

เชื้อ *Cummea latent viroid* (CLVd) สายพันธุ์ใหม่ที่ทำให้เกิดอาการรุนแรงในมะอึก  
(*Solanum stramonifolium* Jacq.)

The New Strain of *Cummea latent viroid* (CLVd) Causes Severe Symptoms  
on Bolo Maka (*Solanum stramonifolium* Jacq.)

ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์<sup>1/</sup>

คณินดิษฐ์ เหรียณวารากร<sup>2/</sup>

วิภา เกิดพิพัฒน์<sup>3/</sup>

Parichate Tangkanchanapas<sup>1/</sup>

Kanungnit Reanwarakorn<sup>2/</sup>

Wipa Kirdpipat<sup>3/</sup>

---

**ABSTRACT**

*Cummea latent viroid* (CLVd), one of the smallest plant pathogens consisting of 367-374 nucleotides, is an important plant pathogen in tomato causing stunting, necrosis of leaf veins, petioles, and stem, leaf discoloration, flower dropping, small fruits, as well as death of the whole plant. Nevertheless, it can cause high yield loss in tomato, potato, and pepper crop productions, but causes symptomless on some species of *Solanum* such as eggplant (*Solanum melongena*), and bolo maka (*Solanum stramonifolium*). In 2011, a new strain of CLVd was found inducing severe symptoms in bolo maka such as stunting, apical stunt, rugosity and mosaic of leaves, small lateral leaves, necrosis of leaf veins and petioles. By nucleotide sequence analysis of the new strain and the previously reported CLVds in GenBank, 7-9 different changed bases were shown. In these bases, only two bases at position 83 and 292 that varied by the symptom on bolo maka. Both positions were part of pathogenic domain (P domain) on the new strain which base A was added at the position 83 (base insertion) and base A or T was changed to G (base substitution) at the position 292. Since, the pathogenic domain sequences (nucleotide position 39-91 at

---

<sup>1/</sup> กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขา กรมวิชาการเกษตร กทม.10900

<sup>1/</sup> Plant Virology Section, Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

<sup>2/</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>2/</sup> Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasertsart University, Kamphaeng Saen district, Nakorn Pathom province 73140

<sup>3/</sup> กลุ่มวิจัยกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.10900

<sup>3/</sup> Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

upper P-domain and 277-328 at lower P-domain) have been known as the domain that controls the disease symptoms and virulence on host plants of most viroids. Base on this work, it is possible to assess whether the two positions play the role in the pathogenicity and severity controller of this viroid. This is the first report for CLVd. However, to prove this hypothesis, further study is needed to confirm the assumption.

**Key-words:** *Columnea latent viroid* (CLVd), severe strain, *Solanum stramonifolium* and pathogenic domain

### บทคัดย่อ

เชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) เป็นเชื้อโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุดชนิดหนึ่งมีขนาดตั้งแต่ 367-374 นิวคลีโอไทด์ และเป็นเชื้อสาเหตุโรคสำคัญในมะเขือเทศ ก่อให้เกิดอาการต้นเตี้ย แคระแกร็น เซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านใบ และกิ่ง ใบเหลืองบิดม้วน และมีอาการดอกร่วง ผลที่ได้มีขนาดเล็ก และทำให้พืชตายในที่สุด เชื้อไวรอยด์ชนิดนี้ทำความเสียหายต่อการผลิตมะเขือเทศ มันฝรั่งและพริกอย่างรุนแรง แต่ไม่แสดงอาการผิดปกติกับพืชสกุล *Solanum* บางชนิด เช่น มะเขือเปราะ (*Solanum melongena*) และมะเขือ (*Solanum stramonifolium*) จากการตรวจสอบเชื้อ CLVd ในปี พ.ศ. 2554 พบ

สายพันธุ์ใหม่ซึ่งสามารถก่อให้เกิดอาการที่รุนแรงในมะเขือได้ โดยทำให้เกิดอาการต้นเตี้ย แคระแกร็น ยอดและใบหดลรูป ใบมีอาการต่าง เนื้อใบหดย่น ใบข้างมีขนาดเล็ก และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบและก้านใบ เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบระหว่างเชื้อ CLVd สายพันธุ์ใหม่ และสายพันธุ์ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ใน GenBank พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 7 - 9 เบส โดยมีเพียง 2 เบสที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะอาการที่เกิดบนมะเขือ คือที่ตำแหน่ง 83 และ 292 บน pathogenic domain (P domain) โดยเกิดการเติมเบส A ที่ตำแหน่ง 83 (base insertion) และเกิดการแทนที่เบสจากเบส A หรือ T เป็น G ที่ตำแหน่ง 292 (base substitution) ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้ระบุว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ P domain (ตำแหน่ง 39 - 91 ที่บริเวณ upper P domain และ 277 - 328 ที่บริเวณ lower P domain) มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการแสดงอาการและความรุนแรงของโรค ทำให้สามารถประเมินได้ว่าเบสทั้ง 2 ตำแหน่งดังกล่าวมีส่วนในการควบคุมความรุนแรงของเชื้อไวรอยด์ดังกล่าว ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรกสำหรับเชื้อ CLVd แต่อย่างไรก็ตามการที่ยืนยันข้อสันนิษฐานดังกล่าวจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม

**คำหลัก:** *Columnea latent viroid* (CLVd) สายพันธุ์รุนแรง มะเขือ และ pathogenic domain

## คำนำ

*Columnea latent viroid* (CLVd) เป็นเชื้อไวรอยด์ในวงศ์ Pospiviroidae ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ มันฝรั่ง พริก ยาสูบ แตงกวา ต้นลิปสติก (*Columnea erythrophea*) และพืชในสกุล *Solanum* อื่นอีกหลายชนิด เชื้อชนิดนี้ถูกพบครั้งแรกโดยการนำสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากใบของต้นลิปสติก ซึ่งไม่แสดงอาการผิดปกติ ถูกนำมาปลูกถ่ายเชืบบนมะเขือเทศสายพันธุ์ Rutgers โดยสามารถถ่ายทอดโรคและแสดงอาการผิดปกติบนมะเขือเทศ คล้ายกับลักษณะอาการที่เกิดจากเชื้อ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (Owen et al., 1978) เชื้อ CLVd ก่อให้เกิดความเสียหายกับมะเขือเทศอย่างรุนแรง ทำให้ต้นเตี้ยแคระแกร็น ใบเหลืองบิดม้วนและมีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านใบและกิ่ง ดอกร่วง ผลที่ได้มีขนาดเล็ก (ปริเชษฐ์, 2548) ทำให้ผลผลิตมะเขือเทศลดลงถึง 49% (ศศิประภา, 2551) และทำให้พืชตายในที่สุด แต่ไม่ทำให้เกิดอาการผิดปกติในมะเขือเปราะ (*Solanum melongena* Jacq.) และมะอึ๊ก (*Solanum stramonifolium* Jacq.) (ปริเชษฐ์, 2551) ในขณะที่เชื้อชนิดนี้ก่อให้เกิดอาการหัวมันฝรั่งบิดม้วนเป็นกระสวยคล้ายกับเชื้อ PSTVd (Owen et al., 1978; Hammond et al., 1989) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อชนิดนี้สามารถเข้าทำลายพริกเผ็ดได้ โดยทำให้เกิดอาการต้นโทรมแคระแกร็น ใบเหลืองบิดม้วนและมีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบและก้านใบ (ปริเชษฐ์, 2548) เชื้อ

ชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศได้ถึง 30% (ศศิประภา, 2551; Matthews-Berry, 2010) และสามารถแพร่กระจายโรคผ่านทางอุปกรณ์เกษตรกรที่ปนเปื้อนได้ง่าย

ไวรอยด์เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุด มีขนาดตั้งแต่ 246 – 463 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยเส้นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นวงปิด ไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม และไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ ซึ่งแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยปกติแล้วไวรอยด์ในวงศ์ Pospiviroidae อยู่ในสภาพโครงสร้างทุติยภูมิที่มีลักษณะเป็น rod-shape ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เสถียรมากที่สุด (Diener, 1987) ไวรอยด์เป็นเชื้อปรสิตถาวร (obligate parasite) ที่อาศัยโปรตีนและสารเคมีต่าง ๆ จากพืชในการเพิ่มปริมาณ การเคลื่อนย้าย และการทำให้อาการผิดปกติในพืช โครงสร้างของเชื้อไวรอยด์ในวงศ์ Pospiviroidae ประกอบไปด้วย 5 domain ได้แก่ conserved central domain (C domain) เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณของไวรอยด์ (Baumstank and Riesner, 1995) และการควบคุมความรุนแรงของโรคในเชื้อ PSTVd ด้วย (Qi and Ding, 2003) pathogenic domain (P domain) มีบทบาทเกี่ยวกับกลไกการเกิดโรค รวมถึงการควบคุมความรุนแรงของโรค (Keese and Symons, 1987), variable domain (V domain) เป็นบริเวณที่มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุด (Diener, 1987) และ terminal domain (T domains) เป็นบริเวณ

ปลายทั้ง 2 ด้านของโครงสร้างเชื้อไวรัสมีลักษณะเป็นเบสอนุภาคในไวรัสกลุ่ม PSTVd (Keese and Symons, 1987) มีหน้าที่ควบคุมการเพิ่มปริมาณของเชื้อและความรุนแรงของอาการโรค (Sano et al., 1992) ความรุนแรงของโรคมิตั้งแต่ไม่แสดงอาการใด ๆ จนถึงระดับที่ทำให้พืชอาศัยตายได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อไวรัสและชนิดของพืชอาศัย (Schnlizer et al., 1985; Owens, 1990; Owens et al., 1991, 1995, 1996, Hammond, 1992; de la Pea et al., 1999; Skori et al., 2001) ปัจจุบันทั่วโลกในการก่อให้เกิดโรคและความรุนแรงของอาการยังไม่เป็นที่กระจ่างนัก มีสมมติฐานที่มาอธิบายหลายข้อด้วยกัน เช่น ในการทดลองของ Schmitz และ Riesner (1998) พบว่าการที่มุมโค้งงอของโครงสร้างทุติยภูมิที่ตำแหน่ง 50 และ 310 บริเวณ P domain มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของเชื้อ PSTVd ในขณะที่ Qi, และ Ding (2003) รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 257 และ 259 บริเวณ loop E ซึ่งอยู่บน C domain มีผลต่อระดับความรุนแรงของเชื้อ PSTVd โดยไม่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้อ จากการสำรวจในปี พ.ศ. 2554 พบเชื้อ CLVd สายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดอาการรุนแรงในมะเขือซึ่งแตกต่างจากเชื้อ CLVd สายพันธุ์อื่นที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ ในขณะที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปของเชื้อ CLVd กับลักษณะความรุนแรงของโรคที่เกิดบนมะเขือ

จึงเป็นเรื่องน่าสนใจที่ต้องพิสูจน์ โดยในการทดลองนี้ได้ตั้งชื่อเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวตามพืชอาศัยที่ตรวจพบว่า CLVd-bolo maka

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การถ่ายทอดเชื้อด้วยวิธีกลและลักษณะอาการ (Mechanical transmission and symptom)

สำรวจและเก็บตัวอย่างมะเขือเทศมะเขือชนิดต่าง ๆ และมะเขือ ในพื้นที่แปลงผลิตจ.สกลนคร ขอนแก่น อุตรธานี มุกดาหาร กาฬสินธุ์และมหาสารคาม ที่แสดงอาการผิดปกติคล้ายคลึงกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสคือมีอาการเซลล์ตาย (necrosis) ที่บริเวณใบก้านใบและกิ่ง ยอดสั้น ใบหดลรูป มาบดละเอียดในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9.0 ความเข้มข้น 0.1 M ในอัตราส่วนใบพืชต่อบัฟเฟอร์ 1:5 จากนั้นผสมผง carborundum และปลูกเชื้อ (inoculation) ลงบนใบพืชทดสอบ 2 ชนิด คือ มะเขือเทศพันธุ์ Rutgers (*Solanum lycopersicum* Rutgers) และมะเขือ ในระยะสร้างใบจริง 2 คู่ ตรวจสอบอาการโรคหลังปลูกเชื้อไปแล้วประมาณ 2-4 สัปดาห์

### 2. การตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธีการ Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ: สกัดอาร์เอ็นเอจากใบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers และมะเขือที่แสดงอาการของโรคหลังได้รับการปลูกเชื้อด้วย

วิธี CTAB method (ปริเชษฐ์, 2548) โดยบดตัวอย่างพืช 100 มก. เติม CTAB extraction buffer (2 % CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0 %  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  และ 2.0 % PVP-40 โดย  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  และ PVP-40 เติมก่อนใช้) ปริมาตร 1 มล. บ่มที่ 65°ซ เป็นเวลา 30 นาที บั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl acetate (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน บั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl acetate (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน บั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบน เติม 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตรหนึ่งเท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ -20°ซ. ซ้ำมคืน นำไปบั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วย TE buffer ที่มี 1 % SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol ที่แช่เย็น 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนกรดนิวคลีอิกด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บั่นตกตะกอน

ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ไม่มี nuclease ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป

## 2.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อไวรอยด์:

ตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยไพรเมอร์ PC2 (cPC2: TGT-TTC-WRC-DGG-GAT-TAC-TCC-TG และ hPC2: GGG-TTT-TCA-CCC-TTC-CTT-TC) (ปริเชษฐ์, 2548) ซึ่งจำเพาะกับเชื้อ 7 ชนิดคือ *Columnea latent viroid* (CLVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), *Mexican papita viroid* (MPVd), *Tomato planta macho viroid* (TPMVd), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) และ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) และตรวจสอบ NAD gene ของพืชซึ่งใช้เป็น internal control ด้วยไพรเมอร์ NAD (Nad2.1a: GGA-CTC-CTG-ACG-TAT-ACG-AAG-GAT-C และ Nad2.2b: AGC-AAT-GAG-ATT-CCC-CAA-TAT-CAT) (Thompson et al., 2003) โดยไพรเมอร์ PC2 จะให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณตั้งแต่ 350 - 370 เบส และไพรเมอร์ NAD จะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 188 เบส

## 2.3 การตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-

**PCR:** ตรวจสอบอาร์เอ็นเอตัวอย่างพืชเพื่อหาเชื้อไวรอยด์ด้วยปฏิกิริยา One-Step RT-PCR (Invitrogen) โดยการผสมกรดนิวคลีอิกที่สกัด

จากพืชทดสอบ 2 ไมโครลิตร กับไพรเมอร์ PC2 (2 mM) ปริมาตรเส้นละ 2 ไมโครลิตร 2X Reaction mix buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร น้ำกลั่นหนึ่งขวด ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร และเอ็นไซม์ SuperScript™ III RT / Platinum® taq mix ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 48°ซ. เป็นเวลา 45 นาที จำนวน 1 รอบ 94°ซ. เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation temperature 94°ซ เป็นเวลา 45 วินาที annealing temperature 56°ซ. เป็นเวลา 45 วินาที extension temperature 72 °ซ. เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72 °ซ. เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ 5 ไมโครลิตร ตรวจสอบด้วย gel electrophoresis ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยใช้ agarose gel เข้มข้น 2.0 % และย้อม gel ด้วย ethidium bromide

### 3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้ เชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy (Promega) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ โคลนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Library efficiency DH5a competent cells (invitrogen) โดยใช้วิธีการ Heat shock transformation (Fristch *et al.*, 2001) จากนั้นตรวจสอบ clone ที่ได้และสกัดพลาสมิดด้วยวิธีการ Small-scale boiling lysis method (Sambrook and Russell,

2001) และส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบ โปรแกรม ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสที่ต่างกันของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบเทียบกับไวรัสชนิดต่าง ๆ ที่มีรายงาน และ mfold RNA-Folding-Form (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) เพื่อวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อไวรัส

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. การถ่ายทอดเชื้อด้วยวิธีกลและลักษณะอาการ (Mechanical transmission and symptom)

การทดสอบคุณสมบัติการถ่ายทอดโรคกับพืชทดสอบ พบว่าตัวอย่างมะอึ๊กที่เก็บได้จากแปลงสวนครัว บริเวณสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ทำให้พืชทดสอบทั้ง 2 ชนิดเกิดอาการผิดปกติ คือทำให้มะอึ๊กเทศพันธุ์ Rutgers เกิดอาการลำต้นแคระแกร็นอย่างรุนแรง ก้านใบและยอดหดสั้น ใบหด ลดรูป และบิดม้วนเสียรูปทรง และมีลักษณะอาการเซลล์ตาย (necrosis) ที่บริเวณเส้นใบ กิ่งและก้านใบ (Figure 1) ซึ่งเป็นลักษณะอาการที่จำเพาะของเชื้อไวรัส และสามารถก่อให้เกิดอาการผิดปกติที่รุนแรงในมะอึ๊กได้ โดยมีอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ยอดและใบหดลดรูป ใบ มี

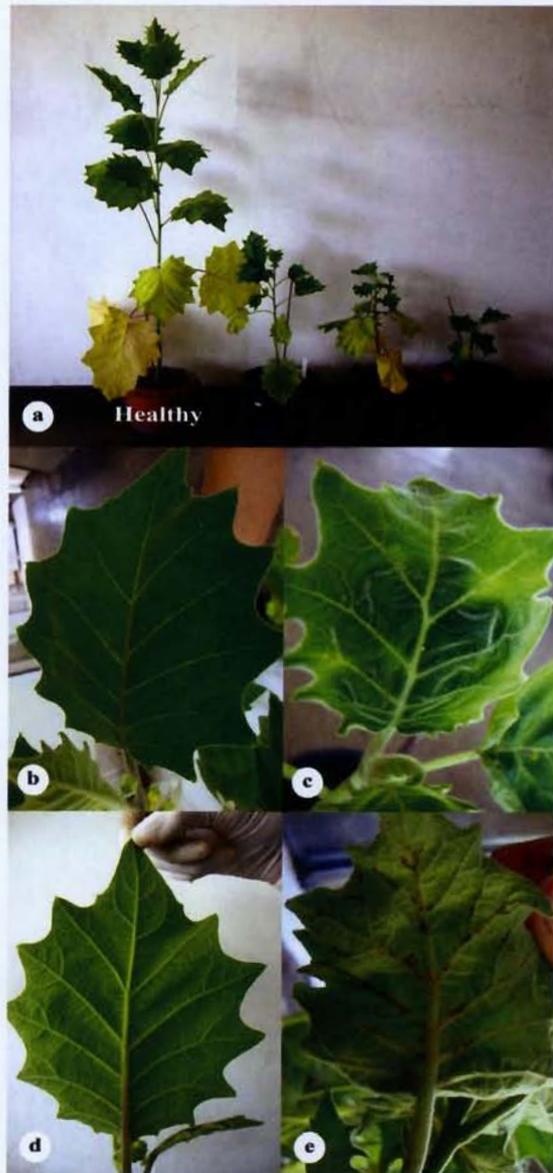


**Figure 1.** Symptom appearing on infected tomato var. Rutgers after mechanical transmission of CLVd-bolo maka isolate: a) stem stunting, b) rugosity and chlorosis of leaves, c) necrosis of leaf veins and petioles.



**Figure 3.** Symptoms on bolo maka: stunting, rugosity and small lateral leaves

อาการต่าง เนื้อใบหดย่น และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ (Figure 2) และใบข้างที่สร้างใหม่จะมีขนาดเล็ก และมีอาการเนื้อใบหดย่น (Figure 3) ซึ่งต่างจากเชื้อ CLVd ที่จะไม่แสดงอาการผิดปกติ (latent) กับมะอึ๊ก (Figure 4) และในปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่ามีเชื้อไวรัสชนิดที่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในพืชกลุ่มมะอึ๊กได้



**Figure 2.** Symptoms of infected bolo maka after CLVd-bolo maka inoculation: a) comparison of plant height between healthy one (left side) and infected ones (three on right side), b) upper healthy leaf, c) upper infected leaf showing rugosity and chlorosis, d) under healthy leaf and e) lower infected leaf showing vein necrosis



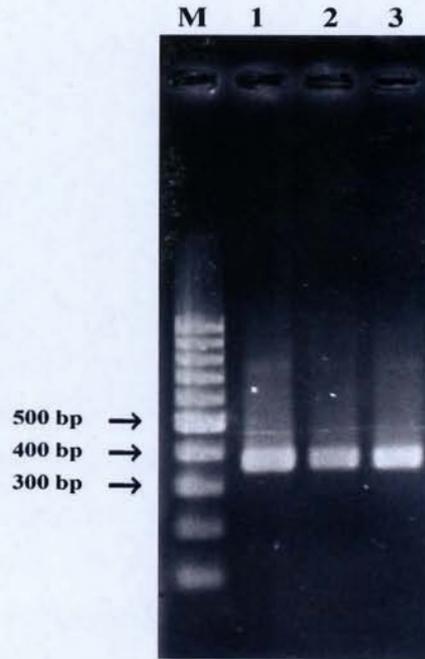
**Figure 4.** Symptom comparisons on bolo maka after inoculation of CLVd original isolate: a) comparison of symptom between CLVd-bolo maka (right side) and CLVd original isolate (left side), b) latent symptom of CLVd original isolate, c) apical stunt, rugosity and vein necrosis of CLVd-bolo maka

## 2. การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากพืชทดสอบทั้ง 2 ชนิด ที่แสดงอาการผิดปกติด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 370 คู่เบส (Figure 5) ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัส

## 3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส

เมื่อนำผลผลิต RT-PCR ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีขนาดตั้งแต่ 369-370 นิวคลีโอไทด์ (Figure 6) เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้ง 3 โคลน [Solanum 1 (JF742632.1), Solanum 4 (JF742633.1)



**Figure 5.** Electrophoretic analysis of DNA bands (around 370 base pairs), by RT-PCR of CLVd-bolo maka isolates with PC2 primers, 1) bolo maka sample, 2) CLVd-bolo maka infected bolo maka plant and 3) CLVd-bolo maka infected tomato plant

และ Solanum 16 (JF742634.1)] มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ *Columnea latent viroid isolate* MC-M-11 และ PQ-49 (Accession number AM698095 และ DQ923058 ตามลำดับ) โดยมีค่า score อยู่ในช่วง 625-638 bits มีค่า expected value อยู่ระหว่าง  $7e-176$  ถึง  $9e-180$  และมีค่า identities 98% ซึ่งยืนยันว่าเป็นเชื้อ CLVd ซึ่งในการทดลองนี้ได้ตั้งชื่อเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวตามพืชอาศัยที่ตรวจพบว่า CLVd-bolo maka

(หมายเหตุ: % identity เป็นค่าบอกระดับความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับเชื้อไวรอยด์จะอยู่ที่ระดับตั้งแต่ 90% ขึ้นไปจึงนับว่าเป็นเชื้อไวรอยด์ชนิดเดียวกัน ค่า score เป็นค่าที่เกิดจากการคำนวณเมทริกของโปรแกรม ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาเปรียบเทียบ โดยปกติแล้วต้องมีค่ามากกว่า 200 bits จึงนับว่ามีความน่าเชื่อถือ และค่า expected value เป็นค่าที่ได้จากการค้นและเปรียบเทียบข้อมูลของ GenBank โดยที่ค่า expected value เป็นค่าที่บอกว่าลำดับนิวคลีโอ

ไทด์ตรงกับสิ่งที่เปรียบเทียบมากน้อยแค่ไหน โดยทั่วไปแล้วจะมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ และหากมีค่าเป็นศูนย์หมายความว่า เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เดียวกัน)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CLVd-bolo maka มาวิเคราะห์ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW2 โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CLVd ที่มีรายงานว่าไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในมะอึก [PC-2-Pa2 (DQ022677.1), PQ-728 (DQ923061.1) และ MC-M-11

```

Solanum_1      CGGAACFAAACTCGTGGTTCTGTGGTTCACACCTGACCCATGCAGCCATGCAAAGAAAAA 60
Solanum_4      CGGAACFAAACTCGTGGTTCTGTGGTTCACACCTGACCCATGCAGCCATGCAAAGAAAAA 60
Solanum_16     CGGAACFAAACTCGTGGTTCTGTGGTTCACACCTGACCCATGCAGCCATGCAAAGAAAAA 60
*****

Solanum_1      AAGAACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCGGGGCAACTCAGACCGAG 120
Solanum_4      AAGAACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCGGGGCAACTCAGACCGAG 120
Solanum_16     AAGAACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCGGGGCAACTCAGACCGAG 120
*****

Solanum_1      CGGGGTCTTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCCGAGAAACAGG 180
Solanum_4      CGGGGTCTTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCCGAGAAACAGG 180
Solanum_16     CGGGGTCTTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCCGAGAAACAGG 180
*****

Solanum_1      GTTTTACCCCTTCCTTTCTTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAGTC 240
Solanum_4      GTTTTACCCCTTCCTTTCTTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAGTC 240
Solanum_16     GTTTTACCCCTTCCTTTCTTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAGTC 240
*****

Solanum_1      TTGACCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCAT-C 299
Solanum_4      TTGACCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCATAC 300
Solanum_16     TTGACCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCAA-C 299
*****

Solanum_1      CTCCTTTTCTTCATTCATGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTGTTAGCCCTTGGAAACCGCA 359
Solanum_4      CTCCTTTTCTTCATTCATGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTGTTAGCCCTTGGAAACCGCA 360
Solanum_16     CTCCTTTTCTTCATTCATGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTGTTAGCCCTTGGAAACCGCA 359
*****

Solanum_1      GTTGGTTCCT 369
Solanum_4      GTTGGTTCCT 370
Solanum_16     GTTGGTTCCT 369
*****

```

**Figure 6.** Sequence comparison of CLVd-bolo maka isolates (Solanum1, Solanum 4 and Solanum 16)

(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 (Figure 7) ซึ่งทั้ง MC-M-11, PQ-728 และ PC-2-Pa2 ไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในมะอึกแต่อย่างใด ในขณะที่ CLVd-bolo maka ก่อให้เกิดอาการที่รุนแรงในมะอึก นอกจากนี้การวิเคราะห์เปรียบเทียบ multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อ PC-2-Pa2, PQ-728 และ MC-M-11 กับ CLVd-bolo maka ด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ 2 ตำแหน่งเท่านั้น ที่มีการเปลี่ยนแปลงตามลักษณะอาการที่ปรากฏบนมะอึก คือที่บริเวณตำแหน่ง 83 และ

292 (มีการเติมเบส A เพิ่มขึ้น 1 เบส ที่ตำแหน่ง 83 และ มีการเปลี่ยนจากเบส A หรือ T เป็นเบส G ที่ตำแหน่ง 292) โดยความแตกต่างดังกล่าวจะแปรผันตามลักษณะอาการที่ปรากฏกับพืชทดสอบ (Figure 7 and Table 1) ดังนั้นจึงน่าจะอนุมานได้ว่าตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันบน P domain 2 ตำแหน่งดังกล่าว เป็นส่วนควบคุมความรุนแรงของอาการที่เกิดขึ้นในมะอึก

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CLVd-bolo maka และสายพันธุ์อื่น ๆ มาวิเคราะห์เปรียบเทียบโครงสร้างทุติยภูมิที่บริเวณ P domain ด้วยโปรแกรม mfold RNA-Folding-Form ได้โครงสร้างทุติยภูมิเป็นแท่ง (rod-like secondary structure) และบริเวณตำแหน่ง 83 และ 292 (บริเวณ P domain) เป็นจุดที่เกิด internal loop ซึ่งใกล้เคียงกับตำแหน่งควบคุมความรุนแรงโรคของเชื้อ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) บน stem loop ที่ตำแหน่ง 50 และ 310 (Schmitz and Riesner, 1998) โดยมี internal loop อีกวงอยู่ถัดไปทางขวา 9 นิวคลีโอไทด์ ในขณะที่ PC-Pa-2 เกิด internal loop ที่มีขนาดเล็กกว่า และมี internal loop อีกวงอยู่ถัดไปทางขวา 10 นิวคลีโอไทด์ ในขณะที่ PQ-728 และ MC-M-11 มี internal loop ที่ตำแหน่ง 83 และ 292 เช่นกัน แต่มี internal loop อีกสองวงอยู่ถัดไปทางขวา 5 นิวคลีโอไทด์ (Figure 8) แสดงว่าโครงสร้างทุติยภูมิที่แตกต่างกันของเชื้อ CLVd แต่ละ isolate

ปัจจุบันพบว่าการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เพียงตัวเดียว ก็ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค

Solanum1	CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAGAAAAA	60
Solanum4	CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAGAAAAA	60
Solanum16	CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAGAAAAA	60
PC-2-Pa2	CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAGAAAAA	60
PQ-728	-GGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAGAAAAA	59
MC-M-11	CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAGAAAAA	60
<hr/>		
Solanum1	AAGAACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG	120
Solanum4	AAGAACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG	120
Solanum16	AAGAACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG	120
PC-2-Pa2	A-GAACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG	118
PQ-728	AAGAACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG	118
MC-M-11	A-GAACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG	118
<hr/>		
Solanum1	CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCGCAGAAACA	178
Solanum4	CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCGCAGAAACA	178
Solanum16	CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCGCAGAAACA	178
PC-2-Pa2	CGGGGATCGCGGACCGAGGGCGGAAGCCTGCTTCAGACAGGAGTAATCCCGCAGAAACA	178
PQ-728	CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGATAGGAGTAATCCCGCAGAAACA	176
MC-M-11	CGGGG-TCTTG-ACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCCGCAGAAACA	176
<hr/>		
Solanum1	GGGTTTTACCCCTTCCTTCTTCTGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG	238
Solanum4	GGGTTTTACCCCTTCCTTCTTCTGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG	238
Solanum16	GGGTTTTACCCCTTCCTTCTTCTGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG	238
PC-2-Pa2	GGGTTTTACCCCTTCCTTCTTCTGTTTCCTTCCTTCCTCTGCTT--CGGGCTCGCCCGGAG	236
PQ-728	GGGTTTTACCCCTTCCTTCTTCTGTTTCCTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG	236
MC-M-11	GGGTTTTACCCCTTCCTTCTTCTGTTTCCTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAG	236
<hr/>		
Solanum1	TCTT-GA--CCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCAGTT-CGCTCAAG-C	293
Solanum4	TCTT-GA--CCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCAGTT-CGCTCAAG-C	293
Solanum16	TCTT-GA--CCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCAGTT-CGCTCAAG-C	293
PC-2-Pa2	TCTTCGAATCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCA-CGCGAGT--CGCTCACTGC	293
PQ-728	TCTT-GA--CCGGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCAGTTTCGCTCAA-C	292
MC-M-11	TCTT-GA--CCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCAGTTTCGCTCAAAGC	293
<hr/>		
Solanum1	CTCA-TCCTCCTTTTCTTCATTCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGG	352
Solanum4	CTCATACTCCTTTTCTTCATTCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGG	353
Solanum16	CTCA-ACCTCCTTTTCTTCATTCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAAGGTGTTTAGCCCTTGG	352
PC-2-Pa2	CTCA-ACCTCCTTTTCTTAC-TTCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTCAGCCCTTGG	351
PQ-728	CTCA-ATCTCCTTTTCTTCATTCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTCAGCCCTTGG	351
MC-M-11	CTCA-ATCTCCTTTTCT-CATTCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGG	351
<hr/>		
Solanum1	AACCGCAGTTGGTTCCT-	369
Solanum4	AACCGCAGTTGGTTCCT-	370
Solanum16	AACCGCAGTTGGTTCCT-	369
PC-2-Pa2	AACCGCAGTTGGTTCCT-	368
PQ-728	AACCGCAGTTGGTTCCTC	369
MC-M-11	AACCGCAGTTGGTTCCT-	368

**Figure 7.** Sequence comparison of CLVd-bolo maka isolates (Solanum1, Solanum 4 and Solanum 16) and other CLVd isolates (PC-2-Pa2, PQ-728, and MC-M-11). Colour underlined sequences was mean viroid domains. (green = TL domain, pink = P domain, yellow = C domain, dark blue = V domain, and light blue = TR domain)

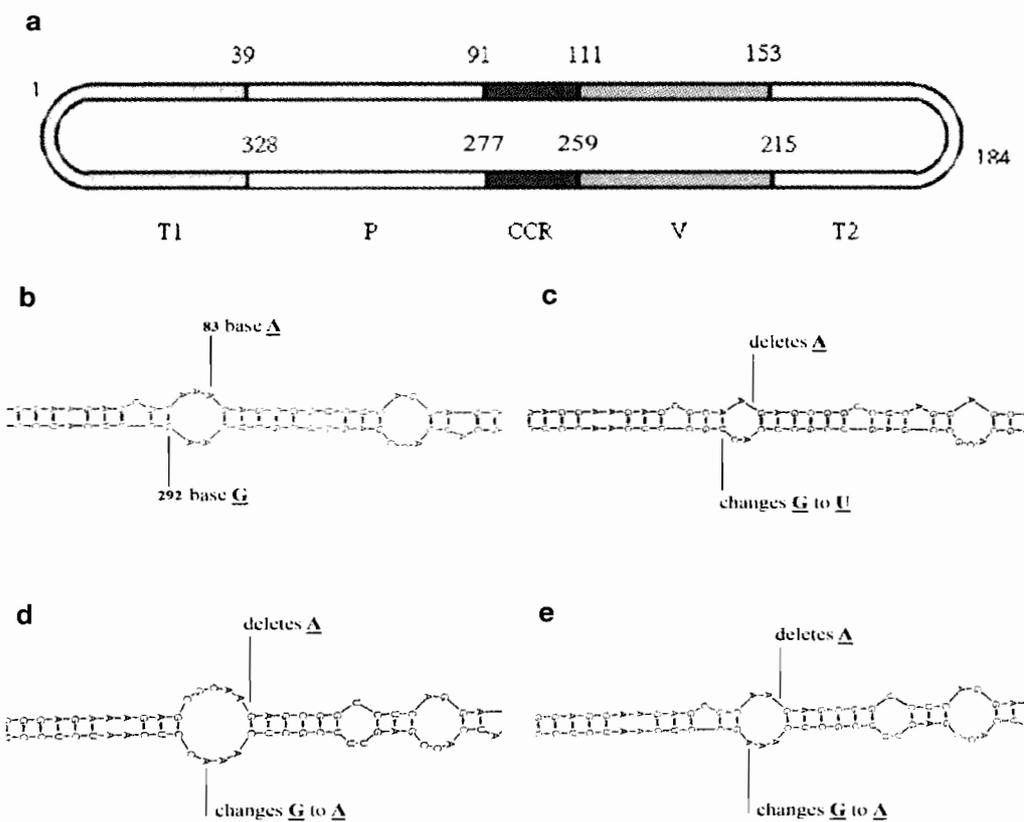
**Table 1.** Domain sequence comparison of CLVd-bolo maka isolate and other CLVd latent symptom isolates (PC-2-Pa2, PQ-728, and MC-M-11)

Domain	Sequence position	Identity of CLVd-bolo maka (%)			CLVd latent symptom isolates
		Solanum 1	Solanum 4	Solanum 16	
Left terminal domain	329 - 39	96	96	95	PQ-728
	(79 base)	98	98	97	PC-2-Pa2
		100	100	98	MC-M-11
Upper pathogenic domain	40 - 91	96	96	96	PQ-728
	(51-54 base)	100	100	100	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Upper central domain	92 - 110	100	100	100	PQ-728
	(19 base)	100	100	100	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Upper variable domain	111 - 153	100	100	100	PQ-728
	(41-43 base)	68	68	68	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Right terminal domain	154 - 215	95	97	95	PQ-728
	(62 base)	98	96	93	PC-2-Pa2
		96	98	96	MC-M-11
Lower variable domain	216 - 259	93	93	93	PQ-728
	(43-44 base)	90	90	90	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Lower central domain	260 - 276	100	100	100	PQ-728
	(14-17 base)	100	100	100	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Lower pathogenic domain	278 - 328	92	92	95	PQ-728
	(54-56 base)	88	80	90	PC-2-Pa2
		94	85	96	MC-M-11

**Remarks:** The accession number of each CLVd isolate: Solanum 1 (JF742632.1), Solanum 4 (JF742633.1), Solanum 16 (JF742634.1), PQ-728 (DQ923061.1), PC-2-Pa2 (DQ022677.1) and MC-M-11 (AM698095.1)

และชนิดของพืชอาศัย (Wassenegger *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมี รายงานว่าไวรอยด์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีอัตราการ กลายของสารพันธุกรรมสูงสุด (Gago *et al.*, 2009) ทำให้โอกาสเป็นไปได้ที่จะเกิดเชื้อไวรอยด์ ชนิดพันธุ์ใหม่ หรือชนิดพันธุ์เดิมที่มีความรุนแรง ของโรคที่เปลี่ยนไป หรือเข้าทำลายพืชอาศัยต่าง

ชนิดจากที่เคยมีรายงานมาได้ อย่างไรก็ตามการ พิสูจน์ว่าเบสตำแหน่งที่ 83 และ 292 ซึ่งอยู่ บริเวณ P domain มีผลต่อการควบคุมการ แสดงออกของอาการโรคของเชื้อ *Columnea latent viroid* จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อ สนับสนุนข้อสมมุติฐานดังกล่าวต่อไป



**Figure 8.** Comparison of internal loop structure at position 83 and 292 (program mfold RNA-Folding-Form) : a) 5 domains of CLVd; conserved central domain (C domain), pathogenicity domain (P domain), variable domain (V domain), terminal-left domains (TL domains) และ terminal-right domains (TR domains), b) big internal loop of CLVd-bolo maka with another loop at right side., c) smaller internal loop of CLVd PC-2-Pa2 with another loop at right side.,d) big internal loop of CLVd PQ-728 with another two loops at right side, e) biggest internal loop of CLVd MC-M-11 with another two loops at right side

## สรุปผลการทดลอง

เชื้อ CLVd-bolo maka ที่พบมีความสามารถในการก่อให้เกิดอาการที่รุนแรงในมะอึ๊ก โดยจะทำให้เกิดอาการลำต้นแคระแกร็นอย่างรุนแรง ก้านใบและยอดหดสั้น ใบหดลดรูปและบิดม้วนเสียรูปทรง และมีลักษณะอาการเซลล์ตาย ซึ่งจะแตกต่างจากเชื้อ CLVd ที่เคยมีรายงาน ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเบสตำแหน่งที่ 83 และ 292 ในบริเวณ P domain แปรผันตามลักษณะความรุนแรงของอาการบนมะอึ๊ก

## เอกสารอ้างอิง

ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า.

ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ คณินันต์ เจริญวรการ, เสริมศิริ จันทร์เปรม และรัชณี ชงประยูร. 2548. โพรเมอร์สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศ 6 ชนิด ในกลุ่ม *Pospiviroid* ด้วยเทคนิค RT-PCR. วารสารโรคพืช 1-2: 13-21.

ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2551. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์กับเมล็ดมะเขือเทศที่เหมาะสมในงานกักกันพืช. ผลงานวิจัยเรื่องเต็ม กรมวิชาการเกษตร. 35 หน้า.

ศศิประภา มาราช. 2551. โคลนก่อโรคของเชื้อ *Columnea latent viroid* และผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์การค้า. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า.

Baumstank, T. and D. Riesner. 1995. Only one of four possible secondary structures of central conserved region of *Potato spindle tuber viroid* is a substrate for processing in a potato nuclear extract. *Nucleic Acids Res.* 23: 4246-4254.

de la Pea, M., B. Navarro and R. Flores. 1999. Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: A tetraloop within the in vivo branched RNA conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9960-9965.

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

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 Sci.* 323: 1308.

- 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 Res.* 17 (23): 10083-10094.
- Hammond, R.W. 1992. Analysis of the virulence modulating region of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) by site-directed mutagenesis. *Virology* 187: 654-662.
- Keese, P. and R. H. Symons. 1987. Physical-chemical properties: molecular structure (primary and secondary). Pages 37-62. In *The Viroids*. T.O. Diener (ed.). Plenum Press Inc., New York.
- Matthews-Berry, S. 2010. *Emerging Viroid Threats to UK Tomato Production. The food and environmental research agency (Fera)*. [www.defra.gov.uk/fera/plants/plantHealth](http://www.defra.gov.uk/fera/plants/plantHealth). 1/July/2013.
- Owens, R.A. 1990. Mutational analysis of viroid pathogenicity: *tomato apical stunt viroid*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 374-380.
- 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 USA*, 89: 388-394.
- Owens, R.A., G. Steger, Y. Hu, A. Fels, R.W. Hammond and D. Riesner. 1996. RNA structural features responsible for *Potato spindle tuber viroid* pathogenicity. *Virology.* 222: 144-158.
- Owens, R.A., S.M. Thompson and G. Steger. 1991. Effects of random mutagenesis upon *Potato spindle tuber viroid* replication and symptom expression. *Virology.* 185: 18-31.
- Owens, R.A., W. Chen, Y. Hu and Y.-H. Hsu. 1995. Suppression of *Potato spindle tuber viroid* replication and symptom expression by mutations which stabilize the pathogenicity domain. *Virology.* 208: 554-564.
- Qi, Y. and B. Ding. 2003. Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding Viroid RNA. *The Plant Cell* 15: 1360-1374.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning. Pages 1.44-1.46. In: *A Laboratory Manual*. Vol.1 Cold Spring Harbour Laboratory, New York.

- Sano, T., T. Candresse, R. W. Hammond, T.O. Diener and R. A. Owens. 1992. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 10104–10108.
- Schmitz A. and D. Riesner. 1998. Correlation between bending of the VM region and pathogenicity of different *Potato spindle tuber viroid* strains. *RNA* 4: 1295–1303.
- Schnlzer, M., B. Haas, K. Ramm, H. Hofmann and H.L. Snger. 1985. Correlation between structure and pathogenicity of Potato spindle tuber viroid (PSTVd). *EMBO J.* 4: 2181–2190.
- Skori, D., M. Conerly, J.A. Szychowski and J.S. Semancik. 2001. CEVd-induced symptom modification as a response to a host-specific temperature-sensitive reaction. *Virology* 280: 115–123.
- Thompson, J.R., S. Wetzel, M.M. Klerks, D. Vaskova, C.D. Schoen, J. Spak and W. Jelkmann. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *J. of Virological Methods* 111: 85-93.
- Wassenegger M., R. L. Spieker, S. Thalmeir, F. U. Gast, L. Riedel and H. L. Sanger. 1996. A single nucleotide substitution converts *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for nicotiana tabacum. *Virology* 226: 191–197.
- Zhu Y., Y. Qi, Y. Xun, R. Owens and B. Ding, 2002. Movement of *Potato spindle tuber viroid* reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. *Plant Physiol.* 130: 138–146.