ส.วก.ท.

การใช้เทคนิค duplex RT-PCR สำหรับตรวจสอบเชื้อ *Piper yellow mottle virus* และ *Cucumber mosaic virus* ที่ก่อโรคในพริกไทย

Using of Duplex RT-PCR for Detection of *Piper Yellow Mottle Virus* and *Cucumber Mosaic Virus*, Infecting Black Pepper (*Piper nigrum* L.)

มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม[1,*] และ รัชนี ฮงประยูร[2]

Maneerat Koohapitagtam[1,*] and Ratchanee Hongprayoon[2]

[1] สาขาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จันทบุรี 22170

[2] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Division of Agricultural Biotechnology, Faculty of Science and Arts, Burapha University, Chantaburi Campus, 22170 Thailand

[2] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Sean, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, 73140 Thailand

รับเรื่อง: มิถุนายน 2561 Received: June 2018

รับตีพิมพ์: ตุลาคม 2561 Accepted: October 2018

*Corresponding author: maneenoi@go.buu.ac.th

ABSTRACT: *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) and *Cucumber mosaic virus* subgroup I (CMV subgroup I) are important viruses that can cause significant loss of black pepper product around the world. The objective of this research aims to use a duplex reverse transcription-PCR (duplex RT-PCR) for the detection of PYMoV and CMV subgroup I infecting black pepper. Primer pairs specific to PYMoV (PYMoV-F and PYMoV-R) and CMV subgroup I (CMV I-F and CMV I-R) were designed from Open reading frame I (ORFI) of PYMoV and *CP* gene of CMV subgroup I which yields DNA products of approximately 450 bp and 500 bp, respectively. Optimization conditions for the duplex RT-PCR to amplify DNA products of the corresponding viruses were studied. The result showed that the optimized concentrations of the total DNA for PYMoV were 10, 50 and 100 ng whereas those for CMV subgroup I were 100 and 200 ng. The optimized annealing temperature was 55.8°C and the quantitative ratios of primer pairs for both viruses (PYMoV-F and PMMoV-R : CMV I-F and CMV I-R) were 1 : 1. Evaluation of the developed duplex RT-PCR was performed by analyzing nine black pepper leaf samples showing virus like-diseases. The result showed a strong DNA band at approximately 450 bp in all samples indicating that they were infected by PYMoV only. This result was correlated with those obtained from the conventional PCR and RT-PCR detections, respectively. Therefore, the developed duplex RT-PCR can be used for the detection of these two viruses. In addition, this technique will be useful in further screening application for virus-free black pepper production.

Keywords: Duplex RT-PCR, detection, black pepper virus, *Piper yellow mottle virus*, *Cucumber mosaic virus*

Agricultural Sci. J. (2018) Vol. 49(3): 207–216 ว. วิทย. กษ. (2561) 49(3): 207–216

บทคัดย่อ

Piper yellow mottle virus (PYMoV) และ *Cucumber mosaic virus* subgroup I (CMV subgroup I) เป็นเชื้อไวรัสที่สำคัญและสร้างความเสียหายให้กับผลผลิตพริกไทยตามแหล่งปลูกต่าง ๆ ทั่วโลก งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เทคนิค duplex reverse transcription-PCR (duplex RT-PCR) ในการตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I จากตัวอย่างพริกไทย โดยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PYMoV (PYMoV-F และ PYMoV-R) และ CMV subgroup I (CMV I-F และ CMV I-R) ออกแบบมาจากยีนในส่วน Open reading frame I (ORFI) ของเชื้อ PYMoV และยีนในส่วนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (*CP* gene) ของเชื้อ CMV subgroup I ซึ่งให้ผลผลิต DNA ขนาดประมาณ 450 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อ PYMoV และเชื้อ CMV subgroup I ด้วยเทคนิค duplex RT-PCR พบว่าความเข้มข้นของ total DNA ของเชื้อ PYMoV ที่เหมาะสมคือ 10, 50 และ 100 นาโนกรัม ในขณะที่ความเข้มข้นของ total RNA ของเชื้อ CMV subgroup I ที่เหมาะสม คือ 100 นาโนกรัม และ 200 นาโนกรัม annealing temperature ที่เหมาะสมคือ 55.8 องศาเซลเซียส และอัตราส่วนของคู่ไพรเมอร์ (PYMoV-F และ PMMoV-R : CMV I-F และ CMV I-R) คือ 1 : 1 การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค duplex RT-PCR ที่พัฒนาได้โดยตรวจสอบตัวอย่างใบพริกไทยที่แสดงอาการของโรคคล้ายติดเชื้อไวรัส จำนวนทั้งสิ้น 9 ตัวอย่าง ผลที่ได้พบว่าทุกตัวอย่างให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส เพียงแถบเดียว แสดงว่าติดเชื้อ PYMoV สอดคล้องกับผลการตรวจสอบตัวอย่างด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และ Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ตามลำดับ ดังนั้นเทคนิค duplex RT-PCR ที่พัฒนาได้ สามารถใช้ตรวจสอบเชื้อ ไวรัสทั้ง 2 ชนิด นี้ ในพริกไทย และในอนาคตสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกท่อนพันธุ์พริกไทยปลอดเชื้อไวรัสได้

คำสำคัญ: Duplex RT-PCR, การตรวจสอบ, ไวรัสพริกไทย, *Piper yellow mottle virus*, *Cucumber mosaic virus*

บทนำ

พริกไทยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของหลายประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Bhat and Siju, 2007) รวมถึงประเทศไทย จากการลงพื้นที่สำรวจโรคพืชที่เป็นปัญหาหลักที่ทำให้ผลผลิตพริกไทยลดลงในอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ซึ่งเป็นแหล่งผลิตพริกไทยที่สำคัญของประเทศ โดยมีพื้นที่ปลูกมากถึงร้อยละ 98 ของพื้นที่ปลูกทั่วทั้งประเทศ พบว่าต้นพริกไทยเกือบทั้งหมดในพื้นที่สำรวจแสดงอาการใบด่าง (mosaic) ใบด่างประ (mottle) ใบมีจุดสีเหลือง (chorotic) เสียรูปร่าง (leaf distortion) และมีขนาดเล็กลง รวมถึงต้นพริกไทยแสดงอาการแคระแกร็น (stunting) ให้เห็นอย่างชัดเจน ซึ่งอาการทั้งหมดดังกล่าวเป็นลักษณะอาการคล้ายโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส (Lockhart *et al*., 1997)

เชื้อไวรัสที่มีรายงานพบการแพร่ระบาดและทำความเสียหายให้กับผลผลิตพริกไทยตามแหล่งปลูกต่าง ๆ ทั่วโลก มีอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) ที่มีอนุภาครูปร่างคล้ายกระสวย (bacilliform) และมีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายคู่ (dsDNA) และเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) subgroup I ที่มีอนุภาครูปร่างเป็นทรงกลม (isometric) และมีสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยว (ssRNA) (Bhat and Siju, 2007) การตรวจสอบต้นพริกไทยที่ติดเชื้อ PYMoV หรือ CMV subgroup I ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน จากลักษณะอาการภายนอกที่ปรากฏทำได้ยาก เนื่องจากต้นพริกไทยที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ แสดงลักษณะอาการที่คล้ายคลึงกัน (Silva *et al*., 2002) แม้ว่าในประเทศไทยจะมีรายงานการก่อโรคของเชื้อไวรัสในพริกไทยเพียงชนิดเดียว คือ เชื้อ PYMoV (Lockhart *et al*., 1997) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันมีรายงานการแพร่ระบาดและ

ทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตพริกไทยของเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ในแหล่งปลูกพริกไทยทั่วโลกร่วมกัน (Bhat *et al*., 2013) ดังนั้นเพื่อเป็นการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ในแหล่งปลูกพริกไทยของประเทศไทย จึงควรมีการตรวจสอบเชื้อไวรัสในพริกไทยที่แสดงอาการใบด่าง ใบด่างประ ใบมีจุดสีเหลือง เสียรูปร่าง และลำต้นพริกไทยแคระแกร็น ที่พบอีกครั้ง ซึ่งจะทำให้ทราบแนวทางในการหาวิธีการควบคุมโรค เพื่อลดการแพร่ระบาดของไวรัสในพริกไทยที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป ทั้งนี้การตรวจสอบเชื้อ PYMoV และCMV subgroup I ที่แม่นยำและนิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ การใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และ เทคนิค Reverse transcription-PCR (RT-PCR) ตามลำดับ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด จากตัวอย่างพริกไทยเพียง 1 ตัวอย่าง จำเป็นจะต้องเตรียมปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน 2 ปฏิกิริยา ได้แก่ ปฏิกิริยา PCR จำนวน 1 ตัวอย่าง และ ปฏิกิริยา RT-PCR อีกจำนวน 1 ตัวอย่าง ทำให้สิ้นทั้งเปลืองเวลาและค่าใช้จ่าย (Bhat *et al*., 2013)

ในปี ค.ศ. 2007 Bhat and Siju ได้รายงานความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิค multiplex reverse transcription-PCR สำหรับตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I จากตัวอย่างพริกไทยโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ได้ในคราวเดียวกัน ทำให้ทราบถึงชนิดของเชื้อไวรัสที่พบแพร่ระบาดในแหล่งปลูกพริกไทยในประเทศอินเดีย ซึ่งเทคนิคดังกล่าว สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคด้วยการใช้คัดเลือกท่อนพันธุ์พริกไทยปลอดเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ก่อนนำลงไปปลูกในแปลง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อใช้เทคนิค duplex RT-PCR ในการตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I จากตัวอย่างพริกไทยที่แสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบด่างประ เสียรูปร่าง และลำต้นพริกไทยแคระแกร็น ก่อนที่จะนำเทคนิคดังกล่าวไปตรวจสอบตัวอย่างพริกไทยในแปลงปลูกเพิ่มเติม เพื่อสำรวจการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส และประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวในการคัดเลือกต้นพริกไทยปลอดเชื้อไวรัส เพื่อการควบคุมโรคในขั้นตอนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

แหล่งของเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I

ตัวอย่างเชื้อ *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) สำหรับใช้เป็น positive control ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มาจากการตรวจสอบเชื้อ PYMoV จากตัวอย่างต้นพริกไทยที่ปลูกในอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ที่ใบแสดงอาการด่างประ มีจุดสีเหลืองแพร่กระจายทั่วทั้งใบ ใบลดรูปและเสียรูปร่าง ตามการรายงานของ Lockhart *et al*. (1997) โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PYMoV (Bhat and Siju, 2007) และทำการตรวจสอบเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) subgroup I จากตัวอย่างต้นพริกไทยด้วยเทคนิค Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส ตามการรายงานของ Yu *et al*. (2005) ในขณะที่ตัวอย่างเชื้อ CMV subgroup I (CMV ไอโซเลท 30RS) ซึ่งใช้เป็น positive control ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยเลี้ยงเชื้อไวรัสไว้ในต้นลำโพง (*Datura stramonium* L.)

คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา duplex RT-PCR

Forward primer และ reverse primer สำหรับใช้เพิ่มปริมาณเชื้อ PYMoV ใช้ตามการรายงานของ Bhat and Siju (2007) ซึ่งออกแบบมาจากยีนในส่วน Open reading frame I (ORFI) ของเชื้อ PYMoV (GenBank Accession No. DQ836226) โดย forward primer (PYMoV-F) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5’-TAACAGGACTAGGGATCG-3’ และ reverse primer (PYMoV-R) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5’-CAGCTGGTCTTGATAATAG-3’ ซึ่งจะให้ผลผลิต DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส ในขณะที่ forward primer และ reverse primer ของเชื้อ CMV subgroup I ใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ ซึ่งออกแบบมาจาก coat protein gene (*CP* gene) ของเชื้อ CMV ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank โดย forward primer (CMV-F) และ reverse primer (CMV-R) คู่แรก ใช้ตามการรายงานของ Bhat and Siju (2007) ที่ออกแบบมาจาก *CP* gene ของเชื้อ CMV (GenBank Accession No. AY545924) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ CMV-F 5’-ATGGACAAATCTGAATCAAC-3’ และ CMV-R 5’-TCAAACTGGGAGCACCC-3’ ในส่วนของไพรเมอร์คู่ที่ 2 ออกแบบมาจาก *CP* gene ของเชื้อ CMV subgroup I ตำแหน่งที่ 121–143 และ 601–620 ตามลำดับ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ forward primer (CMV I-F) 5’-CGACTTAATAAGACGTTAG CAGC-3’ และ reverse primer (CMV I-R) 5’-TGCTCRAYGTCRACA-3’ (Yu *et al*., 2005) โดยไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ จะให้ผลผลิต DNA ขนาดประมาณ 650 คู่เบส และ 500 คู่เบส ตามลำดับ

การสกัด total DNA และ total RNA

นำตัวอย่างใบพริกไทยที่ติดเชื้อ PYMoV และใบลำโพงที่ติดเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS มาทำการแยกสกัด total DNA ด้วย DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) และ total RNA ด้วย RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) ตามลำดับ วัดความเข้มข้นของ DNA และ RNA ที่แยกสกัดได้ด้วยเครื่อง nanodrop 8000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร นำสารละลาย total DNA และ total RNA ที่แยกสกัดได้ไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ด้วยเทคนิค duplex RT-PCR

การหาความเข้มข้นของ DNA และ RNA ที่เหมาะสม

หาความเข้มข้นของ total DNA และ total RNA ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ด้วยเทคนิค duplex RT-PCR โดยใช้ SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ *Taq* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าวข้างต้น ดังนี้ เตรียมหลอดปฏิกิริยาปริมาตรหลอดละ 50 ไมโครลิตร จำนวนทั้งสิ้น 9 หลอด หลอดปฏิกิริยาที่ 1, 4 และ 7 เติม total DNA ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม หลอดปฏิกิริยาที่ 2, 5 และ 8 เติม total DNA ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม และหลอดปฏิกิริยาที่ 3, 6 และ 9 เติม total DNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ตามลำดับ จากนั้นเติม total RNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ลงในหลอดปฏิกิริยาที่ 1, 2 และ 3 เติม total RNA ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม ลงในหลอดปฏิกิริยาที่ 4, 5 และ 6 และเติม total RNA ความเข้มข้น 300 นาโนกรัม ลงในหลอดปฏิกิริยาที่ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ เติม 2X reaction Mix ลงในหลอดปฏิกิริยาปริมาตรหลอดละ 25 ไมโครลิตร คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PYMoV (PYMoV-F และ PYMoV-R) และ CMV subgroup I (CMV-F และ CMV-R; CMV I-F และ CMV I-R) ความเข้มข้นไพรเมอร์ละ 10 พิโคโมลาร์ และ SuperScript™ III RT/Platinum™ *Taq* Mix ปริมาตรหลอดละ 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรปฏิกิริยาแต่ละหลอดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนครบปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler (Bio-Rad C1000 Touch™) โดยใช้โปรแกรมในการสังเคราะห์ ดังนี้ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบแถบ DNA ของเชื้อ PYMoV ที่ขนาดประมาณ 450 คู่เบส และ CMV subgroup I ขนาดประมาณ 650 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ ด้วย 2% agarose gel electrophoresis เลือกความเข้มข้นของ total DNA และ total RNA ที่ใช้น้อยที่สุด แต่ยังคงให้ความเข้มของแถบ DNA ที่ปรากฏบนเจลชัดเจน มาใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป กำหนด positive control ที่ใช้คือ total DNA เชื้อ PYMoV และ total RNA เชื้อ CMV ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR ตามลำดับ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส ในขณะที่ negative control ที่ใช้ในปฏิกิริยาคือน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค duplex RT-PCR

การหาอุณหภูมิของ annealing temperature ที่เหมาะสม

หาอุณหภูมิในส่วนของ annealing temperature ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณ total DNA ของเชื้อ PYMoV และ total RNA ของเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค duplex RT-PCR โดยใช้ความเข้มข้นของ total DNA และ total RNA ที่ได้จากผลการทดลองในเบื้องต้น โดยเตรียมปฏิกิริยาทั้งสิ้น 8 หลอด ปริมาตรหลอดละ 50 ไมโครลิตร ซึ่งในแต่ละหลอดประกอบด้วย total DNA และ total RNA, 2X reaction Mix คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ความเข้มข้นไพรเมอร์ละ 10 พิโคโมลาร์ และ SuperScript™ III RT/Platinum™ *Taq* Mix ปรับปริมาตรหลอดปฏิกิริยาแต่ละหลอดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนครบปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งโปรแกรมสำหรับการทดสอบอุณหภูมิ annealing ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ annealing เริ่มตั้งแต่ 40.8, 42.3, 45.4, 50.0, 55.8, 60.6, 63.3 และ 64.8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และอุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบความเข้มของแถบ DNA เชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ด้วย 2% agarose gel electrophoresis เลือกอุณหภูมิ annealing ที่ให้ความเข้มของแถบ DNA ของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ดีที่สุด มาใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป กำหนด positive control ที่ใช้คือ total DNA เชื้อ PYMoV และ total RNA เชื้อ CMV ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR ตามลำดับ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส ในขณะที่ negative control ที่ใช้ในปฏิกิริยาคือน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค duplex RT-PCR

การหาอัตราส่วนคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

หาอัตราส่วนคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา duplex RT-PCR ในการศึกษานี้ ดัดแปลงจาก Özdemir (2009) โดยเตรียมปฏิกิริยา duplex RT-PCR จำนวนทั้งสิ้น 7 หลอด ในแต่ละหลอดใช้สัดส่วนคู่ไพรเมอร์ของ PYMoV : CMV ดังนี้คือ 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 2 : 1, 3 : 1 และ 4 : 1 ตามลำดับ ตรวจสอบอัตราส่วนของคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากความเข้มของแถบ DNA ของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ที่ปรากฏบน 2% agarose gel electrophoresis

การตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ในพริกไทยด้วยเทคนิค duplex RT-PCR

ทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค duplex RT-PCR ด้วยการตรวจสอบเชื้อไวรัส PYMoV และ CMV subgroup I จากตัวอย่างใบพริกไทยที่เก็บมาจากต้นพริกไทยที่แสดงอาการคล้ายติดเชื้อไวรัส ได้แก่ ใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบด่างประ ใบมีจุดสีเหลือง ใบเสียรูปร่าง จำนวนทั้งสิ้น 9 ตัวอย่าง

จากแปลงปลูกพริกไทย ในอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี เปรียบเทียบกับการตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I จากตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR ตามลำดับ

ผลการทดลองและวิจารณ์

แหล่งของเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I

การคัดเลือกตัวอย่างต้นพริกไทยที่แสดงอาการติดเชื้อ *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) เพียงชนิดเดียวสำหรับใช้เป็น positive control ในการศึกษาครั้งนี้ จำนวนทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค PCR และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PYMoV ภายหลังทำการตรวจสอบขนาดของ DNA ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis แล้ว พบว่าทุกตัวอย่างติดเชื้อ PYMoV โดยให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส สอดคล้องกับการรายงานของ Bhat and Siju (2007) ที่ทำการตรวจสอบเชื้อ PYMoV ที่ก่อโรคในพริกไทยในประเทศอินเดียและใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกัน อย่างไรก็ตามตัวอย่างต้นพริกไทยทั้งหมดที่นำมาตรวจสอบไม่ปรากฏแถบ DNA ขนาดประมาณ 500 คู่เบส (CMV subgroup I) แสดงว่าตัวอย่างต้นพริกไทยที่เก็บมา ติดเชื้อ PYMoV เพียงชนิดเดียว ยืนยันแถบ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส ที่เพิ่มปริมาณได้ว่าเป็นเชื้อ PYMoV ด้วยการส่ง DNA ที่เพิ่มปริมาณได้จากใบพริกไทยที่เก็บได้จากต้นพริกไทยตัวอย่างที่ 4 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณได้ คือ hypothetical protein gene ของเชื้อ PYMoV ซึ่งได้รายงานเข้าสู่ฐานข้อมูลของ GenBank และได้รับ Accession number คือ LN901314 เก็บตัวอย่างต้นพริกไทยตัวอย่างที่ 4 ไว้เป็น positive control เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ในส่วนของเชื้อ CMV subgroup I (CMV ไอโซเลท 30RS) แม้ว่าได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวมาใช้เป็น positive control จากกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งเก็บรักษาเชื้อไวรัสไว้ในต้นลำโพง (*Datura stramonium* L.) มาใช้ในการทดลอง อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบเชื้อ CMV อีกครั้ง ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV subgroup I ตามการรายงานของ Yu *et al*. (2005) ผลที่ได้พบว่าตัวอย่างดังกล่าวยังคงให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อ CMV subgroup I โดยปรากฏแถบ DNA ขนาดประมาณ 500 คู่เบส

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ด้วยเทคนิค duplex RT-PCR

การหาความเข้มข้นของ DNA และ RNA ที่เหมาะสม

การทดลองชุดที่ 1 ซึ่งใช้คู่ไพรเมอร์ PYMoV (PYMoV-F และ PYMoV-R) และ CMV (CMV-F และ CMV-R) ภายหลังทำการตรวจวิเคราะห์ DNA ด้วย 2% agarose gel electrophoresis แล้ว ผลที่ได้พบว่า ทั้ง 9 ปฏิกิริยา ที่ใช้ความเข้มข้นของ total DNA ได้แก่ 10, 50 และ 100 นาโนกรัม ตามลำดับ และ total RNA ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 นาโนกรัม ตามลำดับ ให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส ของเชื้อ PYMoV เพียงชนิดเดียว โดยไม่พบแถบ DNA ขนาด 650 คู่เบส ของเชื้อ CMV ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่คู่ไพรเมอร์ของเชื้อ CMV ที่ใช้ในปฏิกิริยาชุดที่ 1 ไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ตรวจสอบเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค duplex RT-PCR ทั้งนี้เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวมาใช้ตรวจสอบเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค RT-PCR ก็ไม่พบแถบ DNA ขนาด 650 คู่เบส เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ในปฏิกิริยาชุดที่ 2 ซึ่งใช้คู่ไพรเมอร์ PYMoV (PYMoV-F และ PYMoV-R) และ CMV subgroup I (CMV I-F และ CMV I-R) ภายหลังการตรวจวิเคราะห์ขนาด DNA ของเชื้อ PYMoV และ CMV ด้วย 2% agarose gel electrophoresis แล้ว พบว่าทุกปฏิกิริยาให้แถบ DNA

ขนาดประมาณ 450 คู่เบส (PYMoV) และ 500 คู่เบส (CMV subgroup I) (Figure 1A) เช่นเดียวกับ positive control ที่ใช้คือ ตัวอย่างเชื้อ PYMoV ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PYMoV-F และ PYMoV-R และเชื้อCMV subgroup I ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CMV I-F และ CMV I-R แสดงว่า คู่ไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถนำมาใช้ตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV ด้วยเทคนิค duplex RT-PCR ได้ เมื่อพิจารณาความเข้มของแถบ DNA ของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ที่ได้ในแต่ละปฏิกิริยา พบว่า หากใช้ total DNA ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 นาโนกรัม และ total RNA ความเข้มข้น 100 และ 200 นาโนกรัม ตามลำดับ ให้แถบ DNA ของเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ที่เข้มและชัดเจน มากกว่าใช้ total DNA ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 นาโนกรัม และ total RNA ความเข้มข้น 300 นาโนกรัม (Figure 1B) โดยความเข้มข้นต่ำสุดของ total DNA และ total RNA ที่สามารถใช้ในปฏิกิริยา duplex RT-PCR ได้คือ 10 นาโนกรัม และ 100 นาโนกรัม ตามลำดับ ซึ่งในการศึกษานี้เลือกใช้ความเข้มข้นของ total DNA และ RNA ดังกล่าว ไปใช้ทดสอบหา annealing temperature ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา duplex RT-PCR ขั้นตอนต่อไป

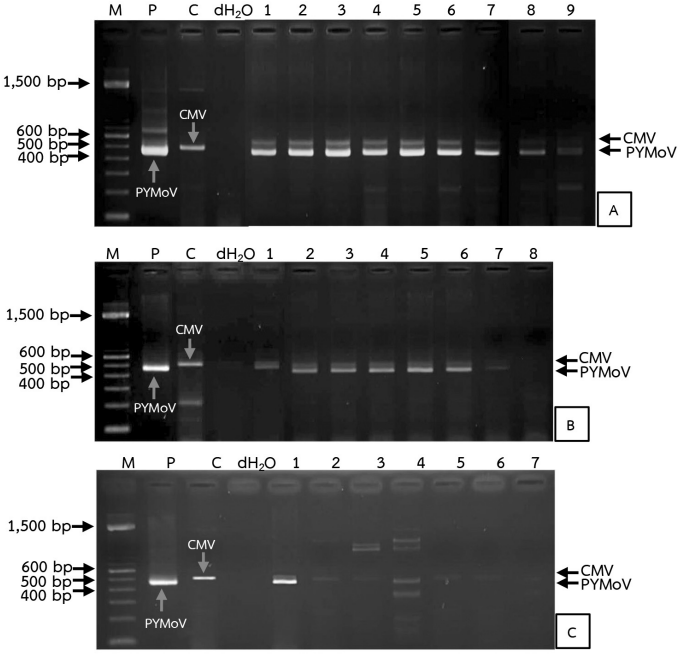

Figure 1 Optimization of DNA and RNA templates concentration (A), annealing temperature (B) and primer pairs ratio (C) required for duplex RT-PCR detection of PYMoV and CMV. Lane M indicates 100 bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), lane P and C (A, B and C) are a positive control of PYMoV and CMV samples, amplified by PCR and RT-PCR, respectively. Lane dH_2O (A, B and C) is a negative control whereas lane 1–9 (A) are a test of templates concentration including 10 ng, 50 ng and 100 ng of DNA combined with 100 ng (lane 1–3), 200 ng (lane 4–6) and 300 ng of RNA (lane 7–9), respectively. Lane 1–8 (B) are a test of annealing temperature using total DNA concentration at 10 ng and total RNA concentration at 100 ng, vary from 40.8, 42.3, 45.4, 50.0, 55.8, 60.6, 63.3 and 64.8 degree celsius respectively. Finally (C), lane 1–7 are a test of primer pairs ratio including 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 2 : 1, 3 : 1 and 4 : 1, respectively.

การหาอุณหภูมิของ annealing temperature ที่เหมาะสม

ผลการตรวจสอบขนาด DNA ของเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ที่ขนาดประมาณ 450 คู่เบส และ 500 คู่เบส ตามลำดับ ด้วย 2% agarose gel electrophoresis พบว่าการใช้ annealing temperature ตั้งแต่ 40.8, 42.3, 45.4, 50.0, 55.8 และ 60.6 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดได้ (Figure 1B) โดยการใช้ annealing temperature ที่ 55.8 องศาเซลเซียส ให้แถบ DNA ของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด เข้มและชัดเจนกว่าการใช้ annealing temperature อื่น ๆ

การหาอัตราส่วนคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

หาอัตราส่วนคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา duplex RT-PCR ในการศึกษานี้ โดยใช้อัตราส่วนของคู่ไพรเมอร์ PYMoV : CMV (PYMoV-F และ PYMoV-R : CMV I-F และ CMV I-R) ได้แก่ 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 2 : 1, 3 : 1 และ 4 : 1 ตามลำดับ ใช้ total DNA ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม และ total RNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม annealing temperature เท่ากับ 55.8 องศาเซลเซียส ภายหลังทำการตรวจสอบขนาด DNA ของเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ที่ขนาดประมาณ 450 คู่เบส และ 500 คู่เบส ด้วย 2% agarose gel electrophoresis พบว่าคู่ไพรเมอร์อัตราส่วนที่เหมาะสมและสามารถเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ได้คือ 1 : 1 ในขณะที่คู่ไพรเมอร์อัตราส่วนอื่น ๆ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ (Figure 1C)

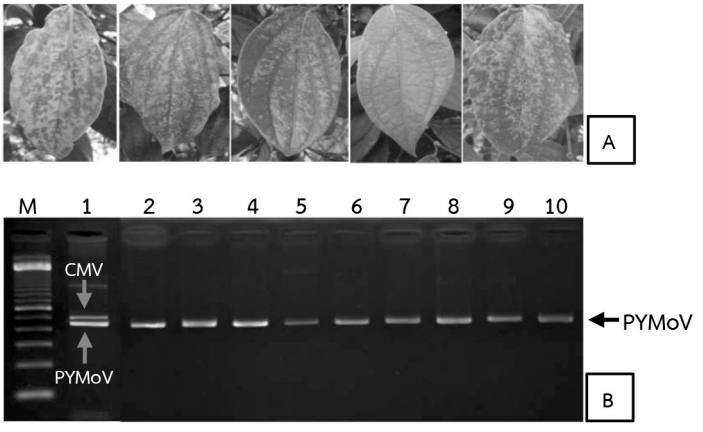

Figure 2 Detection of PYMoV and CMV subgroup I from field of 9 black pepper samples expressing foliar symptoms vary from severe mosaic, mottling, chlorotic and leaf distortion (A) by duplex RT-PCR (B). Lane M is 100 bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), Lane 1 determines a positive sample (PYMoV+CMV) amplified by duplex RT-PCR. Lane 2–10 are a test plant samples no.1–9, respectively.

การตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ในพริกไทยด้วยเทคนิค duplex RT-PCR

ผลการทดสอบประสิทธิภาพเทคนิค duplex RT-PCR ด้วยการตรวจสอบเชื้อไวรัส PYMoV และ CMV subgroup I จากตัวอย่างใบพริกไทยที่เก็บมาจากต้นพริกไทยที่แสดงอาการคล้ายติดเชื้อไวรัส (Figure 2A) จำนวน 9 ตัวอย่าง ในแปลงปลูกพริกไทย อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี พบว่า ทุกตัวอย่างให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส เพียงแถบเดียว (Figure 2B) ทั้งนี้ผลที่ได้สอดคล้องกับการตรวจสอบเชื้อ PYMoV ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งพบแถบ DNA ขนาด 450 คู่เบส และการตรวจสอบเชื้อ CMV subgroup I ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ไม่พบแถบ DNA ขนาด 500 คู่เบส เช่นเดียวกัน แสดงว่าเทคนิค duplex RT-PCR ที่พัฒนาได้ในการศึกษาครั้งนี้ มีประสิทธิภาพ สามารถตรวจสอบตัวอย่างต้นพริกไทยติดเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ได้ผลที่สอดคล้องกับการตรวจสอบเชื้อไวรัส PYMoV ด้วยเทคนิค PCR และเชื้อไวรัส CMV subgroup I ด้วยเทคนิค RT-PCR ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากจำนวนตัวอย่างต้นพริกไทยที่นำมาใช้ในการตรวจสอบมีจำนวนค่อนข้างน้อย ซึ่งอาจส่งผลโดยตรงต่อความถูกต้องและแม่นยำในการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคดังกล่าว ดังนั้นจึงควรตรวจสอบตัวอย่างพริกไทยทั้งที่แสดงอาการคล้ายติดเชื้อไวรัสและไม่แสดงอาการติดเชื้อไวรัส (Symptomless) ในแปลงปลูกเพิ่มเติม

สรุป

การใช้เทคนิค duplex RT-PCR สำหรับการตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ที่ก่อโรคในพริกไทย โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ORFI ของเชื้อ PYMoV (PYMoV-F และ PMMoV-R) ซึ่งให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *CP* gene ของเชื้อ CMV subgroup I (CMV I-F และ CMV I-R) ซึ่งให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 500 คู่เบส ความเข้มข้นของ total DNA ที่เหมาะสมคือ 10, 50 และ 100 นาโนกรัม ตามลำดับ และ total RNA ที่เหมาะสมคือ 100 และ 200 นาโนกรัม annealing temperature ที่ให้แถบ DNA ของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ชัดเจน คือ 55.8 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของคู่ไพรเมอร์ (PYMoV-F และ PMMoV-R : CMV I-F และ CMV I-R) ที่เหมาะสม คือ 1 : 1 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของเทคนิค duplex RT-PCR ที่พัฒนาได้ ด้วยการตรวจสอบตัวอย่างพริกไทยที่แสดงอาการคล้ายติดเชื้อไวรัส จำนวน 9 ตัวอย่าง พบว่า ทุกตัวอย่างให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส สอดคล้องกับการตรวจสอบตัวอย่างพริกไทยด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ตามลำดับ ในเบื้องต้นแสดงว่าเทคนิค duplex RT-PCR ที่พัฒนาได้ สามารถตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ในพริกไทยได้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเพื่อคัดเลือกท่อนพันธุ์พริกไทยปลอดเชื้อไวรัสได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ภายใต้สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และคณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

เอกสารอ้างอิง

Bhat, A.I. and S. Siju. 2007. Development of a single-tube multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of *Cucumber mosaic virus* and *Pipper yellow mottle virus* associated with stunt disease of black pepper. Curr. Sci. 93(7): 973–975.

Bhat, A.I., A. Siljo and K.P. Deeahma. 2013. Rapid detection of *Piper yellow mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* infecting black pepper (*Piper nigrum*) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). J. Virol. Methods. 193(1): 190–196.

Lockhart, B.E.L., K. Kiratiya-Angul, P. Jones, L. Eng, P. de Silva, N.E. Olszewski, N. Lockhart, N. Deema and J. Sangalang. 1997. Identification of *Piper yellow mottle virus* a mealybug-transmitted badnavirus infecting *Piper* spp. Eur. J. Plant Pathol. 103(4): 303–311.

Özdemir, Z. 2009. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* using pure culture. J. Plant Pathol. 91(2): 495–497.

Silva, D.P.P., P. Jones and M.W. Shaw. 2002. Identification and transmission of *Piper yellow mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* infecting black pepper (*Piper nigrum*) in Sri Lanka. Plant Pathol. 51(5): 537–545.

Yu, C., J. Wu and X. Zhou. 2005. Detection and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. J. Virol. Methods. 123(2): 155–161.