

การตรวจสอบ *Cucumber mosaic virus* และ *Tomato yellow leaf curl virus* ในมะเขือม่วงที่มีการติดเชื้อไวรัส โดยวิธีการ duplex PCR

Detection of *Cucumber mosaic virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* in infected eggplant by duplex PCR

อุษณีย์ แสนสบาย^{1*}, พิภัทร เจียมพิริยะกุล², พรพันธุ์ ภู่อ้อมพันธุ์¹ และ เกษสินี สิทธิวงศ์¹

Usanee Sansabai^{1*}, Pipat Chiampiriyakul², Pornpan Pooprompan¹
and Kassinee Sitthiwong¹

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิควิธีการ PCR เพื่อการตรวจสอบเชื้อไวรัสสองชนิด ได้แก่ CMV และ TYLCV ในปฏิกิริยาเดียวกันจากเนื้อเยื่อใบของมะเขือม่วงที่ติดเชื้อในธรรมชาติ ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทำการพัฒนาเทคนิควิธีการ duplex PCR เพื่อการตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดข้างต้น ให้สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้แม้มีปริมาณที่ต่ำ โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ซึ่งแต่ละคู่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ RNA และ DNA ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมของ CMV และ TYLCV ตามลำดับ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ที่อุณหภูมิ 57.3 °C เป็นระดับอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมในขั้นตอน primer annealing ใน duplex PCR และสามารถให้ผลผลิตของปฏิกิริยาเป็นแถบดีเอ็นเอซึ่งมีขนาด 444 คู่เบสสำหรับ CMV และขนาด 991 คู่เบส สำหรับ TYLCV นอกจากนี้ผลของการทดสอบและประเมินความไวแสดงให้เห็นว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในปฏิกิริยาเดียวได้จากปริมาณเนื้อเยื่อใบมะเขือม่วงปริมาณเพียง 625 นาโนกรัม

คำสำคัญ: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), duplex PCR

ABSTRACT: This study aimed to develop a polymerase chain reaction (PCR) assay for simultaneous detection of *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) from naturally infected eggplant leaf tissues. A duplex PCR assay was developed for sensitive and simultaneous detection of both the viruses (CMV and TYLCV). Each two pairs of specific primers were designed against their genomic RNA and DNA of these viruses (CMV and TYLCV) respectively. PCR conditions were optimized by setting annealing temperature at 57.3 °C. This optimized condition showed an expected size of amplicons in duplex PCR with respect to CMV (444 bp) and TYLCV (991 bp). Furthermore, the sensitivity showed that the minimum amount of leaf tissue required for successful amplification was 625 ng.

Keywords: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), duplex PCR

¹ สาขาวิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Division of Horticulture, Faculty of Agricultural Production, Maejo University

² สาขาวิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Division of Plant Protection, Faculty of Agricultural Production, Maejo University

* Corresponding author: usanee_mju@hotmail.com

บทนำ

มะเขือม่วง (Eggplant) เป็นพืชผักเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งที่มีปริมาณการเพาะปลูกเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากผลผลิตเป็นที่ต้องการทั้งในและต่างประเทศ ในประเทศไทยการผลิตมะเขือม่วงมักประสบกับอุปสรรคและปัญหาในการติดเชื้อและเกิดโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส CMV และ TYLCV ซึ่งจัดเป็นไวรัสสองชนิดที่มีความสำคัญ เนื่องจากมีรายงานถึงการลดลงของผลผลิตมะเขือม่วงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีสาเหตุเกิดจาก CMV (Hossein-zadeh *et al.*, 2012) และการรายงานถึงความเสียหายของ TYLCV ต่อผลผลิตมะเขือเทศสูงสุดถึง 100 % (Moriones *et al.*, 2000) ในขณะที่วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสที่ได้รับความนิยม ได้แก่ ELISA นั้นยังมีข้อจำกัดในเรื่องของความไว (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของไวรัส (specificity) ที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR (Mekuria *et al.*, 2003) ซึ่งมีประสิทธิภาพความไวที่สูงมากในการตรวจสอบไวรัส สามารถตรวจสอบได้แม้มีปริมาณไวรัสที่ต่ำ ดังนั้นการพัฒนารูปแบบการตรวจสอบ CMV และ TYLCV ให้สามารถตรวจสอบไวรัสสาเหตุโรคทั้งสองชนิดได้ในปฏิกิริยาเดียวกัน Duplex polymerase chain reaction (duplex PCR) และมีประสิทธิภาพสูงในความไว ความถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว จึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งในการวิจัยและพัฒนารูปแบบการตรวจสอบไวรัสอย่างมีประสิทธิภาพ

Duplex PCR เป็นเทคนิควิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสสองชนิดได้ในปฏิกิริยาเดียว ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงทั้งในความรวดเร็ว และความประหยัดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดใดชนิดหนึ่งปฏิกิริยา แต่การตรวจสอบเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิดในปฏิกิริยาเดียวนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนารูปแบบการตรวจสอบให้เหมาะสมต่อการตรวจสอบเชื้อไวรัสเหล่านั้น จากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชชนิดต่างๆ โดยเฉพาะเชื้อไวรัสพืชที่มีความแตกต่างกันในชนิดของ

สารพันธุกรรม ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนารูปแบบ duplex PCR ให้สามารถตรวจสอบ CMV ซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (ssRNA) และ TYLCV ซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ssDNA) จากเนื้อเยื่อใบมะเขือม่วงในปฏิกิริยาเดียวกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการศึกษา

การสกัดแยกกรดนิวคลีอิกจากตัวอย่างใบมะเขือม่วง

บดเนื้อเยื่อใบมะเขือม่วงน้ำหนัก 50 มิลลิกรัม จนละเอียด ในสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 1,500 μ l ซึ่งมีส่วนผสมของ 150 mM Tris-Cl, 500 mM NaCl, 100 mM EDTA และ 1% SDS แล้วนำน้ำคั้นบดที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ระดับ 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสแล้วเติมด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 เท่าของน้ำใส ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ระดับ 16,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนน้ำใสส่วนบนด้วยการเติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่าของน้ำใส โดยเก็บตะกอนที่ได้หลังจากการหมุนเหวี่ยงที่ระดับ 16,000 xg เป็นเวลา 20 นาที แล้วผึ่งให้แห้งในอากาศก่อนนำไปละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE

การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค (RT)-PCR

สังเคราะห์ cDNA โดยเทคนิควิธีการ Reverse Transcription (RT) ซึ่งใช้ EPCMV 22 เป็น reverse primer มีส่วนผสมของสารละลายของปฏิกิริยา ดังนี้ อาร์เอ็นเอแม่แบบ ปริมาณ 0.1-1.0 μ g และ reverse primer ปริมาณ 100 pmol ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 80 $^{\circ}$ C นาน 5 นาที แล้วเติม 5x RT buffer 4 μ l, 10 mM dNTPs 2 μ l, สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RNase ปริมาณ 20 หน่วย และเอนไซม์ M-MuLV reverse transcriptase 200 หน่วย ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำให้ได้ปริมาตรสุทธิ 20 μ l บ่มที่ 42 $^{\circ}$ C ใช้เวลา 60 นาที และนำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณขึ้น DNA ในหลอดทดลอง โดยเทคนิควิธีการ Polymerase

chain reaction (PCR) ซึ่งส่วนผสมสารละลายของปฏิกิริยา มีดังนี้ ดีเอ็นเอแม่แบบปริมาตร 5 μ l, 2.5 mM dNTPs 4 μ l, 10x PCR buffer 5 μ l, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.25 หน่วย, 10 μ M forward primer 2 μ l และ 10 μ M reverse primer 2 μ l ปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำให้ได้ปริมาตรสุทธิ 50 μ l ภายใต้สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94 $^{\circ}$ C 60 วินาที, 53-64 $^{\circ}$ C 60 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72 $^{\circ}$ C เวลา 60 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ

ในการศึกษาวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์ที่ได้มีการพัฒนาและออกแบบได้แก่ EPCMV21 (Forward primer 5'-CCGCGGGTCTTATTATGG-3') และ EPCMV22 (Reverse primer 5'-TCGGAGGGAGGATTCT -3') ที่จำเพาะเจาะจงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนสารพันธุกรรมของ CMV ซึ่งให้ผลผลิตของปฏิกิริยา ขนาด 444 คู่เบส และคู่ของไพรเมอร์ EPYMV21 (Forward primer 5'-GAGAGTTTGCACGGCTTTAGATG-3') และ EPYMV22 (Reverse primer 5'-ACGCGCAGCTGATTATGTA(C/T)T (A/G)T-3') ที่จำเพาะเจาะจงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนสารพันธุกรรมของ TYLCV ซึ่งให้ผลผลิตของปฏิกิริยาขนาด 991 คู่เบส นอกจากนี้ได้นำคู่ของไพรเมอร์ cp16S5P1 (Forward primer 5'- GCATGCCGCCAGCGTTCATC-3') และ cpval3P2 (Reverse primer 5'-AGTTC-GAGCCTGATTATCCC-3') ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ซึ่งให้ผลผลิตของปฏิกิริยา ขนาด 297 คู่เบส (Petit *et al.*, 1996) มาใช้เพื่อเป็นตัวควบคุมการเกิดปฏิกิริยา PCR (Control reactions) และทำการสกัดแยกผลผลิตของปฏิกิริยา ขนาด 444 คู่เบส และขนาด 991 คู่เบส ออก

จากเจล เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และจำแนกยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสทั้งสอง โดยการใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) วิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากปฏิกิริยาในการศึกษาวิจัยนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ได้มีการรายงานในฐานข้อมูลพันธุกรรม

การทดสอบสภาพอุณหภูมิที่เหมาะสมของการตรวจสอบไวรัสในวิธีการ duplex PCR

ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยา duplex PCR ในระดับอุณหภูมิของการเกิด primer annealing ที่แตกต่างกันในช่วงอุณหภูมิ 53-64 $^{\circ}$ C จำนวน 5 ระดับ ได้แก่ 54.2, 57.3, 59.6, 62.3 และ 63.6 $^{\circ}$ C เป็นระยะเวลา 1 นาทีเท่ากัน ในทุกระดับอุณหภูมิ ด้วย MultiGene Gradient Thermal Cycler (Labnet, USA) โดยพิจารณาเปรียบเทียบ ความจำเพาะเจาะจงของการให้ผลผลิตดีเอ็นเอ ปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอ และคุณภาพการแสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอใน 2% agarose gel electrophoresis

การประเมินความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส โดยวิธีการ duplex PCR จากเนื้อเยื่อพืช

ประเมินความไวในการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่มีการติดเชื้อในมะเขือม่วงโดยใช้เนื้อเยื่อใบของมะเขือม่วงเป็นตัวอย่างในการประเมิน โดยใช้ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อใบมะเขือม่วงน้ำหนัก 50 มก. ผ่านการสกัดแยกจนได้สารละลายอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอรวม ปริมาตร 400 μ l ก่อนการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี RT-PCR ซึ่งในปฏิกิริยา RT ปริมาตร 20 μ l มีการใช้สารละลายอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้จากใบมะเขือม่วงปริมาตร 4 μ l และมีการใช้ส่วนผสมภายหลังจากการทำปฏิกิริยาของปฏิกิริยา RT ในอัตราส่วน ปริมาตร 1 μ l ในทุก 10 μ l ของส่วนผสมใน duplex PCR

ทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบต่อเชื้อไวรัส โดยวิธีการ duplex PCR กับตัวอย่างพืชเป็นโรค จากแปลงปลูก

ทดลองใช้วิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัส โดยวิธีการ duplex PCR กับตัวอย่างใบมะเขือม่วงที่แสดงลักษณะอาการผิดปกติซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสและตัวอย่างใบมะเขือม่วงปกติ จำนวน 15 ตัวอย่าง จากแปลงปลูก โดยทำการสกัดแยกกรดนิวคลีอิกจากเนื้อเยื่อใบมะเขือม่วงเพื่อนำมาใช้เป็นอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอแม่แบบในการตรวจสอบเชื้อไวรัส โดยวิธีการ duplex PCR จากนั้นแสดงผลของปฏิกิริยา โดยการตรวจสังเกตแถบดีเอ็นเอผลผลิตของปฏิกิริยาที่ปรากฏโดย agarose gel electrophoresis

ผลการศึกษา

การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR และ PCR

ผลการตรวจสอบ CMV และ TYLCV ที่มีการติดเชื้อไวรัสบนมะเขือม่วงโดยเทคนิค RT-PCR และ PCR จากตัวอย่างใบมะเขือม่วง จำนวน 4 ตัวอย่าง (Figure 1 A) พบแถบดีเอ็นเอขนาดความยาว 444 คู่เบส ซึ่งมีขนาดตรงกันกับขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ผลผลิตที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ CMV ที่ได้จากการคำนวณระยะห่างระหว่างไพรเมอร์คู่เดียวกัน (Lane 1 และ 2) และแถบดีเอ็นเอขนาดความยาว 991 คู่เบส ซึ่งมีขนาดตรงกันกับขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ผลผลิตที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ TYLCV ที่ได้จากการคำนวณระยะห่างระหว่างไพรเมอร์คู่เดียวกัน (Lane 5 และ 7) ในตัวอย่างที่มีการติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิด และไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอซึ่งจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดดังกล่าวในตัวอย่างที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัส

โดยพบการปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดความยาว 297 คู่เบส ซึ่งจำเพาะเจาะจงกับคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (Control reactions) ในทุกตัวอย่างใบของมะเขือม่วงทั้งตัวอย่างใบมะเขือม่วงที่ติดเชื้อไวรัส และตัวอย่างใบมะเขือม่วงที่ไม่ติดเชื้อไวรัส และผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยืนยันความจำเพาะเจาะจงของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบและจำแนกยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสทั้งสอง พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของปฏิกิริยาขนาด 444 คู่เบส มีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนสารพันธุกรรมของ CMV strain CLW2 จากประเทศมาเลเซีย ที่ระดับ 98% identity และลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของปฏิกิริยาขนาด 991 คู่เบสมีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนสารพันธุกรรมของ TYLCV-[Thailand Kan1] ที่ระดับ 99% identity

การทดสอบสภาพอุณหภูมิที่เหมาะสมของการตรวจสอบไวรัสในวิธีการ duplex PCR

ผลของการทดสอบแสดงรูปแบบของแถบผลผลิตดีเอ็นเอจำนวนสามแถบที่มีขนาดความยาว 297, 444 และ 991 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดความยาวของโมเลกุลดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งปรากฏและให้ผลในความเข้มของแถบดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งสามแถบสูงสุดและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดอื่น ที่ระดับอุณหภูมิ 57.3 °C ในขั้นตอนการเกิด primer annealing ของปฏิกิริยา และพบมีปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ลดต่ำลง ที่ระดับอุณหภูมิ 59.6, 62.3 และ 63.6 °C ตามลำดับ ซึ่งที่ระดับอุณหภูมิ 62.3 และ 63.6 °C ไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาว 444 คู่เบส พบเพียงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาว 297 คู่เบส และ 991 คู่เบส (Figure 1 B)

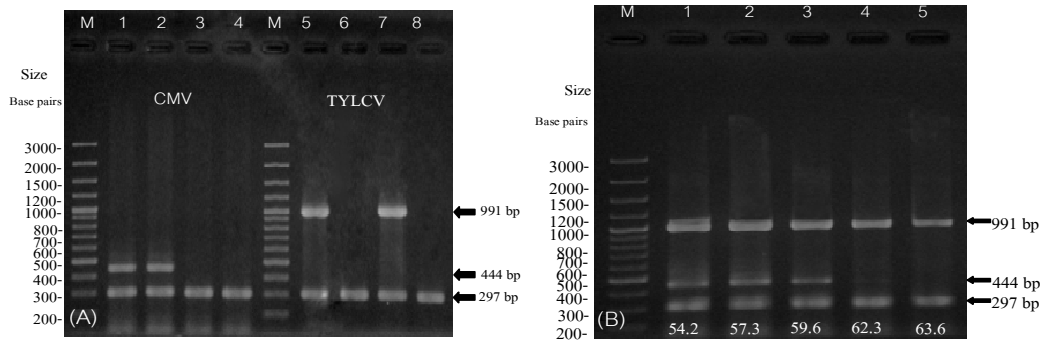


Figure 1 (A) Detection of CMV (Lane 1-4) and TYLCV (Lane 5-8) by uniplex (RT)-PCR from naturally infected eggplant leaf tissues samples of Acc. No. B-15 (Lane 1 and 5), Acc. No. F-04 (Lane 2 and 6), Acc. No. F-16 (Lane 3 and 7) and Acc. No. A-11 (Lane 4 and 8). (B) Determination of the optimal primer annealing temperature by duplex PCR using virus specific primers from naturally infected eggplant leaf tissue sample of Acc. No. B-15.

การประเมินความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส โดยวิธีการ duplex PCR จากเนื้อเยื่อพืช

การประเมินความไวในการตรวจสอบ CMV และ TYLCV โดยวิธีการ duplex PCR จากใบของมะเขือม่วง โดยการศึกษาเปรียบเทียบหาจุดสุดท้ายของปริมาณต่ำสุดของผลผลิตจาก PCR ที่ได้จากการใช้คู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ EPCMV21 และ EPCMV22 และคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ EPYMV 21 และ EPYMV 22 ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 444 คู่เบส และ 991 คู่เบส ที่มีความจำเพาะต่อ CMV และ TYLCV ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ที่ระดับปริมาณต่ำสุดของผลผลิตจาก PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอได้ทั้งสามขนาดเท่ากับ 0.25 μ l (Figure 2 A)

ทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบเชื้อไวรัส โดยวิธีการ duplex PCR กับตัวอย่างพืชเป็นโรคจากแปลงปลูก

ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงในการตรวจสอบต่อเชื้อไวรัสเป้าหมายซึ่งได้แก่ CMV และ TYLCV

โดยวิธีการ duplex PCR จากตัวอย่างใบของมะเขือม่วง แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด ซึ่งไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นที่นอกเหนือจากขนาด 444 คู่เบส และ 991 คู่เบส ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อ CMV และ TYLCV ในตัวอย่างของมะเขือม่วงที่มีการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด (Figure 2B: Lane 1, 2, 13) ในตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ CMV ชนิดเดียว พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอขนาด 444 คู่เบส เพียงแถบเดียว (Figure 2B: Lane 3, 7, 8, 10, 11, 14) และในตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ TYLCV เพียงชนิดเดียว พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอขนาด 991 คู่เบส เพียงแถบเดียว (Figure 2B: Lane 4, 5, 9, 15) ในตัวอย่างของมะเขือม่วงที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้ ไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอขนาด 444 คู่เบส และ 991 คู่เบส มีเพียงแถบดีเอ็นเอขนาด 297 คู่เบส ขนาดเดียวเท่านั้น (Figure 2B: Lane 6, 12)

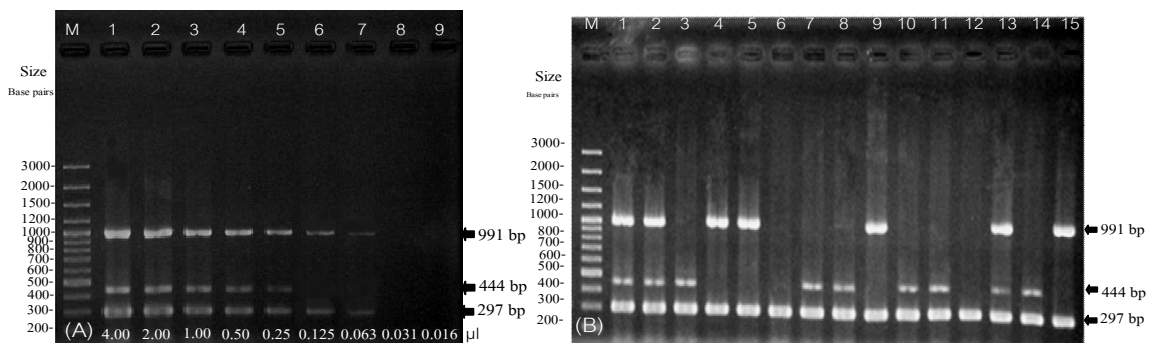


Figure 2 (A) Evaluation of sensitivity in simultaneous detection of CMV and TYLCV from naturally infected eggplant leaf sample of Acc. No. B-15 by duplex PCR using virus specific primers. **(B)** Detection of CMV and TYLCV by duplex PCR from naturally infected eggplant leaf tissues samples.

วิจารณ์

การศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคของมะเขือม่วงโดยวิธีการ duplex PCR เพื่อการตรวจสอบไวรัส CMV และ TYLCV ได้ในปฏิกิริยาเดียว สามารถให้ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดดังกล่าวจากตัวอย่างใบมะเขือม่วงได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) สูง ซึ่งวิธีการตรวจสอบที่ได้พัฒนาขึ้นในการวิจัยนี้มีความไว (sensitivity) สูงในการตรวจสอบ โดยสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้จากปริมาณเนื้อเยื่อใบมะเขือม่วงที่มีการติดเชื้อไวรัสในปริมาณเพียง 625 นาโนกรัม (ระดับ 0.25 μ l ของตัวอย่างสารละลายกรดนิวคลีอิก) ซึ่งเป็นค่าการประเมินที่ได้จากการคำนวณเปรียบเทียบจากปริมาณเนื้อเยื่อใบที่ใช้ในการเตรียมเพื่อแยกกรดนิวคลีอิก โดยการตรวจสอบไวรัส CMV และ TYLCV ในปฏิกิริยาเดียวกันที่ได้จากการพัฒนาเทคนิควิธีการในการวิจัยนี้ใช้เวลาเพียง 5 ชั่วโมงเท่านั้น นับว่าเป็นวิธีการตรวจสอบที่มีความรวดเร็วและให้ความถูกต้องแม่นยำสูงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสหนึ่งชนิดในหนึ่งปฏิกิริยา (uniplex PCR) และการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา สอดคล้องกับรายงานของ Watpade et al., (2013) ซึ่งรายงานว่า duplex PCR

เป็นเทคนิควิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสสองชนิดได้ในปฏิกิริยาเดียวที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในความรวดเร็วและความประหยัด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสหนึ่งชนิดในหนึ่งปฏิกิริยาของการตรวจสอบ Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) และ Apple mosaic virus (ApMV) ในแอปเปิ้ล

เทคนิควิธีการตรวจสอบที่ได้พัฒนาขึ้นในการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสบนพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ มะเขือม่วง มะเขือเทศ พริก และยาสูบ เป็นต้น (ไม่ได้แสดงผล) ซึ่งให้ผลถูกต้องแม่นยำและมีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของไวรัสทั้งสอง ด้วยประสิทธิภาพการตรวจสอบที่มีความไวสูงของเทคนิควิธีดังกล่าว ทำให้เทคนิควิธีการตรวจสอบไวรัสที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจสอบไวรัสที่มีปริมาณต่ำมากได้จากเมล็ดพันธุ์ ต้นกล้า และเนื้อเยื่อพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยง (plant tissue culture) เป็นต้น อีกทั้งมีความรวดเร็วในการตรวจสอบไวรัสทั้งสองชนิดในปฏิกิริยาเดียว ทำให้ประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย จึงเหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการตรวจสอบไวรัสในการผลิตเมล็ดพันธุ์ การตรวจสอบไวรัสในต้นกล้าระดับโรงเรียน การตรวจสอบไวรัสในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนการตรวจสอบไวรัสในระดับแปลงปลูก

สรุป

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า การตรวจสอบ CMV และ TYLCV สาเหตุโรคของมะเขือม่วง โดยวิธีการ duplex PCR ด้วยคู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ EPCMV21 และ EPCMV22 และคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ EPYMV 21 และ EPYMV 22 ที่ได้ออกแบบในการวิจัยนี้ สามารถใช้ตรวจสอบไวรัสสาเหตุโรคทั้งสองชนิดของมะเขือม่วงได้ในปฏิกิริยาเดียวอย่างมีประสิทธิภาพสูงในความเร็ว อยู่ในช่วง 5 ชั่วโมงเท่านั้น และมีความไว (sensitivity) สูงในการตรวจสอบ โดยสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้จากปริมาณเนื้อเยื่อใบมะเขือม่วงที่มีการติดเชื้อไวรัสในปริมาณเพียง 625 นาโนกรัม

เอกสารอ้างอิง

- Hosseinzadeh, H., S. Nasrollanejad and H. Khateri. 2012. First report of Cucumber mosaic virus subgroups I and II on soybean, pea, and eggplant in Iran. *Acta Virol.* 56:145–8.
- Mekuria, G., S.A. Ramesha, E. Albertsb, T. Bertozzia, M. Wirthensohna, G. Collinsa and Margaret Sedgleya. 2003. Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of *Prunus necrotizing spot virus* and *prune dwarf virus* in almond (*Prunus dulcis*). *Journal of Virological Methods* 114:65–69.
- Moriones, E. 2000. TYLCV datasheet. EWSN, U.K
- Petit, R.J., B. Demasure, and S. Dumolin-Lapègue. 1996. CpDNA and plant mtDNA primers. *In* Molecular tools for screening biodiversity: Plants and Animals. A. Karp, P.G. Isaac, and D Ingram eds, Chapman & Hall. Systematic review of the published literature. <http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/cpdna.html>. Accessed 8 January. 2014.
- Watpade, S., R. Baswaraj, K.K. Pramanick, S. Neeraj, H. Anil, and S. Usha. 2013. Simultaneous detection of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus and Apple mosaic virus in crab apples and apple root stocks by duplex RT-PCR. *Sci Hortic-Amsterdam.* 164:88-93.