

การเคลื่อนที่และการถ่ายทอดด้วยวิธีกลของเชื้อ *Columnea latent viroid* Movement and Horizontal Transmission of *Columnea latent viroid*

สุวิมล เหล่ามโนธรรม¹และคณินนิตย์ เหมียววรกร^{1,2,3*}
Suvimol Laomanotham¹ and Kanungnit Reanwarakorn^{1,2,3*}

บทคัดย่อ

ประเทศไทยมีรายงานการสำรวจพบเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) ซึ่งไวรอยด์ชนิดนี้เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญของมะเขือเทศที่คาดว่าน่าจะติดมากับเมล็ดพันธุ์นำเข้าที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ CLVd จากการตรวจพบเชื้อ CLVd ในแปลงมะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการเคลื่อนที่ของเชื้อ CLVd และการถ่ายทอดโดยวิธีกลโดยใช้ใบมีดทำแผล“razor slashing method”ในมะเขือเทศพันธุ์ที่นิยมปลูกกันทั่วไป “เชอร์รี่และสีดาทิพย์ 4” โดยติดตามและตรวจสอบอาการของโรคในต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ CLVd และยืนยันผลด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction ผลการศึกษาพบว่ารูปแบบการเคลื่อนที่ของเชื้อ CLVd ในต้นมะเขือเทศทั้งสองสายพันธุ์มีลักษณะการเคลื่อนที่ไปส่วนยอดบนสุด จากนั้นเคลื่อนที่ลงมาสู่ใบอื่นๆที่อยู่ถัดลงมา และพบว่าเชื้อ CLVd จากมะเขือเทศสีดาทิพย์ 4 ต้นที่เป็นโรคสามารถแพร่ไปยังต้นมะเขือเทศที่ไม่เป็นโรคโดยวิธีกล โดยสามารถถ่ายทอดไปจนถึงต้นที่ 10 ได้ จากการค้นพบในครั้งนี้ชี้แนะว่า การแพร่ระบาดของเชื้อไวรอยด์ CLVd ในสภาพแปลงปลูกมะเขือเทศน่าจะมาจากวิธีกลผ่านการใช้มีดตัดแต่งหรืออุปกรณ์อื่นๆโดยไม่มี การทำความสะอาดเมื่อทำงานกับต้นมะเขือเทศจำนวนมาก

คำสำคัญ: *Pospiviroid* การถ่ายทอด การเคลื่อนที่ การปนเปื้อน การแพร่กระจาย

Abstract

Columnea latent viroid (CLVd) is a causative agent of an important disease in tomato. There was reported of CLVd infection in the Northeastern and Northern tomato fields in Thailand which might be come from imported seed of CLVd hosts. In this study, the movement and horizontal transmission by “razor slashing method” of CLVd in two commonly grown tomato varieties, “Cherry” and “Seedathip 4”, were investigated by symptom observation and reverse transcription-polymerase chain reaction technique confirmation on inoculated tomato plants. The results indicated that the CLVd moved to the apical shoots before migrating downward. The viroid could effectively be transmitted horizontally through mechanical mode until plant number 10 from a single CLVd infected Seedathip 4 tomato plant. This suggested that mechanical route via contaminated cutters or other tools were likely caused CLVd transmission in field condition.

Keyword: *Pospiviroid*, transmission, movement, contamination, distribution

¹ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

²ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

³ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

*Corresponding author, Email: agrknr@ku.ac.th

คำนำ

Columnnea latent viroid (CLVd) มีลักษณะเป็น RNA สายเดี่ยววงปิด ไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม ชื่อของเชื้อนี้ได้มาจากไอโซเลทแรกที่พบจากต้น *Columnnea erythropae* (ต้นลิปสติก) พบครั้งแรกในรัฐ Maryland ประเทศสหรัฐอเมริกา บนต้นลิปสติกเชื้อไม่ก่อให้เกิดอาการของโรค แต่เมื่อถ่ายทอดไปยังมะเขือเทศสายพันธุ์ Rutgers พบว่าอาการของโรคที่แสดงออกในมะเขือเทศสายพันธุ์ Rutgers จะมีความคล้ายคลึงกับ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) แต่อาการจะไม่รุนแรงเท่า PSTVd สายพันธุ์รุนแรง (Owens *et al.*, 1978) และจากการสำรวจแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศใน 4 จังหวัดคือ ในจังหวัด สกลนคร ขอนแก่น เลย มหาสารคาม ปี 2548 พบเชื้อ CLVd เป็นครั้งแรกในประเทศไทย พบลักษณะอาการผิดปกติบนมะเขือเทศคือเกิดอาการเซลล์ตาย (necrosis) ที่บริเวณใบ ก้านใบและกิ่ง ยอดหดสั้น ใบหดรูป ใบเป็นสีม่วง (ปริเชษฐ์, 2548) เมื่อทดสอบความเสียหายของผลผลิตของมะเขือเทศพันธุ์เชอร์รี่ และ สีดาทิพย์ 3 ในโรงเรือนทดลองพบว่าต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ CLVd พบความเสียหายของผลผลิตของทั้ง 2 พันธุ์คิดเป็น 46.68 และ 44.04 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ (ศศิประภา, 2551) นอกจากนี้เชื้อ CLVd ยังมีพืชอาศัยที่สำคัญโดยการทดลองของ Hammond *et al.* (1989) พบว่า ไอโซเลทของเชื้อ CLVd จากต้นลิปสติกสามารถถ่ายทอดโรคไปยังต้น *Gynura* แดงกวา มะเขือเทศ และมันฝรั่ง การถ่ายทอดของเชื้อไวรอยดไปสู่ต้นใหม่นั้นสามารถแบ่งออกได้ 2 รูปแบบคือ 1. Horizontal transmission เป็นรูปแบบสำคัญของการแพร่กระจายของเชื้อไวรอยดโดยส่วนใหญ่จะเกิดจากการปนเปื้อนทางเครื่องมือทางการเกษตร เครื่องจักร อุปกรณ์ (เช่น กรรไกรตัดกิ่ง ใบมีดตอนกิ่ง) หรือแม้กระทั่งมือ ถังมือ และ เสื้อผ้าเครื่องแต่งกาย สามารถเป็นตัวกลางให้เชื้อไวรอยดถ่ายทอดได้โดยวิธีกล การเกษตรในปัจจุบันมักทำการเกษตรแบบพืชเชิงเดี่ยวในพื้นที่นั้นๆจะมีความหนาแน่นของพันธุกรรมของพืชที่มีความสม่ำเสมอสูง ส่งเสริมให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อในสภาพแปลงปลูกได้ดีและเชื้อสามารถถ่ายทอดไปกับเมล็ดพันธุ์ ด้วยเหตุนี้ทำให้มีการแพร่ระบาดของเชื้อในระยะไกลได้โดยติดไปกับเมล็ดผ่านการค้าระหว่างประเทศ (Hadidi *et al.*, 2017) รูปแบบที่ 2 คือ Vertical transmission เป็นรูปแบบการถ่ายทอดของเชื้อผ่านทางเมล็ดและละอองเกสร ซึ่งมีรายงานในไวรอยดทั้งสองวงศ์โดยในวงศ์ *Avsunviroidae* พบใน 2 เชื้อคือ *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) และ *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) ที่สามารถถ่ายทอดผ่านทางละอองเกสร (Flores *et al.*, 2011) ในเชื้อ CLVd มีรายงานการถ่ายทอดทางเมล็ดโดยตรงจากต้นกล้าที่มาจากเมล็ดที่ได้จากต้นติดเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดสูงถึง 5.3-100 % ในมะเขือเทศ (Matsushita and Tsuda, 2016) ด้วยเหตุนี้จึงให้ความสำคัญในการศึกษาระยะเวลาแพร่กระจายเชื้อภายในต้นมะเขือเทศของเชื้อ CLVd และการถ่ายทอดเชื้อ CLVd โดยวิธีกลผ่านการใช้ใบมีดในมะเขือเทศ พันธุ์สีดาทิพย์ 4 และพันธุ์เชอร์รี่ เพื่อให้ทราบระยะเวลาการเข้าทำลายของเชื้อ หากเกิดการถ่ายทอดโดยวิธีกลจะได้กำจัดแหล่งของเชื้อได้ทันเวลา

วิธีการศึกษา

ศึกษาระยะเวลาการแพร่กระจายของเชื้อ *Columnnea latent viroid* ในต้นมะเขือเทศ

การทดลองนี้ต้องการทราบถึงระยะเวลาการแพร่กระจายของเชื้อทั่วทั้งต้นในต้นมะเขือเทศโดยทำการปลูกเชื้อ CLVd ลงบนต้นมะเขือเทศ 2 พันธุ์คือ สีดาทิพย์ 4 และ เชอร์รี่ พันธุ์ละ 5 ต้น ที่ระยะหลังย้ายกล้า 30 วัน ทำการติดป้ายที่ใบโดยนับใบที่ถัดจากใบเลี้ยงขึ้นมาเป็นใบที่ 1 ติดป้ายจนถึงใบที่ 16 และใบสุดท้ายเป็นใบยอด จากนั้นสังเกตอาการและจดบันทึกลักษณะอาการที่เกิดขึ้นทุกสัปดาห์โดยสังเกตลักษณะอาการต่างๆ เช่น ยอดหดสั้น ใบลดรูป และอาการเซลล์ตาย (necrosis) ที่บริเวณเส้นใบ ให้ระดับเป็นระดับความรุนแรง 3 ระดับ ดังนี้ (-) คือ ไม่แสดงอาการ (+) คือ พบอาการเซลล์ตายที่เส้นใบบนใบย่อยเล็กน้อย (++) คือ พบอาการเซลล์ตายแพร่กระจายทั่วทั้งใบย่อย (+++) คือ พบอาการเซลล์ตายแพร่กระจายไปทั่วทั้งใบ

ตรวจติดตามการแพร่กระจายของเชื้อทั่วต้นหลังจากการปลูกเชื้อทุกสัปดาห์ด้วยเทคนิค reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) ที่ใบบนและใบล่างนับจากใบที่ถูกปลูกเชื้อและในสัปดาห์ต่อไป มาตรวจใบเหนือและล่างลงไป ถัดไปจากใบเดิม (Figure 1)

การสกัดกรดนิวคลีอิกจากใบ

การสกัดอาร์เอ็นเอจากใบมะเขือเทศ โดยวิธี CTAB method ตามวิธีการของ Scottish Agricultural Science Agency โดยเติมไนโตรเจนเหลวในตัวอย่างพืช 100 มิลลิกรัม บดจนกระทั่งตัวอย่างละเอียดเติม 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 เติวก่อนใช้งานเท่านั้น) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มที่ 65 °C เป็นเวลา 30 นาที (พลิกหลอดไปมาทุก 10-15 นาที) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำ phenol 350 ไมโครลิตร และเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ดูดของเหลวส่วนใสส่วนบนปริมาตร 550 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอน ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบน 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม 5M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ เติมน้ำ isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตรเท่ากับสารละลาย พลิกหลอดเพื่อให้สารละลายเข้ากันและบ่มที่ -20°C ซ้ำมคืน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เทของเหลวส่วนใสทิ้งระวังไม่ให้ตะกอนไหลตก ละลายตะกอนด้วย TE buffer ที่ประกอบด้วย 1% SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมน้ำ 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol ที่แช่เย็น 300 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเพื่อผสมให้สารเข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่ -20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนนิวคลีอิก ล้างตะกอนกรดนิวคลีอิกด้วย 70% ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดเกลือต่างๆ และ isopropanol ออก นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เท ethanol และตากตะกอนนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำบริสุทธิ์ที่ไม่มี nuclease ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°C (Jeffries and Tina, 2004)

ตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

สังเคราะห์ cDNA ของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้โดยการใช้ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณเบสของไวรัสของเชื้อไวรัส ในการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ CL-P2 (cCL-P2 : 5' CTG CAG CCA TGC AAA GA (17) 3', hCL-P2 : 5' GGT CAG GTG TGA ACC AC (17) 3') (ศศิประภา, 2551) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ CLVd ที่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศซึ่งให้แถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ขนาด 368 คู่เบส

ขั้นตอนการทำ RT-PCR

เพื่อสร้างสาย cDNA จากเชื้อไวรัส ปฏิบัติประกอบด้วยไพรเมอร์สาย cCL-P2 ความเข้มข้น 2 pmole ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ 1.75 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 96 °C นาน 5 นาที จากนั้นนำมาแช่น้ำแข็งทันที นาน 5 นาที แล้วนำเข้าเครื่อง 37 °C นาน 15 นาที จากนั้นนำออกมาเติมน้ำ reverse transcription buffer 2.0 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs 1.0 ไมโครลิตร, 200 U/μl reverse transcriptase 0.25 ไมโครลิตรนำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาเพิ่มปริมาณปฏิกิริยาประกอบไปด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อ 9.4 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 1.6 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs 0.5 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ cCL-P2 และ hCL-P2 ความเข้มข้น 2 pmole/μl ปริมาณสายละ 2.0 ไมโครลิตร, 2 U/μl Taq DNA polymerase 0.5 ไมโครลิตร และ cDNA 2.0 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ pre-denature ที่ 92 °C นาน 3 นาที denature ที่ 92 °C เป็นเวลา 40 วินาที annealing ที่ 60 °C เป็นเวลา 40 วินาที และ extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 40 วินาที จำนวน

35 รอบ และตามด้วย extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที 1 รอบตรวจสอบขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยการใช้ 2% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ซึ่งจะแสดงผลให้เห็นแถบของดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 370 คู่เบส

ศึกษาการถ่ายทอดโดยวิธีกลของเชื้อ CLVd ด้วยวิธี razor blade contamination

หลังจากการสำรวจในแปลงเกษตรกรพบว่าหากพบอาการที่สงสัยว่าเป็นอาการของ CLVd ก็จะมีพบในต้นถัดไปอีกเช่นกันซึ่งมีความเป็นไปได้ที่การแพร่ระบาดจะเกิดจากการตัดแต่งใบจากต้นเป็นโรคของเกษตรกร จึงต้องการศึกษาว่าการตัดแต่งใบจากต้นติดเชืื่อนั้น เชื้อ CLVd จะสามารถถ่ายทอดโรคไปได้อีกกี่ต้น (Figure 2)

เตรียมต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่มีการติดเชื้อ CLVd จำนวน 1 ต้น ที่ได้มีการตรวจยืนยันด้วยเทคนิค RT-PCR ทำการระบุตำแหน่งที่จะทำให้เกิดแผลในช่วงกลางลำต้นขึ้นไปประมาณ 30 เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นแหล่งของเชื้อในการถ่ายทอดโรค และเตรียมต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 จำนวน 30 ต้น (ข้าละ 10 ต้น) เพื่อจำลองการติดเชื้อจากการตัดแต่งใบมะเขือเทศ

ระบุตำแหน่งบนใบมีดที่บริเวณปลายใบมีดระยะ 1 เซนติเมตรที่จะให้มีการปนเปื้อนเชื้อจากนั้นทำให้มีดปนเปื้อนเชื้อ CLVd ด้วยการใช้มีดปาดบนต้นที่ติดเชื้อ จำนวน 10 ครั้ง และตัดที่ใบย่อยอีก 5 ครั้ง จากนั้นนำไปทำแผลบนต้นมะเขือเทศปกติที่เตรียมไว้ ทำแผลให้กับต้นที่ 1 จนถึงต้นที่ 10 ทำเช่นนี้อีก 2 ข้า ด้วยใบมีดคนละชุด (ทำแผลบนต้นปกติบริเวณกลางลำต้นตรงบริเวณที่แตกกิ่งแขนงและตัดที่ใบที่ 8)

บันทึกอาการและตรวจติดตามเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค RT-PCR ทุกต้นหลังจากทำแผลให้กับต้นมะเขือเทศทุกสัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์

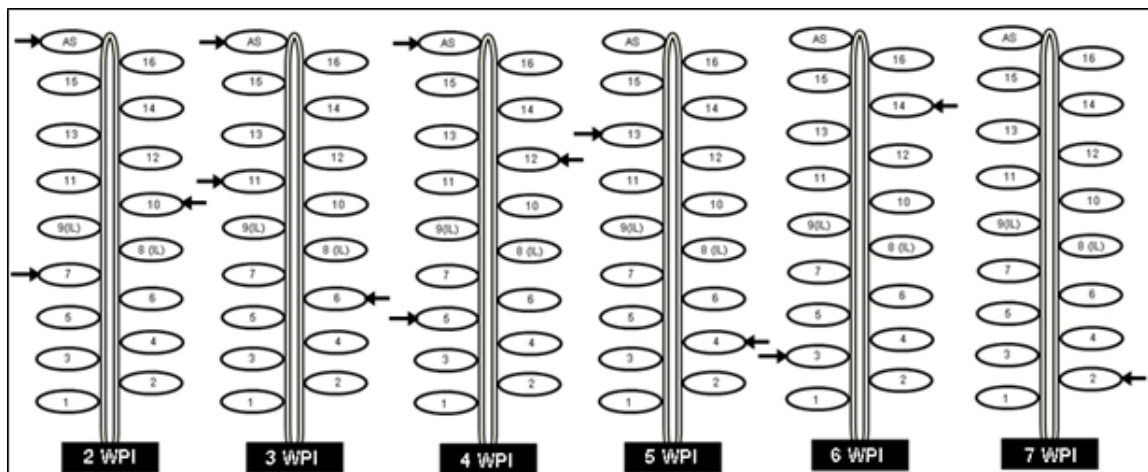


Figure 1 Diagram of collected tomato leave at post inoculation in CLVd movement test. (WPI) = weeks post inoculation, (IL) = inoculated leaf, (AS) = apical shoot and Arrows = collected leaves.

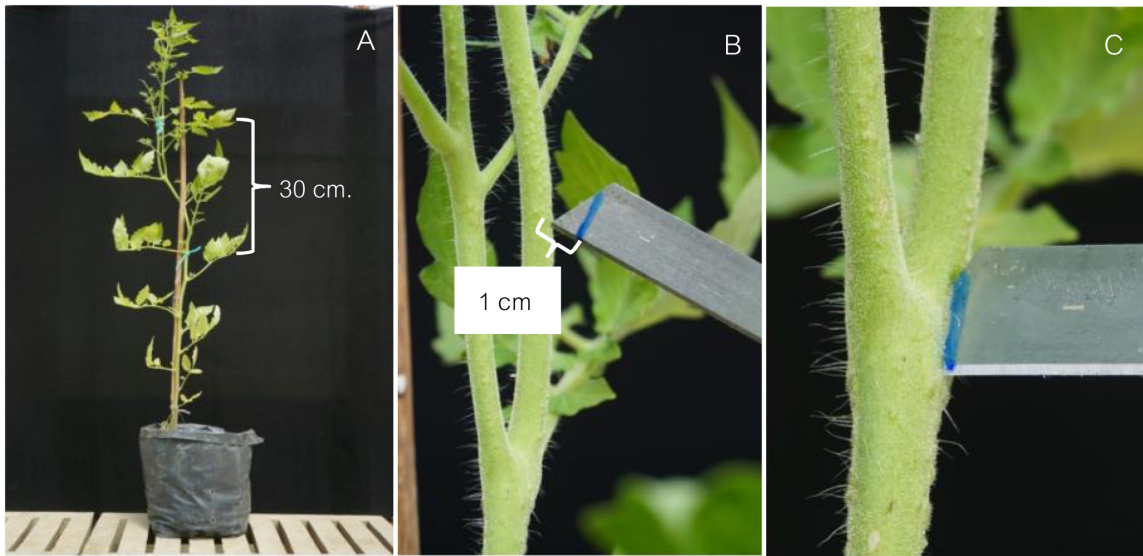


Figure 2 Horizontal transmission test on Seedathip 4 tomato plant. (A) 30 cm long location on CLVd infected tomato plant for performing of contaminated blade, (B) 1 cm long at on the CLVd contaminated tip blade and (C) mechanical inoculation on healthy tomato plant.

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ศึกษาระยะเวลาการแพร่กระจายของเชื้อ *Columnea latent viroid* ในต้นมะเขือเทศ

หลังจากปลูกเชื้อ CLVd ลงบนใบที่ 8 และ 9 ของมะเขือเทศทั้งสองพันธุ์ พันธุ์ละ 5 ต้นหลังจากนั้น 2 สัปดาห์ มะเขือเทศทั้ง 2 พันธุ์เริ่มแสดงอาการที่ใบยอด ทำการบันทึกผลการแสดงอาการที่ใบทุกใบนับจากใบที่ 1 นับจากใบล่างขึ้นไปสู่ใบบนที่ 16 และใบยอด ตาม Table 1 และ 2 จะพบว่าการเดินทางของเชื้อ CLVd จะไปแพร่กระจายในเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตก่อนคือใบยอดที่แตกออกมาใหม่ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยยอดที่แตกออกมาใหม่มีอาการแผลไหม้ที่เส้นใบเป็นจุดเล็กๆ ใบยอดที่แตกออกมาใหม่มีขนาดเล็กลง และใบบิดม้วน (Figure 3A, 3B) ในขณะที่ใบล่างถัดจากใบที่ปลูกเชื้อนั้นไม่แสดงอาการใดๆ ในทั้ง 2 พันธุ์ เก็บใบไปตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR หลังจากนั้น สัปดาห์ถัดมาเชื้อจะกระจายตัวจากใบบนสุดลงสู่ใบล่างถัดๆ ไป (Figure 3C, 3D) เมื่อเก็บใบล่างจากใบที่ปลูกเชื้อไปตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR ก็ยังให้ผลเป็นลบ หลังจากนั้นสัปดาห์ที่ 4 หลังการปลูกเชื้อพบอาการไหม้บริเวณลำต้น และพบใบที่แตกออกมาใหม่ตามซอกใบของใบที่ 5 และ 6 มีลักษณะใบเหลืองและมีอาการไหม้ที่เส้นกลางใบ จึงเก็บใบอ่อนที่ซอกใบที่ 5 และ 6 ของมะเขือเทศของทั้งสองพันธุ์ไปตรวจ ปรากฏว่าพบเชื้อ CLVd เมื่อเปรียบเทียบกับใบที่ 10 และ ใบที่ 11 ของทั้ง 2 พันธุ์ ในสัปดาห์ที่ 7 8 และ 9 พบว่าพันธุ์สีดาทิพย์ 4 แสดงอาการซ้ำกว่าพันธุ์เซอร์รี

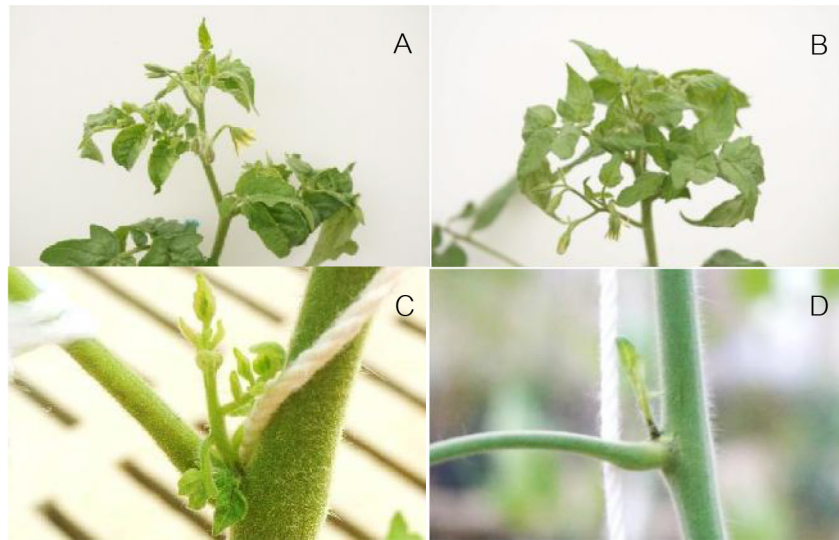


Figure 3 Symptoms caused by CLVD on Seedathip 4 and Cherry tomato: necrotic spot on leaf veins, epinasty leaves and apical shoot abnormality on (A) Seedathip 4 as well as (B) Cherry and lateral shoot distortion on (C) Seedathip 4 as well as (D) Cherry.

จากการทดลองพบว่าในระยะเวลา 2 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อมะเขือเทศแสดงอาการที่ยอดในทั้ง 2 พันธุ์ แต่ใบที่ต่ำกว่าใบที่ 8 และ 9 กลับยังไม่แสดงอาการซึ่งเมื่อตรวจยืนยันผลด้วยเทคนิค RT-PCR ตรวจไม่พบเชื้อเช่นเดียวกัน การเคลื่อนที่ของเชื้อไวรอยด์จะมีการแพร่กระจายของเชื้อแบบ Systemic คือการแพร่กระจายไปทั่วทั้งต้นโดยเคลื่อนที่จากเซลล์หนึ่งไปยังเซลล์ข้างเคียงหลังจากนั้นจึงแพร่กระจายไปตามส่วนต่างๆ ทั่วทั้งต้น (Hadidi, 2003) เช่นในการเคลื่อนที่ของเชื้อ PSTVd จะพบว่าเคลื่อนที่จากใบล่างขึ้นสู่ใบยอดโดยผ่าน phloem (Palukaitis, 1987) และการศึกษาของ Zhu *et al.* (2001) พบว่าเชื้อ PSTVd จะเคลื่อนที่ไปยังใบที่กำลังมีการเจริญเติบโตแต่ไม่พบที่ใบที่พัฒนาเต็มที่แล้ว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ที่ตรวจไม่พบเชื้อ CLVD ในใบล่างซึ่งมีการพัฒนาของใบเต็มที่แล้วขณะที่ยอดที่แตกออกมาใหม่ตามข้อใบของใบที่ 5 และ 6 นั้นกลับตรวจพบเชื้อเนื่องจากเป็นใบที่กำลังมีการเจริญเติบโตหรือยังพัฒนาไม่เต็มที่และจากการทดลองในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าเชื้อ CLVD สามารถแพร่กระจายเชื้อไปทั่วทั้งต้นได้ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์

หลังจากการปลูกเชื้อที่ใบยอดในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 เมื่ออายุ 30 วันหลังจากการย้ายกล้า ซึ่งเป็นที่สังเกตว่าหลังการปลูกเชื้อ 2 สัปดาห์ใบที่อยู่เหนือใบที่ทำการปลูกเชื้อยังไม่แสดงอาการและตรวจไม่พบเชื้อขณะที่ตรวจพบเชื้อ CLVD ที่ใบยอด 4 ใน 5 ต้นในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 และ 2 ใน 5 ต้นในมะเขือเทศพันธุ์เซอรี่และตรวจพบเชื้อ CLVD ที่ใบยอดครบทั้ง 5 ต้นในสัปดาห์ที่ 3 หลังการปลูกเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของเชื้อ CEVd ที่ศึกษาการเคลื่อนที่และการเพิ่มปริมาณเชื้อในต้นอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ตรวจสอบด้วยวิธี RT-qPCR assay เป็นระยะเวลา 5 วันหลังการปลูกเชื้อที่บริเวณโคนต้น โดยตรวจติดตามเชื้อที่ 3 ส่วนคือ ส่วนลำต้น รากและใบ พบว่า มีการตรวจพบเชื้อที่บริเวณต้นโดยปริมาณของเชื้อ CEVd เพิ่มปริมาณสูงขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 5 แต่ตรวจพบเชื้อที่รากในวันที่ 3 และตรวจพบที่ใบได้ในวันที่ 5 จึงทำให้ทราบว่าเชื้อ CEVd เคลื่อนที่ลงไปที่เพิ่มปริมาณที่รากก่อนที่จะเคลื่อนที่สู่ใบยอด (Hajeri *et al.*, 2011) และสอดคล้องกับการทดลองของ Bani Hashemian *et al.* (2010) ที่ศึกษาเชื้อไวรอยด์ 6 ชนิดที่เป็นเชื้อสำคัญในพืชตระกูลส้ม พบว่าการเคลื่อนที่ของเชื้อไวรอยด์สามารถเคลื่อนที่แบบ Long-distance movement ได้จากจุดที่ทำการปลูกเชื้อผ่านการเสียบยอด หลังจากการปลูกเชื้อ 4 เดือน ตรวจพบเชื้อ

CEVd มีการเคลื่อนที่ลงไปที่ต้นตอ (rootstock) และเคลื่อนที่สู่ส่วนบนที่เป็นยอดพันธุ์ดี (scion: Etrog citron) โดยทั้งหมดมีการเคลื่อนที่ผ่าน interstock ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีการตรวจพบเชื้อหรือตรวจพบเชื่อน้อยมากโดยวิธี Northern hybridization ซึ่ง interstock เป็นพันธุ์ที่ไม่มีประสิทธิภาพในการที่เชื้อไวรัสจะสะสมและเพิ่มปริมาณของเชื้อได้แต่ยอมให้เชื้อมีการเคลื่อนที่ผ่านได้ ซึ่งการเคลื่อนที่ขึ้น และลงของเชื่อนั้น เป็นการเคลื่อนที่ผ่าน phloem และมีความเกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยาร่วมกันของเชื้อกับพืชโดยจากการศึกษาของ Gómez and Pallás (2004) ศึกษาในเชื้อ *Hop stunt viroid* พบความเกี่ยวข้องของโปรตีน CsPP2 (Ribonucleoprotein Complex) จากแตงกวาที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ผ่านการเสียยอดได้

Table 1 Intensity of leaf's symptoms on Seedathip 4 and RT-PCR results of CLVd at 8 weeks post inoculation.

WPI	Intensity of leaf's symptoms and RT-PCR results															
	1	2	3	4	5	6	7	IL	10	11	12	13	14	15	16	AS
2	-	-	-	-	-	-	-	(0/5)	-	(0/5)	-	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	-	(0/5)	-	+	-	-(0/5)	+	+	++	++	++	+++
4	-	-	-	-	(0/5)	-	-	+	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++
5	-	-	-	(0/5)	-	-	-	+	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++
6	-	-	(0/5)	-	-	-	-	+	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7	-	(0/5)	-	-	-	-	-	+	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
8	N	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
9	N	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(-) = no symptoms, (+) = slight necrosis on leaflet vein, (++) = necrosis on over leaflet, (+++) = necrosis on over the entire leaf, 0/5-5/5 = number of CLVd positive tomato plant /number of tested plant, (N) = no recording because of leaf dropping, (WPI) = weeks post inoculation, (IL) = inoculated leaf, (AS) = apical shoot.

Table 2 Intensity of leave's symptoms on Cherry and RT-PCR results of CLVd at 8 weeks post inoculation.

WPI	Intensity of leaf's symptoms and RT-PCR result															
	1	2	3	4	5	6	7	IL	10	11	12	13	14	15	16	AS
2	-	-	-	-	-	-	-	(0/5)	(0/5)	-	-	-	-	-	-	++ (2/5)
3	-	-	-	-	-	(0/5)	-	+	-	(0/5)	+	+	+++	+++	+++	+++ (5/5)
4	-	-	-	-	(0/5)	-	-	+	-	-	(2/5)	+	+++	+++	+++	+++ (5/5)
5	-	-	-	(0/5)	-	-	-	+	-	-	++	(5/5)	+++	+++	+++	+++
6	-	-	(0/5)	-	-	-	-	+	-	-	++	++	(5/5)	+++	+++	+++
7	-	(0/5)	-	-	-	-	+	+	++	+	++	++	+++	+++	+++	+++
8	N	N	-	-	-	-	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
9	N	N	-	-	-	-	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(-) = no symptoms, (+) = slight necrosis on leaflet vein, (++) = necrosis on over leaflet, (+++) = necrosis on over the entire leaf, 0/5-5/5 = number of CLVd positive tomato plant /number of tested plants, (N) = no recording because of leaf dropping, (WPI) = weeks post inoculation, (IL) = inoculated leaf, (AS) = apical shoot.

2. ศึกษาการถ่ายทอดโดยวิธีกลของเชื้อ CLVd ด้วยวิธี razor blade contamination

จากการเก็บตัวอย่างตรวจทุกสัปดาห์จนถึงสัปดาห์ที่ 8 ปรากฏว่าจากการปลูกเชื้อโดยการใช้อิมมิดทำแผลบริเวณกึ่งกลางของลำต้นและการตัดใบซึ่งเป็นการเลียนแบบการตัดแต่งใบของเกษตรกรหากมีการปนเปื้อนเชื้อ CLVd ไปกับอุปกรณ์ตัดแต่งกิ่ง แล้วไปทำบาดแผลให้กับต้นปกติไปเรื่อยๆ จากต้นที่ 1 ไปจนถึงต้นที่ 10 ทั้ง 3 ซ้ำให้ผลแตกต่างกันไปในแต่ละซ้ำ โดยในซ้ำที่ 1 ตรวจพบเชื้อ CLVd เพียงแค่ 3 ต้น (คิดเป็น 30%) คือต้นที่ 3 ในสัปดาห์ที่ 2 หลังการทำบาดแผล และต้นที่ 4 และ 5 พบในสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ตามลำดับ หลังการทำบาดแผล ส่วนในซ้ำที่ 2 ตรวจพบเชื้อ CLVd ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 หลังจากการทำบาดแผลในต้นที่ 1, 2, 3, 6, 9 และ 10 ส่วนต้นที่ 5 ตรวจพบในสัปดาห์ที่ 6 คิดเป็น 70% ของการติดเชื้อและสุดท้ายในซ้ำที่ 3 ตรวจพบจำนวน 5 ต้น คิดเป็น 50% ของการติดเชื้อจากอิมมิด โดย ต้นที่ 1, 2 และ 3 ตรวจพบในสัปดาห์ที่ 6 ต้นที่ 8 และ 9 ตรวจพบในสัปดาห์ที่ 3 จากผลการศึกษาในครั้งนี้นี้สรุปได้ว่าหากเชื้อมีปริมาณมากพอก็จะสามารถทำให้ต้นปกติติดเชื้อได้จนถึงต้นที่ 10 และต้นที่ตรวจพบเชื้อในสัปดาห์ที่ 3, 5 และ 6 (Table 3) นั้นอาจขึ้นกับปริมาณเชื้อที่น้อยมากทำให้การเพิ่มปริมาณเชื้อในต้นที่แข็งแรง ที่มีความต้านทานต่อเชื้อในแต่ละต้นต่างกัน จึงทำให้ตรวจพบเชื้อช้า และต้นที่ตรวจไม่พบเชื้อ CLVd เลยนั้นอาจขึ้นอยู่กับ การทำบาดแผลให้กับต้นปกติอาจจะไม่สัมผัสเชื้อที่ปนเปื้อนที่อิมมิดหรือเชื้อเข้าไปในบาดแผลของต้นปกติได้แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณบนต้นปกติได้

Table 3 RT-PCR results of CLVd mechanical transmission by razor slashing method.

Rep ^{1/}	Weeks ^{2/}									
	No.1 ^{3/}	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9	No.10
I	-	-	2	5	6	-	-	-	-	-
II	2	2	2	-	6	2	-	-	2	2
III	6	6	6	-	-	-	-	3	3	-

^{1/} I = first replication, II = second replication, III = third replication.

^{2/} CLVd detection by RT-PCR technique every week for 8 weeks post inoculation.

^{3/} inoculated plant no. 1-10 by razor slashing method.

จากการทำให้ใบมีดปนเปื้อนเชื้อ CLVd เพื่อเป็นการจำลองการถ่ายทอดโดยวิธีกลโดยใช้ใบมีดพบว่า การทดลองทั้ง 3 ซ้ำให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันแต่โดยรวมแล้วการถ่ายทอดเชื้อสามารถตรวจเชื้อได้ในระยะเวลาเพียง 2 สัปดาห์หลังจากการทำบาดแผล(พืชได้รับเชื้อแล้ว) โดยสังเกตอาการที่ใบยอดเริ่มม้วนหงิก และมีอาการไหม้ที่เส้นใบ และตรวจพบเชื้อในสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ถึงแม้ว่าจะมีต้นที่ไม่ติดเชื้อเลยก็ตาม นอกจากนั้นผลในซ้ำที่ 2 ยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถถ่ายทอดไปได้โดยง่ายจากการทำบาดแผลเพียง 3 ครั้งลงบนต้นที่ไม่เป็นโรคจากต้นที่ 1 จนถึงต้นที่ 10 ซึ่งเชื้อ CLVd สามารถถ่ายทอดและตรวจพบเชื้อได้จนถึงต้นที่ 10 ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดได้ในระดับ 30-70% สอดคล้องกับการศึกษาเชื้อไวรอยด์ที่เข้าทำลายต้น citron เช่นเชื้อ *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd) และ *Citrus viroid IV* (CvD-IV) จะพบว่า การถ่ายทอดโดยใช้ใบมีดผ่าตัดในการทดลองในโรงเรียนขั้นต้นจากการทำให้ต้น citron ติดเชื้อจากการเฉือนเพียง 1 ครั้ง ในการถ่ายทอดเชื้อพบการติดเชื้อในอัตรา 25-50% ซึ่งแตกต่างจากการทดลองในสภาพแปลงทดลองโดยการทาบกิ่ง ซึ่งมีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์โดยมีอัตราการถ่ายทอดที่ 4-21% ซึ่งค่อนข้างต่ำ สาเหตุอาจเกิดจาก สภาพอากาศและปริมาณเชื้อที่มีปริมาณน้อย (Barbosa *et al.*, 2005) และการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ PSTVd โดยวิธีกลผ่านทางการใช้วัสดุภายในได้การควบคุมอุณหภูมิที่แตกต่างกันที่ 15°C และ ที่ 25°C ในมะเขือเทศพบว่ามีความสามารถในการถ่ายทอดได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้อุณหภูมิ 25 °C โดยมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอด 100% (Verhoeven *et al.*, 2010) แสดงให้เห็นว่าการถ่ายทอดเชื้อไวรอยด์ด้วยวิธีกลเป็นวิธีถ่ายทอดเชื้อได้ง่ายดังนั้นเกษตรกรผู้ปลูกต้องระมัดระวังอุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดแต่งที่ควรมีการฆ่าเชื้อเพื่อลดการแพร่ระบาดของในสภาพแปลงปลูก สำหรับการทดลองในครั้งนี้เนื่องจากยังสามารถตรวจพบเชื้อ CLVd ได้จนถึงต้นที่ 10 ซึ่งอาจยังมีโอกาสที่เชื้อจะสามารถถ่ายทอดเชื้อไปได้มากกว่านั้น หากมีการศึกษาต่อควรเพิ่มปริมาณต้นมะเขือเทศในแต่ละซ้ำให้มากกว่า 10 ต้น เพื่อให้ทราบว่าเชื้อ CLVd จะสามารถถ่ายทอดเชื้อในสภาพจริงไปได้จำนวนต้นมากเท่าใดและเพิ่มจำนวนพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ เนื่องจากความต้านทานต่อเชื้อในแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกัน

เนื่องจากการตัดแต่งกิ่งเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพในมะเขือเทศโดยช่อดอกช่อแรกจะเกิดที่ตำแหน่งใบที่ 8-9 สำหรับในประเทศไทยมักจะเป็นพันธุ์ที่มีการเก็บเกี่ยวเร็วมักจะตัดแต่งกิ่งแขนงให้มี 2-3 แขนงต่อต้น ส่วนกิ่งแขนงอื่นๆที่อยู่ใต้ช่อดอกแรกมักจะตัดทิ้งตั้งแต่ระยะเป็นกิ่งอ่อน (จานุรักษ์, 2541) นอกจากนั้นการศึกษากการตัดแต่งช่อดอกเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตมะเขือเทศภายใต้สภาพโรงเรียน พบว่าการตัดแต่งช่อดอก ให้มีจำนวนช่อดอก 4-5 และ 6-7 ช่อต่อกิ่งจะให้ผลผลิตต่อต้นสูงสุด (สุทธิณี และ สุชีลา, 2552) จากที่กล่าวมาจะเห็นว่าลักษณะการตัดแต่งกิ่งจะสอดคล้องกับการทดลองการแพร่กระจายของเชื้อ CLVd ภายในต้นที่พบเชื้อ CLVd ที่พบอยู่ในบริเวณส่วนเจริญภายในต้นเช่นในใบที่ 7 จนถึงใบยอดและยอดที่แตกตามซอกใบต่ำกว่าใบที่ 7 ลงมา ซึ่งหากเกษตรกร

มีการตัดแต่งกิ่ง หรือ ตัดแต่งข้อในตำแหน่งดังกล่าวที่มีเชื้ออยู่จะเป็นการส่งเสริมการแพร่ระบาดภายในแปลงปลูกได้มากยิ่งขึ้น โดยความรุนแรงของโรคจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อที่เข้าทำลาย สายพันธุ์ของมะเชื้อเทศ และสภาพแวดล้อมที่ปลูกพืช ซึ่งป้องกันได้โดยทำการฆ่าเชื้อที่ติดมากับอุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดแต่งกิ่งจากการศึกษาในเชื้อ PSTVd ซึ่งเป็นเชื้อในสกุลเดียวกับเชื้อ CLVd สามารถใช้ 3% sodium hypochlorite (น้ำยาซักผ้าขาว) ในการฆ่าเชื้อนี้ได้ (Singh *et al.*, 1989)

สรุปผลการศึกษา

เชื้อไวรอยด์ *Columnea latent viroid* (CLVd) สามารถเคลื่อนที่และแพร่กระจายภายในต้นมะเชื้อเทศในระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยมีรูปแบบการเคลื่อนที่จากจุดที่ได้รับเชื้อไปยังยอดและเคลื่อนที่ลงมาในใบถัดลงมา เชื้อ CLVd สามารถแพร่กระจายจากต้นที่เป็นโรคไปยังต้นข้างเคียงจำนวนมากโดยวิธีกล ซึ่งคาดว่าเป็นลักษณะที่พบจริงในสภาพการปลูกเพื่อการค้า ดังนั้นเกษตรกรจึงควรตรวจแปลงกำจัดต้นเป็นโรคและทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงอย่างสม่ำเสมอ เพื่อลดโอกาสการแพร่กระจายของโรค

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์วิทยการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

เอกสารอ้างอิง

- จานลักษณะ ขนบตี. 2541. การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์โอเดียร์สโตร. กรุงเทพฯ.
- ปรีเชษฐ ตั้งกาญจนนาสน. 2548. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเชื้อเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุทธิณี สีลากุล และสุชีลา เตชะวงศ์เสถียร. 2552. เทคโนโลยีการจัดการตัดแต่งข้อสำหรับการผลิตมะเชื้อเทศภายใต้สภาพโรงเรือนพลาสติก. ว.วิทย.เกษตร. 40(3) (พิเศษ): 125-128.
- ศศิประภา มาราช. 2551. โคลนก่อโรคของเชื้อ *Columnea latent viroid* และผลกระทบต่อมะเชื้อเทศพันธุ์การค้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Bani Hashemian, S.M., C.J. Barbosa, P. Serra and N. Duran-Vila. 2010. Effects of resistance of *Eremocitrus glauca* and *Microcitrus australis* to viroid infection: replication, accumulation and long-distance movement of six citrus viroids. *Plant Pathology* 59(3): 413-421.
- Barbosa, C.J., J.A. Pina, J. Pérez-Panadés, L. Bernad, P. Serra and L. Navarro. 2005. Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Disease* 89: 749-754.
- Flores, R., F.D. Serio, B. Navarro, N. Duran-Vila and R.A. Owens. 2011. Viroids and Viroid Diseases of Plants Studies in Viral Ecology: John Wiley & Sons, Inc. 307-342.
- Gómez, G., and V. Pallás. 2004. A Long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex *In Vivo* with *Hop stunt viroid* RNA. *Journal of Virology* 78(18): 10104-10110.
- Hadidi, A., R. Flores, P. Palukaitis and J. Randles. 2017. Viroid Biology. 53. In L. Versteeg-Buschman, ed. Viroid and Satellites. Academic press. United Kingdom. 746p.
- Hadidi, A., R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik. 2003. Viroids. Science Publishers, Inc., USA. 370p.

- Hajeri, S., C. Ramadugu, K. Manjunath, J. Ng, R. Lee and G. Vidalakis. 2011. *In vivo* generated *Citrus exocortis viroid* progeny variants display a range of phenotypes with altered levels of replication, systemic accumulation and pathogenicity. *Virology* 417(2): 400-409.
- 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: 10083-10093.
- Jeffries, C. and J. Tina. 2004. Protocol for the Diagnosis of Quarantine Organism: *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). Scottish Agricultural Science Agency, East Craigs, Edinburgh, United Kingdom.
- Matsushita, Y. and S. Tsuda. 2016. Seed transmission of *Potato spindle tuber viroid*, *Tomato chlorotic dwarf viroid*, *Tomato apical stunt viroid*, and *Columnnea latent viroid* in horticultural plants. *European Journal of Plant Pathology* 145(4): 1007-1011.
- Owens R., D.R. Smith and T.O. Diener. 1978. Measurement of viroid sequence homology by hybridization with complementary DNA prepared *In vitro*. *Virology* 89: 388-394.
- Palukaitis, P. 1987. *Potato spindle tuber viroid*: investigation of the long-distance, intra-plant transport route. *Virology* 158: 239-241.
- Singh, R.P., A. Boucher and T.H. Somerville. 1989. Evaluation of chemicals for disinfection of laboratory equipment exposed to *Potato spindle tuber viroid*. *American Potato Journal* 66(4): 239-246.
- Verhoeven, J.T.J., L. Hüner, M.V. Marn, I.M. Plesko and J.W. Roenhorst. 2010. Mechanical transmission of *Potato spindle tuber viroid* between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides* and potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology* 128(4): 417-421.
- Zhu, Y., L. Green, Y.M. Woo, R. Owens and B. Ding. 2001. Cellular basis of *Potato spindle tuber viroid* systemic movement. *Virology* 279(1): 69-77.

วันรับบทความ (Received date) 3 พ.ย. 2560

วันแก้ไขบทความ (Revised date) 14 ม.ค. 2561

วันตอบรับบทความ(Accepted date) 14 ก.พ. 2561