

วิวัฒนาการของเชื้อ columnea latent viroid (CLVd) ในพืชอาศัย
โดยการศึกษา quasi-species population
Insight into Host-driven *in Planta* Evolution of Columnea Latent Viroid
through Quasi-species Population

ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์^{1/*} กาญจนา วาระวิชณี^{1/} Annelies Haegeman^{2/} Monica Höfte^{3/} Kris De Jonghe^{2/}
Parichate Tangkanchanapas^{1/*} Kanjana Warawichanee^{1/} Annelies Haegeman^{2/} Monica Höfte^{3/}
Kris De Jonghe^{2/}

Received 2 May 2024/Revised 2 Jul. 2024/Accepted 4 Jul. 2024

ABSTRACT

With a high mutation rate and fast replication, a population of mutated viroid progenies is generated and co-exists in the same host plant as a population of variants (so-called quasi-species), showing a huge level of genetic diversity. In our work, we report the evidence of the quasi-species in CLVd in several solanaceous plants; tomato (Rutgers and Seda 50), bolo maka and eggplant. An infectious dsDNA CLVd was synthesized from the recombinant plasmid containing the full-length genome of CLVd isolate Solanum-1 (JF742632) and then inoculated on the plants under specific conditions. The initial inoculation only successfully infected tomato cv. Rutgers. This CLVd-infected Rutgers was used for subsequent inoculation of the above-mentioned host plants. When all host plants proved to be systemically infected, RNA extraction and RT-PCR were performed. To study the CLVd population in individual host plants, the specific CLVd primers linked with an eight base sample-tagging sequence were used for amplifying libraries. The average 20,237 CLVd reads per PCR-replicate and 22 progeny variants in total from the first infected tomato plant were obtained. Among these 22 of CLVd variants, we found 22 total number of single-nucleotide polymorphisms in which average three point-mutations per CLVd genome mainly in Terminal Right and Pathogenic domains were observed. In addition, the estimated mutation rate of CLVd was calculated at 8.15×10^{-3} . Our data demonstrate that CLVd

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok 10900, Thailand

^{2/} Plant Sciences Unit, Flanders Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food, Burgemeester Van Gansberghelaan 96, 9820 Merelbeke, Belgium

^{3/} Department of Plants and Crops, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Coupure links 653, 9000 Ghent, Belgium

* Corresponding author: parichate_tk@yahoo.com

in a host plant exists as a population of quasi-species while showing host specificity of the dominant variants as host-driven in *planta* evolution.

Keywords: columnnea latent viroid; quasi-species; population study; mutations; high-throughput sequencing

บทคัดย่อ

ไวรอยด์มีอัตราการกลายพันธุ์สูงและมีการจำลองตัวรวดเร็วมาก ส่งผลให้เกิดการสร้างกลุ่ม variant ของไวรอยด์ที่มีลำดับสารพันธุกรรมคล้ายกัน จำนวนมากอยู่ร่วมกันในพืชอาศัยต้นเดียวกัน หรือ quasi-species ส่งผลให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างมหาศาล งานวิจัยนี้ได้ศึกษา quasi-species ของ CLVd ในมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers และสีกดา50 รวมทั้งมะเขือเทศพันธุ์อื่นๆ และมะเขือเทศเปราะ โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ infectious dsDNA clone ของ CLVd จาก recombinant plasmid ที่มีชิ้น full-length จีโนมของ CLVd isolate Solanum-1 (JF745632) บรรจุอยู่ใน plasmid ลงบนพืชทดสอบ พบว่า มีเพียงมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers เท่านั้นที่ติดเชื้อและแสดงอาการโรค จึงนำมะเขือเทศดังกล่าวมาใช้ปลูกเชื้อให้กับพืชทดสอบ ชนิดอื่น ๆ หลังจากพืชทดสอบทั้งหมดแสดงอาการติดเชื้อแล้ว จึงทำการสกัดอาร์เอ็นเอ RT-PCR และ amplicon library สำหรับการศึกษาประชากรของเชื้อ CLVd ที่แตกต่างกันในพืชทดสอบแต่ละชนิด โดยใช้เทคนิค amplicon sequencing และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ CLVd ที่เชื่อมต่อกับ sample-tagging sequence เพื่อใช้ในการจำแนกชนิด variant ของ CLVd ใน library ผลการศึกษา

พบว่า ในพันธุ์ Rutgers ได้ข้อมูลจำนวน CLVd เฉลี่ย 20,237 read ต่อ PCR-replicate โดยพบจำนวน variant ทั้งสิ้น 22 variant และมี single-nucleotide polymorphisms เฉลี่ย 3 ตำแหน่งต่อจีโนม อยู่ในบริเวณ Terminal Right และ Pathogenic domain นอกจากนี้ พบอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยของ CLVd Solanum-1 ที่ 8.15×10^{-3} ผลจากงานวิจัยนี้เป็น การพิสูจน์การเกิด quasi-species ของ CLVd และพบว่า ชนิดของ dominant variant มีความเกี่ยวข้องกับชนิดพืชอาศัย

คำสำคัญ: columnnea latent viroid; quasi-species; การศึกษาประชากร; การกลายพันธุ์; high throughput sequencing

บทนำ

Columnnea latent viroid (CLVd) เป็นเชื้อไวรอยด์ในสกุล *Pospiviroid* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคมะเขือเทศและพริกที่มีขนาดเล็กที่สุด มีองค์ประกอบเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยววงปิดที่ไม่มีโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และไม่สามารถอ่านรหัสพันธุกรรมหรือสังเคราะห์โปรตีนใด ๆ ได้ มีขนาดจีโนมตั้งแต่ 367-374 นิวคลีโอไทด์ (Ding and Itaya, 2007; Gago-Zachert, 2016; Navarro et al., 2012) โดยทั่วไปจีโนมของเชื้อไวรอยด์ในสกุล *Pospiviroid* อยู่ในรูปโครงสร้างทุติยภูมิที่มีลักษณะคล้ายไม้เท้า (rod-like secondary structure) เนื่องจาก ลำดับเบสมีลักษณะเป็น self complementary base-pair (Dingley et al., 2003; Palukaitis, 2014) โดยโครงสร้างดังกล่าวมีความสำคัญต่อวงจรการก่อโรคในพืชอาศัยของเชื้อ CLVd และสามารถจำแนกออกเป็น 5 domain คือ terminal left (TL), pathogenic (P), central (C),

variable (V) และ terminal right (TR) domain โดย TL domain และ C domain มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการจำลองตัวของเชื้อไวรอยด์ (Flores et al., 2012) เป็นบริเวณที่มีลำดับเบสอนุรักษ์จำนวนมาก มีลักษณะเป็น lethal mutations ซึ่งจะส่งผลกระทบร้ายแรงต่อการก่อโรคในพืชอาศัย (Tangkanchanapas et al., 2020; 2021) ขณะที่ P domain เกี่ยวข้องกับการพัฒนาอาการของโรคบนพืชอาศัย และ V domain เป็นบริเวณตำแหน่งที่มีลำดับเบสผันแปรมากที่สุด (Keese and Symons, 1985) และอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะอาการและความรุนแรงของโรค (Tangkanchanapas et al., 2021) และในบริเวณ TR domain ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายของอนุภาคไวรอยด์ภายในเซลล์พืชไปยังบริเวณนิวเคลียสพืช (nucleus-specific trafficking) โดยอาจอาศัย Virp1 โปรตีนพืชที่มีคุณสมบัติในการจับกับ TR domain ของไวรอยด์และพาอนุภาคไวรอยด์ไปยังนิวเคลียสพืช เป็นบริเวณที่ไวรอยด์เกิดการจำลองตัวและเป็นจุดเริ่มต้นของกลไกการติดเชื้อ รวมถึงการกระจายตัวของเชื้อไปตามระบบท่อลำเลียงในพืชอาศัย (Kalantidis et al., 2007; Steger, 2017; Zhong et al., 2008)

เชื้อ CLVd พบครั้งแรกในต้นลิปสติก (*Columnea erythrophaea*) ที่ไม่แสดงอาการผิดปกติ ในรัฐแมริแลนด์ ประเทศสหรัฐอเมริกา (Owens et al., 1978) เชื้อชนิดนี้มีพืชอาศัยที่ค่อนข้างจำกัด เช่น มะเขือเทศ มันฝรั่ง มะเขือเปราะ พริก พืชเนียบ มะฮอก Gynura แก้ว และแตงกวา เป็นพืชอาศัยหลัก (กนกมณี และ คณิงนิตย์, 2561; ปรีเชษฐ์ และคณะ, 2556; Matsushita and Tsuda, 2016; Owens et al., 1978; Verhoeven et al., 2004) เชื้อ CLVd สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด

พันธุ์ในมะเขือเทศ พืชเนียบ แตงกวา และ พริก (กนกมณี และคณิงนิตย์, 2561; ศศิประภา, 2551; Constable et al., 2019; Hammond et al., 1989; Matsushita and Tsuda, 2016) ในประเทศไทย พบเชื้อชนิดนี้เป็นครั้งแรกในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศลูกผสม ที่ จ. ขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2547 ซึ่งเป็นเมล็ดพ่อแม่พันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อนำมาใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม (ปรีเชษฐ์, 2548) และในปี พ.ศ. 2554 พบเชื้อ CLVd variant ครั้งแรกในมะฮอก คือ CLVd isolate Solanum-1 (GenBank accession No. JF742632) ซึ่งเชื่อก่อให้เกิดอาการรุนแรงในมะฮอก และมะเขือเทศ (ปรีเชษฐ์ และคณะ, 2556)

ไวรอยด์ในวงศ์ *Pospiviroidae* อาศัยเอนไซม์ DNA-dependent RNA polymerase II (Pol II) ในนิวเคลียสของเซลล์พืชในการเพิ่มปริมาณ (Flores et al., 2011) เมื่อเอนไซม์ polymerases ของพืชต้องใช้ RNA ของไวรอยด์เป็น template แทนที่จะใช้ DNA ตามปกติ ผลที่ตามมาจึงทำให้ไวรอยด์ที่จำลองตัวออกมาใหม่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมากขึ้น โดย ในวงศ์ *Pospiviroidae* จะมีอัตราการกลายพันธุ์ 5×10^{-3} (Brass et al., 2017) และ $1.43-2.63 \times 10^{-4}$ ใน potato spindle tuber viroid (PSTVd) (López-Carrasco et al., 2017) ซึ่งการเกิดอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงในขั้นตอนการจำลองตัวของเชื้อไวรอยด์นี้ ส่งผลให้เกิดกลุ่ม variant ของอนุภาคไวรอยด์ (อนุภาคไวรอยด์ที่มีจีโนมที่มีลำดับเบสที่แตกต่างกัน) ปะปนอยู่ร่วมกันในเซลล์พืชเซลล์เดียวกัน ซึ่งเรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวว่า “quasi-species” (Brass et al., 2017; Domingo et al., 2012) การเกิดการจำลองตัวซ้ำ ๆ ของ variant อนุภาคไวรอยด์ ทำให้เกิดการสะสมของกลุ่ม variant ไวรอยด์รุ่นลูกหลานที่มีการกลายพันธุ์

สะสม ซึ่งเรียกลักษณะดังกล่าวว่า “swarms” หรือ “clouds” ซึ่งแต่ละ variant จะมีปริมาณสะสมที่แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของพืชอาศัยหรือสิ่งแวดล้อม (Domingo et al., 2012; Luring and Andino, 2010) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิวัฒนาการของประชากร CLVd variant ในพืชอาศัยหลายชนิด อัตราการกลายพันธุ์ของเชื้อ CLVd ความผันแปรของลำดับเบสของ quasi-species ที่เปลี่ยนแปลงตามชนิดพืชอาศัย และศึกษาผลของ hotspot mutation บนจีโนมของเชื้อ CLVd Solanum-1 ที่มีต่อความเสถียรของโครงสร้างทุติยภูมิของ variant ของเชื้อ CLVd เพื่อเป็นข้อมูลในการหาแนวทางป้องกันกำจัดและลดความรุนแรงของโรคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียม infectious dsDNA ของเชื้อ CLVd isolate Solanum-1

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการสังเคราะห์ infectious dsDNA CLVd clone จาก recombinant plasmid ที่มีสาย full-length genome ของเชื้อ CLVd isolate Solanum-1 บรรจุอยู่ (Figure 1) เพื่อใช้เป็น CLVd variant เดียว (single unique sequence) โดยสังเคราะห์สาย linear full-length CLVd dsDNA จาก recombinant plasmid (Figure 1A) ที่มีสาย full-length genome ของเชื้อ CLVd isolate Solanum-1 ขนาด 369 bp (ตำแหน่ง 178-177) บรรจุอยู่ (Figure 1B) โดยอาศัยคู่ไพรเมอร์ PC-2 (Table 1) ตามวิธีการของปริเชษฐ์ และคณะ (2548) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้; 10X *Pfu* buffer 5 μ l, 0.2 mM dNTPs, 2 mM $MgSO_4$, 0.16 mM คู่ไพรเมอร์,

Pfu DNA polymerase with proofreading activity 1.5 U (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) และ purified recombinant plasmid 120 ng โดยปฏิกิริยามีปริมาตรรวมทั้งสิ้น 50 μ l จากนั้นนำ blunt-end CLVd amplicon ที่สังเคราะห์ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย SmartPure PCR kit (Kaneka Eurogentec S.A., Seraing, Belgium) ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วย NanoDrop ND1000 spectrophotometer (Isogen Life Science, De Meern, The Netherlands) และ 2% agarose gel electrophoresis ขึ้นถัดมา นำ blunt-end CLVd amplicon ที่ได้ไปเชื่อมต่อบนแบบ self-circularization และ multimeric linear form เพื่อสังเคราะห์ CLVd infectious clone (Figure 1A) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้; polyethylene glycol MW 6000 5% (w/v), T4 DNA ligase 5 U (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA) และ blunt-end CLVd amplicon 10 ng/ μ l จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่ 16 °ซ.ข้ามคืน และหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 65 °ซ.นาน 10 นาที (Tangkanchanapas et al., 2020) ตรวจสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยา ligation (Figure 1A) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CLVd-infect (Table 1) ตำแหน่ง 23-68 (Figure 1B) ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้; 10X PCR buffer 2 μ l, 0.2 mM dNTPs, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM คู่ไพรเมอร์, FastStart™ *Taq* DNA Polymerase 1 U (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) และ ligated product 1 μ l ปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 20 μ l ดำเนินปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการของ Tangkanchanapas et al. (2020) ตรวจสอบผล PCR ด้วย 2% agarose gel electrophoresis

2. การปลูกเชื้อไวรัสต้นพืชทดสอบและการเก็บรักษา

นำ infectious dsDNA CLVd มาปลูกเชื้อบนมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers อายุ 3 สัปดาห์ ด้วยวิธีกล (slashing) จำนวน 10 ต้น โดยการใช้มีดกรีดบนบริเวณลำต้นสร้างแผลรูปปากฉลาม จากนั้นจึงไปเปตสารละลาย infectious dsDNA CLVd ปริมาณ 5-10 μ l หยดลงบนแผล และปิดแผลด้วยพาราฟิล์ม จากนั้นนำไปดูแลในโรงเรือนภายใต้ระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 27 °ซ. ตรวจสอบอาการโรคทุก 3-4 วัน เมื่อ

มะเขือเทศพันธุ์ Rutgers แสดงอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 6 สัปดาห์ และตรวจพบเชื้อ CLVd ด้วยวิธีการ RT-PCR จึงนำต้นมะเขือเทศที่ติดเชื้อมาใช้ปลูกเชื้อให้กับพืชทดสอบชนิดต่าง ๆ ได้แก่ มะเขือเทศพันธุ์สีดา 50 มะอึก และมะเขือเปราะ ด้วยวิธีกล จำนวน 5-6 ซ้ำต่อชนิดพืชอาศัย โดยพืชทั้งหมดถูกเก็บรักษาในโรงเรือนภายใต้สภาวะเดียวกัน เพื่อรอให้พืชทดสอบแสดงอาการที่จำเพาะของโรคอย่างชัดเจน จากนั้นจึงยืนยันการติดเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค RT-PCR

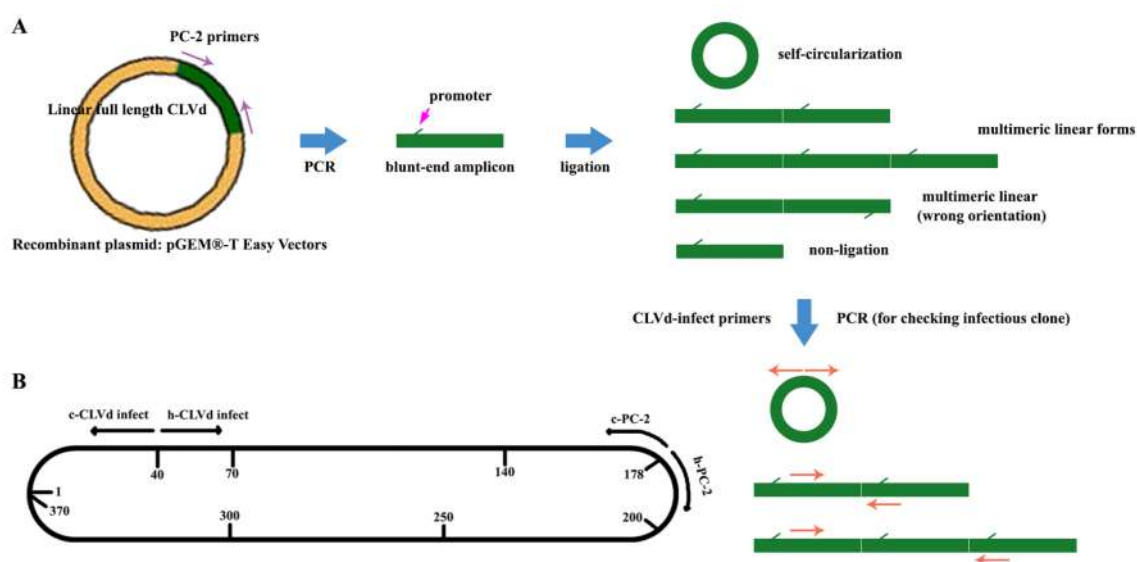


Figure 1 (A) scheme of infectious dsDNA CLVd construction: start from blunt-end linear dsDNA CLVd synthesis with PC-2 primers and *Pfu* DNA polymerase, then ligated the blunt-end amplicon which resulted in several ligation product forms (self-circularization, multimeric linear, multimeric linear with wrong orientation and non-ligation) and examine the efficiency of the ligation reaction by PCR with CLVd-infect primers; (B) The position of specific CLVd primers: PC-2 and CLVd-infect

Table 1 Details of primers used in this work

Primers	Sequences (5'-3')	Positions	Tm°
c-PC-2	TGTTTCWRCDDGGGATTACTCCTG	153-177	56.5
h-PC-2	GGGTTTTACCCCTTCCTTTC	178-197	56.2
c-CLVd-infect	TGCAGGGTCAGGTGTGAACCAC	23-39	63.2
h-CLVd-infect	GCCATGCAAAGRAAAAAGAAYGGG	40-68	63.0

3. การสกัดอาร์เอ็นเอ การเตรียม library และการทำ amplicon sequencing

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบพืชทดสอบที่ติดเชื้อ CLVd ตัวอย่างละ 100 มก. ด้วยชุด Spectrum™ plant total RNA kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต และนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสังเคราะห์สาย complementary DNA (cDNA) ด้วย iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ CLVd-infect (Table 1) ที่มีการเชื่อมต่อ tagging sequence จำนวน 8 นิวคลีโอไทด์ต่อท้ายที่ปลาย 5'-end ของคู่ไพรเมอร์ เพื่อใช้เป็นดัชนีในการจำแนกและติดตามชิ้น DNA amplicon จากพืชทดสอบแต่ละตัวอย่าง ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้; BIO-X-ACT short mix 10 µl, 0.2 mM คู่ไพรเมอร์ที่เชื่อมต่อ tagging sequence และ cDNA 1 µl ปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 20 µl ดำเนินปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนดังนี้; 94 °ซ. นาน 3 นาที จากนั้นตามด้วยขั้นตอน PCR 40 รอบ (94 °ซ. นาน 40 วินาที, 59 °ซ. นาน 40 วินาที และ 72 °ซ. นาน 40 วินาที) และ 72 °ซ. นาน 10 นาที (Tangkanchanapas et al., 2020) ตัวอย่างละ 4 ซ้ำ โดยใช้ tagging sequence ที่แตกต่างกันเพื่อระบุแยกชนิดแหล่งที่มาของตัวอย่างพืชอาศัย

ในขั้นตอนต่อมา นำ amplicon product ทั้งหมดที่สังเคราะห์ได้มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Sera-Mag™ SpeedBead carboxylate-modified magnetic particles (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ตรวจสอบปริมาณของ amplicon product ที่ได้ด้วย QuantiFluor® dsDNA system (Promega

Corporation, Madison, WI, USA) จากนั้น ปรับความเข้มข้นของแต่ละตัวอย่างให้ได้ 80 นาโนกรัม และรวมตัวอย่างที่ได้เป็น library (2 ซ้ำ/pooled library) นำแต่ละ amplicon pool library เชื่อมต่อเข้ากับ Illumina adapter โดยผู้ให้บริการวิเคราะห์ลำดับเบส (Admera Health, South Plainfield, NJ, USA) ด้วยการใช้ชุด KAPA Hyper Prep PCR-free ligation kit (F. Homann-La Roche AG, Basel, Switzerland) นำ ligated library ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยเครื่อง MiSeq v3 instrument (2 X 300 bp) (Illumina, San Diego, CA, USA)

4. ขั้นตอนการจัดการอ่านข้อมูล และการวิเคราะห์ในส่วนท้าย

จัดการข้อมูลที่ได้หลังจากวิเคราะห์หาลำดับเบสจาก high-throughput sequencing (HTS) library ตามวิธีการของ Tangkanchanapas et al. (2020) จากนั้นนำข้อมูล read sequence ทั้งหมดของ CLVd variant ที่ได้และ CLVd Solanum-1 isolate (master sequence) มาวิเคราะห์ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม MUSCLE (MEGA7) (default parameter) (Kumar et al., 2016) และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA7 โดยเลือกวิธีการ neighbor-joining (bootstrap 1000 replicates) ทำการวิเคราะห์หา major SNPs (single nucleotide polymorphisms) ที่เกิดขึ้นทั้งหมด และโครงสร้างทุติยภูมิ (thermodynamic secondary structure) ของ variant CLVd Solanum-1 ทั้งหมดที่ตรวจพบด้วยโปรแกรม RNA folding form program (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) โดยเลือกโครงสร้างทุติยภูมิที่มีค่า Gibbs free energy ต่ำที่สุดมาใช้ในการ

วิเคราะห์ และเปรียบเทียบโครงสร้างทุติยภูมิของ เชื้อ CLVd isolate อื่นได้แก่ Chaipayon-1 LP1-15c4 และ 93007481 (14A) (GenBank accession KM214216 JF446920 และ AY372392 ตามลำดับ) รวมถึง progeny variant ต่าง ๆ ของเชื้อ CLVd ทั้ง 3 isolates ด้วย

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของ infectious dsDNA CLVd Solanum-1

ผลการตรวจสอบการสังเคราะห์ infectious dsDNA CLVd isolate Solanum-1 ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า infectious CLVd clone ที่สังเคราะห์ได้ประกอบไปด้วย dsDNA CLVd ที่อยู่ในรูปแบบ self-circularized และ multimeric form (Figure 2) ซึ่งทั้ง 2 รูปแบบดังกล่าวมีคุณสมบัติก่อให้เกิดการ ติดเชื้อและเพิ่มปริมาณในพืชอาศัยได้ โดยหลังจาก

การปลูกเชื้อด้วย infectious dsDNA CLVd เป็น ระยะเวลา 6 สัปดาห์ มีเพียงมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers จำนวน 1 จาก 10 ต้น เท่านั้น ที่แสดงอาการผิดปกติ ตามลักษณะอาการของเชื้อ CLVd และสามารถ ยืนยันผลด้วยการตรวจ RT-PCR จึงใช้มะเขือเทศ พันธุ์ Rutgers ที่ติดเชื้อจาก infectious CLVd clone ดังกล่าวเป็น inoculum ในการปลูกเชื้อ บนพืชทดสอบ 3 ชนิด ได้แก่ มะเขือเทศพันธุ์สีดา50 มะอึก และมะเขือเปราะ (Figure 2) โดยหลังจาก ปลูกเชื้อ 1-2 เดือน พืชทดสอบทั้งหมดแสดงอาการ โรคที่เฉพาะของเชื้อ CLVd และสามารถยืนยัน ผลการติดเชื้อไวรอยต์ได้ด้วยเทคนิค RT-PCR (ข้อมูลไม่ได้แสดง) จากผลการทดลองปลูกเชื้อด้วย infectious dsDNA CLVd Solanum-1 เห็นได้ว่า infectious clone ดังกล่าวมีอัตราการติดเชื้อที่ ค่อนข้างต่ำ (1/10 ต้น)

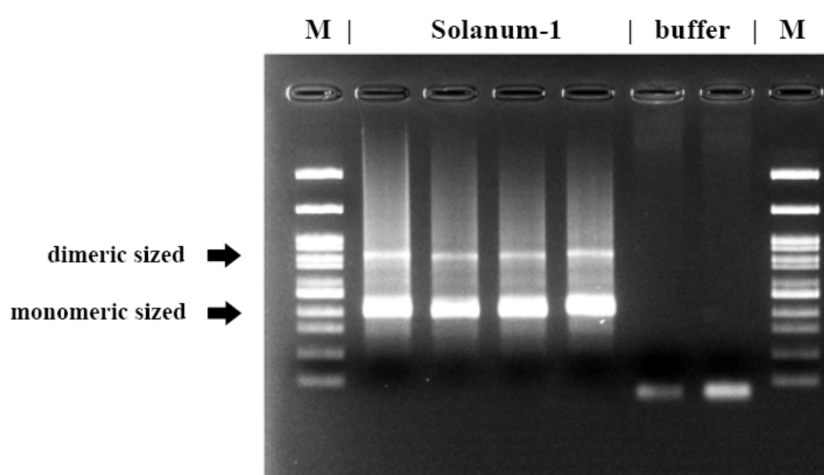


Figure 2 Infectious dsDNA CLVd Solanum-1 products. The mixture of infectious dsDNA CLVd products; self-circularization and multimeric dsDNA CLVd forms. Monomeric sized bands indicate the full-length genome of CLVd. Dimeric-sized bands indicate the double full-length genome size of CLVd. Solanum-1 indicates ligation products from CLVd GenBank accession JF742632, buffer indicates non-DNA target and lanes M: 100 bp DNA ladder

2. ประชากร quasi-specie ของเชื้อ CLVd Solanum-1 ในมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers

ในการศึกษา quasi-species sequence variation ของกลุ่มประชากร CLVd variant ด้วยเทคนิค indexed amplicon sequencing พบจำนวน CLVd sequence read เฉลี่ย 20,237 ต่อ PCR replicate ในมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers (Table 2) โดยลักษณะประชากร ของ CLVd progeny variant ทั้งหมดที่พบมีความแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Solanum-1 master sequence (GenBank Accession No. JF742632) อย่างชัดเจน กล่าวคือ progeny variant ทั้งหมดที่ตรวจพบมีจำนวนทั้งสิ้น 22 variants ซึ่งมีลำดับเบสต่างจาก CLVd Solanum-1 (Table 2) โดยทั้ง 22 CLVd progeny variants นั้น สามารถจำแนกเป็น major progeny variant ($\geq 1\%$ prevalence) จำนวน 7 variants ได้แก่ variant9_Run2 (60.7%) variant23_Run2 (19.8%) variant207_Run2 (2.8%) variant472_Run2 (1.5%) variant514_Run2 (1.4%) variant698_Run2 (1.1%) และ variant718_Run2 (1.0%) ในขณะที่ตรวจไม่พบ CLVd Solanum-1 sequence เริ่มต้น (Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ angkanchanapas et al. (2020) ที่พบว่า หลังกลไกการติดเชื้อไวรอยต์ในพืชอาศัยจะก่อให้เกิดการสร้างและสะสมกลุ่มของ variant ใหม่ที่มีความแตกต่างจากไวรอยต์เริ่มแรก นอกจากนี้ จากการตรวจสอบประชากร ของ CLVd Solanum-1 variant ในพืชทดสอบทั้งหมด ไม่พบ CLVd Solanum-1 master sequence ที่ได้ทำการปลูกเชื้อตั้งแต่ในขั้นตอนแรก

สำหรับการวิเคราะห์ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ (single-nucleotide polymorphisms, SNPs) พบว่า CLVd progeny variant ทั้งหมด

มี SNPs 22 ตำแหน่ง (Table 2) ปรากฏอยู่ 2-5 ตำแหน่งต่อจีโนม โดยมี SNPs หลัก 2 ตำแหน่ง คือ SNP_{C169A} และ SNP_{A172U} อยู่ในบริเวณ TR domain ซึ่งปรากฏอยู่ในทุก CLVd progeny variant (100%) ในขณะที่ในบริเวณ P domain พบ SNPs จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ SNP_{A74G} SNP_{A290G} SNP_{A297G} SNP_{U298A} SNP_{U311A} และ SNP_{A313U} โดยมีความถี่ในการตรวจพบเท่ากับ 1.0 1.0 21.4 22.4 1.5 และ 2.2% ตามลำดับ (Figure 4) นอกจากนี้ยังพบ SNPs ในบริเวณอื่น ๆ ของเชื้อ CLVd ดังนี้ SNP_{U22G} (1.4%) ใน TL domain, SNP_{A97C} (3.6%) ใน C domain และ SNP_{C143U} (2.7%) ใน V domain (Figure 4) การวิเคราะห์และคำนวณอัตราการกลายพันธุ์ของเชื้อ CLVd Solanum-1 โดยไม่รวมลำดับเบสบริเวณไพรเมอร์ทั้ง 2 ด้าน พบว่า อัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยของเชื้ออยู่ในระดับสูง คือ 8.15×10^{-3} (Table 2) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของเชื้อ PSTVd ซึ่งเป็นไวรอยต์ในสกุลเดียวกัน ที่มีอัตราการกลายพันธุ์เฉลี่ยอยู่ที่ 1.5×10^{-4} (López-Carrasco et al., 2017)

สำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของ progeny variant เชื้อ CLVd Solanum-1 พบว่า SNPs หลัก 2 ตำแหน่ง คือ SNP_{C169A} และ SNP_{A172U} ส่งผลโดยตรงต่อโครงสร้างทุติยภูมิโดยฟื้นฟูให้โครงสร้างทุติยภูมิที่ไม่สมบูรณ์ของ CLVd Solanum-1 กลับมาอยู่ในสภาพ rod-like secondary structure ที่สมบูรณ์ได้ (Figure 4) และในการทดลองนี้ไม่พบ CLVd Solanum-1 master sequence ที่ได้ปลูกเชื้อไว้ในขั้นตอนแรกกับพืชทดสอบทุกชนิดแสดงให้เห็นว่า โครงสร้าง rod-like structure ที่สมบูรณ์มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อกระบวนการติดเชื้อและก่อให้เกิดโรค จึงอาจเป็นสาเหตุให้ CLVd progeny ทุก variant ที่ตรวจพบในมะเขือเทศ

พันธุ์ Rutgers เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง SNP_{C169A} และ SNP_{A172U} ซึ่งอยู่บริเวณ TR domain สอดคล้องกับรายงานของ Tangkanchanapas et al. (2020) ที่พบว่า variant9_Run2 ซึ่งเป็น progeny variant ที่ตรวจพบได้มากที่สุด (60.7%) มี SNPs ปรากฏเพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้น คือ SNP_{C169A} และ SNP_{A172U}

จึงมีความเป็นไปได้ว่า CLVd variant9_Run2 อาจเป็น variant แรกที่เกิดการกลายพันธุ์หลังการปลูกเชื้อในมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ซึ่งงานวิจัยนี้ได้พิสูจน์การปรากฏและมีอยู่ของ quasi-species evolution ของเชื้อ CLVd Solanum-1

Table 2 Summary of the data obtained for CLVd Solanum-1 in the first tomato cv. Rutgers

Data obtained	CLVd Solanum-1 in tomato CV. Rutgers
Total bases read (4 replicates)	2,606,469,600
Mean depth	20,237
Unique mutations ^{1/}	22
Average mutation per genome	3
Total mutation count ^{2/} (4 replicates)	21,238,300
Mutation frequency ^{3/} ($\times 10^3$)	8.15

^{1/} Number of different mutations found (presence/absence)

^{2/} Number of mutation reads

^{3/} Total mutation count divided by total bases read

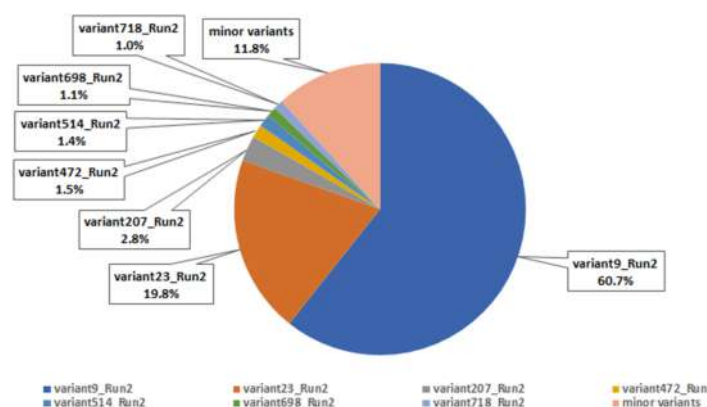


Figure 3 Pie chart displays major variants of the first tomato cv. Rutgers plant infected with CLVd Solanum-1

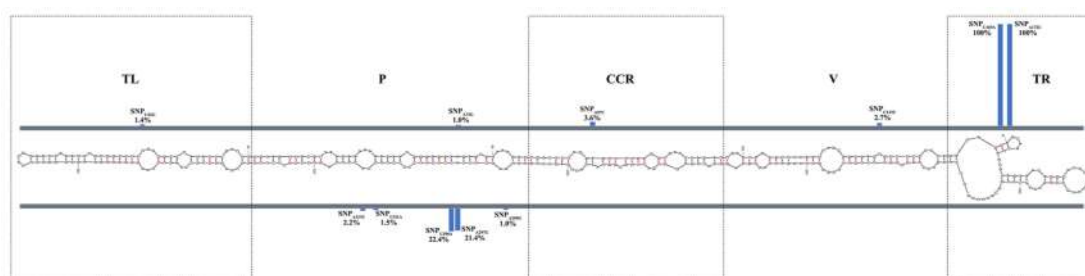


Figure 4 Position of major SNPs on the CLVd Solanum-1 secondary structure. The blue bar shows the % prevalence of major SNPs and the position on CLVd Solanum-1 secondary structure

3. วิวัฒนาการของประชากร quasi-species ของ infectious CLVd Solanum-1

จากการศึกษาวิวัฒนาการของ quasi-species ของ CLVd Solanum-1 พบว่า variant หลักทั้งหมดของ CLVd Solanum-1 สามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มหลักที่ประกอบด้วย variant เกือบทั้งหมดที่พบในมะเขือเทศ และมะเขือ (tomato and bolo maka group) และ กลุ่มรองที่ประกอบไปด้วย variant ทั้งหมดที่พบในมะเขือเปราะ (eggplant group) (Figure 5) โดยในกลุ่มหลักประกอบไปด้วย variant ส่วนใหญ่ที่พบในมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers โดยมี variant9_Run2 เป็น variant หลัก (60.7%) ซึ่งแสดงอยู่ตรงกลางของ clade นอกจากนี้แล้วยังมี variant หลักทั้งหมดที่พบในมะเขือ รวมอยู่ในกลุ่มหลักนี้ด้วย (Figure 5) โดยกลุ่มหลักดังกล่าวเชื่อมต่อโดยตรงกับ CLVd Solanum-1 sequence เริ่มต้น ในขณะที่กลุ่มที่ 2 (minor clade) มีความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างห่างกันกับกลุ่มหลักกลุ่มแรกพอสมควร โดยในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วย variant หลักทั้งหมดที่พบในมะเขือเปราะร่วมกับ variant ลำดับรองที่พบในมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers จำนวน 2 variant (แสดงด้วยวงกลมสีแดง) และ variant ลำดับรองที่พบในมะเขือจำนวน 2 variant (แสดงด้วยวงกลมสีชมพู) แสดงให้เห็นว่า กลุ่มหลักดังกล่าว (tomato and bolo maka group) น่าจะเป็น progeny variant กลุ่มแรกที่เกิดการกลายพันธุ์จาก CLVd Solanum-1 infectious sequence เริ่มต้น เพื่อเป็นการปรับตัวให้เหมาะสมกับการเพิ่มปริมาณตัวเองในมะเขือเทศ ก่อน รวมถึงการฟื้นฟูโครงสร้างทุติยภูมิที่ไม่สมบูรณ์ให้กลับมาอยู่ในสภาพ rod-like secondary structure ตามปกติก่อน จากนั้นเป็นไปได้ว่า มีบาง variant ในมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบ

ในการสร้าง variant ใหม่ที่มีความเหมาะสมกับมะเขือเปราะ (หรือพืชอาศัยชนิดอื่น ๆ) ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของ progeny variant ที่มีต่อชนิดพืชโดยอาศัยกลไก quasi-species

จากผลการวิเคราะห์ radiation phylogenetic tree พบว่า CLVd Solanum-1 sequence เริ่มต้น (แสดงด้วยเครื่องหมายสี่เหลี่ยมสีน้ำเงิน) มีโครงสร้างทุติยภูมิที่ไม่สมบูรณ์บริเวณปลาย TR domain เชื่อมต่อโดยตรงกับ CLVd variant9_Run2 (ตั้งอยู่ตรงตำแหน่งจุดกึ่งกลางของกลุ่มหลัก) ซึ่งเป็น progeny variant ที่มีปริมาณมากที่สุด และมี SNPs จำนวนน้อยที่สุดเพียง 2 ตำแหน่ง (SNP_{C169A} และ SNP_{A172U}) แต่ตรวจไม่พบ CLVd Solanum-1 master sequence ในพืชทดสอบอื่น ๆ เนื่องมาจากในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อ CLVd Solanum-1 clone ในมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง SNP_{C169A} และ SNP_{A172U} ก่อน เพื่อฟื้นฟูโครงสร้างทุติยภูมิที่ไม่สมบูรณ์ของ CLVd Solanum-1 ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการติดเชื้อและเพิ่มปริมาณตัวเองให้กลับมาอยู่ในลักษณะโครงสร้างปกติของไวรอยด์คือกลายพันธุ์มาเป็น CLVd variant9_Run2 จากนั้นจึงอาศัย CLVdvariant9_Run2 เป็น template ในการเพิ่มปริมาณในพืชอาศัย หลังจากนั้น progeny variant ที่มีความเหมาะสมกับชนิดพืชอาศัยและเนื้อเยื่อพืชจะถูกสร้างขึ้นมา และจากการวิเคราะห์ radiation phylogenetic analysis แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อ CLVd Solanum-1 ในมะเขือเปราะ (รวมถึงมะเขือ) จำเป็นต้องอาศัย CLVd progeny variant ที่จำเพาะจากต้นมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ต้นแรก ก่อนการสร้าง progeny variant ที่เหมาะสมสำหรับมะเขือเปราะ ซึ่งผลสอดคล้องกับรายงานของ (Tangkanchanapas et al., 2020)

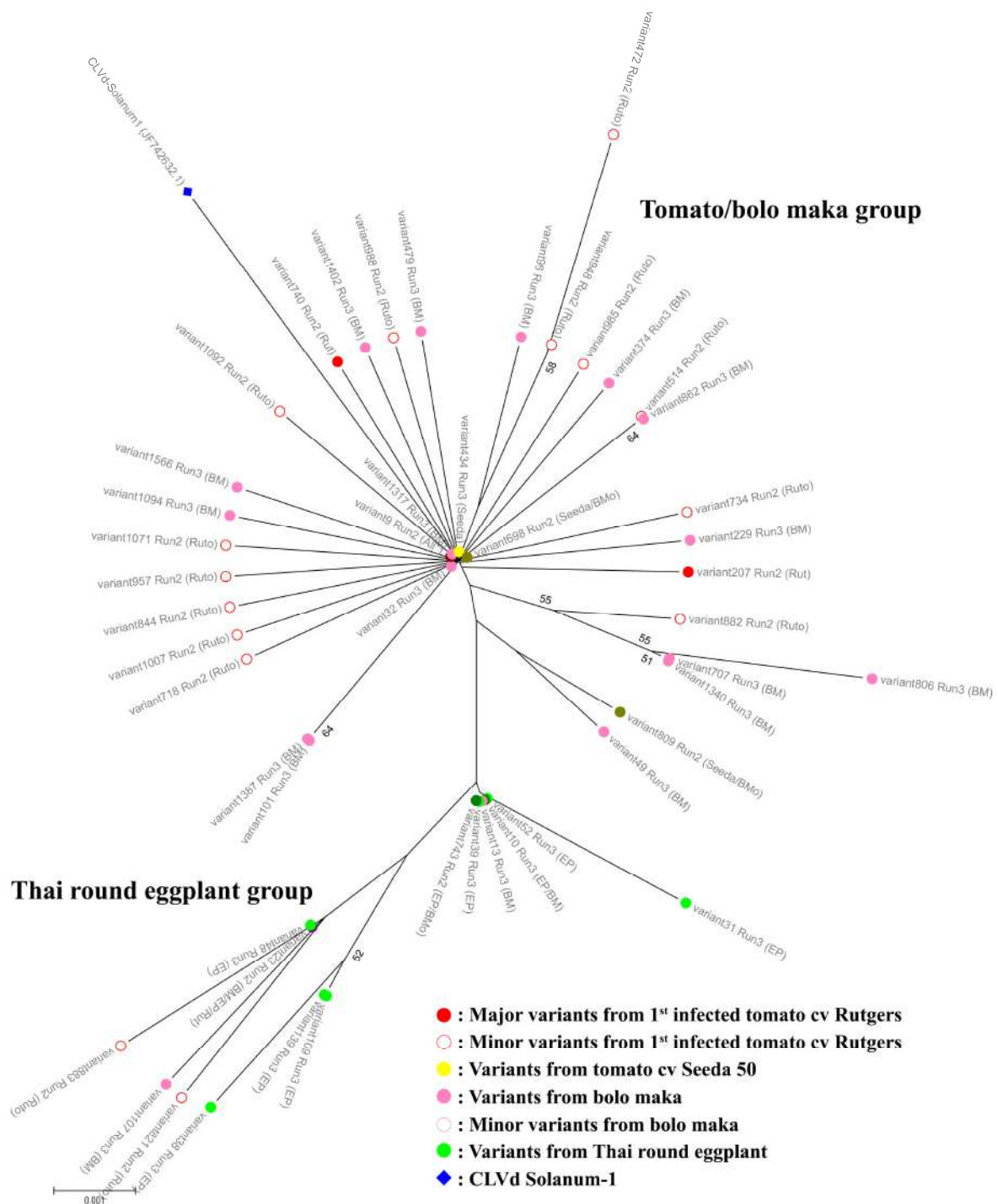


Figure 5 Evolution of CLVd Solanum-1 quasi-species within different host species from the neighbor-joining phylogenetic tree analysis. The major and minor variants from the first tomato cv. Rutgers are indicated with red dots and circles, respectively. Progeny variants from tomato cv. Seeda50, bolo maka and Thai round eggplant are indicated with yellow, purple, green and light blue dots, respectively. The blue diamond shape indicated the CLVd Solanum-1 original sequence. A tree was constructed using MEGA version 7.0.21 with 1,000 bootstrap replicates and 50% cut-off value

4. ลักษณะโครงสร้างของ CLVd Solanum-1 progeny variant

จากการวิเคราะห์ SNPs ที่ปรากฏบน CLVd Solanum-1 progeny หลัก ($\geq 1\%$ prevalence) ทั้ง 41 variant พบ SNPs หลักจำนวน 11 ตำแหน่ง โดยอยู่ที่บริเวณ TR domain จำนวน 2 SNPs ที่ P domain พบ 6 SNPs และ base deletion 2 ตำแหน่ง และ บริเวณ TL domain พบ 1 SNPs โดยแต่ละ SNPs มีความถี่ในการปรากฏที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดพืชทดสอบ นอกจากนี้ SNPs บางตำแหน่งยังส่งผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อ CLVd Solanum-1 ด้วย (Figure 6) SNP_{C21A} เป็นการกลายพันธุ์หลักตำแหน่งเดียวที่พบบน TL domain โดย SNPs นี้จะพบเฉพาะในเนื้อเยื่อใบแก่ของมะเขือต้นที่ 1 มีความถี่อยู่ที่ 11.7% ส่งผลทำให้ loop ที่บริเวณ TL domain ขยายขนาดใหญ่ขึ้น (Figure 6) ขณะที่บริเวณ P domain พบการกลายพันธุ์หลักทั้งสิ้น 8 ตำแหน่ง ได้แก่ SNP_{A73G} SNP_{-73A} SNP_{A81G} SNP_{A297U} SNP_{A297G} SNP_{U298A} SNP_{U305C} และ SNP_{-309C} ซึ่งการกลายพันธุ์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นใน domain นี้ไม่ส่งผลกับโครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อ CLVd Solanum-1 นอกจากนี้ยังไม่พบความเกี่ยวข้องระหว่าง SNPs ทั้ง 8 ตำแหน่งนี้กับชนิดของพืชอาศัยด้วย (Figure 6) ที่บริเวณ TR domain พบการกลายพันธุ์หลัก 2 ตำแหน่ง คือ SNP_{C169A} และ SNP_{A172U} ซึ่ง SNPs ทั้ง 2 ตำแหน่งเป็นการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบในทุก ๆ progeny variant ของ CLVd Solanum-1 (Figure 6) โดย SNP_{C169A} เป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่สำคัญในการฟื้นฟูสภาพโครงสร้างทุติยภูมิที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อ CLVd Solanum-1 ให้กลับมาอยู่ในโครงสร้างปกติของไวรอยด์ อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทุติยภูมิของไวรอยด์และชนิดพืช

อาศัย เนื่องจาก progeny variant ทั้งหมดของเชื้อ CLVd Solanum-1 ที่ตรวจพบ ($\geq 0.1\%$ prevalence) จะมีลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิที่บริเวณปลายด้านขวา (TR end) คล้ายกัน คือ ประกอบไปด้วย 3 loops ซึ่งคล้ายคลึงกันกับโครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อ CLVd หลาย isolate ที่ตรวจพบในมะเขือเทศ ได้แก่ Chaipayon-1 variant 1 2 10 11 12 15 17 18 19 20 และ 22 ที่พบในมะเขือเทศ และมะเขือ (GenBank accession no. MN921165 MN921166 MN921172 MN921173 MN921174 MN921175 MN921177 MN921178 MN921179 MN921180 และ MN921181 ตามลำดับ) (Tangkanchanapas et al., 2020) รวมถึง CLVd isolate LP1-15c4 (GenBank accession no. JF446920) ที่ตรวจพบกับมะเขือเทศที่ปลูกในประเทศไทย และ CLVd isolate 93007481 (14A) (GenBank accession no. AY372392) (Figure 7) ที่มีรายงานการตรวจพบในมะเขือเทศที่ปลูกในประเทศเนเธอร์แลนด์ (Verhoeven et al., 2004) จึงมีความเป็นไปได้ว่า ลักษณะโครงสร้างที่บริเวณปลาย TR end ซึ่งประกอบไปด้วย 3 loops อาจเป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรและเหมาะสมต่อการจับกับโปรตีน Virp1 ของมะเขือเทศ จึงทำให้ variant เหล่านี้มีความเหมาะสมในการเพิ่มปริมาณและการก่อโรคในมะเขือเทศ

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ ได้แสดงให้เห็นถึงการวิวัฒนาการและพลวัตของ quasi-species ของเชื้อ CLVd ในแง่มุมด้านปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดพืชอาศัยและเชื้อ CLVd โดยได้พิสูจน์ให้เห็นถึงการพัฒนาของ host-specific variant spectra ของเชื้อ CLVd Solanum-1 ที่เกิดขึ้นเฉพาะในพืชอาศัย

แต่ละชนิดรวมถึงชนิดของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ CLVd มีวิวัฒนาการแบบไม่สิ้นสุด โดยเชื้อมีแนวโน้มเปลี่ยนแปลง variant ไปตามสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับชนิดพืชอาศัย นอกจากนี้ ผล

จากงานวิจัยนี้ยังเป็นการยืนยันความสำคัญของ
โครงสร้างทุติยภูมิ rod-like structure ต่อกลไกและ
วงจรการก่อโรคของเชื้อ CLVd อีกด้วย



Figure 6 Structural consequences of major single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of dominant variants and mutation frequency (in percentage) per individual plant and plant tissues of CLVd Solanum-1. The table shows the positions and domains where mutations occurred with mutation frequency in percentage and the secondary structures. The color scale represents a mutation frequency ranging from grey (0%) over green and brown to red (100%). 0.0 = <0.1% prevalence, - = not present

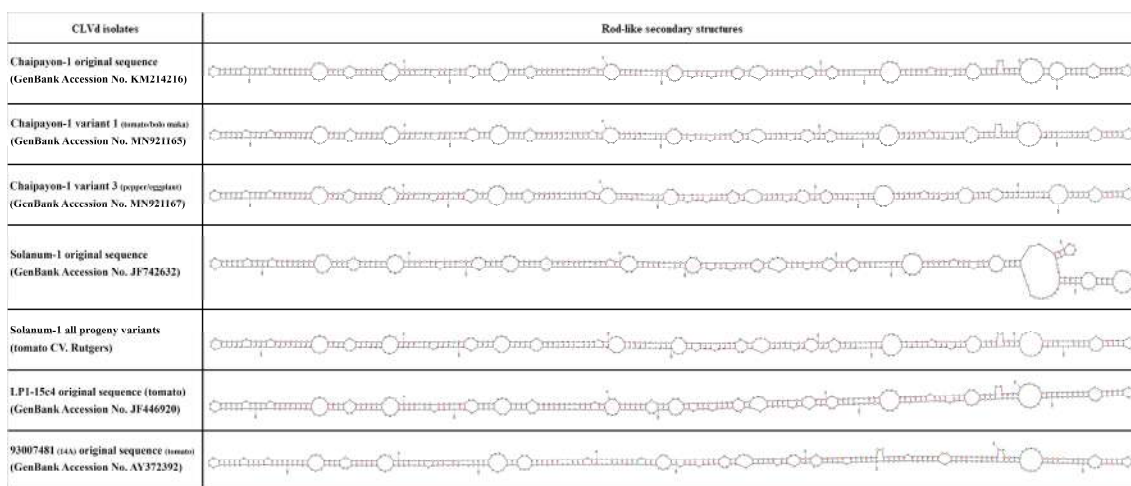


Figure 7 Rod-like secondary structures of four CLVd isolates: (1) Chaipayon-1, Chaipayon-1 variant 1 and Chaipayon-1 variant 3 (GenBank accession KM214216, MN921165 and MN921167, respectively); (2) Solanum-1 (GenBank accession no. JF742632) and all variants; (3) LP1-15c4 (GenBank accession no. JF446920); and 93007481 (14A) (GenBank accession no. AY372392)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สำนักงาน ก.พ. ในการสนับสนุน
ทุนวิจัย (PhD) นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ
Ariane Staelens Kris Van Poucke Thomas
Goedefroit และ Cinzia Vanmalderghem ที่มี
ส่วนช่วยในงานทดลองวิจัยนี้ ขอขอบคุณ ดร. วันเพ็ญ
ศรีทองชัย สำหรับการตรวจแก้ไขภาษา

เอกสารอ้างอิง

- กนกมณี ต้นสุวรรณ และคณินนิตย เจริญวรารกร. 2561.
การถ่ายทอดเชื้อ *Columnnea latent viroid* ผ่าน
ทางเมล็ดของแตงกวา. วารสารวิชาการเกษตร. 36:
130–140.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. การตรวจสอบเชื้อ
ไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขต
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. จ.นครปฐม. 85 หน้า.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ คณินนิตย เจริญวรารกร เสริมศิริ
จันทร์เปรม และรัชณี ธงประยูร. 2548. ไพโรเมอร์
สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคใน
มะเขือเทศ 6 ชนิด ในกลุ่ม *Pospiviroid* ด้วย
เทคนิค RT-PCR. วารสารโรคพืช. 1(2): 13-21.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ คณินนิตย เจริญวรารกร และ
วิภา เกิดพิพัฒน์. 2556. เชื้อ *Columnnea latent
viroid* (CLVd) สายพันธุ์ใหม่ที่เกิดอาการ
รุนแรงในมะเขือ (*Solanum stramonifolium* Jacq.).
วารสารวิชาการเกษตร. 31: 53–68.
- ศศิประภา มาราช. 2551. โคลนก่อโรคของเชื้อ *Columnnea
latent viroid* และผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์
การค้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต. มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. จ.นครปฐม. 86 หน้า.
- Brass, J.R.J., R.A. Owens, J. Matoušek and G.
Steger. 2017. Viroid quasispecies revealed by
deep sequencing. RNA Biology. 14: 317–325.

- Constable, F., G. Chambers, L. Penrose, A. Daly, J.
Mackie, K. Davis, B. Rodoni and M. Gibbs.
2019. Viroid-infected tomato and Capsicum
seed shipments to Australia. Viruses. 11(2): 98.
- Ding, B. and A. Itaya. 2007. Viroid: A useful model
for studying the basic principles of infection
and RNA biology. Molecular Plant-microbe
Interactions. 20(1): 7–20.
- Dingley, A.J., G. Steger, B. Esters, D. Riesner and
S. Grzesiek. 2003. Structural characterization
of the 69 nucleotide potato spindle tuber
viroid left-terminal domain by NMR and
thermodynamic analysis. Journal of Molecular
Biology. 334: 751–767.
- Domingo, E., J. Sheldon and C. Perales. 2012. Viral
quasispecies evolution. Microbiology and
Molecular Biology Reviews. 76(2): 159–216.
- Flores, R., D. Grubb, A. Elleuch, M.Á. Nohales, S.
Delgado and S. Gago. 2011. Rolling-circle
replication of viroids, viroid-like satellite
RNAs and hepatitis delta virus: Variations
on a theme. RNA Biology. 8: 200–206.
- Flores, R., P. Serra, S. Minoia, F. Di Serio and B.
Navarro. 2012. Viroids: From genotype
to phenotype just relying on RNA
sequence and structural motifs. Frontiers in
Microbiology. 3: 217.
- Gago-Zachert, S.. 2016. Viroids, infectious long
non-coding RNAs with autonomous replication.
Virus Research. 212: 12–24.
- Hammond, R., D.R. Smith and T.O. Diener. 1989.
Nucleotide sequence and proposed
secondary structure of *Columnnea latent
viroid*: A natural mosaic of viroid sequences.
Nucleic Acids Research. 17: 10083–10094.

- Kalantidis, K., M.A. Denti, S. Tzortzakaki, E. Marinou, M. Tabler and M. Tsagris. 2007. Virp1 is a host protein with a major role in Potato Spindle Tuber Viroid infection in Nicotiana plants. *Journal of Virology*. 81(23): 12872–12880.
- Keese, P. and R.H. Symons. 1985. Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 82(14): 4582–4586.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33(7): 1870–1874.
- Lauring, A.S. and R. Andino. 2010. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathogens*. 6(7): e1001005.
- López-Carrasco, A., C. Ballesteros, V. Sentandreu, S. Delgado, S. Gago-Zachert, R. Flores and R. Sanjuán. 2017. Different rates of spontaneous mutation of chloroplastic and nuclear viroids as determined by high-fidelity ultra-deep sequencing. *PLoS Pathogens*. 13(9): e1006547.
- Matsushita, Y. and S. Tsuda. 2016. Seed transmission of potato spindle tuber viroid, tomato chlorotic dwarf viroid, tomato apical stunt viroid, and Columnea latent viroid in horticultural plants. *European Journal of Plant Pathology*. 145: 1007–1011.
- Navarro, B., A. Gisel, M.E. Rodio, S. Delgado, R. Flores and F. Di Serio. 2012. Viroids: How to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie*. 94(7): 1474–1480.
- Owens, R.A., D.R. Smith and T.O. Diener. 1978. Measurement of viroid sequence homology by hybridization with complementary DNA prepared in vitro. *Virology*. 89(2): 388–394.
- Palukaitis, P., 2014. What has been happening with viroids?. *Virus Genes*. 49: 175–184.
- Steger, G., 2017. Modelling the three-dimensional structure of the right-terminal domain of pospiviroids. *Scientific Reports*. 7(1): 711.
- Tangkanchanapas, P., A. Haegeman, M. Höfte and K. De Jonghe. 2021. Reassessment of the Columnea latent viroid (CLVd) taxonomic classification. *Microorganisms*. 9: 1117.
- Tangkanchanapas, P., A. Haegeman, T. Ruttink, M. Höfte and K. De Jonghe. 2020. Whole-Genome deep sequencing reveals host-driven in-plant evolution of columnea latent viroid (CLVd) quasi-species populations. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(9): 3262.
- Verhoeven, J.T.J., C.C.C. Jansen, T.M. Willems, L.F.F. Kox, R.A. Owens and J.W. Roenhorst. 2004. Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology*. 110: 823–831.
- Zhong, X., A.J. Archual, A.A. Amin and B. Ding. 2008. A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *The Plant Cell*. 20(1): 35–47.