีเขียวอ่อน ติดผลน้อยและไม่มีการพัฒนาของเมล็ดภายในผลหลังได้รับการปลูกเชื้อมานาน 6 เดือน เมื่อศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อไวรอยด์ในพริกหวาน 2 (Sweet pepper 2) ที่ตรวจพบการติดเชื้อของต้น 100% และมีการติดเมล็ด พบว่าเมื่อนำเมล็ดที่ได้ไปปลูกในสภาพโรงเรือน มีต้นพริกที่ออกจำนวนทั้งหมด 26 ต้นจากเมล็ดที่นำมาทดสอบ 100 เมล็ด (ความงอก 26%) เมื่อต้นพริกอายุครบ 10 สัปดาห์ นำไปมาตรวจหาเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อยืนยันการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดสู่ต้นอ่อน ผลการตรวจพบ 16 ต้น จาก 26 ต้น ตรวจพบเชื้อ CLVd ซึ่งคิดเป็นอัตราการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดของเชื้อ CLVd ในพริกหวาน 2 ดังกล่าวเท่ากับ 61.5% จากงานทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อ CLVd สามารถถ่ายทอดทางเมล็ดพริกหวานได้ ส่งผลให้เกิดความเสี่ยงในการแพร่ระบาดของเชื้อ CLVd ในแปลงปลูกพริก เนื่องจากพริกส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการทำให้ยากที่จะกำจัดต้นติดเชื้อออกไปจากพื้นที่ปลูก ดังนั้นการใช้เมล็ดพันธุ์พริกที่ปลอดโรคจะสามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์ได้ดีที่สุด

คำสำคัญ: ไวรอยด์ พริก การถ่ายทอดทางเมล็ด

คำนำ

พริก (*Capsicum annuum*) เป็นพืชในวงศ์เดียวกับ มะเขือเทศ มะเขือ ยาสูบ และมันฝรั่ง มีถิ่นกำเนิดจากอเมริกาใต้และแพร่กระจายพันธุ์ปลูกไปทั่วโลก จากข้อมูลปริมาณการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ควบคุมของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2558 จำนวน 4,272 ตัน มีปริมาณการนำเข้าเมล็ดมะเขือเทศ พริก และมะเขือยาว จำนวน 2.6, 1.8 และ 2.8 ตัน ตามลำดับ และปริมาณการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ควบคุมในปี พ.ศ. 2559 จำนวน 7,600 ตัน มีปริมาณการนำเข้าเมล็ดมะเขือเทศ พริก มะเขือยาว จำนวน 2.9, 21.6 และ 0.7 ตัน ตามลำดับ (สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์ไทย, 2560) เป็นที่ทราบกันดีว่าการนำเข้าชิ้นส่วนและเมล็ดพันธุ์พืชจากต่างประเทศต้องมีการตรวจสอบเพื่อให้ปราศจากศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 ซึ่งได้ระบุเชื้อไวรอยด์ไว้ทั้งหมด 15 ชนิด และหลายชนิดก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจ เช่น พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง และพืชผักวงศ์แตงที่มีรายงานแล้วมี 12 ชนิด ได้แก่ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (Diener, 1987), *Citrus exocortis viroid* (CEVd) (Fagoaga and Duran-Vila, 1996), *Columnea latent viroid* (CLVd)

(Hammond et al., 1989), *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) (Lawson, 1987), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) (Walter, 1987), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) (Verhoeven et al., 2009), *Tomato planta macho viroid* (TPMVd) (Galindo et al., 1982), *Maxican papita viroid* (MPVd) (Verhoeven et al., 2011), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) (Singh et al., 1999), *Tomato bunchy top viroid* (TBTVD) (Mishra et al., 1991), *Hop stunt viroid* (HSVd) (Shikata, 1987) และ *Cucumber pale fruit viroid* (CPFVd) (Sano et al., 1984)

เชื้อไวรอยด์จัดเป็นสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุด ลักษณะโครงสร้างเป็นเส้นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยววงปิด ไม่มีโปรตีนห่อหุ้มและไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนเองได้ เพิ่มปริมาณภายในเซลล์ของพืชอาศัยและส่งเสริมให้แสดงอาการโรคอย่างรุนแรงในพืชที่มีความอ่อนแอ เช่น มันฝรั่ง และมะเขือเทศ เชื้อไวรอยด์ชนิดแรกที่พบ คือ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) ซึ่งรายงานเข้าทำลายในมันฝรั่ง (Diener, 1987) นอกจากนี้มีรายงานพบเชื้อไวรอยด์หลายชนิดในพริก เช่น CLVd, CSVd, CEVd, HSVd และ PSTVd บริเชษฐ และคณะ (2548) รายงานการสำรวจพบเชื้อ CLVd จากตัวอย่างมะเขือเทศที่แสดง

อาการต้นเตี้ย แคระแกร็น ยอดแตกเป็นพุ่ม ใบหดลดรูป ย่น และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ ก้านใบ กิ่งและ ลำต้น และได้ติดตามการกักกันพืชหลังการเข้ามาในปี พ.ศ. 2550 รายงานการสำรวจเชื้อไวรัสในพืชที่จังหวัด สกลนคร ขอนแก่น อุดรธานี มุกดาหาร กาฬสินธุ์ และ มหาสารคาม ตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ดักกล่าว 11 ตัวอย่าง จากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ที่ใช้เมล็ดพันธุ์พ่อแม่จาก ต่างประเทศ เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม (ปริเชษฐ และ คณะ, 2554) และในปี พ.ศ. 2554-2555 ทำการสำรวจ เชื้อไวรัสในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้เมล็ด พันธุ์พ่อแม่จากต่างประเทศ ตรวจสอบการติดเชื้อ CLVd ในมะเขือเทศ จำนวน 4 ตัวอย่าง และมะเขือ 1 ตัวอย่าง (ปริเชษฐ และคณะ, 2555) ต่อมามีการสำรวจพบ PCFVd ในมะเขือเทศของประเทศไทย (Reanwarakorn *et al.*, 2011) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีรายงานการถ่ายทอดทางเมล็ด พันธุ์พริกได้ โดยความเสียหายจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ใน ประเทศเนเธอร์แลนด์ทำให้ผลผลิตลดลงมากกว่า 50% (Verhoeven *et al.*, 2009) รายงาน ความเสียหาย เนื่องจากเชื้อ CLVd ในหลายประเทศทั่วโลก ได้แก่ ปี ค.ศ. 2007 พบเชื้อไวรัสเข้าทำลายมะเขือเทศพันธุ์ Angelle และ Santazian ในประเทศอังกฤษอัตรา 50-60% และ คาดว่าความเสียหายของผลผลิตที่เกิดขึ้นมีมากกว่าการ เข้าทำลายจาก PSTVd (Nixon *et al.*, 2010; Singh, 1983) และรายงานความเสียหายของมะเขือเทศใน ประเทศแคนาดา (Singh *et al.*, 1992) เยอรมนี (Spieker, 1996) และฝรั่งเศส (Steyer *et al.*, 2009) นอกจากนี้ ผลผลิตมันฝรั่งในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลองมีความเสียหายถึง 82% จากการเข้าทำลายจากเชื้อไวรัสที่ ดักกล่าวอีก ด้วย (Hadidi *et al.*, 2003; Sano, 1984; Singh *et al.*, 1992; Spieker, 1996; Verhoeven *et al.*, 2004)

จากรายงานการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพันธุ์ของ เชื้อ CLVd ในมะเขือเทศ และพริก (Matsushita and Tsuda, 2016) วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้จึง มุ่งเน้นศึกษาการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด (seed transmission) ของเชื้อไวรัสที่ดักกล่าวในพริกเพื่อใช้เป็น ข้อมูลที่สำคัญในการหาแนวทางในการป้องกันการระบาด และกำจัดเชื้อไวรัสที่ติดมากับเมล็ด พัฒนาเทคโนโลยี

การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์เพื่อการนำเข้าและ ส่งออก เนื่องจากยังไม่มีมาตรการกำจัดเชื้อไวรัสที่ ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดที่มีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมพืชทดสอบ

พันธุ์พริกที่ใช้ในการทดสอบจำนวนทั้งหมด 6 พันธุ์ ได้แก่ พริกขี้หนู (*Capsicum frutescens*) จำนวน 1 พันธุ์ และ *C. annum* L. เป็นพริกลูกผสมชั่วที่ 1 (F1 hybrid) จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ พริกขี้หนูพันธุ์เทวี 60 (Tevee 60) พริกหยวกพันธุ์กิงเพชร (Kingpetch) พริก หวาน 1 (Sweet pepper 1) และ พริกหวาน 2 (Sweet pepper 2) และพริกพันธุ์ผสมเปิด (OP) ได้แก่ พริกมันดำ (PBC365)

เพาะเมล็ดพริกทั้งหมดลงในกระบะเพาะและ ย้ายปลูกเมื่อมีอายุ 21 วัน หรือมีใบจริง 2-3 ใบ ลงในถุง ปลูกขนาด 15 นิ้ว ใช้พีทมอสและดินอบฆ่าเชื้อเป็นวัสดุ ปลูก ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ทุก 2 สัปดาห์ และใช้มะเขือเทศพันธุ์ Rutgers เป็นพันธุ์อ่อนแอควบคุม (susceptible check) จำนวนพืชทดสอบอย่างน้อย 6 ต้นต่อพันธุ์ พืช ปกติจำนวน 2 ต้นต่อพันธุ์ อายุพืชที่ใช้ในการปลูกเชื้อ คือ อายุประมาณ 30 วันหลังออกหรือมีใบจริง 3-4 ใบ

2. การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบโรค (inoculum) และ ปลูกเชื้อ

การเตรียมเชื้อ CLVd ในการปลูกเชื้อให้พืช ทดสอบ ใช้เชื้อ CLVd ไชโยเลท NK-KUKPS1 accession no. KY235369 โดยใช้ใบสดของมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ที่ติดเชื้อ CLVd น้ำหนัก 1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ (0.1M phosphate buffer, pH 9.0 ที่ เติม 0.1%(w/v) Na₂SO₃ ก่อนการใช้งาน) 5 มิลลิลิตร บดใบพืชในบัฟเฟอร์จน ละเอียด กรองเอาเศษพืชออก และเติมผงคาร์โบรันด์ม อัตรา 0.1%(w/v) ปลูกเชื้อด้วยวิธีกลโดยทาน้ำคั้นลงบน ใบของพืชทดสอบ และทาบัฟเฟอร์ที่เติมผงคาร์โบรันด์ม ลงบนใบของพืชปกติ (negative control) ทั้งไว้ประมาณ 1-2 นาที และล้างใบด้วยน้ำสะอาดจากนั้นนำพืชที่รับ การปลูกเชื้อและพืชปกติไปปลูกในโรงเรือนกันแมลง ที่มี

อุณหภูมิระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส (Hammond *et al.*, 1989) รับแสงอย่างน้อย 12 ชั่วโมงต่อวัน ทำการปลูกเชื้อ 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 2 ห่างจากครั้งแรก 1 สัปดาห์ ปล่อยให้พริกทุกต้นติดเมล็ดตามธรรมชาติ และนำไปมาตรวจสอบการติดเชื้อ CLVd หลังปลูกเชื้อ 8 สัปดาห์

3. การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพืช

ทำการสกัดแยกอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบ และเมล็ด ด้วยวิธี CTAB (Reanwarakorn *et al.*, 2011) โดยบดตัวอย่างพืชน้ำหนัก 0.05-0.1 กรัม กับไนโตรเจนเหลวจนตัวอย่างพืชละเอียด และเติม CTAB extraction buffer (2% w/v CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl และเติม 1.0% w/v Na₂SO₃ และ 2.0% w/v PVP-40 ก่อนใช้งาน) และละลายตะกอนสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นหนึ่งขวดที่ปราศจาก RNase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

ตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค RT-PCR จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยชุดไพรเมอร์ CL-P2 ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ CLVd (สาย cCL-P2 ลำดับเบสประกอบด้วย 5'-CTGCAGCCATGCAAAGA-3' จำนวน 17 เบส และสาย hCL-P2 ลำดับเบสประกอบด้วย 5'-GGTCAGGTGTGAACCAC-3' จำนวน 17 เบส) ดีเอ็นเอผลผลิตแบบครบจีโนมของเชื้อ CLVd ขนาด 370 นิวคลีโอไทด์ (ศศิประภา, 2551) แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนแรก เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA ของเชื้อไวรัสด้วยวิธีการ reverse transcription (RT) ปฏิกริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ไพรเมอร์สายลบ (cCL-P2) ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และตัวอย่างอาร์เอ็นเอ 3.5 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycler ยี่ห้อ Biometra รุ่น T1 (Biometra GmbH) โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้คือ 96 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ จากนั้นนำมาแช่น้ำแข็งทันที 2 นาที และ

นำเข้าเครื่อง thermal cycler อีกครั้ง โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที 1 รอบ จากนั้นนำมาเติม reverse transcriptase buffer ความเข้มข้น 1X, dNTPs ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และเอ็นไซม์ reverse transcriptase ความเข้มข้น 100 ยูนิต แล้วจึงนำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 1 รอบ

ขั้นตอนที่สอง เป็นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก cDNA ที่ได้จากขั้นตอนแรกด้วยเทคนิค PCR เพื่อให้มีปริมาณของผลผลิตดีเอ็นเอมากพอที่จะตรวจสอบในขั้นตอนต่อไปได้ ปฏิกริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x PCR buffer (Thermo Scientific™) MgCl₂ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ dNTPs ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ cCL-P2 และ hCL-P2 ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ Taq. DNA polymerase (Thermo Scientific™) ความเข้มข้น 1 ยูนิต cDNA ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นหนึ่งขวดที่ปราศจาก RNase จากนั้นนำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยโปรแกรมการทำงานดังนี้คือ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที โดยทำซ้ำขั้นที่ 2-4 จำนวน 39 รอบ และขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกริยา RT-PCR ที่ได้ข้างต้น ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ละลายใน 0.5 X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide นาน 15 นาที แช่ในน้ำ 5 นาที และนำไปตรวจดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV-transilluminator และบันทึกภาพ

5. การตรวจสอบการเข้าทำลายและการถ่ายทอดเชื้อทางเมล็ด

สังเกตและบันทึกลักษณะอาการผิดปกติของพืชทดสอบที่ได้รับการปลูกเชื้อ CLVd เปรียบเทียบกับพืช

ปกติ และเก็บตัวอย่างใบพืชทดสอบที่ได้รับการปลูกเขื่อนาน 8 สัปดาห์ และต้นปกติ มาสกัดอาร์เอ็นเอและตรวจสอบหาเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค RT-PCR ตามขั้นตอนในข้อ 3 และ 4 จากนั้นนำผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR มาหาเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อ CLVd ในพริกทุกพันธุ์ที่นำมาทดสอบ

เก็บเมล็ดพริกจากต้นที่ได้รับการปลูกเขื่อนาน 8 สัปดาห์ และต้นปกติ มาทำการนับจำนวนเมล็ด จากนั้นนำเมล็ดที่ได้มาสกัดอาร์เอ็นเอและตรวจสอบหาเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อหาสายพันธุ์พริกที่มีเมล็ดติดเชื้อไวรอยด์ จากนั้นเมล็ดที่เหลือจากการตรวจพบเชื้อไวรอยด์ในขั้นต้นนี้จะถูกนำไปทดสอบการถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ โดยการปลูกลงในกระถางขนาด 6 นิ้ว เพื่อสังเกตอาการของโรคในสภาพโรงเรือน (grow-out test, GOT) เปรียบเทียบกับต้นที่ปลูกจากเมล็ดที่ได้จากต้นปกติเป็นเวลา 10 สัปดาห์ และยืนยันผลการถ่ายทอดไวรอยด์ผ่านทางเมล็ดด้วยการตรวจสอบหาเชื้อ CLVd จากใบพืชทดสอบอายุ 10 สัปดาห์หลังปลูก ด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีการข้างต้น

ผลการทดลอง

การตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ CLVd ในพริก 6 พันธุ์

จากการทดลองพบว่าพันธุ์พริกที่ใช้ในการทดสอบจำนวนทั้งหมด 6 พันธุ์ ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อ CLVd ได้ และมีเพียงพริกขี้หนู (*C. frutescens*) ที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรอยด์ โดยมีอาการใบยอดมิดปกติ ปลายใบม้วนพับไปด้านหลัง และมีขนาดลดลง ดอกมิดปกติและกลีบดอกมีสีเขียวอ่อน ติดผลน้อยและไม่มีการพัฒนาของเมล็ดภายในผล (ภาพที่ 1) เมื่อตรวจสอบอาร์เอ็นเอจากใบของพริกทั้งหมดด้วยเทคนิค RT-PCR คิดเป็นอัตราการเข้าทำลายของเชื้อ CLVd ในพริกขี้หนู (*C. frutescens*) ที่ 83% พริกขี้หนูพันธุ์เทวี 60 ที่ 67% พริกหยวกพันธุ์กิ่งเพชร พริกหวาน 1 และ พริกหวาน 2 และพริกมันดำ (PBC365) ที่ 100% ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 1)

การตรวจสอบการถ่ายทอดเชื้อ CLVd ทางเมล็ด

จากการทดลองพริกจำนวน 3 พันธุ์ จาก 6 พันธุ์ มีการติดผลและเมล็ดหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ CLVd ได้แก่ พริกขี้หนูพันธุ์เทวี 60 พริกหยวกพันธุ์กิ่งเพชร และพริกหวาน 2 (ตารางที่ 1) เมื่อทำการตรวจสอบหาเชื้อ CLVd จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเมล็ดพริกทั้ง 3 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค RT-PCR ปรากฏว่าตรวจไม่พบเมล็ดติดเชื้อ CLVd จากพริกขี้หนูพันธุ์เทวี 60 และพริกหยวกพันธุ์กิ่งเพชร จากจำนวนเมล็ดที่นำมาตรวจสอบทั้งหมด 516 และ 140 เมล็ด ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าเมล็ดพริกหวาน 2 ที่สุ่มมาตรวจสอบจำนวน 10 เมล็ด พบ 5 เมล็ดติดเชื้อ CLVd จึงนำเมล็ดที่เหลือไปปลูกทดสอบในสภาพโรงเรือน เพื่อยืนยันการถ่ายทอดเชื้อสู่ต้นอ่อน (embryo) (ภาพที่ 2)

ผลการตรวจสอบยืนยันการถ่ายทอดเชื้อ CLVd ทางเมล็ดในพริกหวาน 2 ซึ่งตรวจพบเชื้อไวรอยด์จากเมล็ดที่สุ่มตรวจในเบื้องต้นพบเมล็ดที่ติดเชื้อ 50% (ติดเชื้อ 5 เมล็ดจาก 10 เมล็ด) ด้วยเทคนิค RT-PCR นั้น นำเมล็ดที่เหลือจำนวน 100 เมล็ดมาปลูกทดสอบในสภาพโรงเรือน เปรียบเทียบกับเมล็ดที่ได้จากพริกหวาน 2 ต้นปกติ พบว่ามีจำนวนต้นที่ออกทั้งหมด 26 ต้น (ความงอก 26%) ในขณะที่เมล็ดจากพริกหวาน 2 ต้นปกติ มีจำนวนต้นที่ออกทั้งหมด 89 ต้นจากจำนวน 100 เมล็ด (ความงอก 89%) โดยต้นพริกที่ออกจากเมล็ดที่ได้จากต้นติดเชื้อไวรอยด์ไม่พบอาการผิดปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นพริกที่ออกจากเมล็ดที่ได้จากต้นปกติที่มีอายุ 10 สัปดาห์เท่ากัน และเมื่อตรวจสอบยืนยันการถ่ายทอดเชื้อ CLVd สู่ต้นอ่อนด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าพริกหวาน 2 ที่ออกทั้งหมด 26 ต้น มีต้นพริกที่ติดเชื้อไวรอยด์จำนวน 16 ต้น คิดเป็นการถ่ายทอดเชื้อ CLVd ทางเมล็ด เท่ากับ 61.5% ดังแสดงผลในตารางที่ 1 และภาพที่ 3 แต่ไม่พบต้นติดเชื้อ CLVd จากพริกหวาน 2 ซึ่งปลูกจากเมล็ดที่ได้จากต้นปกติเมื่อตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิค RT-PCR (ไม่ได้แสดงผล)

Table 1. Detection of *Columnnea latent viroid* infection in six pepper cultivars by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Pepper cultivar	Symptom	Total seed ²	RT-PCR			
			% Plant infection	Infected seed /total seed test	Grow-out test (infected/ total germinated plant)	% seed transmission ³
<i>C. frutescens</i>	+ (L-dist) ¹	0	83 (5/6)	NT	NT	NT
Tevee 60	-	516	67 (4/6)	0/516	NT	NT
Kingpetch	-	140	100 (6/6)	0/140	NT	NT
Sweet pepper 1	-	0	100 (6/6)	NT	NT	NT
Sweet pepper 2	-	110	100 (6/6)	5/10	16/26	61.5
PBC365	-	0	100 (6/6)	NT	NT	NT

¹ L-dist = abnormal apical, leaf epinasty and reducing leaf size, ² total seed from CLVd infected plant,

³ % seed transmission = (CLVd infected plant /total germinated plants) x 100, NT= No test



Figure 1. Symptoms of *Columnnea latent viroid* infected on chili pepper (*C. frutescens*) at 6 months post inoculation; (A) healthy (B) abnormal apical, reducing of leaf size, abnormal flowers with light green petals

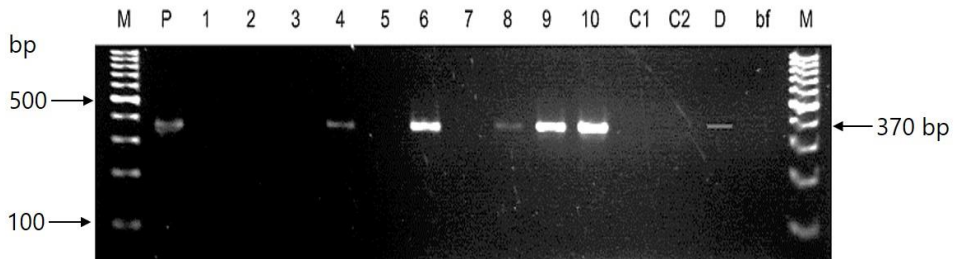


Figure 2. RT-PCR results of *Columnnea latent viroid* detection of seed from Sweet pepper 2 plant, the target size of DNA product was 370 bp; M= 100 bp. molecular weight markers, P= CLVd infected Rutgers tomato, 1-10 = seed no. 1 to no. 10, C1 and C2 = healthy pepper seed, D= CLVd infected pepper leaf, bf= buffer

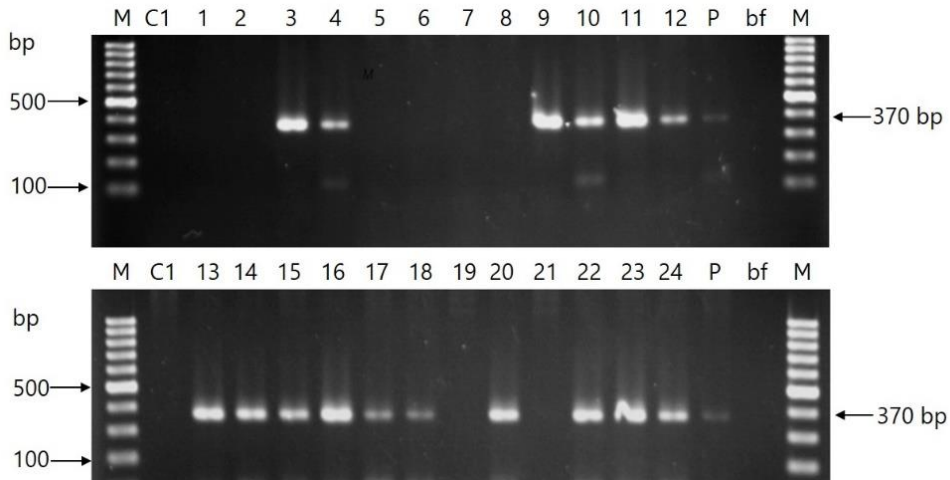


Figure 3. RT-PCR results of seedling at 10 weeks post sowing on grow-out test of *Columnnea latent viroid* infected seed lot Sweet pepper 2, the target size of DNA product was 370 bp; M= 100 bp. molecular weight marker, P= CLVd infected Rutgers tomato, 1-24 = plant no. 1 to 24, C1= healthy pepper, bf= buffer

วิจารณ์

ลักษณะอาการโรคที่เกิดจากเชื้อ CLVd จากการปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนพริกทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาพบว่าพริกทุกสายพันธุ์มีการแสดงความต้านทานแบบทนทาน (tolerance) ต่อการเข้าทำลายของเชื้อ CLVd เนื่องจากไม่แสดงอาการโรค หรือแสดงอาการภายหลังการติดเชือย่างช้า ๆ เนื่องจากเชื้อไวรอยด์มีลักษณะแฝงอยู่ภายในต้นพืช และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR อัตราการเข้าทำลายของเชื้อ CLVd บนพริกทั้ง 6 พันธุ์

อยู่ในระดับสูง คือ 67-100% ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงในการแพร่ระบาดของเชื้อ CLVd ไปกับต้นพริกที่ติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ ซึ่งทำให้ยากต่อการกำจัดเชื้อไวรอยด์ให้หมดไปจากแปลงปลูก และจะเป็นแหล่งของเชื้อที่สามารถเข้าทำลายพืชผักและไม้ดอกซึ่งเป็นพืชปลูกเศรษฐกิจที่มีรายงานแล้วว่ามี ความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ CLVd เช่น มะเขือเทศ มะเขือ แตงกวา พืชเนย และ gloxinea (Hammond *et al.*, 1989; Matsushita and Tsuda, 2015; Nielsen and Nicolaisen, 2010; Yanagisawa and Matsushita, 2017) เป็นต้น

ผลการทดลองการตรวจสอบการถ่ายทอดเชื้อ CLVd ทางเมล็ดข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเข้าทำลายของเชื้อ CLVd มีผลต่อการพัฒนาของผล และการติดเมล็ดของพริกทั้ง 6 สายพันธุ์แตกต่างกัน ได้แก่ แบบแรก เชื้อไวรัสโรยต์ทำให้พริก 3 พันธุ์ ได้แก่ พริกขี้หนู (*C. frutescens*) พริกหวาน 1 และพริกมันดำ (PBC365) ได้รับผลกระทบจากการเข้าทำลายค่อนข้างมาก เนื่องจากบางต้นสามารถติดผลได้แต่ไม่มีการพัฒนาของเมล็ด และบางต้นไม่มีการติดผลหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติที่ปลูกเชื้อด้วยฟเฟอรียังคงติดผลและเมล็ดได้ อาจเนื่องมาจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสโรยต์มีผลทำให้ละอองเกสร (pollen) มีความผิดปกติ เมื่อเกิดการปฏิสนธิจึงไม่เกิดการพัฒนารูปของเมล็ด (seed coat) และต้นอ่อนภายในเมล็ด แบบที่สอง คือ พริกพันธุ์ที่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัสโรยต์สามารถออกดอก ติดผลและมีการพัฒนาของเมล็ดเช่นเดียวกับต้นปกติ ได้แก่ พริกขี้หนูพันธุ์เทวี 60 พริกหยวกพันธุ์กิ่งเพชร และพริกหวาน 2 แสดงว่าเชื้อไวรัสโรยต์ดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อการพัฒนาละอองเกสรและการปฏิสนธิน้อยกว่าของพริก 3 พันธุ์แรกที่ไม่ติดเมล็ดดังกล่าว หรือกล่าวได้ว่าพริกแต่ละสายพันธุ์มีความทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสโรยต์ได้แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามการศึกษาการถ่ายทอดของเชื้อ CLVd ผ่านเมล็ดพริกในครั้งนี้ สามารถยืนยันเป็นครั้งแรกได้ว่าเชื้อ CLVd สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดของพริกหวานได้ ซึ่งจากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อ CLVd มีรายงานการถ่ายทอดผ่านเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ 5.5-100% แต่ไม่มีรายงานการถ่ายทอดผ่านเมล็ดพริกและมะเขือ (Matsushita and Tsuda, 2016) รายงานการศึกษาเชื้อ PSTVd ก็พบว่าเชื้อไวรัสโรยต์สามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ดพันธุ์พริก 2 สายพันธุ์ คือ *C. annuum* var. *grossum*4 และ *C. annuum* var. *angulosum*3 ที่ 0.3% และ 0.5% ตามลำดับ ถ่ายทอดผ่านเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ 90% (Matsushita and Tsuda, 2016) การถ่ายทอดผ่านเมล็ดพริกชนิดอื่นๆ 97% (Verhoeven *et al.*, 2009) และรายงานการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อ PCFVd ในพริกหวานสายพันธุ์ Jaguar ที่ 19% ซึ่งทำให้ผลพริกมีขนาดลดลงอย่างมาก สามารถเข้าทำลายมะเขือเทศและมันฝรั่ง ทำให้มีลักษณะ

อาการโรคคล้ายกับการเข้าทำลายโดย PSTVd (Owens *et al.*, 1978) นอกจากนี้การศึกษาดูการติดตามการสะสมของ PSTVd ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของเมล็ดมะเขือเทศที่ได้จากต้นที่ติดเชื้อและมีการถ่ายทอดทางเมล็ดด้วยวิธี *in situ* hybridization พบว่าการที่เชื้อ PSTVd มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดสูงถึง 90% เนื่องจากเชื้อไวรัสโรยต์ดังกล่าวสะสมอยู่ในต้นอ่อน ปลายราก (radical) เอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) และเปลือกหุ้มเมล็ด ดังนั้นเมื่อกอกเป็นต้นอ่อนเชื้อจึงสามารถเจริญเพิ่มปริมาณในต้นอ่อนได้ และสามารถถ่ายทอดผ่านทางวิถีกลไกมีการสัมผัสกัน (Matsushita and Tsuda, 2016) เนื่องจาก PSTVd และ PCFVd จัดอยู่ในสกุล (genus) *Pospiviroid* เช่นเดียวกับกับ CLVd (Matsushita and Tsuda, 2016; Owens *et al.*, 1978; Verhoeven *et al.*, 2009) จึงเป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อไวรัสโรยต์ในสกุลนี้ มีความสามารถในการเข้าทำลายและถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์พืชเศรษฐกิจ เช่น มะเขือเทศ และพริกได้ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อการผลิตผลสดและการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกและนำเข้า ถูกจัดให้เป็นเชื้อกักกันเนื่องจากก่อให้เกิดความเสียหายรุนแรงในหลายประเทศทั่วโลก นอกจากนี้การนำเมล็ดพริกมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารบางชนิด เช่น sodium hypochlorite (สวิตา และคณะ, 2560) ยังไม่มีรายงานว่าสามารถใช้ฆ่าเชื้อไวรัสโรยต์ในเมล็ดได้ ดังนั้นจึงมีความสำคัญอย่างมากในการตรวจสอบเชื้อ CLVd ในเมล็ดพันธุ์พริกก่อนการนำเข้าและส่งออกไปยังต่างประเทศด้วยเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง นอกจากนี้การสุ่มตัวอย่างเมล็ดเพื่อใช้ในการตรวจสอบควรมีจำนวนที่เพียงพอในการตรวจสอบ

สรุป

เชื้อ CLVd สายพันธุ์ NK-KUKPS1 ที่นำมาใช้ทดสอบเพื่อศึกษาการเข้าทำลายและการถ่ายทอดทางเมล็ดในพริก มีความสามารถในการเข้าทำลายพริกทุกพันธุ์ที่นำมาศึกษา โดยพริกเกือบทุกพันธุ์ไม่แสดงอาการของโรค เมื่อตรวจสอบยืนยันผลด้วยเทคนิค RT-PCR ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อเชื้อ CLVd พบว่าเชื้อไวรัสโรยต์สายพันธุ์ดังกล่าวนี้ สามารถถ่ายทอด

ผ่านเมล็ดพริกหวาน 1 พันธุ์ จากพริกทั้งหมด 6 พันธุ์ และพบว่าต้นพริกที่ได้จากเมล็ดติดเชื้อ ไวรอยต์ไม่แสดงอาการของโรค ทำให้ยากต่อการตรวจหาเชื้อในเบื้องต้น ด้วยสายตาและทำลายต้นเป็นโรค หากเกิดการหลุดรอดของต้นติดเชื้อจะทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อได้อย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามการถ่ายทอดทางเมล็ดของ เชื้อ CLVd จะมีเปอร์เซ็นต์สูงหรือไม่ ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อไวรอยต์ ความรุนแรงของเชื้อ ชนิดและสายพันธุ์พืช ความอ่อนแอของพืช และสภาพแวดล้อม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.) ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

เอกสารอ้างอิง

ปรีเชษฐี ตั้งกาญจนภาสน์ คณินันต์ย เจริญวรการ เสริมศิริ จันท์เปรม และ รัชณี ยงประยูร 2548. ไพโรเมอร์สำหรับตรวจสอบไวรอยต์ที่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศ 6 ชนิดในกลุ่ม *Pospiviroid* ด้วยเทคนิค RT-PCR. วารสารโรคพืช 19: 13-21.

ปรีเชษฐี ตั้งกาญจนภาสน์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย กาญจนาวาระวิชนี และ วันเพ็ญ ศรีชาติ 2554. การตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) ที่ติดเข้ามาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ. หน้า 1570-1576. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ปรีเชษฐี ตั้งกาญจนภาสน์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย กาญจนาวาระวิชนี และ วันเพ็ญ ศรีชาติ 2555. การตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) ที่ติดเข้ามาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ. หน้า 1859-1889. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์ไทย. 2560. สถิตินำเข้า-ส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุม. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : <http://www.thasta.com/web/index.php/2016-05-29-01-47-24/2016-05-29-01-48-39> (12 สิงหาคม 2560).

สวีตา สุวรรณรัตน์ ปฐวิภา สงกุมาร Siegrid Steinkellner และ สมศิริ แสงโชติ 2560. การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ cutinase และ endopolygalacturonase ของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ในช่วงการเข้าทำลายบนผลพริก. วารสารเกษตร 33(3): 357-366.

ศศิประภา มาราช 2551. โคลนก่อโรคของเชื้อ *Columnea latent viroid* และผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์การค้า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 86 หน้า.

Diener, T. O. 1987. The Viroids. Plenum Press, Inc., New York. 344 p.

Fagoaga, C. and N. Duran-Vila. 1996. Naturally occurring variants of *Citrus exocortis viroid* in vegetable crops. Plant Pathology 45: 45-53.

Galindo, J.A., D.R. Smith and T.O. Diener. 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. Phytopathology 72: 49-54.

Hadidi, A., R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik. 2003. Viroids. CSIRO Publishing, Collingwood, Vic. 370 p.

Hammond, R., D.R. Smith and T.O. Diener. 1989. Nucleotide sequence and proposed

- secondary structure of *Columnea latent viroid*: a natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Research* 17: 10083-10094.
- Lawson, R.H. 1987. *Chrysanthemum stunt*. pp. 247-259. In: T.O. Diener (ed.). *The Viroids*. Plenum Press, New York. 344 p.
- 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: 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: 1007-1011.
- Mishra, M.D., R.W. Hammond, R.A. Owens, D.R. Smith and T.O. Diener. 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of *Citrus exocortis viroid*. *Journal of General Virology* 72: 1781-1785.
- Nielsen, S.L. and M. Nicolaisen. 2010. First report of *Columnea latent viroid* (CLVd) in *Gloxinia gymnostoma*, *G. nematanthodes* and *G. purpurascens* in a botanical garden in Denmark. *New Disease Reports* 22: 4.
- Nixon, T., R. Glover, S. Mathews-Berry, M. Daly, E. Hobden, C. Lambourne, V. Harju and A. Skelton. 2010. *Columnea latent viroid* (CLVd) in tomato: the first report in the United Kingdom. *New Disease Reports* 59: 392.
- Owens, R.A., D.R. Smith and T.O. Diener. 1978. Measurement of viroid sequence homology by hybridization with complementary DNA prepared *in vitro*. *Virology* 89: 388-394.
- Reanwarakorn, K., S. Klinkong and J. Porsoongnum. 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports* 24: 6.
- Sano, T., L. Uyeda and E. Shikata. 1984. Comparative studies of *Hop stunt viroid* and *Cucumber pale fruit viroid* by polyacrylamide gel electrophoretic analysis and electron microscopic examination. *Annual Phytopathology Society Japan* 50: 339-345.
- Shikata, E. 1987. *Hop stunt*. pp. 279-289. In: T.O. Diener (ed.). *The Viroids*. Plenum Press, New York. 344 p.
- Singh, R.P. 1983. Viroids and their potential danger to potatoes in hot climates. *Canadian Plant Disease Survey* 63: 13-18.
- Singh, R.P., X. Nie and M. Singh. 1999. *Tomato chlorotic dwarf viroid*: an evolutionary link in the origin of *Pospiviroids*. *Journal of General Virology* 80: 2823-2828.
- Singh, R.P., D.K. Lakshman, A. Boucher and S. M. Tavantzis. 1992. A viroid from *Nematanthus wettsteinii* plants closely related to the *Columnea latent viroid*. *Journal of General Virology* 73: 2769-2774.
- Spieker, R.L. 1996. A viroid from *Brunfelsia undulata* closely related to the *Columnea latent viroid*. *Archives of Virology* 141: 1823-1832.
- Steyer, S., T. Olivier, A. Skelton, T. Nixon and E. Hobden. 2010. *Columnea latent viroid* (CLVd): first report in tomato in France. *Plant Pathology* 59: 794-794.
- 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 Research* 144: 209-214.
- Verhoeven, J.T.J., C.C.C. Jansen, T.M. Willems, 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*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 823-831.
- Verhoeven, J.T.J., R.A. Owens and J.W. Roenhorst. 2011. *Mexican papita viroid* and *Tomato planta macho viroid* belong to a single species in the genus *Pospiviroid*. *Archives of Virology* 156: 1433-1437.
- Walter, B. 1987. *Tomato apical stunt*. pp. 321-327. In: T. O. Diener (ed.). *The Viroids*. Plenum Press, New York. 344 p.
- 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: 211-217.
-