

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : แผนงานวิจัยและพัฒนาด้านเมล็ดพันธุ์พืช
2. โครงการวิจัย : โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์
กิจกรรม : -
กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การตรวจสอบเชื้อ Pospiviroid ในเมล็ดพันธุ์พืชเพื่อการนำเข้า-ส่งออกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Detection of Pospiviroid in Seed for Import-Export by Molecular Technique
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : นางสาวศุภลักษณ์ สัตยสมิตสถิต
สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก
ผู้ร่วมงาน : นางสาวกัญทิมา ทองศรี
สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก
นางสาวภัสสร วัฒนกุลภาคิน
สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

5. บทคัดย่อ

พอสพิไวรัสเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในหลายประเทศ ดังนั้นจึงเป็นข้อกักกันที่สำคัญในการส่งออกเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ วิธีการในการตรวจวินิจฉัยจำเป็นต้องมีประสิทธิภาพและมีความถูกต้องแม่นยำสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการใช้เทคนิคไพโรซีควอนซิ่งเพื่อนำมาใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยอาศัยหลักการของ synthesis sequencing และการตรวจจับ PPI ที่หลุดออกมาในขณะที่เกิดกระบวนการ polymerization เทคนิคนี้มีการพัฒนาประสิทธิภาพโดยเทียบกับวิธีทดสอบมาตรฐานด้วยเทคนิค real time RT-PCR (TaqMan) โดยการใช้ข้อมูลชีวสารสนเทศและข้อมูลจีโนมจากฐานข้อมูลธนาคารพันธุกรรมเพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์และหาสถานะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาไพโรซีควอนซิ่ง พบว่าไพรเมอร์ PPV1 มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส 8 ชนิด ได้แก่ *Potato spindle tuber viroid*, *Tomato chlorotic dwarf viroid*, *Mexican papita viroid*, *Tomato planta macho viroid*, *Chrysanthemum stunt viroid*, *Citrus exocortis viroid*, *Tomato apical stunt viroid* และ *Iresine viroid* ซึ่งให้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 197 คู่เบส ขณะที่ไพรเมอร์ PPV2 มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส *Columnea latent viroid* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 194 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ไพโรซีควอนซิ่งให้ลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันมีความจำเพาะแต่ละชนิดของไวรัส ดังนั้นจึงเป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วและมีความถูกต้องสูง เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจไวรัสในเมล็ดพันธุ์เพื่อการรับรองการปลอดศัตรูพืชสำหรับการนำเข้า-ส่งออก

คำสำคัญ: พอสพิไวรัส, ไพโรซีควอนซิ่ง, เมล็ดพันธุ์

Abstract

Pospiviroid can cause disease of considerable economic importance many countries. Therefore, it is an internationally important quarantine pest. Developing an efficient and accurate diagnostic method, it is necessary. In the study of the use of pyrosequencing technique for detection of viroid, it can be used quickly and high reliability. Pyrosequencing is a technique for DNA sequencing based on the bioluminescence analysis of pyrophosphate. This method improves test efficiencies compared to the standard test methods of real time RT-PCR (TaqMan). Bioinformatics and genome data bases from GenBank were used to design primer and optimized condition for pyrosequencing. It was found that the PPV1 is a specific primers for 8 Pospiviroid detection such as *Potato spindle tuber viroid*, *Tomato chlorotic dwarf viroid*, *Mexican papita viroid*, *Tomato planta macho viroid*, *Chrysanthemum stunt viroid*, *Citrus exocortis viroid*, *Tomato apical stunt viroid* and *Iresine viroid* whereas primer PPV2 is a specific primer for detection of *Columnea latent viroid* to yield a cDNA fragment about 197 and 194 base pairs, respectively. When analyzed, pyrosequencing gave different nucleotide sequences with specificity of each type of Viroid. Therefore, it is a fast and highly accurate detection method. Suitable for use in the detection of viroid in seeds for certification of pest-free for import-export seed.

Key words; Pospiviroid, pyrosequencing, seed

6. คำนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกและนำเข้าเมล็ดพันธุ์เป็นจำนวนมากโดยเฉพาะเมล็ดผัก ซึ่งการส่งออกไปยังประเทศในแถบยุโรปมีการกำหนดศัตรูพืชกักกันหลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อไวรอยด์ ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็ก โมเลกุลประกอบด้วยอาร์เอ็นเอวงแหวนสายเดี่ยวที่มีความยาว 239-401 นิวคลีโอไทด์ จีโนมที่มีขนาดเล็กของไวรอยด์จะไม่มีโปรตีนห่อหุ้มดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจสอบด้วยเทคนิคทางด้านซีรัมได้ (Verhoeven *et al.*, 2004) และไวรอยด์เพิ่มจำนวนโดยเอนไซม์ของพืชอาศัย ไวรอยด์สามารถแบ่งได้เป็น 2 แฟมิลี ได้แก่ Avsunviroidae และ Pospiviroidae (Flores *et al.*, 2000) จีโนมของ Pospiviroid เป็นหนึ่งที่มีจำนวนชนิดของเชื้อไวรอยด์มากที่สุด ได้แก่ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), *Columnea latent viroid* (CLVd), *Mexican papita viroid* (MPVd), *Tomato plancha macho viroid* (TPMVd), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd), *Iresine viroid* (IrVd) เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญของผักหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ ทำให้ผลผลิตลดลงถึง 49 เปอร์เซ็นต์ เชื้อชนิดนี้มีพืชอาศัยที่กว้าง เช่น มะเขือเทศ, มันฝรั่ง, แตงกวา, พริก, มะเขือชนิดต่าง ๆ และไม้ประดับ อีกทั้งยังสามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ นอกจากนี้ประเทศไทยก็มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อใช้ทำพันธุ์ในประเทศ และผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออกในปริมาณที่มาก จึงทำให้เชื้อไวรอยด์ดังกล่าวมีโอกาสติดเข้ามา กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าและแพร่ระบาดทำความเสียหายในประเทศไทยได้ ปัจจุบันยังพบว่ามีไวรอยด์อีกหลายชนิดที่ทำความเสียหายให้แก่พืช ซึ่งปัญหาสำคัญในการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ คือเชื้อไม่สามารถแยกบริสุทธิ์และเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ได้ จึงมีการใช้เทคนิคการตรวจ เช่น Biological indexing หรือการใช้พืชทดสอบ ซึ่งเป็นวิธีการเริ่มแรกที่ใช้ในงานตรวจวินิจฉัยโรคพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรอยด์ เป็นวิธีการที่ง่ายแต่ไม่

สามารถใช้ตรวจจำแนกได้ครอบคลุมทั้งหมดข้อเสียที่สำคัญของวิธีการนี้คือ ต้องใช้พืชทดสอบหลายๆ ชนิดในการตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรอยด์ ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจตัวอย่างปริมาณมาก เนื่องจากต้องใช้พื้นที่โรงเรือนมากและสิ้นเปลืองแรงงานสูง นอกจากนี้ยังกินเวลาในการรอให้พืชทดสอบแสดงอาการตั้งแต่ 2 อาทิตย์ จนถึงหลายเดือน แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่สามารถนำมาใช้กับไวรอยด์บางชนิดได้ เช่น CCCVd และ CTiVd เนื่องจากไม่มีพืชทดสอบที่เหมาะสม และวิธีการปลูกเชื้อมีความยุ่งยาก ต้องใช้เครื่องมือที่มีแรงดันสูงในการปลูกเชื้อ รวมถึงระยะเวลาที่เชื้อแสดงอาการอาจกินเวลานานกว่า 4 ปี เทคนิคไพโรซีควอนซึ่งเป็นการพัฒนาโดยอาศัยหลักการของ synthesis sequencing และการตรวจจับ PPI ที่หลุดออกมาในขณะที่เกิดกระบวนการ polymerization การทำงานนั้นอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิดด้วยกันคือ klenow fragment ทำหน้าที่ต่อสายดีเอ็นเอ เอนไซม์ ATP sulfurylase ทำหน้าที่เปลี่ยน PPI ที่เกิดขึ้นให้เป็น ATP ซึ่งจะเป็นพลังงานให้กับเอนไซม์ luciferase ให้เป็น oxyluciferin ซึ่งสามารถให้แสงออกมาได้ โดยแสงที่เกิดขึ้นจะถูกตรวจจับด้วยเซ็นเซอร์ของกล้อง CCD นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ apyrase ทำหน้าที่ในการกำจัด dNTPs และ ATP ที่หลงเหลืออยู่ในระบบ (Gruber et al., 2002; Nordstrom et al., 2000) ซึ่งใช้ระยะเวลาการตรวจสอบเพียง 2 วัน ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ Pospiviroid ให้ครอบคลุมทุกชนิดของไวรอยด์กลุ่มนี้ โดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลขั้นสูงสามารถตรวจ Pospiviroid พร้อมกันได้หลายชนิดจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเพื่อนำมาใช้ตรวจสอบติดตามเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าหรือส่งออกต่างประเทศและเพิ่มความสามารถในการแข่งขันเพราะจะทำให้ประเทศคู่ค้ามีความเชื่อมั่นในระบบการตรวจสอบ นอกจากนี้การเปิดเสรีทางการค้าทำให้แต่ละประเทศกำหนดเกณฑ์มาตรฐานสินค้าเกษตรขึ้นมาเพื่อใช้เป็นข้อกีดกันทางการค้า ดังนั้นผลงานวิจัยนี้สามารถนำมาช่วยลดปัญหาเหล่านั้นได้ และยังเป็นวิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อโรคศัตรูพืชที่พืชรากกันที่มีประสิทธิภาพด้วยเช่นกัน

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

1. Pospiviroid positive sequence
2. Two set of PyroMark Assay (PPV1 and PPV2)
3. RNA extraction kit (MACHEREY-NAGEL)
4. PyroMark OneStep RT-PCR Kit (200) cat no. 978803
5. PyroMark Q48 Advanced Reagents (4 x 48) cat no. 974002
6. PyroMark Q48 Magnetic Beads (300) cat no. 974203
7. PyroMark Q48 Absorber Strips (100)
8. PyroMark Q48 Discs (50)
9. Nano drop
10. PyroMark Q48 Autopre

7.2 วิธีการทดลอง

7.2.1 การเตรียมสังเคราะห์เชื้อไวรอยด์เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) สังเคราะห์ชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอของเชื้อ Pospiviroid 9 ชนิด ได้แก่ Potato spindle tuber viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Mexican papita viroid, Tomato planta macho viroid, Chrysanthemum stunt viroid, Citrus exocortis viroid, Tomato apical stunt viroid, Iresine viroid และ Columnea latent viroid เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)

7.2.2 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ Pospiviroid ทำการค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ pospiviroid ทั้ง 9 ชนิด เพื่อนำไปออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อหาลำดับเบสของไพรเมอร์

7.2.3 การตรวจเชื้อไวรัสด้วยวิธี pyrosequencing

เชื้อไวรัสให้ถึงความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาเจือจางให้ได้ปริมาณ 2 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เตรียมน้ำยา PyroMark OneStep RT-PCR reagent, CoralLoad Concentrate, primer solutions และ 25 mM MgCl₂ โดยแช่ในน้ำแข็ง กำหนดปริมาตรน้ำยาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

องค์ประกอบ	ป ริ ม า ต ร /reaction (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 5x*	5.0	1X
dNTP Mix	1.0	1X
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5	
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1.0	
10 µM Forward primer	0.625*/1.25**	0.25 µM/0.5 µM
10 µM Reverse primer (biotin label)	0.625*/1.25**	0.25 µM/0.5 µM
RNase free water	4.25/3.0	
RNA template (2 ng/ul)	10.0	20 ng/rxn
Final volume	25.0	

*PPV2 primer/**PPV1 primer

ใช้ปิเปตดูด Master mix ผสมให้เข้ากันและดูดใส่หลอดพีซีอาร์เต็ม template DNA (≤ 500 ng/reaction) ในแต่ละหลอดพีซีอาร์ (20 ng extracted RNA 10ul (2ng/ul)) ตั้งโปรแกรมการทำงาน ของเครื่อง thermal cycler โดยกำหนดสภาวะดังนี้

Reverse transcription	30 min 50°C	Hold
Initial PCR activation step	15 min 95°C	Hold
3-step cycling		
Denaturation	30s 94°C	45 cycles
Annealing	30s 62°C	
Extension	30s 72°C	
Final extension	10min 72°C	Hold

นำหลอดพีซีอาร์ในเครื่อง thermal cycler และเริ่มต้นทำปฏิกิริยา นำ PCR product ไปตรวจสอบผลด้วยอะกาโรสเจลก่อนวิเคราะห์ด้วย Pyrosequencing จากนั้นนำ PCR product ปริมาตร 10 µl ไปวิเคราะห์ด้วย Pyrosequencing Pospiviroid analysis sequence ผลิตผลซึ่งได้ผ่านการเพิ่มปริมาณ ด้วยวิธี RT-PCR มาแล้ว 20 ไมโครลิตรผสม กับ streptavidin SepharoseTM beads 200 ไมโครกรัม และ PyroMarkTM binding buffer 3 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เพื่อให้ streptavidin จับกับสาย DNA ได้ทั่วถึง จากนั้นใส่คู่ sequencing primers เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่ผสมกับ annealing buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เพื่อจับกับ DNA สายเดี่ยว ก่อนนำไปหาลำดับเบสโดยใช้น้ำยา PyroMark Q48 Advanced Reagent (Qiagen, Hilden, Germany) หลังจากนั้น เติม enzyme substrate และ nucleotides (A, C, G, and T) ลงใน cartridge ปริมาณตามการคำนวณจากโปรแกรม เมื่อนำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์ ประมาณ 1-2 ชั่วโมง อ่านลำดับเบสนิวคลีโอไทด์

7.2.4 การตรวจเชื้อไวรัสในเมล็ดพันธุ์ผักด้วยวิธี pyrosequencing

การเตรียมตัวอย่าง

ตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยใช้เทคนิคไพโรซีควนซึ่งร่วมกับเรียลไทม์พีซีอาร์ (วิธีการมาตรฐาน) โดยสุ่มตรวจเมล็ดพันธุ์ผักของบริษัทที่จะส่งออก ได้แก่ เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจำนวน 50 ตัวอย่างและพริก 50 ตัวอย่าง ซึ่งเมล็ดพืชแต่ละตัวอย่าง (3,000 หรือ 20,000 เมล็ด) โดยแบ่งเป็น 3 ตัวอย่างย่อย ตัวอย่างละ 1000 เมล็ด หรือ 50 ตัวอย่างย่อย ตัวอย่างละ 400 เมล็ด และนำแต่ละตัวอย่างย่อยไปบดด้วยไนโตรเจนเหลวในโถรงบตัวอย่าง จนได้เป็นผงละเอียด

การสกัดอาร์เอ็นเอจากชุดสกัดสำเร็จรูปของบริษัท MACHEREY-NAGEL โดยมีขั้นตอนดังนี้

ถ่ายผงตัวอย่างที่บดละเอียดใส่หลอด 1.5 มล. เติมนัฟเฟออร์ PFL 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดและเติมนัฟเฟออร์ PFR 10-50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที กรองตัวอย่างโดยสวมคอลัมน์ NucleoSpin RNA Plant Filter Column ในหลอดเก็บตัวอย่าง ดูดส่วนใสจากข้างต้น ใส่ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที ปรับสภาวะการจับของอาร์เอ็นเอโดยเติมนัฟเฟออร์ PFB 500 µl ลงในส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 และผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที สวมคอลัมน์ NucleoSpin RNA Plant Column ในหลอดเก็บตัวอย่าง ดูดส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์ในหลอดเก็บตัวอย่างทิ้งและนำมาสวมกับคอลัมน์อีกครั้ง ดูดส่วนใสที่เหลือใส่ลงในคอลัมน์และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์และหลอดเก็บตัวอย่างทิ้ง นำหลอดเก็บตัวอย่างอันใหม่มาสวมกับคอลัมน์เดิม ล้างและทำให้แห้งแผ่น silica membrane ล้างครั้งที่ 1 โดยเติมนัฟเฟออร์ PFW1 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์และหลอดเก็บตัวอย่างทิ้ง นำหลอดเก็บตัวอย่างอันใหม่มาสวมกับคอลัมน์เดิม ล้างครั้งที่ 2 โดยเติมนัฟเฟออร์ PFW2 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์ในหลอดเก็บตัวอย่างทิ้งและนำมาสวมกับคอลัมน์อีกครั้ง ล้างครั้งที่ 3 โดยเติมนัฟเฟออร์ PFW2 500 µl ลงในคอลัมน์ที่ได้ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์และหลอดเก็บตัวอย่างทิ้ง ใสอาร์เอ็นเอออกจากคอลัมน์ สวมคอลัมน์ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มล. เติมน้ำที่ปราศจาก RNase 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

7.2.5 การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคไพโรซีควนซึ่ง

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางให้ได้ปริมาณ 2 นาโนกรัม/ไมโครลิตรและนำไปทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนในข้อ 7.2.3

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาที่ดำเนินการ ปีที่เริ่มต้น...2561...ปีที่สิ้นสุด...2562...

สถานที่ทำการทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียมเชื้อไวรัสเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)

เนื่องจากเชื้อไวรัสในในกลุ่มพอสพิไวรัสหลายชนิดยังไม่มีรายงานในประเทศไทยดังนั้นในการตรวจสอบเบื้องต้นจำเป็นต้องมีตัวควบคุมเชิงบวกเพื่อเป็นการประกันผลที่ได้ เชื้อไวรัสในจีนัส *Pospiviroid* มีจีโนมขนาดเล็กขนาด 356-375 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นจึงสามารถสังเคราะห์ได้ทั้งจีโนมโดยพอสพิไวรัสที่ทำการสังเคราะห์มีขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน (Table 1)

2. การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Pospiviroid* ทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ *Potato spindle tuber viroid*, *Tomato chlorotic dwarf viroid*, *Mexican papita viroid*, *Tomato planta macho viroid*, *Chrysanthemum stunt viroid*, *Citrus exocortis viroid*, *Tomato apical stunt viroid*, *Iresine viroid* และ *Columnea latent viroid* ในฐานข้อมูลพันธุกรรม GeneBank ของเชื้ออ้างอิงหมายเลข Accession no. GU911350.1, NC_003637.1, NC_001558.1, EU879922.1, KF683201.1, AB006737.1, AB054599.1, KF484878.1 และ NC_003538.1 ตามลำดับมา เทียบเคียงสำหรับการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค pyrosequencing ซึ่ง เป็นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบใหม่ (Figure 1) โดยใช้โปรแกรม PyroMark® Assay Design SW 2.0 ในการออกแบบและมีการพิจารณาคัดเลือกไพรเมอร์โดยกำหนดให้มีปริมาณ GC อยู่ระหว่าง 30-80% และมีค่า Tm 60 องศาเซลเซียส พบว่าได้ไพรเมอร์ 2 ชุด คือ PPV 1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Forward คือ TCAGGGATCCCCGGGGAA และ reverse คือ TCCAGTTGTCTCCACCGGGTAGT และไพรเมอร์สำหรับการทำซีควนซ์คือ CCCGGGGAAACCTGGA โดยการออกแบบได้มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส 8 ชนิด ได้แก่ *Potato spindle tuber viroid*, *Tomato chlorotic dwarf viroid*, *Mexican papita viroid*, *Tomato planta macho viroid*, *Chrysanthemum stunt viroid*, *Citrus exocortis viroid*, *Tomato apical stunt viroid* และ *Iresine viroid* โดยมีขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 197 bp ส่วนไพรเมอร์ PPV2 ได้มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส *Columnea latent viroid* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Forward คือ AGCCCCGGGGCAACTCAG และ reverse คือ AGCAACTCGGTGATGCCAC และไพรเมอร์สำหรับการทำซีควนซ์คือ CCCGGGGCAACTCAG โดยมีขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 194 bp (Table 2)

3. การตรวจเชื้อไวรัสด้วยวิธี pyrosequencing

เมื่อนำเชื้อพอสพิไวรัสทั้ง 9 ชนิดที่สังเคราะห์ได้เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงบวกไป ตรวจด้วยเทคนิคไพโรซีควนซ์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้คือ PPV1-SP และ PPV2-SP และมีการติดตามด้วยไบโอดีน ผลการวิเคราะห์ electrophorograms พบว่าให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความ แตกต่างกันตามชนิดของเชื้อ (Figure 2) โดย *Potato spindle tuber viroid* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ GCGAACTGGCAACAAGGACGGTGGGAGTGCCAGCGGCC; *Tomato chlorotic dwarf viroid* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ GCGAACTGGCAAAAAGGCGGCAGGGAGCTTGTGGAAGGCGAAACAGGA; *Mexican papita viroid* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ GCGAACTGGCAAAGGAGTCGCGGCTGGGGAGTCTCCTCAGACAGGA; *Tomato planta macho viroid* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ GCGAACTGGCAAGGAGTCGCGGCTGGGGAGTCT; *Chrysanthemum stunt viroid* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ GGAAGTCCGACGAGATCGCGGTTGGGGCTTA; *Citrus exocortis viroid* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ GGAAGTCGAGGTCGGGGGGTACAGCTGCTTC; *Tomato apical stunt viroid* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ GGAAGTCGAGGTCGGGGCTTCGGACTACT; *Iresine viroid* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ GCGAACTCGCAAGGAGGCTGGCGGTAGGTGCGC และ *Columnea latent viroid* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ ACCGAGCGGGTCTCGTGGTTCGAGGGCGTTGCCCTGTT

เทคนิคไพโรซีควอนซึ่งสำหรับการนำมาใช้ตรวจเชื้อมีความถูกต้องสูงเนื่องจากมีการ synthesis sequencing และการตรวจจับ PPI ที่หลุดออกมาในขณะที่เกิดกระบวนการ polymerization การทำงานนั้นอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิดด้วยกันคือ klenow fragment ทำหน้าที่ต่อสายดีเอ็นเอเอนไซม์ ATP sulfurylase ทำหน้าที่เปลี่ยน PPI ที่เกิดขึ้นให้เป็น ATP ซึ่งจะเป็นพลังงานให้กับเอนไซม์ luciferase ให้เป็น oxyluciferin ซึ่งสามารถให้แสงออกมาได้ โดยแสงที่เกิดขึ้นจะถูกตรวจจับด้วยเซ็นเซอร์ของกล้อง CCD นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ apyrase ทำหน้าที่ในการกำจัด dNTPs และ ATP ที่หลงเหลืออยู่ในระบบ เทคนิคนี้มีความถูกต้องแม่นยำกว่าวิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ทั่วไป เนื่องจากเทคนิคพีซีอาร์มีข้อจำกัดด้วยความไวของพีซีอาร์และมีโอกาสการจับที่ผิดพลาดของไพรเมอร์ระหว่างการเพิ่มขยายขนาดดีเอ็นเอซึ่งอาจจะนำไปสู่การจับกันอย่างไม่จำเพาะมีผลให้เกิดผลเชิงบวก (false positives) หรือผลเชิงลบ (false negatives) ที่ผิดพลาดได้ และการเพิ่มขยายขนาดดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะได้ การประกันความถูกต้องของวิธีการโดยหน่วยงานจาก ต่างประเทศ เช่น OIE และ China entry-exit inspection และ quarantine industry standards รายงานว่าผลผลิตพีซีอาร์จะต้องมีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เสมอ อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำเป็นต้องใช้เวลาที่ยาวนานโดยทั่วไปอยู่ประมาณ 15-20 วัน ดังนั้นวิธีไพโรซีควอนซึ่งสามารถลดระยะเวลาให้สั้นลงเหลือแค่ 3-4 ชั่วโมงเท่านั้นในการวิเคราะห์ ยิ่งไปกว่านั้นวิธีการนี้ยังให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดผลเชิงบวกที่ผิดพลาด (false positives) เทคนิคไพโรซีควอนซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากมีความรวดเร็วในการตรวจสอบ และสามารถใช้ตรวจในเชื้อโรคสำคัญๆ หลายชนิด เช่น ไวรัส (De Battisti *et al.*, 2013; Gharizadeh *et al.*, 2005)

4. การตรวจเชื้อไวรอยต์ในเมล็ดพันธุ์ผักด้วยวิธี pyrosequencing

จากการสุ่มเมล็ดพันธุ์ผัก มะเขือเทศ จำนวน 100 ตัวอย่าง มาตรวจเชื้อไวรอยต์ทั้ง 9 ชนิด โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ 2 คู่ คือ PPV1 และ PPV2 โดยกำหนดสภาวะที่เหมาะสม พบว่าตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักทั้ง 100 ตัวอย่างไม่มีการติดเชื้อไวรอยต์ซึ่งไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นและเมื่อเทียบกับวิธีการมาตรฐาน Real-time PCR (Taqman) ก็ไม่พบเชื้อเช่นกัน ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (positive control) มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น (Figure 3) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าเมล็ดพันธุ์ผักยังไม่มีการติดเชื้อไวรอยต์แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการสุ่มตรวจเมล็ดพันธุ์ให้มากขึ้น

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ Pospiviroid ให้ครอบคลุมทุกชนิดของไวรอยต์ได้แก่ *Potato spindle tuber viroid*, *Tomato chlorotic dwarf viroid*, *Mexican papita viroid*, *Tomato planta macho viroid*, *Chrysanthemum stunt viroid*, *Citrus exocortis viroid*, *Tomato apical stunt viroid*, *Iresine viroid* และ *Columnea latent viroid* โดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลขั้นสูงคือ เทคนิคไพโรซีควอนซึ่งเป็นการพัฒนาโดยอาศัยหลักการของ synthesis sequencing และการตรวจจับ PPI ที่หลุดออกมาในขณะที่เกิดกระบวนการ polymerization พบว่าสามารถตรวจ Pospiviroid พร้อมกันได้หลายชนิดซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเพื่อนำมาใช้ตรวจสอบติดตามเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าหรือส่งออกต่างประเทศและเพิ่มความสามารถในการแข่งขันเพราะจะทำให้ประเทศคู่ค้ามีความเชื่อมั่นในระบบการตรวจสอบ นอกจากนี้การเปิดเสรีทางการค้าทำให้แต่ละประเทศกำหนดเกณฑ์มาตรฐานสินค้าเกษตรขึ้นมาเพื่อใช้เป็นข้อกีดกันทางการค้า ดังนั้นผลงานวิจัยก็สามารถนำมาช่วยลดปัญหาเหล่านั้นได้ และยังเป็นวิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อโรคศัตรูพืชกักกันที่มีประสิทธิภาพด้วยเช่นกัน

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำมาใช้ในการตรวจไวรอยดีในเมล็ดพันธุ์เพื่อการรับรองการปลอดศัตรูพืชสำหรับการนำเข้า
ส่งออก

11. เอกสารอ้างอิง

- De Battisti, C., A. Salomoni, S. Ormelli, I. Monne, I. Capua and G. Cattoli. 2013. Rapid pathotyping of Newcastle disease virus by pyrosequencing *J. Virol Methods*. 188:13-20.
- Gharizadeh, B., M. Oggionni, B. Zheng, E. Akom, N. Pourmand, A. Ahmadian, K.L. Wallin and P. Nyrén. 2005. Type-specific multiple sequencing primers: a novel strategy for reliable and rapid genotyping of human papillomaviruses by pyrosequencing technology. *J. Mol. Diagn.* 7:198-205.
- Gruber, J.D., P.B. Colligan, and J.K. Wolford. 2002. Estimation of single nucleotide polymorphism allele frequency in DNA pools by using Pyrosequencing. *Hum. Genet.* 110:395-401.
- Nordstrom, T., M. Ronaghi, and L. Forsberg. 2000. Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing. *Biotechnol Appl Biochem.* 31:107-112.

12. ภาคผนวก

Table 1 Synthesis of viroid sequence

Viroid species	Size	GC%	Sequence
<i>Potato spindle tuber viroid</i>	309 bp	58.77%	AAAAGAAAAAGAAGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCG GGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAACAAGGACGGTGGGGAGTGCCC AGCGGCCGACAGGAGTAATTCCCGCCGAAACAGGGTTTTACCCCTT CCTTTCTTCGGGTGCCTTCCTCGCGCCCGCAGGACCACCCCTCGCC CCCTTTGCGCTGTCGCTTCGGATACTACCCGGTGGAAACAACCTGAA GCTCCCGAGAACCGCTTTTTCTCTATCTTACTTGCTTCGGGGCGAG GGTGTITAGCCCTTGAACCCGAGTTGGTTCCT
<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>	360 bp	57.35%	CGGAACTAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGTG CAGAAAAGAAAAAGATAGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATC CCCGGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAAAGGCGGCAGGGAGCTT GTGGAAGGCGAAACAGGAGTAATCCCGCGTAGAAACAGGGTTTTCA CCCTTCCTTTCTTCTGCGGTTTCCTTCCTTTGCGCGCCACTCGACCC CTCGCCCCCTTGCCTGTCGCTTCGGCAACTACCCGGTGGATACAA CTGAAGCTCCCGAGAACCGCTTTTTCTCTATCTTGCTGCTACCCGG GCGAGGGTGTITAGCCCTTGAACCCGAGTTGGTTCCT
<i>Mexican papita viroid</i>	360 bp	58.78%	CGGGATCTTTTCCTTGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCAG CCCAGGAAAGAAAAAGAAAGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGA TCCCCGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAAAGGAGTCGCGGCTGG GGAGTCTCCTCAGACAGGAGTAATCCCCGCTGAAACAGGGTTTTCA CCCTTCCTTTCTTCGGGTTTCCTTCCTCTGTGGTTCGACACCCTCGCC CGCCTCTCTGCGCTGTCGCTTCGGATACTACCCGGTGGAAACAACCT GAAGCTCCCGAGAACCGCTTTTTCTCTATCTTGCTGGCGCAGGGGC GAGGGTGGAAAGCCCTGGAACCCGCTGGATGGGTCCCT
<i>Tomato planta macho viroid</i>	360 bp	57.55%	CGGGATCTTTTCCTTGTGGTTCCTGTGGTACACACCTGACCTCCTG ACCAGAAAAGAAAAAGAATTGCGGCCAAAGGAGCGCTTCAGGGAT CCCCGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCGAAGGAGTCGCGGCTGGG GAGTCTCCCAGACAGGAGTAATCCCCGCTGAAACAGTTTTACCCCT TCCTTTCTTCGGGTTTCCTTCCTCTGCGGTTCGACACCCTCGCCCGCT TCTCTGCGCTGTCGCTTCGGAGACTACCCGGTGGAAACAACCTGAA GCTCCAAGCGCCGTTTTTCTCTATCTTGCTGGCTCCGGGGCGAG GGTGGAAAACCTGGAACCCCTTCGAAAAGGGTCCCT
<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>	354 bp	54.13%	CGGGACTTACTTGTGGTTCCTGTGGTGCACCTCCTGACCCTGCTGCT TTACAAGAAAAAGAAATGAGGCGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCG GGGAAACCTGGAGGAAGTCCGACGAGATCGCGGTTGGGGCTTAGGA

			<p>CCCCACTCCTGCGAGACAGGAGTAATCCTAAACAGGGTTTTTCACCC TTCTTTTAGTTTCCTTCTCCTGGAGAGGTCTTCTGCCCTAGCCC GGTCTTCGAAGCTTCTTTGGCTACTACCCGGTGGAAACAACTGAA GCTTCAACGCCTTTTTTTTCCAATCTTCTTTAGCACCCGGGCTAGGGAG TAAGCCCCTGGAACCTTAGTTTTGTTCCCT</p>
<i>Citrus exocortis viroid</i>	373 bp	59.24%	<p>CGGGATCTTTCTTGAGGTTCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGG CAGAAAAAGAAAAAAGAGGCGGCGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGA TCCCCGGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGGTTCGGGGGGGTACAGCT GCTTCGGTCGCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGAGC TCGTCTCCTTCTTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAA GCGCCACGCCCCCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGT GGAAACAACCTGAAGCTTCAACCCCAAACCGCTTTTTCTTATATCTTCA CTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTAGATTGGGT CCCT</p>
<i>Tomato apical stunt viroid</i>	364 bp	57.09%	<p>CGGGAACCTTTCTTGAGGTTCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGG CATCAAGAAAAAGAATGGCGCGGAGGAGAAGAAGTCCTTCAGGGA TCCCCGGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGGTTCGGGGGCTTCGGACTA CTCCTTCGTGAGACAGGAGTAATCCCCGCTGAAACAGGGTTTTTAC CCTTCCTTTCTTCGGGTTTCTTCTCTCGCTGGAGAGGTCTTCGG CCCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGAGACTACCCGGTGAAACAACCT GAAGCTTCAACCCTCTCGCGTTTTTCTCTA TCTTTGTTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCCTGGAACCCTGGA AGGAGTCCCT</p>
<i>Iresine viroid</i>	370 bp	60.4%	<p>TGTGGTTCCAATGGTTGCACCCCTGACCTGCAATGCAAAAAGAAAA AAGATGGGGCGGCGCAACAACGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACC TGGAGCGAACTCGGCAAGGAGGCCTGGCGGTAGGTGCGCGGAGTC GACCGCGTAAAGACCGGAGAACTCCACGCGGCGGAAGAAACAGGA GCTCGTCTCCTTCTTTCTGCGCCCGCAGGACTCACTCGGCAGCGG CGTCTTCTCCGCACCCTCGCCCGCTTCCGCGCTGGTCGCTCTGGCT ACTACCCGGTGATACAACCTGTAGCTTGAAGCC CGCCCGCCCTTTTTCTTCTATCTTCTGCTGCGCGGCGAGGGTGGGC TTCTAAAGGAAACCCT</p>
<i>Columnea latent viroid</i>	369 bp	57.92%	<p>CGGAACTAACTCGTGGTTCTGTGGTACACACCTGACCCTGCAGC CATGCAAAAGAAAAAAGAACGGGAGGAGAGCGCAAGAGCGGTCTC AGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGTCTCGTGGTCAGG GCGTTGCCCTGTTTCAGACAGGAGTAATCCAGCTGAAACAGGGTTT TCACCTTCTTTCTTCTGGTTTCTTCTCTGCTTTCAGCGGCCTCG CCCGAACCTCTTGACCAGCGCAGGTGCTGACGCGACCCGGTGGCAT</p>

			CACCGAGTTGCTCGAGCCTCAACCTCCTTTTT CTCTATCTTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGA CCGCAGTAGGTTTCCT
--	--	--	---

Table 2 Sequences of primer used for pospiviroid detection

Target	Primer sequence	Length (bp)	Tm	% GC	Product size
Assay1 (PPV1*)	PPV1-FP: TCAGGGATCCCCGGGGAA	19	78.0	63.2	197
C=T/A biotin	PPV1-RPB: TCCAGTTGTCTCCACCGGGTAGT	23	75.1	56.5	
	PPV1-SP: CCCGGGGAAACCTGGA	16	65.0	68.8	
Assay2 (PPV2*)	PPV2-FP: AGCCCCGGGGCAACTCAG	18	77.0	72.2	194
Biotin	PPV2-RPB: AGCAACTCGGTGATGCCAC	19	71.3	57.9	
	PPV2-SP: CCCGGGGCAACTCAG	15	61.9	73.3	

PPV1*: detection strain GU911350.1, NC_003637.1, NC_001558.1, EU879922.1, KF683201.1, AB006737.1, AB054599.1, KF484878.1

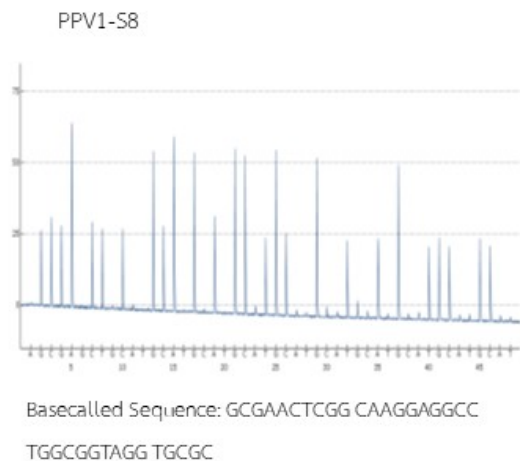
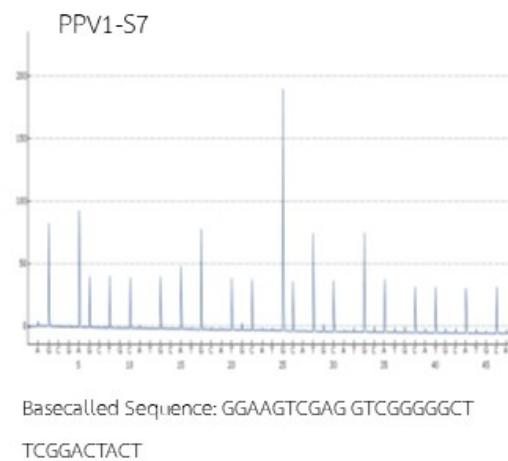
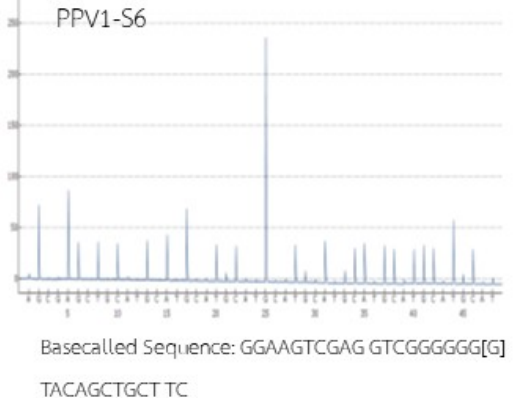
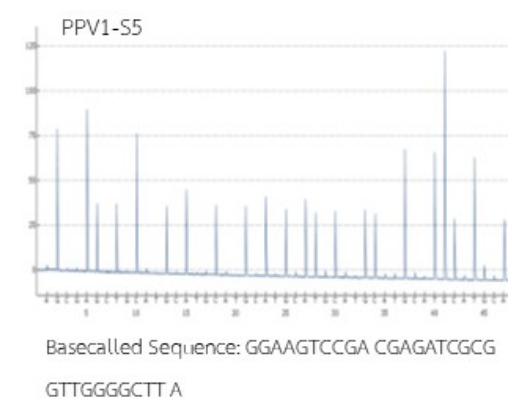
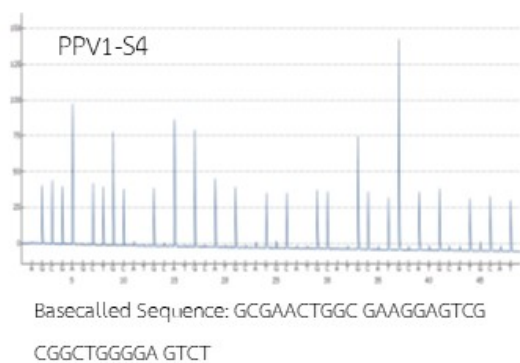
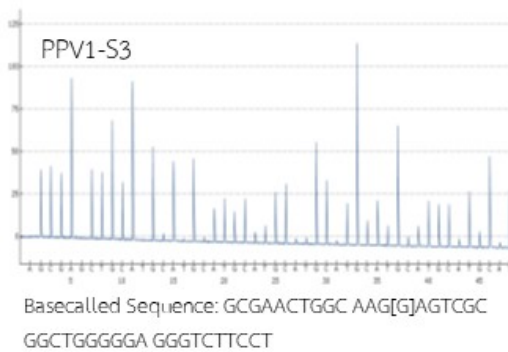
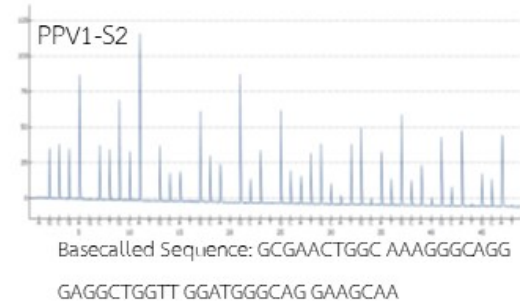
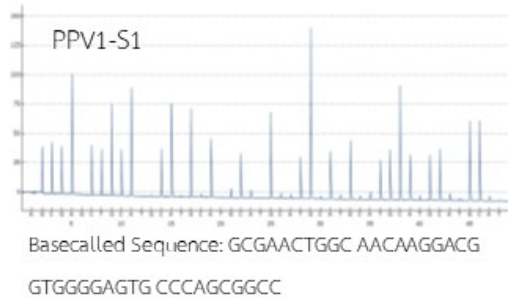
PPV2**: detection strain NC_003538.1

9 strains multiple alignment

GU911350.1	-----	0
NC 003538.1	--CGGAACATAACTCGTGGTTCCTGTGGTTACACACCTGACCCCTGCAGCCATGCAAAAAGAA	58
NC 003637.1	CGGGATCTTTTCTTGTGGTTCCTGTGGTTACACACCTGACCTCCAGCCAGGAAAGAAA-	59
NC 001558.1	CGGGATCTTTTCTTGTGGTTCCTGTGGTTACACACCTGACCTCCAGCAGAAAAGAAA-	59
EU879922.1	-----	0
KF683201.1	--CGGAACATAACTCGTGGTTCCTGTGGTTACACACCTGACCTCCGTGTGCAGAAAAGAAA-	57
AB006737.1	-----	0
AB054599.1	--CGGGATCTTTTCTTGTGGTTCCTGTGGTTCACCTGACCCCTGCAGGCAGAAAAGAAA	58
KF484878.1	--CGGGAACCTTTCTTGTGGTTCCTGTGGTTCACCTGACCCCTGCAGGCATCAAGAAA	58
GU911350.1	-----	30
NC 003538.1	AAAAGAACGGGAGGGAGAGCGCAAGAGCGGCTCAGGAGCCTCCGGGGCAACTCAGACCGA	118
NC 003637.1	-AAAGAAAGGCGG---CTCGGAGGAGCGCTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACCGA	114
NC 001558.1	-AAAGAAATTGC-G---GCCAAGGAGCGCTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACCGA	113
EU879922.1	-----CGGAGGAGCGCTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACCGA	41
KF683201.1	-AAAGATAGGCGG---CTCGGAGGAGCGCTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACCGA	112
AB006737.1	-----AGAAGTCCCTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAA	38
AB054599.1	AAAAGAGGCGGCG---GGGAAGAAGTCCCTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAA	114
KF484878.1	AGAATGGCGCGGA---GGAGAAGAAGTCCCTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAA	114
	* * * * *	
GU911350.1	ACTCGGCAAGGAGGCCCTGGCGTAGGTGCGCGGAGTCGACCCGCGTAAGACCCGGAGA	90
NC 003538.1	GCGGGGTCTCGTGGTCGAGGGCGTTGC---CCT-----GTTCCAGACAGGA	160
NC 003637.1	ACTGGCAAGGAGTTCGCGGCTGGGAGTC-TCC-----TCAGACAGGA	156
NC 001558.1	ACTGGCAAGGAGTTCGCGGCTGGGAGTC-TCC-----CAGACAGGA	154
EU879922.1	ACTGGCAAGGAGGCTGGGAGTGCACAGCG-----GCCACAGGA	84
KF683201.1	ACTGGCAAGGAGGCGGCGAGGAGCTTGTGGAAG-----CGAACAGGA	155
AB006737.1	GTCGACGAGATCGCGGTTGGGGCTTAGGACCC-----CACTCCTGCGAG	83
AB054599.1	GTCGAGGTCGCGGGGGTACAGCTGCTTCGGTCG-----CCGCGGATCACT	159
KF484878.1	GTCGAGGTCGCGGGGCTTCGGACTACTCCTTCGT-----GAGACAGGAGTA	159
GU911350.1	CCACGCGGCGGAAGAAACAGGAGCTCGTCTCTCTCTCTTCTGTGCGCCGACGACTCACT	150
NC 003538.1	-GTAATCCAGCTGAAACAGGGTTTTCACCCCTTCCTTTCTTCT-----GGTTCCCTTCC	214
NC 003637.1	GTAA-TCCCCGCTGAAACAGGGTTTTCACCCCTTCCTTTCTTCTG-----GGTTCCCTT	207
NC 001558.1	GTAA-TCCCCGCTGAAACAGGGTTTTCACCCCTTCCTTTCTTCTG-----GGTTCCCTT	205
EU879922.1	GTAAATC-CGCGCGAAACAGGGTTTTCACCCCTTCCTTTCTTCTG-----GGTTCCTT	135
KF683201.1	GTAAATCCCGCTGAAACAGGGTTTTCACCCCTTCCTTTCTTCTCT-----GCGGTTTCC	207
AB006737.1	ACAGGAGTAATCCTAAACAGGGTTTTCACCCCTTCCTTTAGTTT-----CCTTCC	132
AB054599.1	GGCCTCCAGCGGAGAAACAGGAGCTCGTCTCTCTCTTCTGCT-----GCTGGCTCCACA	214
KF484878.1	----ATCCCGCTGAAACAGGGTTTTCAC-----CCTTCTTCT-----CTTGGGTTTCC	205
	* * * * *	
GU911350.1	CGGCAGCGGCGTCTTCTCGCACCCCTCGCCCGCTTCGCGGCTGCTGCTGCTGCTACTAC	210
NC 003538.1	CTG---CTTCAGCGGCTCGCCCGGAACCTCTTGAC---CAGCGCAGGTGCTGACGCGAC	268
NC 003637.1	-CC---TCTGTGCTG-ACACCCCTCGCCCGCTCTC-TGCGCTGTCGCTTCGGATACTAC	261
NC 001558.1	-CC---TCTGCGGTCG-ACACCCCTCGCCCGCTTCTCTTGCCTGTCGCTTCGGAGACTAC	260
EU879922.1	-CC---TCGCGCCCGCAGGACCACCCCTCGCCCGCTTTCGCGCTGTCGCTTCGGATACTAC	191
KF683201.1	-TT---CCTTTGCGCGCCACTCGACCCCTCGCCCGCTTTCGCGCTGTCGCTTCGGCAACTAC	263
AB006737.1	TCT---CCTGGAGAGTCTTCTGCCCCTAGCCCGGCTTCGGAAGCTTCCCTTTGGCTACTAC	189
AB054599.1	TCC---GATCGTCTGTAAGCGCCACGCCCCCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGCTACTAC	271
KF484878.1	TTC---CTCTCGCTGGAGAGTCTTTCGCGCCCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGAGACTAC	262
	* * * * *	
GU911350.1	CCGGTGGATACAACCTGAGCTTGAAGCCCGCCCGCCCTTTTCTTCTATC--TTCGTGCT	268
NC 003538.1	CGGTGGATCACCGAGTTGCTCGAGCCTCAACCTCCTTTTCTCTATCTTAGCTTGGTCT	328
NC 003637.1	CCGGTGGAAACAACCTGAAGCTCCCGAAGCCGC---TTTTCTCTATCTT--GCTGGGCT	316
NC 001558.1	CCGGTGGAAACAACCTGAAGCTCCCAAGCGCCGC---TTTTCTCTATCTT--GCTGGCTC	315
EU879922.1	CCGGTGGAAACAACCTGAAGCTCCCGAAGCCGC---TTTTCTCTATCTT--ACTTGGTT	246
KF683201.1	CCGGTGGATACAACCTGAAGCTCCCGAAGCCGC---TTTTCTCTATCTT--GCTGCTAC	318
AB006737.1	CCGGTGGAAACAACCTGAAGCTTCAACGCCCTT-----TTTTCCAATCT--TCTTTAGC	240
AB054599.1	CCGGTGGAAACAACCTGAAGCTTCAACCCCAACCCGCTTTCTTATATCTT--CACTGCTC	329
KF484878.1	CCGGTGGAAACAACCTGAAGCTTCAACCCCTTCGCGCTTTTCTCTATCTT--TGTTGCTC	320
	* * * * *	
GU911350.1	CGCGGCGAGGGTGGGCTTCTAAAGGAAACCCT-----	300
NC 003538.1	CCGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAAACCGCAGTAGGTTCCCT---	370
NC 003637.1	AGGGGCGAGGGTGGAAAGCCCTGGAACCCGCTGGATGGGTCCCT-	360
NC 001558.1	CGGGGCGAGGGTGGAAAACCCCTGGAACCCCTTCGAAAAGGGTCCCT	360
EU879922.1	CGGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAAACCGCAGTTGGTTCCCT---	288
KF683201.1	CGGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAAACCGCAGTTGGTTCCCT---	360
AB006737.1	ACCGGGCTAGGGAGTAAGCCCGTGGAAACCTTAGTTTTGTTCCCT-	284
AB054599.1	TCCGGGCGAGGGTGGAAAGCCCTCGGAACCCCTAGATTGGGTCCCT-	373
KF484878.1	TCCGGGCGAGGGTGGAAAGCCCGTGGAAACCCCTGGAAGGAGTCCCT-	364
	* * * * *	

Figure 1 The alignment of accession numbers of viroid species exhibiting sequence identity *Potato spindle tuber viroid* (Accession: EU879922.1), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (Accession: KF683201.1), *Mexican papita viroid* (Accession: NC_003637.1), *Tomato planta macho viroid* (Accession: NC_001558.1), *Chrysanthemum stunt viroid*

(Accession: AB006737), *Citrus exocortis viroid* (Accession: AB054599.1), *Tomato apical stunt viroid* (Accession: KF484878.1), *Iresine viroid* (Accession: GU911350.1), *Columnnea latent viroid* (Accession: NC_003538.1)



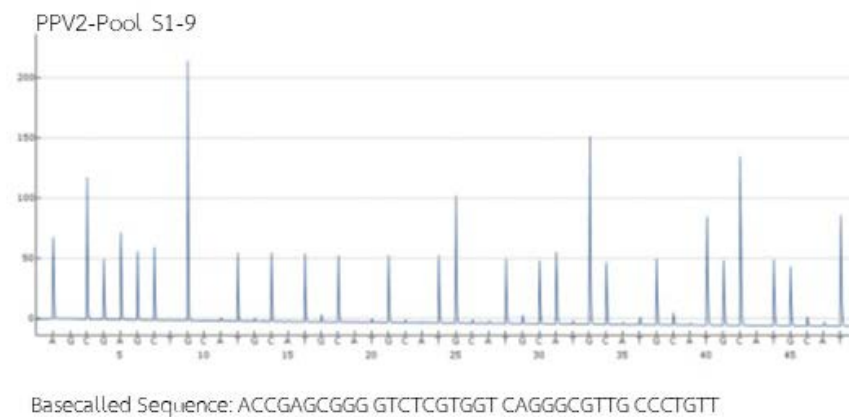
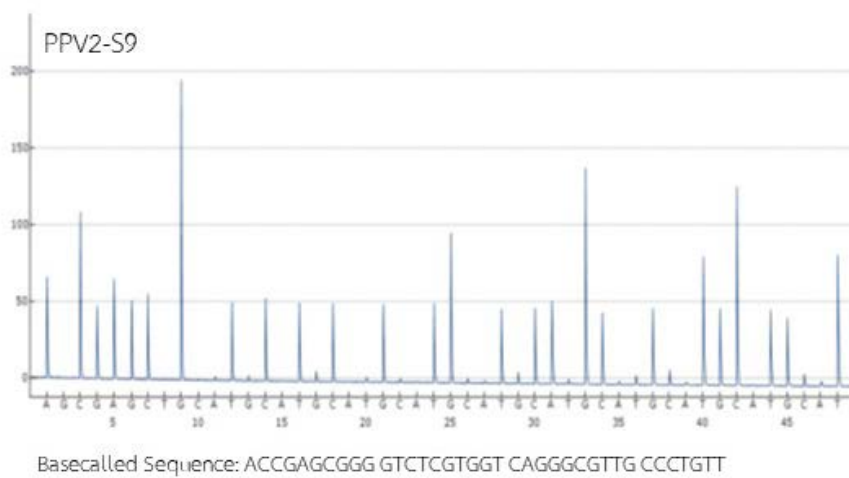
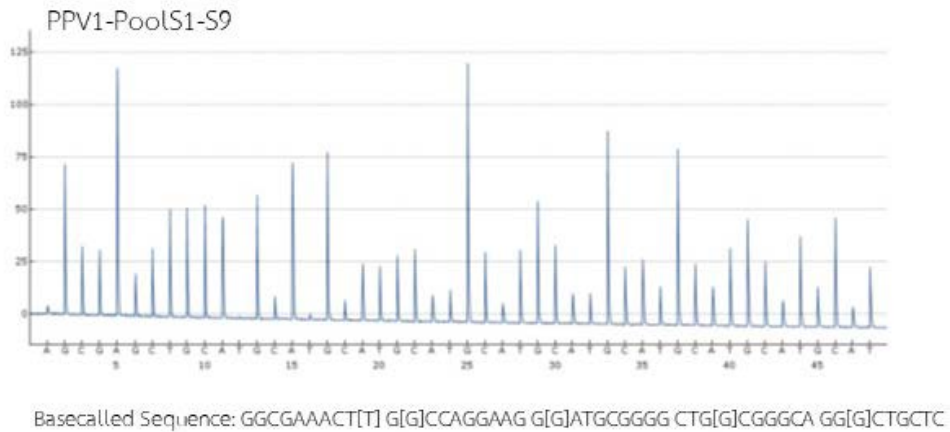


Figure 2 Pyrosequencing signal of Pospiviroid: *Potato spindle tuber viroid* (S1), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (S2), *Mexican papita viroid* (S3), *Tomato planta macho viroid* (S4), *Chrysanthemum stunt viroid* (S5), *Citrus exocortis viroid* (S6), *Tomato apical stunt viroid* (S7), *Iresine viroid* (S8) and *Columnnea latent viroid* (S9)

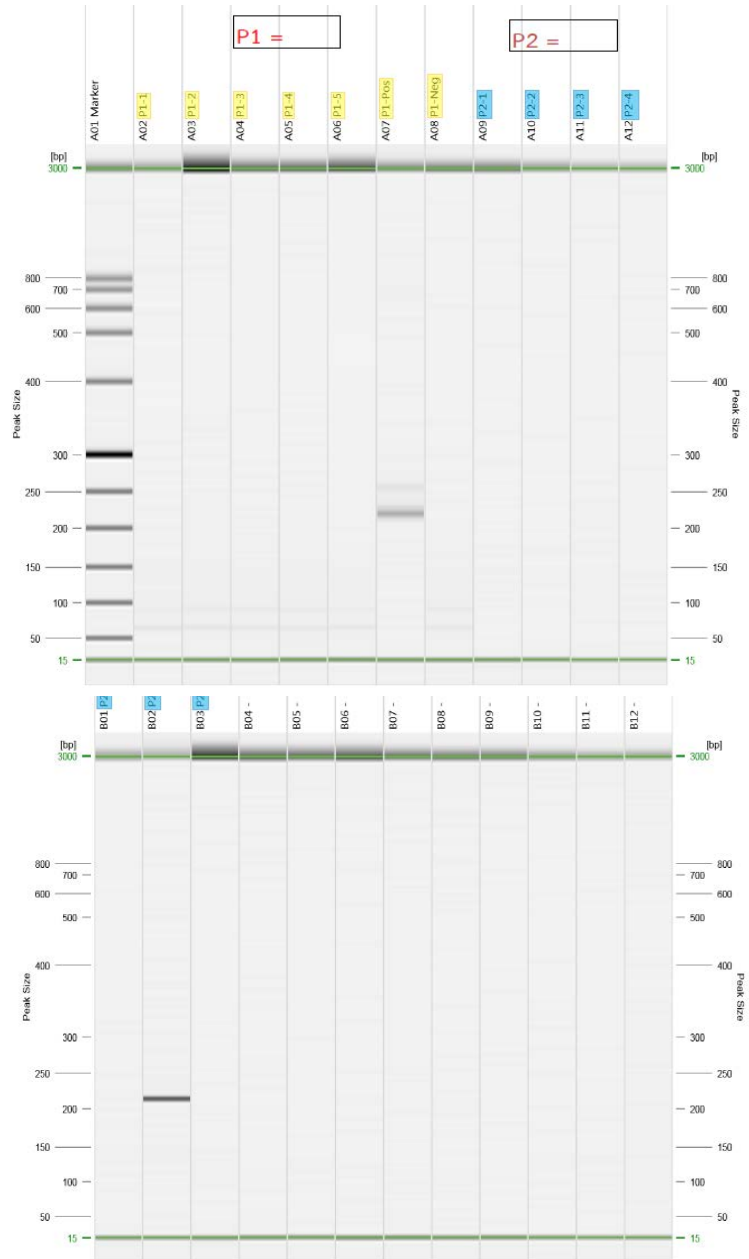


Figure 3 Image of the gels for PCR amplification