

การตรวจติดตามเชื้อ *Cumene latent viroid* (CLVd)
 ที่ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ
 Interception of *Cumene latent viroid* (CLVd)
 in Imported Tomato Seed

ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์^{1/} วันเพ็ญ ศรีทองชัย^{1/}

กาญจน วาระวิชนะ^{1/} วันเพ็ญ ศรีชาติ^{2/}

^{1/} กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/} กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เชื้อ *Cumene latent viroid* (CLVd) เป็นเชื้อโรคพืชกักกันตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๖) พ.ศ. ๒๕๕๐ ลำดับที่ ๑๗๗ ไวรอยด์ชนิดนี้เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญของมะเขือเทศ ทำให้ผลผลิตลดลงถึง 49 เปอร์เซ็นต์ เชื้อชนิดนี้มีพืชอาศัยที่กว้าง เช่น มะเขือเทศ, มันฝรั่ง, แตงกวา, พริก, มะเขือชนิดต่าง ๆ และไม้ประดับ อีกทั้งยังสามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อใช้ทำพันธุ์ในประเทศ และผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออกในปริมาณที่มาก จึงทำให้เชื้อไวรอยด์ดังกล่าวมีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าและแพร่ระบาดทำความเสียหายในประเทศไทยได้ และจากการกักกันพืชหลังการเข้ามาในปี 2551 ตรวจพบเชื้อไวรอยด์ดังกล่าวถึง 11 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงที่เชื้อไวรอยด์ชนิดนี้จะปนเปื้อนติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าได้สูง ดังนั้นการนำวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Cumene latent viroid* ที่ได้พัฒนาแล้วมาใช้ตรวจสอบติดตามเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศจึงเป็นวิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อโรคศัตรูพืชกักกันที่มีประสิทธิภาพทางหนึ่งด้วย จากผลการตรวจสอบติดตามเพื่อการสกัดเชื้อ *Cumene latent viroid* กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ (interception) ในกลุ่มประเทศที่มีความเสี่ยง ตั้งแต่ปี 2554 ถึง 2555 ด้วยวิธีการเพาะในโรงเรือน (seedling symptom test) เพื่อสังเกตอาการ, การสุ่มตรวจด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization และ RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-00-10-54

โดยสุ่มตรวจตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในปี 2554 จำนวน 6 ครั้ง จาก 7 ประเทศ และในปี 2555 จำนวน 10 ครั้ง จาก 12 ประเทศ พบว่าไม่มีตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ใดแสดงอาการผิดปกติที่เป็นลักษณะจำเพาะของเชื้อไวรัสโรยด์ให้พบ (seedling symptom test) และเมื่อทำการสุ่มตรวจวินิจฉัยชั้นละเอียดด้วยเทคนิค 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 ทั้งนี้เนื่องจากด้วยอัตราการปนเปื้อนของเชื้อที่ต่ำ

คำนำ

เชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุดที่มีรายงานมีองค์ประกอบเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นวงปิดไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม มีขนาดประมาณ 370 เบส โดยปกติแล้วอาร์เอ็นเอไวรัสโรยด์จะอยู่ในสภาพโครงสร้างทุติยภูมิที่มีลักษณะเป็น rod-shape เนื่องจากการเกิดจับกันของเบสในสายอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสโรยด์ด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรมากที่สุด ไวรัสโรยด์เป็นเชื้อปรสิตภายในพืชที่ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ การเพิ่มปริมาณการเคลื่อนย้าย และการทำให้พืชเกิดอาการผิดปกติจะใช้โปรตีนและสารเคมีต่าง ๆ จากพืชอาศัย เชื้อ CLVd จัดจำแนกอยู่ในวงศ์ *Pospiviroidae* สกุล *Pospiviroid* เชื้อชนิดนี้เข้าทำลายพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ, มันฝรั่ง, แตงกวา, 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 ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศพ่อแม่ในปริมาณที่มากเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออก ประกอบกับเชื้อชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโรคและเพิ่มปริมาณในพืชหลายชนิดในวงศ์ *Solanaceae* เช่น มะอึก และ มะเขือเปราะ แบบไม่แสดงอาการได้ (latent) ซึ่งยากแก่การตรวจวินิจฉัยและการกำจัดให้หมดสิ้นไปได้ (Eradication) ซึ่งจากการตรวจกักกันพืชหลังการเข้ามา (post entry quarantine) ในปี 2550 ตรวจพบเชื้อไวรัสโรยด์ดังกล่าวจำนวน 11 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่เชื้อชนิดนี้จะสามารถติดเข้ามาแพร่ระบาดและก่อให้เกิดความเสียหายในประเทศไทยได้ จากความเสี่ยงดังกล่าวจึงทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินการในการจัดการความเสี่ยงโดยการตรวจติดตามเชื้อ CLVd กับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. โรงเรือนมุ้งกันแมลง
2. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส
3. ตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส
4. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 3 ตำแหน่ง
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
7. เครื่อง Thermal cycler (PCR)
8. Gel electrophoresis
9. Gel Documentation UV-transilluminator

สารเคมี

1. เอ็นไซม์ One-Step RT-PCR (SS III reverse transcriptase /PLATINUM Taq polymerase) (Invitrogen)
2. เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase
3. สารละลายไพรมเมอร์ที่จำเพาะ
4. 100 bp DNA Ladder
5. ชุด kit สกัด agarose gel: QIAquick Gel Extraction Kit
6. pGEM-T easy vector (Promega)
7. competent cell (*E. coli* DH5 α)
8. สารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-galactoside (X-gal)
9. สารละลาย isopropyl-6-D thiogalactopyranoside (IPTG)
10. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการปลูกเชื้อบนพืชด้วยวิธีกล
11. DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche)
12. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอน การสกัดอาร์เอ็นเอ การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา RT-PCR และ Nucleic Hybridization
13. พืชทดสอบชนิดต่าง ๆ
14. วัสดุการเกษตรต่าง ๆ ดินและปุ๋ยเคมี

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศ

โดยตรวจเอกสารข้อมูลของเชื้อไวรอยด์ CLVd แหล่งประเทศที่มีรายงานการระบาดหรือพบโรค ข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ รายชื่อประเทศที่มีการนำเข้า/ส่งออกเมล็ดพันธุ์ เพื่อกำหนดแหล่งประเทศนำเข้าที่มีความเสี่ยงของโรค

2. เตรียมวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ อุปกรณ์ทางการเกษตรที่จำเป็นในขั้นตอนต่าง ๆ

- 2.1 ขั้นตอนการเพาะเมล็ดในโรงเรือนเพื่อสังเกตอาการผิดปกติ
- 2.2 ขั้นตอนในการสกัดอาร์เอ็นเอ CTAB (Scottish Agricultural Science Agency)
- 2.3 ขั้นตอนในการตรวจสอบด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization
- 2.4 ขั้นตอนในการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR

3. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศที่มีความเสี่ยง ณ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช

เลือกสุ่มตรวจเมล็ดพันธุ์จากกลุ่มประเทศที่มีรายงานการพบเชื้อ CLVd ได้แก่ แคนาดา, เยอรมนี, เนเธอร์แลนด์, สหราชอาณาจักร และ สหรัฐอเมริกา นอกจากนี้ยังสุ่มตรวจในกลุ่มประเทศที่มีความเสี่ยงในด้านมาตรฐานสุขอนามัยพืชด้วยเช่น ประเทศจีน, อินเดีย และอินโดนีเซีย รวมถึงกลุ่มประเทศในแถบอเมริกากลางและใต้ด้วย

4. เพาะตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศดังกล่าวเพื่อดูอาการเบื้องต้นในโรงเรือนทดลอง

โดยการปลูกเมล็ดพันธุ์ในถาดเพาะ ประมาณ 100 – 200 เมล็ดต่อ consignment เป็นระยะเวลา 1 จนถึง 6 สัปดาห์ สังเกตอาการผิดปกติที่เกิดขึ้น และเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อไวรอยด์ CLVd ให้มากพอต่อการตรวจสอบ

5. สํารวจเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้เมล็ดพันธุ์พ่อแม่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

สำรวจโรคในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าเมล็ดพันธุ์พ่อแม่เพื่อผลิตเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออกไปยังต่างประเทศในพื้นที่จังหวัดสกลนคร ขอนแก่น อุดรธานี มุกดาหาร กาฬสินธุ์ และมหาสารคาม เก็บตัวอย่างมะเขือเทศที่แสดงอาการโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไวรอยด์ คือมีลักษณะอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ยอดแตกเป็นพุ่ม ก้านใบ ใบหดลดรูป ย่น และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ ก้านใบ กิ่ง และลำต้น จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวไปปลูกถ่ายเชื้อบนพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ด้วยวิธีกล โดยการใส่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9.0 ความเข้มข้น 0.1 M บนตัวอย่างพืช จากนั้นโรยผง carborundum ลงบนใบพืชทดสอบและทาใบพืชทดสอบด้วยน้ำคั้นจากพืชตัวอย่าง เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค สังเกตลักษณะอาการที่ปรากฏ โดยอาการของโรคจะแสดงในระยะเวลาตั้งแต่ 2 อาทิตย์ ถึง 1 เดือน หลังจากปลูกถ่ายเชื้อ

6. ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Columnea latent viroid* ในชั้นละเอียดด้วยวิธีการ

Nucleic hybridization

6.1 ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการ CTAB (Jeffries and Tina, n.d.)

หลังจากการเพาะเมล็ดพันธุ์ในสภาพเพาะ นำต้นพืชที่แสดงอาการผิดปกติมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการ CTAB โดยการบดใบพืช 100 มิลลิกรัม ด้วยสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na₂SO₃ และ 2.0% PVP-40; Na₂SO₃ และ PVP-40 เติมน้ำก่อนใช้งาน) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวใส ส่วนบนปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติมน้ำ chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติมน้ำ chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมน้ำสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย) และ isopropanol แซ่เย็น ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (1 เท่าของปริมาตรสารละลาย) ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งข้ามคืน จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอน กรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วย TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol แซ่เย็น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 4 นาที ตากตะกอนนิวคลีอิกให้แห้งสนิทและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นหนึ่ง ฝาเชื้อ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ CLVd

6.2 การผลิต cDNA probe ที่จำเพาะต่อเชื้อ CLVd

6.2.1 นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ของเชื้อ CLVd ไปเพิ่มปริมาณให้มากพอด้วยเทคนิค PCR และนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด agarose gel (QIAquick Gel Extraction Kit) (QIAGEN) เพื่อเตรียมสังเคราะห์ cDNA probe เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization ต่อไป

6.2.2 สกัด DNA ของไวรอยต์ออกจาก agarose เจลด้วยวิธีการ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) มีวิธีการดังนี้

6.2.2.1 โดยเติมน้ำสารละลาย QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักรวมของเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายอย่างสมบูรณ์

6.2.2.2 เติมน้ำ isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักรวมของเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจัดชุด column โดยนำ QIAquick spin column วางบน collection tube ดูดสารละลาย

ผสมใส่ใน ชุด column โดยดูดสารละลายปริมาตรไม่เกิน 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งน้ำใสในหลอด collection tube

6.2.2.3 ล้าง QIAquick spin column ด้วยสารละลาย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้าง QIAquick spin column อีกครั้งด้วยสารละลาย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

6.2.2.4 จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย EB buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบขนาดและปริมาณ cDNA ที่ได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis หากได้แถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ จะต้องทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ซ้ำอีกครั้งจนได้แถบดีเอ็นเอแถบเดียว

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

6.2.3.1 นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ความเข้มข้นประมาณ 10 นาโนกรัม – 3 ไมโครกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นหนึ่งขวดเชื้อ 15 ไมโครลิตร เติมนลงในหลอด micro centrifuge

6.2.3.2 นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที และแช่น้ำแข็งทันที นาน 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ จากนั้นเติมสารละลาย DIG High Prime ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน spin down นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน

6.2.3.3 จากนั้นเติมสารละลาย 0.2 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ซึ่งในขั้นนี้จะได้ cDNA probe ที่ถูกติดฉลากด้วย DIG (digoxigenin) เรียบร้อยแล้ว

6.3 การตรวจสอบความเข้มข้นและประสิทธิภาพของ cDNA probe ที่ผลิตได้

6.3.1 เตรียม series dilution ของ cDNA probe ที่เตรียมได้ และ DNA control ตามตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 1 การเตรียม series dilution ของ probe และ DNA control เพื่อตรวจสอบหาความเข้มข้นของ probe

Tube	DNA control (μ l)	From tube	DNA Dilution Buffer (μ l)	Dilution	Final Concentration
1	2	Original	198	1:100	10 pg/ μ l
2	15	1	35	1:3.3	3 pg/ μ l
3	5	2	45	1:10	1 pg/ μ l

4	5	2	45	1:10	0.3 pg/ μ l
5	5	3	45	1:10	0.1 pg/ μ l
6	5	4	45	1:10	0.03 pg/ μ l
7	5	5	45	1:10	0.01 pg/ μ l
8	0	6	50	-	0 pg/ μ l

6.3.2 เตรียมสารละลาย cDNA probe ที่ผลิตได้ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} และ 10^{-8} เท่า (10 fold dilution) โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

6.3.3 ตัดแผ่น nylon membrane ให้มีขนาด 9 X 3 เซนติเมตร หยดสารละลาย cDNA probe และ DNA control ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ลงบนแผ่น nylon membrane หยดละ 1 ไมโครลิตร ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 พังการหยดสารละลาย cDNA probe และ DNA control ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

DNA control →	10 pg/ μ l	3 pg/ μ l	1 pg/ μ l	0.3 pg/ μ l	0.1 pg/ μ l	0.03 pg/ μ l	0.01 pg/ μ l	0 pg/ μ l
cDNA probe →	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}

6.3.4 นำแผ่น nylon membrane ไปวางบน UV-transilluminator โดยหันด้านที่หยด DNA เข้ากับแสง UV เพื่อตรึง DNA ให้ยึดติดกับแผ่น membrane จากนั้นแช่แผ่น membrane ในสารละลาย Maleic acid buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5) ที่อุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส เขย่า นาน 2 นาที และแช่ในสารละลาย Blocking solution (เจือจางสารละลาย 10 X Blocking solution ด้วยสารละลาย Maleic acid buffer) เขย่า นาน 30 นาที จากนั้นนำแผ่น membrane ไปแช่ในสารละลาย Antibody solution (ปั่นตกตะกอน Anti-Digoxigenin-AP ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นเจือจางสารละลาย Anti-Digoxigenin-AP ด้วยสารละลาย Blocking solution ในอัตราส่วน 1:5,000) เขย่า นาน 30 นาที นำแผ่น membrane มาล้างในสารละลาย Washing buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20) เขย่า นาน 15 นาที 2 ครั้ง แช่แผ่น membrane ในสารละลาย Detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5) นาน 5 นาที จากนั้นแช่แผ่น membrane ในสารละลาย Color

substrate solution (ผสมสารละลาย NBT/BCIP ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย Detection buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร) ที่ทิ้งไว้ในที่มีดโดยไม่ต้องเขย่า ประมาณ 15 นาที – 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่แผ่น membrane ในน้ำกลั่นหรือสารละลาย TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ตรวจสอบความเข้มของจุดสีที่เกิดขึ้นเพื่อคำนวณความเข้มข้นของ cDNA probe ที่ได้ โดยเทียบกับ DNA control

6.4 การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization จาก cDNA probe ที่ผลิตได้ มีวิธีการดังนี้

6.4.1 นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ จำนวน 50 เมล็ด ต่อ 1 รายการ มาปลูก รोजันต้นกล้าอายุได้ประมาณ 2 อาทิตย์ จึงสกัดอาร์เอ็นเอจากใบและของต้นมะเขือเทศดังกล่าว เพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization ในขั้นต่อไป

6.4.2 ตัดแผ่น nylon membrane ให้มีขนาดเหมาะสมกับจำนวนตัวอย่างที่จะตรวจสอบ หยดน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ อาร์เอ็นเอที่สกัดจากพืชที่เป็นโรคจากเชื้อ CLVd (positive control) อาร์เอ็นเอจากพืชปกติ (negative control) และอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างมะเขือเทศ 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 ให้ยึดติดกับแผ่น membrane

6.4.3 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

6.4.4 ทำการ denature cDNA probe ที่สังเคราะห์ โดยต้ม cDNA probe ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร นาน 5 นาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม cDNA probe ที่ผ่านการต้มแล้วลงไปยัง สารละลาย DIG Easy Hyb ที่เตรียมเอาไว้ ในปริมาณ 3.5 มิลลิลิตร / พื้นที่แผ่น membrane 100 ตารางเซนติเมตร ผสมให้เข้ากันระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทสารละลาย Prehybridization solution ที่เติมสารละลาย probe/hybridization ลงไปยังแผ่น membrane บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส โดยเขย่าเบา ๆ

6.4.5 ล้างแผ่น membrane 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย 2 X SSC ที่มี 0.1% SDS ผสมอยู่ที่อุณหภูมิ 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

6.4.6 ล้างแผ่น membrane ในสารละลาย Washing buffer เขย่า นาน 5 นาที จากนั้นแช่แผ่น 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) ทิ้งไว้ในที่มืดบนพื้นราบโดยไม่ต้องเขย่า ประมาณ 16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่น้ำกลั่นหรือสารละลาย TE buffer ตรวจสอบความเข้มของจุดสีที่เกิดขึ้น

7. ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Columnea latent viroid* ในชั้นละเอียดด้วยวิธีการ RT-PCR

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการ CTAB (ตามหัวข้อ 6.1) มาตรวจสอบหาการปนเปื้อนของเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค RT-PCR (one-step): โดยใช้ไพรเมอร์ PC-2, CLVd (ปริเชษฐ, 2548) และ NAD (internal control)

7.1 ขั้นตอนของปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

2X one-step buffer	10.0	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	4.5	ไมโครลิตร
2 μ M ไพรเมอร์ สาย c	2.0	ไมโครลิตร
2 μ 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
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

7.2 ตรวจสอบขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ ด้วยวิธีการอีเล็กโตรโฟรีซิสโดยการ ใช้ 2% agarose gel ละลายในสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่าง ศักย์ 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 α) แล้วนำไปหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันผลการตรวจในขั้นสุดท้าย

8.1 ทำการโคลนผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ของไวรอยด์ ด้วยการเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega) และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อไวรอยด์ โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

8.1.1 เตรียม cDNA ให้บริสุทธิ์ โดยการนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ โดยนำผลผลิตของปฏิกิริยา RT-PCR มาแยกดีเอ็นเอตามขนาดโดยใช้วิธีการอีเล็กโตรโฟรีซิส ด้วย 2% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อไวรอยด์ คือมีขนาดประมาณ 370 คู่เบส ใส่หลอด centrifuge tube ซึ่งน้ำหนักของเจล โดยจะต้องไม่เกิน 400 มิลลิกรัม

8.1.2 สกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ตามหัวข้อ 5.2.2 จนกระทั่งได้แถบดีเอ็นเอที่ต้องการแถบเดียว

8.1.3 เชื่อมต่อ cDNA ของเชื้อไวรอยด์เข้ากับพลาสมิดพาหะ โดยเชื่อมต่อ cDNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วกับพลาสมิด pGEM-T Easy (Promega) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

T4 DNA Ligase 2X buffer	10.0 ไมโครลิตร
PGEM-T easy vector	1.0 ไมโครลิตร
PCR product	8.0 ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase (3 unit/ μ l)	1.0 ไมโครลิตร
รวม	20.0 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน

8.1.4 นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดยถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH 5 α ใช้วิธีการ heat shock transformation (Fristch *et al.*, 2001) โดยเติมสารละลายพลาสมิดลูกผสมจากปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มีเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านที่ทำให้พร้อมรับพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ปริมาตร 100

ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบา ๆ แช่วหลอดทดลองในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดมาแช่ในน้ำอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และรีบนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 - 3 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เทอาหาร LB เดิมทิ้งและเติมหาอาหารเหลว LB ใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงไปแทน เพื่อละลายตะกอนของเชื้อแบคทีเรีย ทำการ spread ผิวหน้าอาหารแข็ง LB agar ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร กับสารละลาย isopropyl-6-D thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง จากนั้นนำสารละลายของเชื้อแบคทีเรีย spread บนอาหารแข็ง LB agar ดังกล่าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อคัดเลือก colony ของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วน cDNA ของเชื้อไวรอยด์

8.1.5 สกัดพลาสมิดลูกผสม ใช้วิธีการ Alkaline lysis (Fristch *et al.*, 2001) โดยเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่มีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีการเติมแอมพิซิลิน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารเหลวออก เติมหาสารละลาย Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture จากนั้นเติมหาสารละลาย Solution II (0.2 M NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่เตรียมใหม่ก่อนการใช้งาน ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเติมหาสารละลาย Solution III (3 M potassium acetate, 0.2 M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแช่บนน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่ และเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตร สารละลาย ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งสารละลายและตากตะกอนพลาสมิดให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 ไมโครลิตร

8.1.6 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อในพลาสมิดพาหะ โดยการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ไปตัดโคลนของพลาสมิดลูกผสม เพื่อแยก cDNA ของไวรอยด์ออกจากพลาสมิดลูกผสม มีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

ดีเอ็นเอ	5.0 ไมโครลิตร
10X <i>EcoRI</i> buffer	1.0 ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ <i>EcoRI</i>	0.3 ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ RNase A	0.5 ไมโครลิตร

น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

3.2 ไมโครลิตร

รวม

10.0 ไมโครลิตร

นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 - 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วย 2% agarose gel electrophoresis นำโคลนของพลาสมิดลูกผสมที่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 300 - 400 คู่เบสไปวิเคราะห์หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

8.1.7 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ หลังจากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อในพลาสมิดพาหะและได้โคลนที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดตามที่ต้องการแล้ว นำโคลนดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยเครื่อง Automated DNA sequencer แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรอยด์ที่มีการรายงานอยู่แล้วในฐานข้อมูลของ 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 รายงานผลการตรวจพบเชื้อไวรอยด์ต่อกลุ่มวิจัยการกักกันพืช และจัดทำรายงาน ผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา: ตั้งแต่ ตุลาคม 2553 ถึงกันยายน 2555 รวม 2 ปี

สถานที่วิจัย : 1. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศ

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

1.1 เชื้อไวรอยด์ชนิดนี้ก่อให้เกิดอาการที่รุนแรงในมะเขือเทศ มันฝรั่ง และพริก และสามารถติดโรคโดยไม่แสดงอาการได้ในไม้ประดับหลายชนิด เช่น ต้นลิปสติก

1.2 สามารถในการถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ และแพร่กระจายโรคได้ง่ายด้วยวิธีกล แต่ไม่มีข้อมูลการถ่ายทอดโรคผ่านทางละอองเกสรและแมลง

1.3 ประเทศที่มีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อ CLVd ได้แก่ แคนาดา, เยอรมนี, เนเธอร์แลนด์, สหราชอาณาจักร และ สหรัฐอเมริกา ส่วนประเทศจีนและอินเดียเป็นประเทศที่มีความเสี่ยงที่อาจมีเชื้อชนิดนี้ระบาดในประเทศ

2. เตรียมวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ อุปกรณ์ทางการเกษตรที่จำเป็นในขั้นตอนต่าง ๆ

ได้ไฟเบอร์ และ probe ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Columnea latent viroid* รวมถึงสารเคมีที่จำเป็นต่าง ๆ เพื่อใช้ในงานทดสอบ

3. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศที่มีความเสี่ยง ณ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช

ได้สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ ดังต่อไปนี้

3.1 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

3.2 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 ชิลี เม็กซิโก และอิสราเอล น้ำหนัก 9.078 Kg นำเข้าวันที่ 4 พฤษภาคม 2555
8. ประเทศสหรัฐอเมริกา เปรู ชิลี 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. เพาะตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศดังกล่าวเพื่อดูอาการเบื้องต้นในโรงเรือนทดลอง

ผลการตรวจสอบตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้ามาจากต่างประเทศที่สุ่มจากกลุ่มวิจัยกักกันพืช ผลการสังเกตอาการผิดปกติเมื่อนำไปปลูกเพื่อดูอาการในโรงเรือนพบว่า ไม่มีตัวอย่างใดแสดงอาการของโรคที่จำเพาะของเชื้อไวรอยด์ มีเพียงบางตัวอย่างที่แสดงลักษณะอาการผิดปกติใกล้เคียงกับไวรัสเท่านั้น

5. การตรวจตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่แสดงอาการผิดปกติในชั้นละเอียดด้วยเทคนิค Nucleic hybridization และ RT-PCR

ผลการตรวจสอบตัวอย่างมะเขือเทศที่นำเข้ามาจากต่างประเทศทั้งที่แสดงอาการผิดปกติดังกล่าว และที่ไม่แสดงอาการผิดปกติ โดยการตรวจวินิจฉัยชั้นละเอียดด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization และ RT-PCR พบว่าให้ผลเป็น negative ในทุก ๆ ตัวอย่าง แสดงว่าไม่มีตัวอย่างไหนพบการปนเปื้อนของเชื้อ CLVd ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์

สำหรับการทดลองในส่วนนี้ อาจเป็นไปได้ที่วิธีการในการตรวจติดตามการปนเปื้อนของเชื้อกับเมล็ดพันธุ์นำเข้าอาจยังไม่เหมาะสม ทั้งนี้อาจเนื่องด้วยอัตราการปนเปื้อนของเชื้อที่ต่ำ จึงทำให้ตรวจไม่พบการปนเปื้อนกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวแต่กลับตรวจพบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ซึ่งหากเป็นกรณีนี้จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเมล็ดพันธุ์ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบให้มีปริมาณมากขึ้น (มากกว่า 200 เมล็ด) แต่อย่างไรก็ดีปริมาณเมล็ดที่สามารถสุ่มตรวจได้ขึ้นกับปริมาณเมล็ดที่นำเข้าด้วย เนื่องจากส่วนใหญ่เป็นเมล็ดพ่อ-แม่พันธุ์ที่มีปริมาณน้อย จึงทำให้ไม่สามารถสุ่มปริมาณที่มากได้

6. สํารวจเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้เมล็ดพันธุ์พ่อแม่ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

จากการสำรวจโรคและเก็บตัวอย่างอาการในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและตัวอย่างมะเขือ (*Solanum stramonifolium*) และนำมาปลูกเชื้อบนพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ด้วยวิธีกล พบว่าตัวอย่างมะเขือเทศจำนวน 7 ตัวอย่างและมะเขืออีก 1 ตัวอย่าง แสดงผลอาการจำเพาะบนพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ให้อาการลำต้นแคระแกร็น ใบหดลดรูป ก้านใบและยอดหดสั้นอย่างรุนแรง ใบบิดม้วนเสียรูปทรง ยอดใหม่มีขนาดเล็กผิดปกติ มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ กิ่งก้าน และลำต้น ซึ่งเป็นลักษณะอาการที่จำเพาะของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์ (ภาพที่ 1)

นอกจากนี้ยังมีบางตัวอย่าง (จำนวน 4 ตัวอย่าง) ทำให้พืชทดสอบมะเขือแสดงอาการ ใบหดลดรูป เนื้อใบย่น และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อน้ำเลี้ยงของพืชเล็กน้อย แต่ไม่มีอาการแคระแกร็น (ภาพที่ 2, 3 และ 4) และมีตัวอย่าง 1 ตัวอย่างทำให้พืชทดสอบมะเขือแสดงอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ยอดและใบหดลดรูป ใบมีอาการต่าง เนื้อใบหดย่น และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ (ภาพที่ 5) และใบข้างที่สร้างใหม่จะมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 6) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่ามีเชื้อไวรอยด์ที่

ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในพืชกลุ่มมะเขือได้ และเป็นลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อ *Columnea latent viroid* ซึ่งจะไม่แสดงอาการผิดปกติใด ๆ บนมะเขือก (latent) (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 1 อาการผิดปกติบนพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers



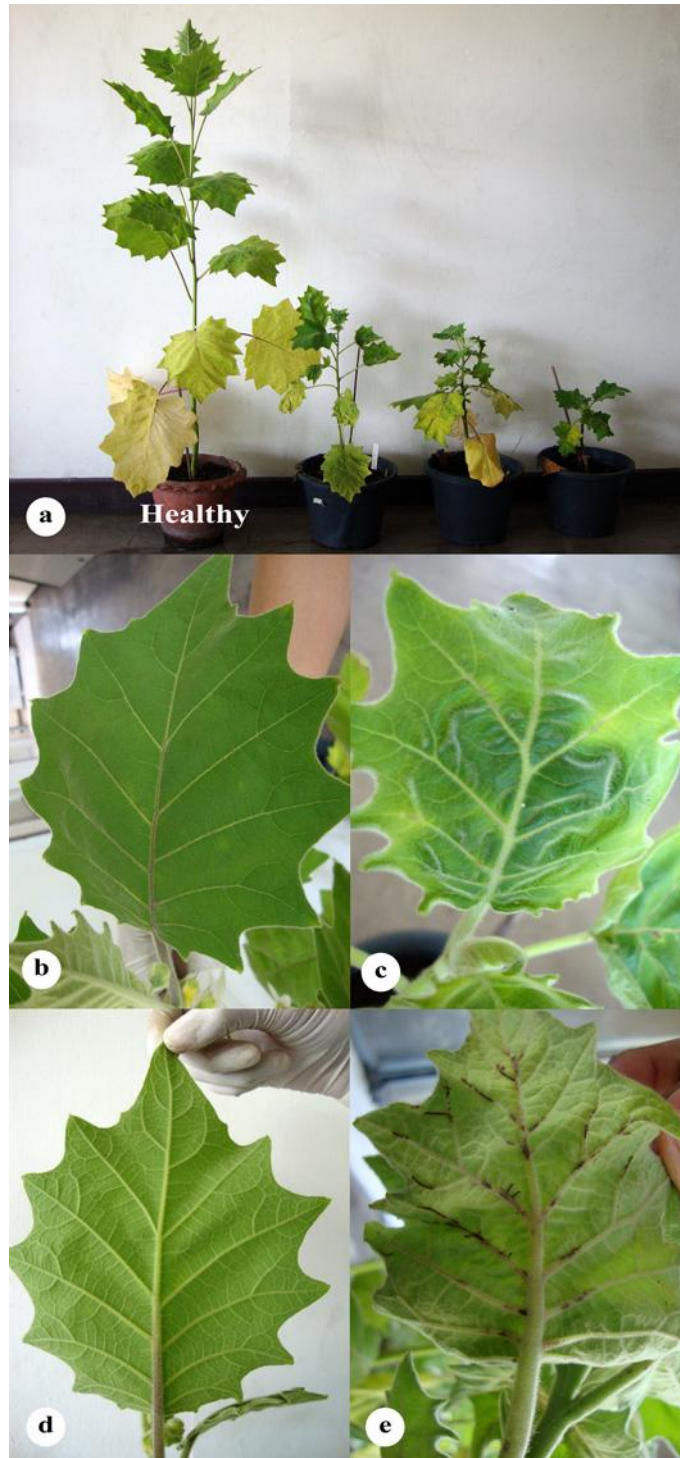
ภาพที่ 2 อาการใบย่นหดลรูปบนพืชทดสอบมะเขือก เปรียบเทียบกับมะเขือกปกติด้านขวา



ภาพที่ 3 อาการผิดปกติบนพืชทดสอบมะอึก ซึ่งแสดงอาการใบหดลรูป เนื้อใบยุ่น



ภาพที่ 4 อาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ (necrosis vein) บนพืชทดสอบมะอึก



- ภาพที่ 5 ลักษณะอาการผิดปกติของมะเอ็กที่ได้รับการปลูกเชื้อ
- เปรียบเทียบความสูงของต้นที่เป็นโรคกับต้นปกติ
 - หลังใบของต้นปกติ
 - หลังใบของต้นที่เป็นโรค: มีอาการต่าง เนื้อใบหดย่น
 - ท้องใบของต้นปกติ
 - ท้องใบของต้นที่เป็นโรค: มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ



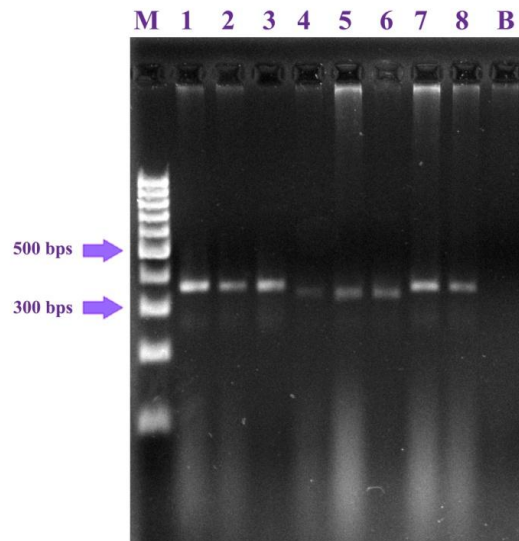
ภาพที่ 6 ลักษณะอาการผิดปกติของใบข้างมะอึกที่สร้างใหม่ มีอาการเล็กแกร็นและเนื้อใบหดย่น

ตารางที่ 3 แสดงผลการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers และมะอึก

ตัวอย่างที่	ชื่อ clone	อาการในมะเขือเทศ	อาการในมะอึก
1	Solanum	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลรูป ใบบิดม้วน เสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ต้นแคระแกร็น ยอดและใบหดลรูป ใบหดย่น ต่าง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ
2	Prayong-17	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลรูป ใบบิดม้วน เสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ไม่แสดงอาการผิดปกติ
3	Sathap	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลรูป ใบบิดม้วน เสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ไม่แสดงอาการผิดปกติ
4	Duenpen	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลรูป ใบบิดม้วน เสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ไม่แสดงอาการผิดปกติ
5	Pinit	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลรูป ใบบิดม้วน เสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ใบย่น หดลรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อน้ำเลี้ยงของพืชเล็กน้อย
6	Prayong-19	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลรูป ใบบิดม้วน เสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ใบย่น หดลรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อน้ำเลี้ยงของพืชเล็กน้อย
7	Supattha	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลรูป ใบบิดม้วน เสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ใบย่น หดลรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อน้ำเลี้ยงของพืชเล็กน้อย
8	Aurai	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลรูป ใบบิดม้วน เสียวรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ใบย่น หดลรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อน้ำเลี้ยงของพืชเล็กน้อย

7. การตรวจตัวอย่างเชื้อไวรัสในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในชั้นละเอียดด้วยเทคนิค RT-PCR

ผลการตรวจสอบตัวอย่างมะเขือเทศที่เก็บจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ที่แม่พันธุ์พันธุ์พ่อแม่ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ และพืชทดสอบทั้งสองชนิด (มะเขือเทศและมะเขือ) ที่ได้รับการปลูกเชื้อ ด้วยเทคนิค RT-PCR พบตัวอย่างพืชทั้ง 8 ตัวอย่างดังกล่าวให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 370 และ 350 เบส (ภาพที่ 7) โดยเป็นแถบขนาด 370 เบส 4 ตัวอย่าง และ 350 เบส 4 ตัวอย่าง



ภาพที่ 7 ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR และ Gel electrophoresis โดยคู่มือโปรแกรม PC-2

M = 100 bps DNA Ladder

1-8 = อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างมะเขือเทศพันธุ์ทั้ง 8 ตัวอย่าง

B = buffer (blank)

8. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โครงสร้างทุติยภูมิ และการจัดกลุ่มของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจได้

8.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากนั้นทำการ cloning ขึ้นดีเอ็นเอทั้ง 8 ตัวอย่างเพื่อเพิ่มปริมาณและนำไปหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า แถบดีเอ็นเอขนาด 370 เบสทั้ง 4 ตัวอย่างเป็นเชื้อ *Cumena latent viroid* (CLVd) และแถบดีเอ็นเอขนาด 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) อยู่ใน ระดับ 96-99 เปอร์เซ็นต์ มีค่า score อยู่ในช่วง 549-634 bits และมีค่า expect value อยู่ในช่วง 4e-153 ถึง 1e-178 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ได้แสดงในภาพที่ 8 ถึง 15 ซึ่งค่าทั้งหมดที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นเชื้อไวรัส CLVd และ PCFVd

(หมายเหตุ: % identity เป็นค่าบอกระดับความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับเชื้อไวรัสจะอยู่ที่ระดับ ตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจึงจะถือว่าเป็นเชื้อไวรัสชนิดเดียวกัน, ค่า score เป็นค่าที่เกิดจากการคำนวณเมทริก ของโปรแกรมซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาเปรียบเทียบ โดยปกติแล้วจะต้องมีค่า มากกว่า 200 bits จึงจะถือว่ามีความน่าเชื่อถือ, และค่า expect value เป็นค่าที่ได้จากการค้นและเปรียบเทียบ ข้อมูลของ GenBank โดยที่ค่า expect value จะเป็นค่าที่บอกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับสิ่งที่เปรียบเทียบมาก น้อยแค่ไหน โดยทั่วไปแล้วจะมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ และหากมีค่าเป็นศูนย์หมายความว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เดียวกัน)

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

```
CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAAGAAAAAAG
AACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGGT
CTTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCAGCAGAAACAGGGTTTTACCC
CTTCCTTTCTTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAGTCTTGACCAGCGCA
GGTTCCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCATACCTCCTTTTTCTTTCAT
TCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCCT
```

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

>gi|432141095|gb|KC143295.1| *Columnea latent viroid clone Prayong-17, complete genome*

```
CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCGAAGAAAAAAGA
ACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGGTCT
TTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCCGCAGAAACAGGGTTTTACCC
TTCTTTCTTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAGTCTTGACCAGCGCAG
GTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCTACCTCCTTTTTCTTCTATCT
AGCTCGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCCT
```

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

>gi|432141091|gb|KC143291.1| *Columnea latent viroid clone Sathap-3, complete genome*

```
CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAAGAAAAAAG
AACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGGT
CTTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCAGCAGAAACAGGGTTTTACCC
CTTCCTTTCTTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAGTCTTGACCAGCGCA
GGTTCCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCTACCTCCTTTTTCTTTCATT
CTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTAGCCCGTGAACCGCAGTTGGTTCCCT
```

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

>gi|333496622|gb|JF742641.1| *Columnea latent viroid clone Duenpen 8, complete genome*
 CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGCTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAAGAAAAAAG
 ATCGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGGT
 CTTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCCGCAGAAACAGGGTTTTTCACC
 CTTCCCTTTCTTCTGGTTTCCTTCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAGTCTTGACCAGCGCA
 GGTTCCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCTACCTCCTTTTTCTTCATT
 CTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTAGCCCTTGGAAGTGCAGTTGGTTCCC

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

>gi|432141105|gb|KC143305.1| *Pepper chat fruit viroid clone Pinit-29, complete genome*
 CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCTCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAAGGG
 GAAGCAAGCATCTCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACAGACCGGGCGGAGAAGCGC
 ACGAGCGGGACCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCCGTTAATCGAGGGTTTTTCACCCTTCCTTT
 CTTTCGGGTTTTCTTCCCTCAGTCGACCGGTCCGCGTCCGGCCTTCTCGCGCACTGCTGTCCGGCT
 ACTACCCGGTGGATAACAACGACAGAGGTGCTTTTTCTTCCACCCGACTTCTACCGACGCGGC
 CGGGAGTGAAGCTACCCGGGACCCGAGAGGATCT

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*
 CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCTCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAAGGG
 GAAGCAAGCATCTCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACAGACCGGGCGGAGAAGCGC
 ACGAGCGGGACCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCAGTAGAAACAGGGTTTTTCACCCTTCCTTT
 CTTTCGGGTTTTCTTCCCTCAGTCGACCGGTCCGCGTCCGGCCTTCTCGCGCACTGCTGTCCGGCT
 ACTACCCGGTGGATAACAACGACAGAGGTGCTTTTTCTTCCACCCGACTTCTACCGACGCGGC
 CGGGAGTGAAGCTACCCGGGACCCGAGAGGATCT

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*
 CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCTCCCCGTAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAAGGG
 GAAGCAAGCATCTCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACAGACCGGGCGGAGAAGCGC
 ACGAGCGGGACCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCAGCAGAAACAGGGTTTTTCACCCTTCCTTT
 CTTTCGGGTTTTCTTCCCTCAGTCGACCGGTCCGCGTCCGGCCTTCTCGCGCACTGCTGTCCGGCT
 ACTACCCGGTGGATAACAACGACAGAGGTGCTTTTTCTTCCACCCGACTTCTACCGACGCGGC
 CGGGAGTGAAGCTACCCGGGACCCGAGAGGATCT

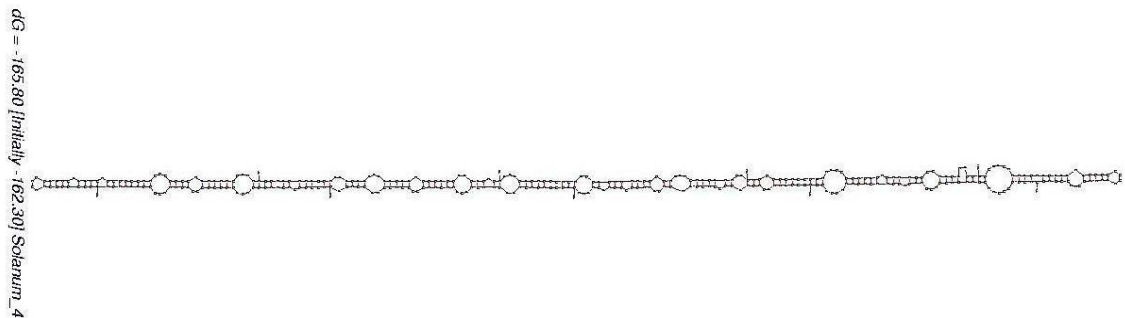
ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* ที่ตรวจพบ (clone Supattha 3)

```
>gi|333496618|gb|JF742637.1| Pepper chat fruit viroid clone Aurai 2, complete genome
CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCTCCCCGACGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAAGGG
GAAGCAAGCATCTCCTGTTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACAGACCGGGCGGAGAAGCGC
ACGAGCGGGACCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCTGTAGAAACAGGGTTTTTCACCCTTCCTTT
CTTCGGGTTTCCTTCCTCAGTCGACCGGTCCGCGTCGGCCTTCTCGCGCACTACTGTCCGGCT
ACTACCCGGTGGATAACAACGACAGAGGTGCTTTTTTCTTCCACCCGACTTCTACCGACGCGGC
CGGGATGAAGCTACCCGGGACCCGAGAGGATCT
```

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

8.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิ

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



ภาพที่ 16 โครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อ CLVd โคลน (clone Solanum 4)

dG = -157.39 [initially -157.20] Duenpen 8



ภาพที่ 17 โครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อ CLVd โคลน (clone Duenpen 8)

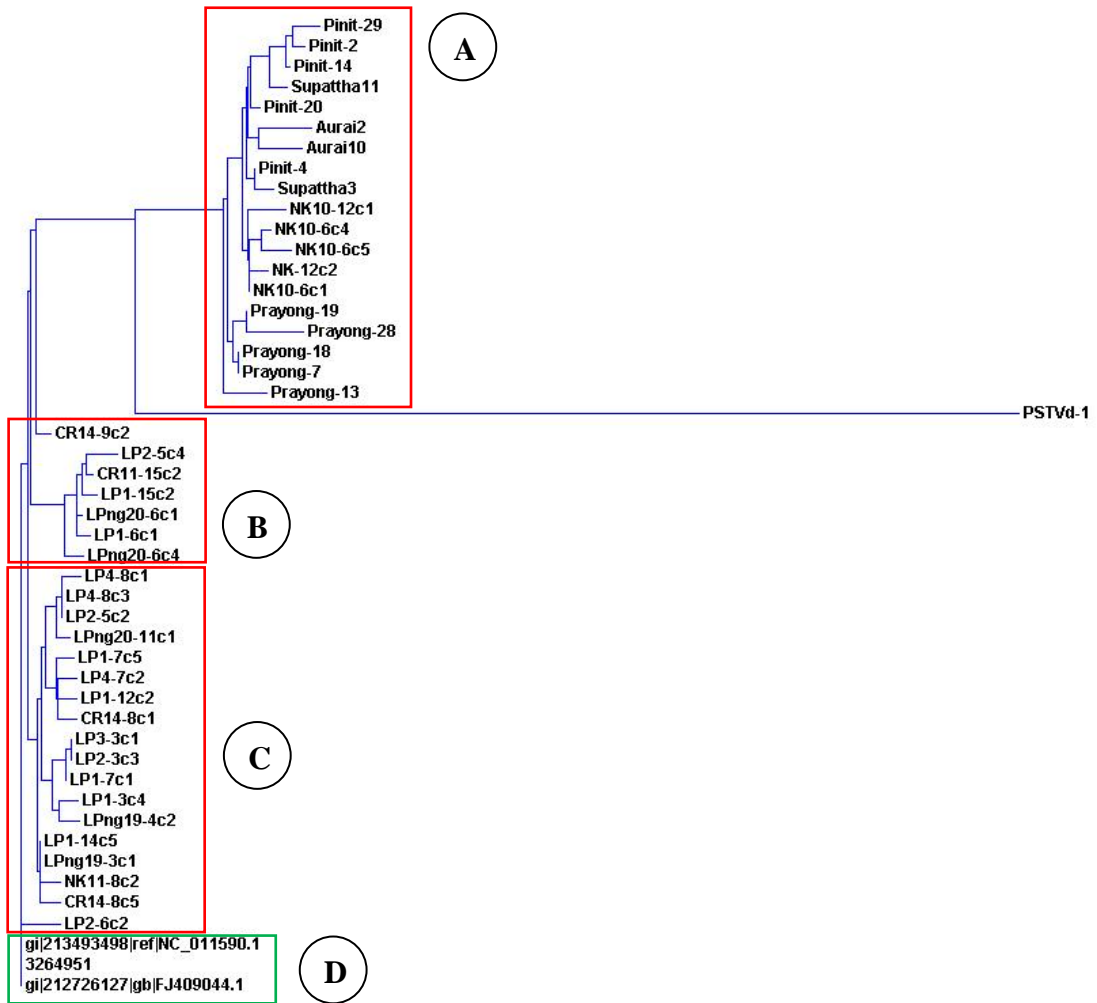
dG = -159.00 [initially -154.00] Aurai 2



ภาพที่ 18 โครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อ CLVd โคลน (clone Aurai 2)

8.3 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Phylogenetic tree)

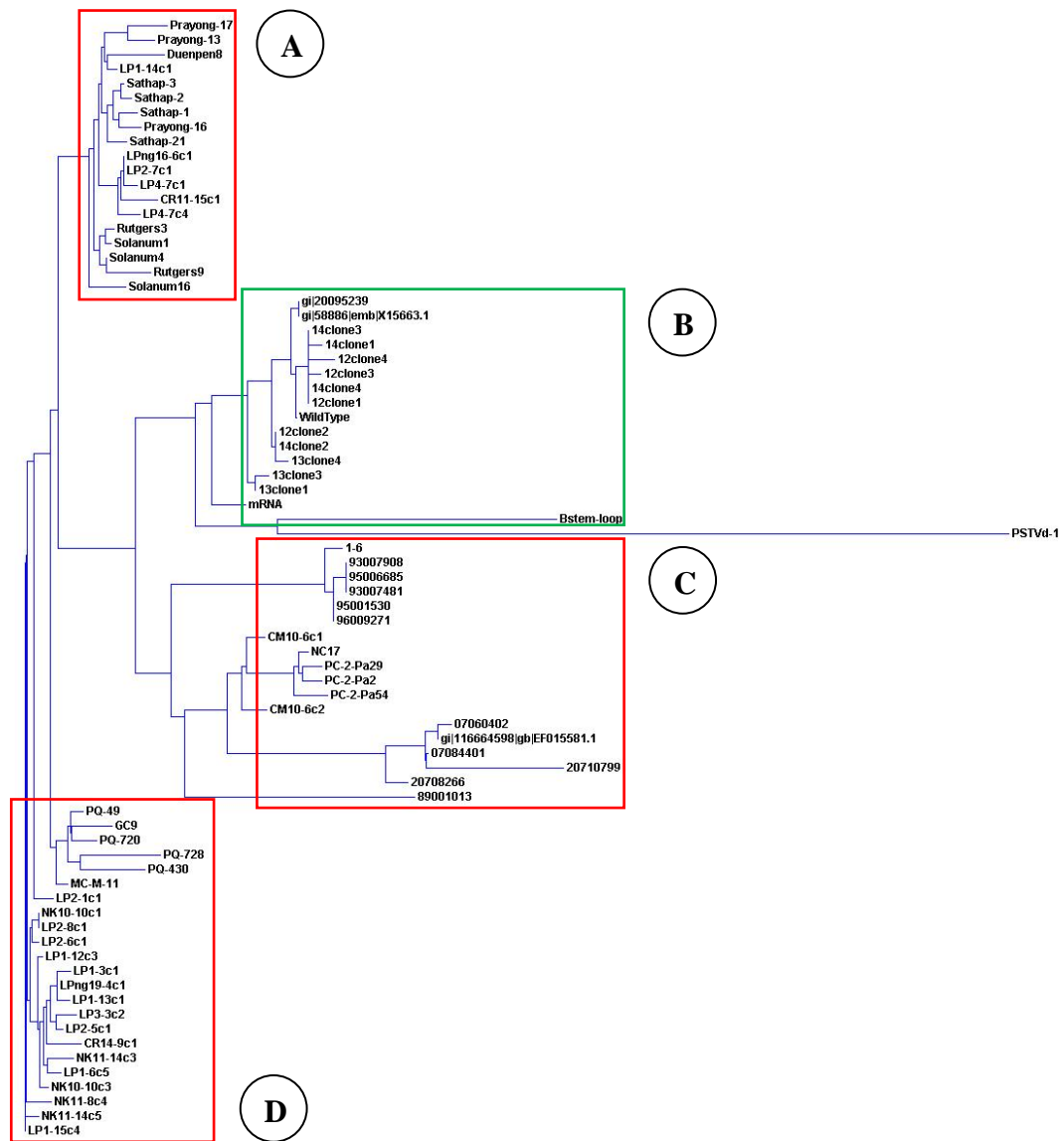
จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด คือ *Columna latent viroid* และ *Pepper chat fruit viroid* ที่มีรายงานทั้งหมดใน NCBI ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) พบว่าสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อ PCFVd ได้เป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 19) และสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อ 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

โดยเชื้อ PCFVd ในกลุ่ม A, B และ C เป็นเชื้อ PCFVd isolate ที่เข้าทำลายมะเขือเทศทั้งหมด ในขณะที่กลุ่ม D เป็นเชื้อ PCFVd isolate ที่เข้าทำลายพริกและ isolate แรกที่มีการค้นพบโดยพบว่าเชื้อ PCFVd ทั้ง 4 โคลนใหม่ จำแนกอยู่ในกลุ่ม A เหมือนกันซึ่งเป็นกลุ่มที่มีรายงานการพบการเข้าทำลายในมะเขือเทศในประเทศไทยในปี 2553 (Reanwarakorn *et al.*, 2011) แต่แตกต่างจากเชื้อ PCFVd ที่มีรายงานในต่างประเทศ (กลุ่ม D) แสดงให้เห็นว่าเชื้อชนิดนี้อาจได้ติดเข้ามากับเมล็ดพ่อแม่พันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้ามาจากต่างประเทศในครั้งแรกในปี 2553 และเชื้อชนิดนี้อาจแพร่กระจายไปในพื้นที่ปลูกในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยแล้ว

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 (ปริเชษฐ, 2548) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม C และแตกต่างจากเชื้อ CLVd ที่มีรายงานตรวจพบในประเทศไทยในปี 2551 (ปริเชษฐ, 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* ใหม่ที่มีความแตกต่างจากชนิดที่ได้มีการรายงานไว้เดิมเนื่องจากมีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดโรคในมะเขือ (*Solanum stramonifolium*) ซึ่งโดยปกติแล้วเชื้อ CLVd จะไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในมะเขือ (latent) ในขณะที่ CLVd isolate solanum จะก่อให้เกิดอาการที่ต้นเตี้ยแคระแกร็นที่รุนแรง อาการยอดและใบด่างและย่นหดลรูป รวมถึงมีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบและกิ่งก้าน (vein necrosis) ถึงแม้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จะมีความแตกต่างกันไม่มากนักก็ตาม

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CLVd-bolo maka มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CLVd ที่มีรายงานว่าไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในมะเขือ [PC-2-Pa2 (DQ022677.1), PQ-728 (DQ923061.1) และ MC-M-11 (AM698095.1)] (ปริเชษฐ, 2548; ปริเชษฐ, 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 ตำแหน่งอยู่บริเวณ 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 ไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในมะเขือแต่อย่างใด ในขณะที่ CLVd-bolo maka ก่อให้เกิดอาการที่รุนแรงในมะเขือ นอกจากนี้การวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ PC-2-Pa2, PQ-728 และ MC-M-11 กับ CLVd-bolo maka ด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ 2 ตำแหน่งเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงตามอาการบนมะเขือ คือที่บริเวณตำแหน่ง 83 และ 292 (มีการเติมเบส A เพิ่มขึ้น 1 เบส ที่ตำแหน่ง 83 และ มีการเปลี่ยนจากเบส A หรือ T เป็นเบส G ที่ตำแหน่ง 292) โดยความแตกต่างดังกล่าวจะแปรผันตามลักษณะอาการที่ปรากฏกับพืชทดสอบ (ภาพ

ที่ 21 และตารางที่ 4) ดังนั้นจึงน่าจะอนุมานได้ว่าตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันบน P domain 2 ตำแหน่งดังกล่าว เป็นส่วนควบคุมความรุนแรงของอาการที่เกิดขึ้นในมะอึ๊ก

Solanum1	CGGAACTAAACTCGTGGTTCCCTGTGGTTACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAGAAAAA	60
Solanum4	CGGAACTAAACTCGTGGTTCCCTGTGGTTACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAGAAAAA	60
Solanum16	CGGAACTAAACTCGTGGTTCCCTGTGGTTACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAGAAAAA	60
PC-2-Pa2	CGGAACTAAACTCGTGGTTCCCTGTGGTTACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAGAAAAA	60
PQ-728	-GGAACTAAACTCGTGGTTCCCTGTGGTTACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAGAAAAA	59
MC-M-11	CGGAACTAAACTCGTGGTTCCCTGTGGTTACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAGAAAAA	60

Solanum1	AAGAACGGGAGGAAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCGGGCAACTCAGACCGAG	120
Solanum4	AAGAACGGGAGGAAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCGGGCAACTCAGACCGAG	120
Solanum16	AAGAACGGGAGGAAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCGGGCAACTCAGACCGAG	120
PC-2-Pa2	A-GAACGGGAGGAAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCGGGCAACTCAGACCGAG	118
PQ-728	AAGAACGGGAGGAAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCGGGCAACTCAGACCGAG	118
MC-M-11	A-GAACGGGAGGAAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCGGGCAACTCAGACCGAG	118

Solanum1	CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCGCAGAAACA	178
Solanum4	CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCGCAGAAACA	178
Solanum16	CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCGCAGAAACA	178
PC-2-Pa2	CGGGGATCGCGGACCGAGGGCGAAGCCTGCTTCAGACAGGAGTAATCCCGCAGAAACA	178
PQ-728	CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGATAGGAGTAATCCCGCAGTAAACA	176
MC-M-11	CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCGCAGTAAACA	176

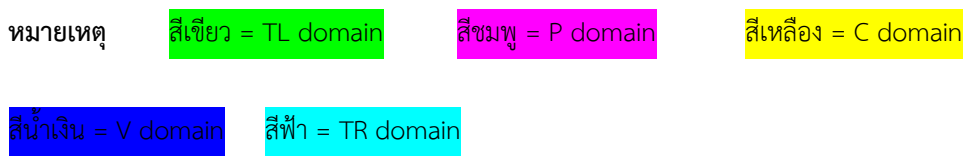
Solanum1	GGGTTTTCACCCCTTCCTTTCTTCTGTGTTCCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG	238
Solanum4	GGGTTTTCACCCCTTCCTTTCTTCTGTGTTCCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG	238
Solanum16	GGGTTTTCACCCCTTCCTTTCTTCTGTGTTCCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG	238
PC-2-Pa2	GGGTTTTCACCCCTTCCTTTCTTCTGTGTTCCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG	236
PQ-728	GGGTTTTCACCCCTTCCTTTCTTCTGTGTTCCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG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

Solanum1	TCTT-GA--CCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCAGTT-CGCTCAAAG-C	293
Solanum4	TCTT-GA--CCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCAGTT-CGCTCAAAG-C	293
Solanum16	TCTT-GA--CCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCAGTT-CGCTCAAAG-C	293
PC-2-Pa2	TCTTCGAATCCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCA-CGCCGAGT--CGCTCAATCG	293
PQ-728	TCTT-GA--CCGCGCAGGGTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCAGTTTCGCTCAAAG-C	292
MC-M-11	TCTT-GA--CCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCAGTTTCGCTCAAAGC	293

Solanum1	CTCA-TCCCTCCTTTTCTTCAATTCTAGCTTGCTCCGGGCGAGGGTGTTCAGCCCTTGG	352
Solanum4	CTCATACCTCCTTTTCTTCAATTCTAGCTTGCTCCGGGCGAGGGTGTTCAGCCCTTGG	353
Solanum16	CTCA-ACCCTCCTTTTCTTCAATTCTAGCTTGCTCCGGGCGAAGGTGTTCAGCCCTTGG	352
PC-2-Pa2	CTCA-ACCCTCCTTTTCTTCA--TTCTAGCTTGCTCCGGGCGAGGGTGTTCAGCCCTTGG	351
PQ-728	CTCA-ATCTCCTTTTCTTCAATTCTAGCTTGCTCCGGGCGAGGGTGTTCAGCCCTTGG	351
MC-M-11	CTCA-ATCTCCTTTTCTTCT-CATTCTAGCTTGCTCCGGGCGAGGGTGTTCAGCCCTTGG	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)



ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละโดเมนของเชื้อ CLVd-bolo maka กับสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดอาการในมะอึ๊ก

โดเมน	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์	% ความเหมือนของเชื้อ CLVd-bolo maka			CLVd สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในมะอึ๊ก
		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

ในปัจจุบันมีรายงานว่าการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์เพียงตัวเดียวก็ส่งผลต่อความรุนแรงของโรคและชนิดของพืชอาศัย (Wassenegger *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไวรอยด์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีอัตราการกลายของสารพันธุกรรมสูงสุด (Gago *et al.*, 2009) ทำให้โอกาสเป็นไปได้ที่จะเกิดเชื้อไวรอยด์ชนิดพันธุ์ใหม่ หรือชนิดพันธุ์เดิมที่มีความรุนแรงของโรคที่เปลี่ยนไป หรือเข้าทำลายพืชอาศัยต่างชนิดจากที่เคยมีรายงานมาได้ อย่างไรก็ตามการพิสูจน์ว่าเบสตำแหน่งที่ 83 และ 292 ซึ่งอยู่บริเวณ P domain มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของอาการโรคของเชื้อ *Columnea latent viroid* จำเป็นต้องมีการศึกษาและทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันข้อสมมุติฐานดังกล่าว (โดยการทำ mutagenesis เปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CLVd) หากตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ตำแหน่งมีบทบาทในเรื่องการควบคุมความรุนแรงของเชื้อ CLVd จริง ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการสร้างความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกในก่อโรคของเชื้อไวรอยด์และอาจนำมาพัฒนาวิธีการควบคุมและป้องกันโรคเชื้อไวรอยด์ดังกล่าวได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการทดลองพบว่ายังมีตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่สุ่มตรวจจากประเทศใดตรวจพบเชื้อ *Cummea latent viroid* จากทั้งการปลูกเพื่อสังเกตอาการ การตรวจด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization และ RT-PCR

ผลจากการสำรวจเชื้อไวรอยต์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ที่ใช้เมล็ดพันธุ์พ่อแม่ที่นำเข้าจากต่างประเทศตรวจพบเชื้อไวรอยต์ 2 ชนิดคือ *Cummea latent viroid* และ *Pepper chat fruit viroid* จำนวนชนิดละ 4 ตัวอย่าง ซึ่งไวรอยต์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทยแล้วในปี 2548 และ 2553 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Cummea latent viroid* strain ใหม่ (CLVd- bolo maka) ที่แตกต่างจากเชื้อ CLVd strain อื่น ๆ ที่เคยมีรายงานมาก่อน โดยก่อให้เกิดอาการรุนแรงในมะเขือ ทำให้เกิดอาการที่ต้นเตี้ยแคระแกร็นที่รุนแรง อาการยอดและใบต่างและย่นหดลรูป และมีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ และกิ่งก้าน

ปัญหาและอุปสรรค

เนื่องจากงานวิจัยเรื่องนี้ไม่ได้รับเงินงบประมาณสนับสนุนงานวิจัยเท่ากับจำนวนที่ขอไว้แต่ต้นคือได้เพียงประมาณ 1๒% ซึ่งในการตรวจติดตามเพื่อสกัดกั้นศัตรูพืชในกลุ่มไวรัสและไวรอยต์ จำเป็นต้องใช้เทคนิควิธีการที่ยุ่ยากซับซ้อนและใช้สารเคมีที่มีราคาแพง และในการตรวจสอบยังต้องการตรวจตัวอย่างในปริมาณมากเนื่องจากเพื่อให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อไวรอยต์ซึ่งมีระดับการปนเปื้อนในเมล็ดในระดับที่ต่ำได้ ซึ่งทำให้จะต้องมีการปรับเปลี่ยนวิธีการในงานทดลองเพื่อให้สอดคล้องกับงบประมาณที่ได้รับและยังสามารถดำเนินการทดลองได้

เอกสารอ้างอิง

- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. การตรวจสอบเชื้อไวรอยต์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2551. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรอยต์กับเมล็ดมะเขือเทศที่เหมาะสมในงานกักกันพืช. เอกสารประกอบการสัมมนาสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์, คณินนิตย์ เจริญวรารกร, เสริมศิริ จันท์เปรม และ รัชณี ฮงประยูร. 2548. โพรเมอร์สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรอยต์ที่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศ 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. Willemen, L.F.F. Kox, R.A. Owens, and J.W. Roenhorst. 2004. Natural Infections of Tomato by *Citrus exocortis viroid*,

Columnnea latent viroid, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. **Eur. J. Plant Pathol.** 110: 823-831.

Wassenegger M., R. L. Speiker, 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.