

เก็บรวบรวมตัวอย่างมะเขือเทศที่แสดงอาการยอดฟุ่มฝอย มีเนื้อเยื่อตายอย่างรุนแรงบนกิ่ง ก้านใบ และเส้นใบ จากแหล่งปลูกต่าง ๆ ในเขตจังหวัดขอนแก่น ตั้งแต่ ปี 2535-2544 จำนวน 7 ตัวอย่าง (BT1/43, BT2/44, BT3/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 และ BS1/35) และเก็บรักษาไว้ในรูปแบบของตัวอย่างแห้ง ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส และใบสดที่ -20 องศาเซลเซียส นำมาตรวจวินิจฉัยสาเหตุของโรคด้วยเทคนิคต่าง ๆ สรุปผลได้ดังนี้ (1) ทุกตัวอย่างยกเว้นตัวอย่าง BT3/44 ให้ผลบวกในการไฮบริดซ์กับ DNA probe ที่จำเพาะกับ citrus exocortis *Pospiviroid* (CEVd) และให้ผลบวกในการตรวจด้วยเทคนิค ELISA เมื่อใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะกับ tomato bushy stunt *Tombusvirus* (TBSV) (2) ไวรัสบริสุทธิ์จากตัวอย่าง BT1/43, BT2/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 และ BS1/35 สามารถทำให้เกิดโรคบนมะเขือเทศได้ โดยมีอาการใบด่างที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อ แล้วตามด้วยอาการเนื้อเยื่อตายตามเส้นใบ กิ่ง และลำต้น ภายใน 20-25 วัน ตรวจพบอนุภาคไวรัสทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 นาโนเมตร เช่นเดียวกับเชื้อไวรัสในจีนัส *Tombusvirus* และไวรัสรูปร่างท่อนตรงขนาด 18 x300 นาโนเมตร คล้ายกับ tobacco mosaic *Tobamovirus* (TMV) ซึ่งลักษณะเหล่านี้ไม่พบในตัวอย่าง BT3/44 ที่เตรียมโดยวิธีการเดียวกัน (3) ส่วน small RNA (450-500 bp) ที่สกัดจากตัวอย่างพืชเป็นโรคทั้งหมดทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศได้ มีอาการโรคยอดฟุ่มฝอยและเนื้อเยื่อตาย เช่นเดียวกับอาการโรคที่พบจากทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษาภายใน 14 วันหลังปลูกเชื้อ (4) จากเทคนิค SDS-PAGE ตรวจพบโปรตีนขนาด 41 kDa และ 17 kDa ใกล้เคียงกับโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสในจีนัส *Tombusvirus* และ TMV ตามลำดับ เฉพาะในต้นพืชเป็นโรคที่ได้จากการปลูกเชื้อด้วยไวรัสบริสุทธิ์ของตัวอย่าง BT1/43, BT2/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 และ BS1/35 ยกเว้น BT3/44 และต้นที่ปลูกเชื้อด้วยส่วน small RNA ของทุกตัวอย่างโรค (4) ตรวจพบ hexagonal inclusion body ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวที่พบในพืชที่เกิดจากเชื้อ TMV เข้าทำลาย โดยพบมากในเซลล์ขนของทุกตัวอย่างที่ปลูกเชื้อด้วยตัวอย่างไวรัสสกัดบริสุทธิ์ ยกเว้นจากตัวอย่าง BT3/44 และตัวอย่างพืชเป็นโรคที่ได้จากการปลูกเชื้อด้วย small RNA จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่าตัวอย่าง BT1/43, BT2/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36, BS1/35 เกิดจากเชื้อ TBSV ร่วมกับไวรอยด์ ส่วนตัวอย่าง BT3/44 เกิดจากไวรอยด์ โดยเชื้อ TMV ที่ตรวจพบไม่ใช่สาเหตุของอาการยอดฟุ่มฝอยและเนื้อเยื่อตายบนมะเขือเทศ แต่อาจเกิดจากการปนเปื้อนในระหว่างทำการทดลอง

นำตัวอย่างไวรอยด์ทั้ง 7 ไอโซเลต ได้แก่ BT1/43, BT2/44, BT3/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 และ BS1/35 มาแยกสกัด small RNA และตัดแยก small RNA ขนาด 450-500 เบส ออกจาก gel แล้วนำมาปลูกเชื้อลงบนมะเขือเทศพันธุ์ สีดา พบว่า small RNA จากทุกตัวอย่างสามารถทำให้เกิดอาการยอดฟุ่มฝอย และเนื้อเยื่อตายบนต้นมะเขือเทศได้ จึงนำตัวอย่างทั้งหมดมาศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาและการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาพบว่าเชื้อไวรอยด์ทั้ง 7 ไอโซเลต มีพีชอาศัยอยู่ในตระกูล *Solanaceae*, *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae* ส่วนตระกูล *Labiatae* ไม่ใช่พีชอาศัยของเชื้อไวรอยด์ทั้ง 7 ไอโซเลต มีความยาวของจีโนม 372, 373, 371, 372, 371, 372 และ 371 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ และระบุได้ว่าเป็น CEVd

T164398

เนื่องจากมีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CEVd มากที่สุดถึง 96.5 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นรายงานการพบเชื้อ CEVd ในมะเขือเทศเป็นครั้งแรกในประเทศไทย

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจเชื้อ CEVd ในมะเขือเทศกับเทคนิค dot blot hybridization พบว่าวิธีการแยกสกัด RNA จากเนื้อเยื่อใบพืชเป็นโรคตามวิธีการดัดแปลงของ Hadidi et al. (1997) เป็นวิธีการที่ดีที่สุด โดยเงื่อนไขการสังเคราะห์ cDNA ที่เหมาะสมคือ มีกรดนิวคลีอิกต้นแบบ 800 นาโนกรัม ใส่ primer CVd (5'-CCCTSAAGRSYYYYYYS-3') จำนวน 100 pmol, MMLV-reverse transcriptase 50U, 10 mM each dNTPs ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำมาสังเคราะห์ ds cDNA โดย PCR โดยมีเงื่อนไขที่เหมาะสมคือ cDNA reaction จำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ primer CVd และ HVd (5'-ATCCCCGGGAAACSTSRAG-3') จำนวนอย่างละ 100 pmol, 200 mM MgCl₂, 20 mM each dNTPs และ *Taq* DNA polymerase จำนวน 2.5 U โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, 48 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ วิธีการนี้สามารถตรวจพบ DNA ของเชื้อ CEVd ขนาด 380 bp ได้จากตัวอย่างพืชทุกแหล่งที่มีเชื้อ CEVd เข้าทำลาย โดยมีความไวในการตรวจสอบหาเชื้อไวรอยต์ได้ในระดับ 800 นาโนกรัม ของ total RNA และมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เทคนิค dot blot hybridization (ใช้ TomVd-BT3 cDNA probe) ถึง 3.5 เท่า ใช้เวลาในการตรวจสอบสั้นกว่า ไม่มีปฏิกิริยาบวกเกิดขึ้นเมื่อตรวจสอบกับตัวอย่างพืชปกติ

Seven samples showing severe necrosis and bunchy top of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (BT1/43, BT2/44, BT3/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 and BS1/35) were collected from Khon Kaen during 1992-2001 and stored as dry materials in 4-10°C and fresh leaves at -20°C. Diagnostic studies were carried out using various techniques. Results revealed as follows. (1) All diseased samples were hybridized with cDNA probe specific for citrus exocortis *Pospiviroid* (CEVd) and positive reacted with antiserum against tomato bushy stunt *Tombusvirus* by ELISA, excluding BT3/44 sample. (2) Virus preparations from BT1/43, BT2/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 and BS1/35, except BT3/44 were infectious on tomato plants, gave the mosaic symptom at 7 days followed by necrosis on veinal leaflet, twig and stem at 20-25 days after inoculation and found the icosahedral virus particles with approximately diameter 30 nm resembled to *Tombusvirus* and rod shape particles with size 18 x 300 nm related to tobacco mosaic *Tobamovirus*(TMV). (3) Small RNA (approximately 450-500 bp) were extracted from disease samples and inoculated on tomato plants. Results showed original disease symptom on tested plants within 14 days after inoculation. (4) Using SDS-PAGE, the 41 kDa and 17 kDa belong to coat protein subunits of *Tombusvirus* and TMV, respectively, were found in protein samples of infected leaves and purified virus preparations of BT1/43, BT2/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 and BS1/35, except BT3/44 sample. (5) The hexagonal inclusion bodies of TMV in hair cells of tomato inoculated with purified preparations of BT1/43, BT2/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 and BS1/35, except BT3/44 sample. This inclusion also did not found in plants inoculated with small RNA of all diseased samples. From all results conclude that the disease sample BT1/43, BT2/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 and BS1/35 were caused by combination of tomato bushy stunt *Tombusvirus* (TBSV) and viroid whereas the sample BT3/44 sample caused by viroid. The TMV was not causal agent of bunchy top with necrosis symptom. It was possibly contaminated during experiment.

The viroid causal agent of BT1/43, BT2/44, BT3/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 and BS1/35 sample was isolated by small RNA extraction/separation technique. The small RNA (450-500 base) from each sample was recovered from gel and mechanically inoculated on tomato "Sida" plants. These small RNAs were infectious and gave the bunchy top with severe necrosis symptoms. Their biological properties and nucleotide sequences were investigated. Results showed that the hosts of viroid isolates were belonged to *Solanaceae*, *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae*. The *Labiatae* was non-host for these viroid isolates. The length of genome was 372, 373, 371, 372, 371, 372 and 371 nucleotides for viroid in BT1/43, BT2/44, BT3/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 and BS1/35, respectively. These viroid isolates can be designated as CEVd variants. They showed 96.5% highly homology with the CEVd sequence. This is the first record of the natural occurrence of a CEVd disease on tomato in Thailand.

The RT-PCR technique for detection of CEVd in tomato was investigated compared with dot blot hybridization technique. The best method for RNA extraction from infected leaf tissue was modified Hadidi et al. (1997)'s method. Optimum condition for cDNA synthesis was 800 ng RNA template, 100 pmol of CVd primer (5'-CCCTSAAGRSYYYYYS-3'), 50 Units of MMLV-reverse transcriptase, 10 mM dNTPs, incubated at 42°C for 2 h. The PCR reaction consisted of 5 µl of first cDNA reaction, 100 pmol of CVd and HVd (5'ATCCCCGGGGAAACSTSRAG-3') primers, 200 mM MgCl₂, 20 mM dNTPs, 2.5 Units of *Taq* DNA polymerase. The PCR protocol was 40 cycles of 95°C for 1 min, 48°C for 1 min and 72°C for 1 min. The 380 bp DNA fragment was successfully obtained from various sources of CEVd infected leaf tissue. The sensitivity of the RT-PCR technique for viroid detection was limited at 800 ng of total RNA template, 3.5 fold higher sensitive than using TomVd-BT3 cDNA probe. Moreover, this RT-PCR technique was rapid time for process and did not show positive reaction with healthy tomato plants.