รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2558

การพัฒนาเทคนิค multiplex RT-PCR เพื่อใช้ในการคัดเลือกต้นพริกไทยปลอดเชื้อไวรัส

Development of multiplex RT-PCR for screening of virus-free pepper (*Piper nigrum* L.)

มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม

สาขาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

ตุลาคม พ.ศ. 2562

รหัสโครงการ 2558...9/2558....

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2558

การพัฒนาเทคนิค multiplex RT-PCR เพื่อใช้ในการคัดเลือกต้นพริกไทยปลอดเชื้อไวรัส

Development of multiplex RT-PCR for screening of virus-free pepper (*Piper nigrum* L.)

มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม

สาขาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัย
ในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก “สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา”

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	(1)
สารบัญภาพ (List of Illustration)	(2)
บทนำ (Introduction)	1
- เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	1
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	6
- วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	7
วัตถุประสงค์ (Objective)	9
วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Method)	10
ผลการวิจัย (Results)	14
อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)	19
สรุปผล (Summary)	20
ผลผลิต (Output)	21
รายงานสรุปการเงิน	22
บรรณานุกรม (Bibliography)	24
ประวัตินักวิจัยและคณะ	27

สารบัญภาพ (List of Illustration)

ภาพที่		หน้า
1	แสดงผลผลิตของต้นพริกไทยปกติ (ซ้าย) และผลผลิตของต้นพริกไทยติดเชื้อไวรัส (ขวา)	8
2	การหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้น DNA และ RNA ต้นแบบ (ก) อุณหภูมิ annealing (ข) และอัตราส่วนคู่ไพรเมอร์ (ค) สำหรับการตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR กำหนด ช่อง M คือ 100 bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) ช่อง P และ C (ก-ค) คือ positive control ของเชื้อ PYMoV และ CMV ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR ตามลำดับ ช่อง dH_2O (ก-ค) คือ negative control ในขณะที่ ช่อง 1-9 (ก) คือ ความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบ ได้แก่ 10 นาโนกรัม 50 นาโนกรัม และ 100 นาโนกรัม ที่ผสมกับ RNA ต้นแบบ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม (ช่อง 1-3) 200 นาโนกรัม (ช่อง 4-6) และ 300 นาโนกรัม (ช่อง 7-9) ตามลำดับ ช่อง 1-8 (ข) คือ การทดสอบอุณหภูมิ annealing ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 40.8, 42.3, 45.4, 50.0, 55.8, 60.6, 63.3 และ 64.8 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยใช้ total DNA ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม และ total RNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ช่อง 1-7 (ค) คือการทดสอบอัตราส่วนคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ได้แก่ 1: 1, 1: 2, 1: 3, 1: 4, 2:1, 3: 1 และ 4:1 ตามลำดับ	17
3	การตรวจสอบเชื้อ PYMoV และเชื้อ CMV subgroup I จากตัวอย่างใบพริกไทยที่แสดงอาการด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ด่างประ ใบมีจุดเหลือง และเสียรูปร่าง จำนวนทั้งสิ้น 9 ตัวอย่าง (ก) ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR ที่พัฒนาได้ (ข) ช่อง M คือ 100 bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) ช่องที่ 1 คือ ตัวอย่างที่มีเชื้อ PYMoV และ CMV (mixed infection) ช่อง 2-10 คือตัวอย่างใบพริกไทย ตัวอย่างที่ 1-9 ตามลำดับ	18

บทนำ (Introduction)

1. เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพริกไทย

พริกไทยมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Piper nigrum* Linn. มีชื่อสามัญ ได้แก่ Pepper, White pepper, Black pepper และ Pepper Corn เป็นต้น

ลำต้นของพริกไทยเป็นไม้เถาเลื้อยเนื้ออ่อนยืนต้น ไม่สามารถยืนอยู่ได้โดยลำพังต้องเกาะยึดติดอยู่กับค้าง โดยใช้รากเล็กๆ ที่เจริญออกมาตามข้อของลำต้นที่เรียกว่า รากตีนตุ๊กแกหรือมือตุ๊กแก หากพริกไทยเจริญอยู่ตามธรรมชาติโดยไม่มีปัญหารบกวนจากการทำลายของโรคและแมลงศัตรูพืชแล้วจะสามารถมีชีวิตยืนนานกว่า 15 ปี ขณะที่ต้นพริกไทยยังมีอายุน้อยอยู่เปลือกลำต้นจะมีสีเขียวและจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลตามอายุที่เพิ่มขึ้น ลำต้นมีข้อและปล้องเห็นได้ชัดเจน บริเวณข้อมักจะมีลักษณะโป่งออก ทำให้มีขนาดใหญ่กว่าส่วนของลำต้น

ในส่วนของใบพริกไทยเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับตามข้อและตามกิ่งแขนง ใบมีรูปร่างแบบรูปไข่โคนใบใหญ่ ฐานใบมีหลายแบบ เช่น กลม มน หรือรูปหยัก ปลายใบแหลม ใบกว้างประมาณ 6-10 เซนติเมตร ยาว 7-14 เซนติเมตร ลักษณะคล้ายใบพลู ผิวใบเรียบ ผิวใบด้านบนเป็นมัน ด้านใต้ใบมีสีจางกว่าบนใบ บางพันธุ์ใบมีลักษณะหยักเป็นคลื่น ขนาดและลักษณะของใบจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์

ดอกพริกไทยจะออกเป็นช่อในแนวยาวตรงข้ามกับใบในส่วนของกิ่งแขนง ไม่มีก้านดอก ช่อดอกยาวประมาณ 7-14 เซนติเมตร ช่อดอกแต่ละช่อประกอบด้วยดอกย่อยประมาณ 70-85 ดอก ช่อดอกอ่อนมีสีเหลืองอมเขียว เมื่อแก่จะมีสีเขียวและปลายช่อห้อยลง ดอกจะบานหมดทั้งช่อใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน ดอกพริกไทยมีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียที่เกิดแยกกัน เป็นดอกไม่สมบูรณ์เพศหรืออาจเป็นดอกสมบูรณ์เพศ แต่ส่วนใหญ่เป็นดอกไม่สมบูรณ์เพศ ปรกติพริกไทยเป็นพืชที่มีการผสมตัวเอง

ผลของพริกไทยมีลักษณะค่อนข้างกลม เรียงตัวกันเป็นพวงอัดแน่นอยู่กับแกนของช่อ มีรสเผ็ดร้อน ผลอ่อนมีสีเขียวและสีจะเข้มขึ้นตามอายุของผล ผลอ่อนที่อายุไม่เกินหนึ่งเดือน เมื่อบีบจะแตกออกภายในผลจะมีลักษณะขุ่นข้นคล้ายนมสด ต่อมาเมื่อผลมีอายุได้ประมาณ 5 เดือน ผิวของผลจะมีลักษณะเป็นมันเงาและเปลี่ยนเป็นสีเขียวปนเหลือง ผลแก่เมื่อสุกเต็มที่จะมีสีส้มหรือสีแดง เมื่อผลแห้งจะเป็นสีดำ ผลจะสุกไม่พร้อมกันทั้งช่อ เมื่อผลสุกจะร่วงหล่นไป เมื่อนำผลสุกมาขยี้เปลือกจะหลุดออกง่าย ภายในผลหนึ่ง ๆ จะมี 1 เมล็ด ผลที่นำมาใช้มีสองชนิด คือ พริกไทยดำ และพริกไทยล่อน พริกไทยดำทำได้โดยเก็บผลที่โตเต็มที่มีสีเขียวแก่มาตากจนแห้ง ซึ่งจะได้พริกไทยสีดำเหี่ยว ส่วนพริกไทยล่อนคือการเก็บผลพริกไทยที่เริ่มสุกมาแช่น้ำแล้วนำมานวดเพื่อลอกเปลือกออก แล้วตากแดด จะได้ผลพริกไทยมีสีขาวเป็นเงาเมล็ด

โดยทั่วไปเมล็ดจะมีสีขาวนวล มีลักษณะแข็ง รูปร่างค่อนข้างกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ภายมนเมล็ดมีต้นอ่อนขนาดเล็กอยู่ เมล็ดมีกลิ่นตัว มีกลิ่นฉุนและมีรสเผ็ด เมล็ดจะสุกไม่เสมอกัน

รากของพริกไทยถ้ายึดตามหน้าที่ของรากจำแนกออกได้เป็น 2 ชนิดคือ รากหาอาหารและรากตีนตุ๊กแก ซึ่งรากหาอาหารเป็นรากที่ทำหน้าที่หารแร่ธาตุอาหารและน้ำจากพื้นดิน เพื่อส่งผ่านลำต้นไปยังใบปรุงอาหารหล่อเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ซึ่งหากปลูกด้วยการใช้เมล็ดจะมีรากแก้ว แต่ปัจจุบันมักจะปลูกจากการปักชำกิ่งจึงมักจะไม่มีรากแก้ว พริกไทยจะมีรากขนาดใหญ่ประมาณ 10-20 ราก และแต่ละรากจะมีความยาวประมาณ 3-4 เมตร มีรากแขนงเจริญออกไปจากรากใหญ่มากมาย กลุ่มของรากเหล่านี้จะกระจายอยู่บริเวณผิวดิน ส่วนรากตีนตุ๊กแกจะทำหน้าที่เป็นรากค้ำจุน ซึ่งจะช่วยยึดเกาะ ทำให้พริกไทยเลื้อยสูงได้ รากตีนตุ๊กแกจะเจริญออกมาจากข้อในระยะเดียวกับการเจริญของยอดอ่อน รากประเภทนี้สามารถเกาะติดกับค้างในระยะเริ่มงอกออกมาใหม่ ๆ เท่านั้น เมื่อรากแก่จนเป็นสีน้ำตาลมักจะไม่เกาะติดกับค้างอีกแล้วหรือติดได้แต่ติดยากขึ้น (รุ่งรัตน์, 2535)

พันธุ์พริกไทยที่นิยมปลูกในประเทศไทย

ในปัจจุบันพบจำนวนทั้งสิ้น 6 พันธุ์ ได้แก่ 1) พริกไทยพันธุ์ใบหนา ลักษณะโคนใบแคบ ปลายใบแหลม ใบมีลักษณะหนา ขอบใบเรียบ ใบสีเขียวเข้มเกือบเป็นมันช่วงข้อยาว กิ่งยาวและค่อนข้างสั้น ช่อดอกยาว เมล็ดห่าง ทรงพุ่มโตและแน่นทึบ ให้ผลผลิตต่ำ 2) พริกไทยพันธุ์โบราณหรือพันธุ์ควายขวิด มีลักษณะเล็กกว่าพันธุ์ใบหนา ซึ่งคลื่นริมใบห่าง กิ่งสั้นและงอไม่เป็นระเบียบ ช่วงข้อค่อนข้างสั้น ช่อดอกยาว เมล็ดห่างและโต ทรงพุ่มใหญ่ปานกลาง มีลักษณะโปร่ง ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ใบหนา 3) พริกไทยพันธุ์บางแก้ว พันธุ์นี้มีใบขนาดเล็กกว่าพันธุ์ใบหนา ขอบใบเรียบ โคนใบแหลม มีเขียวเข้ม ช่วงข้อยาว เมล็ดมีขนาดใหญ่ค่อนข้างถี่ ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์โบราณ ทรงพุ่มค่อนข้างทึบ 4) พริกไทยพันธุ์ปรางถี่ธรรมดา มีลักษณะใบเล็กบางริมใบเป็นคลื่น โคนใบโต ปลายใบแหลม ใบค่อนข้างเหลือง ช่วงข้อสั้น กิ่งสั้นงอหรือทอดลง ช่อดอกสั้น เมล็ดถี่ ความเผ็ดสูง ทรงพุ่มไม่โตและไม่ทึบ ให้ผลผลิตสูง 5) พริกไทยพันธุ์ปรางถี่ใบหยิก ใบหยิกและเล็กกว่าพันธุ์ปรางถี่ธรรมดา ใบค่อนข้างเหลือง ทรงพุ่มใหญ่ กิ่งทอดลง ให้ผลผลิตค่อนข้างสูง แต่ผลผลิตน้อยกว่าพันธุ์ปรางถี่ธรรมดา และ 6) พริกไทยพันธุ์จากประเทศสหพันธรัฐมาเลเซียหรือพันธุ์คุชชิ่ง เป็นพันธุ์ที่มีทรงพุ่มหนาพอสมควร มีลักษณะคล้ายพันธุ์บางแก้วแต่ใบมีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อยและริมใบไม่เป็ นคลื่น ช่อดอกยาว เมล็ดแน่น เมล็ดมีขนาดเล็กกว่าพันธุ์จันทบุรีเล็กน้อย แต่พันธุ์นี้มีการเจริญเติบโตดี (รุ่งรัตน์, 2535)

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของพริกไทย

พริกไทยจะมีการเจริญเติบโตดีในพื้นที่ดินร่วนซุย มีอินทรีย์วัตถุสูง น้ำไม่ขัง มีการระบายน้ำดี ระดับน้ำใต้ดินต่ำและพื้นที่อยู่ใกล้ ๆ แหล่งน้ำ ไม่ชอบสภาพพื้นที่ที่ลาดเทมาก ๆ ฤดูปลูกควรอยู่ในช่วงปลายฤดูฝนหรือต้นหนาว เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหากิ่งพันธุ์เน่าเสียหายในช่วงฤดูฝนชุก พริกไทยชอบขึ้นในสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น อุณหภูมิระหว่าง 10-30 องศาเซลเซียส มีความต้องการน้ำฝนปีละอย่างน้อย 50-80 นิ้ว สามารถปลูกได้ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนกระทั่งความสูงประมาณ 3,500 ฟุต (รุ่งรัตน์, 2535)

วิธีการปลูกพริกไทย

พริกไทยสามารถขยายพันธุ์ได้โดยการเพาะเมล็ดและวิธีการตัดลำต้นส่วนที่อยู่ใกล้กับผิวดิน ซึ่งเรียกว่าไหล ปลูกหรือใช้ยอดปักชำ ซึ่งวิธีการปักชำยอดพริกไทยเป็นวิธีที่นิยมที่สุด โดยการใช้ยอดพริกไทยที่มีอายุประมาณ 1 ปี นำมาตัดเป็นท่อน ๆ ยาวประมาณ 1 ฟุต หรือมีข้อประมาณ 5-7 ข้อ ทำการเด็ดใบบางส่วนออกและจะต้องนำไปปักชำทันทีในกระบะปักชำซึ่งเตรียมไว้ โดยปักให้ท่อนพันธุ์เอียงประมาณ 45 องศา ห่างกันประมาณ 10 เซนติเมตร ให้ข้ออยู่ใต้ระดับผิวดินประมาณ 3-4 ข้อ กะบะปักชำควรอยู่ในที่ร่มรำไร เมื่อท่อนพันธุ์แตกยอดอ่อนขึ้นมาก็ย้ายยอดพันธุ์จากกะบะลงถุงพลาสติกที่ใส่ดินเตรียมไว้แล้ว นำไปตั้งไว้ในที่ร่มรำไร รดน้ำให้ชุ่มเสมอ หลังจากนั้นประมาณ 1 เดือน ยอดพริกไทยซึ่งอยู่ในถุงชำจะแข็งแรงดี จึงสามารถนำไปปลูกต่อไปได้ (รุ่งรัตน์, 2535)

การเก็บเกี่ยวพริกไทย

พริกไทยที่ปลูกอายุประมาณ 3 ปี จะเริ่มออกดอกติดผลและจะแก่พร้อมที่จะเก็บเกี่ยวได้ประมาณ 6-7 เดือนต่อมา การเก็บเกี่ยวพริกไทยจะสังเกตจากสีของเมล็ดกล่าวคือ เมล็ดมีสีเหลืองหรือสีแดงรวงละ 3-4 เมล็ด วิธีการเก็บให้เก็บทั้งรวง แต่พริกไทยจะแก่ไม่พร้อมกัน ทำให้การเก็บต้องทยอยเก็บเป็นงวด ๆ สำหรับการเก็บเกี่ยวเพื่อทำพริกไทยขาวหรือพริกไทยล่อนนั้น พริกไทยที่ใช้จะต้องเป็นพริกไทยที่แก่จัดและผลเริ่มสุกเป็นสีแดงที่โคนช่อประมาณ 2-3 ผล ในส่วนของการทำพริกไทยดำ จะใช้พริกไทยที่ผลยังมีสีเขียวอยู่ แต่เมล็ดภายในแก่จัดซึ่งสังเกตได้โดยการใช้เล็บจิกดู ถ้ารู้สึกว่าเมล็ดแข็งและจิกไม่ลงแสดงว่าเมล็ดแก่จัดสามารถเก็บได้แล้ว (รุ่งรัตน์, 2535)

แหล่งปลูกพริกไทยและความสำคัญทางเศรษฐกิจ

แหล่งปลูกพริกไทยที่ใหญ่ที่สุดของประเทศไทยส่วนใหญ่จะอยู่ในแถบภาคตะวันออก โดยที่อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี เป็นแหล่งปลูกพริกไทยที่สำคัญของประเทศ ซึ่งมีพื้นที่ปลูกมากถึงร้อยละ 98 ของพื้นที่ปลูก ทั่วทั้งประเทศ รองมาได้แก่ จังหวัด ระยอง และ

ตราด ตามลำดับ ในส่วนของภาคใต้พบการปลูกพริกไทยได้ในบางพื้นที่ของจังหวัด กระบี่ ตรัง นราธิวาส และ พังงา เป็นต้น (วัฒนา, 2531)

ในปัจจุบันพริกไทยจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทย สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศจากการส่งออกพริกไทยได้มากถึงปีละประมาณ 30-60 ล้านบาท เกษตรกรผู้ปลูกพริกไทยสามารถขายพริกไทยให้กับผู้บริโภคภายในประเทศได้ราคาสูงถึง กิโลกรัมละ 100-200 บาท จากมูลค่าการส่งออกรวมถึงการจำหน่ายให้กับผู้บริโภคภายในประเทศ ดูเหมือนแนวโน้มการผลิตพริกไทยจะเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรในทางตรงกันข้ามจากผลการสำรวจพื้นที่เพาะปลูกพริกไทยในประเทศไทยมีปริมาณลดลง อย่างต่อเนื่องจนน่าวิตกโดยเฉพาะในจังหวัดจันทบุรี จากผลการสำรวจของ สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ในปี 2547 จังหวัดจันทบุรีมีพื้นที่เพาะปลูกพริกไทยประมาณ 19,829 ไร่ ให้ผลผลิต 14,204 ตัน แต่จากผลการสำรวจในปัจจุบัน ปี พ.ศ. 2557 จังหวัดจันทบุรีเหลือพื้นที่เพาะปลูกพริกไทยเพียง 13,349 ไร่ และให้ผลผลิตเพียง 6,364 ตัน ผลผลิตลดลงจากในอดีตประมาณ 50% สาเหตุสำคัญที่ทำให้พื้นที่เพาะปลูกพริกไทยในจังหวัดจันทบุรีลดลงเป็นผลสืบเนื่องมากจากการเข้าทำลายของโรคพืชโดยเฉพาะเชื้อไวรัส ที่ทำให้ผลผลิตพริกไทยลดลง ต้นทุนการผลิตพริกไทยเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากเกษตรกรจำเป็นต้องใช้สารเคมีกำจัดโรคพืชเพิ่มขึ้น จากปัจจัยเหล่านี้เกษตรกรจึงเปลี่ยนไปเพาะปลูกพืชชนิดอื่นทดแทนการปลูกพริกไทย ทั้งนี้ปัญหาดังกล่าวหากไม่ได้รับการแก้ไข ในอนาคตประเทศไทยอาจจำเป็นต้องนำเข้าพริกไทยจากต่างประเทศเพื่อมาบริโภค รวมถึงการทำสวนพริกไทยในจังหวัดจันทบุรีก็จะกลายเป็นเพียงอดีตไปในที่สุด

เชื้อไวรัสสาเหตุโรคของพริกไทย

เชื้อไวรัสที่พบแพร่ระบาดและทำความเสียหายให้กับพริกไทยตามแหล่งปลูกพริกไทยทั่วโลก โดยเฉพาะในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Bharat, 1952; Holliday, 1959; Prakasam *et al*., 1990) มีอยู่ 2 ชนิด ด้วยกัน คือ เชื้อ *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) และ เชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Bhat and Siju, 2007, Ali and Kobayashi, 2010) เชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้แตกต่างกันโดยที่เชื้อ PYMoV มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด DNA สายคู่ (dsDNA) จัดอยู่ในจีนัส *Badnavirus* วงศ์ *Caulimoviridae* ในขณะที่เชื้อ CMV มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด RNA สายเดี่ยว(ssRNA) จัดอยู่ในจีนัส *Cucumovirus* วงศ์ *Bromoviridae* (Bhat and Siju, 2007) เชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้เมื่อเข้าทำลายพริกไทยจะทำให้ใบพริกไทยมีรูปร่างผิดไปจากปรกติ (leaf distortion) ลดรูป (reduction in size) ใบพริกไทยแสดงอาการด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน (mosaic หรือ mottle) รวมถึงทำให้ต้นพริกไทยเกิดอาการแคระแกร็น โดยอาการทั้งหมดเหล่านี้ส่งผลกระทบโดยตรงต่อปริมาณการผลิตพริกไทยในแหล่งปลูกต่างๆ ทั่วโลก (Bhat *et al*., 2005; Silva *et al*., 2002)

การแพร่ระบาดของเชื้อ *Piper yellow mottle virus* และ เชื้อ *Cucumber mosaic virus*

ในประเทศไทยมีรายงานพบว่ามีเฉพาะเชื้อ PYMoV เท่านั้นที่ก่อโรคในพริกไทย ในขณะที่ประเทศที่เป็นแหล่งปลูกพริกไทย ได้แก่ ประเทศบราซิล อินเดีย ศรีลังกา มาเลเซีย อินเดีย และเวียดนาม มีรายงานพบเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ ร่วมกัน (Lockhart *et al*., 1997; Bhat and Siju, 2007) การแพร่ระบาดของเชื้อ PYMoV และ เชื้อ CMV ในแหล่งปลูกพริกไทยเป็นได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด นี้ สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากต้นพริกไทยเป็นโรคไปยังต้นพริกไทยปกติได้โดยผ่านทางเมล็ด (seed transmission) (Ali and Kobayashi, 2010; Hareesh and Bhat, 2010) และที่สำคัญเชื้อไวรัสสามารถติดไปกับท่อนพันธุ์พริกไทยเป็นโรค ซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่ขยายพันธุ์พริกไทยด้วยวิธีนี้ (Silva *et al*., 2002)

การควบคุมโรคในพริกไทยที่เกิดจากเชื้อ *Piper yellow mottle virus* และ เชื้อ *Cucumber mosaic virus*

การใช้ท่อนพันธุ์จากต้นพริกไทยที่ปราศจากเชื้อไวรัสปลูกลงในแปลงปลูก จัดเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ (Silva *et al*., 2002; Bhat and Siju, 2007) อย่างไรก็ตามการคัดเลือกต้นพริกไทยที่ติดเชื้อไวรัสโดยการตรวจดูด้วยตาเปล่าเพื่อสังเกตจากอาการว่าติดเชื้อไวรัสหรือไม่ทำได้ยาก นอกจากนี้มีบางครั้งที่พริกไทยติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ (latent infection) ซึ่งอาจทำให้การคัดเลือกต้นพริกไทยที่ไม่ติดเชื้อไวรัสผิดพลาดได้ ดังนั้นนักวิจัยในประเทศต่างๆ โดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จึงได้พยายามพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV จากใบหรือต้นพริกไทย ที่มีความไว (sensitivity) และให้ผลการตรวจสอบที่แม่นยำ เพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกต้นพริกไทยปลอดโรค และประสบความสำเร็จ ดังนี้

Bhat และ Siju (2007) ได้รายงานความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุล ได้แก่ multiplex RT-PCR ที่สามารถตรวจสอบและจำแนกเชื้อ PYMoV และ CMV ได้ในคราวเดียวกัน จากตัวอย่างพริกไทยติดเชื้อไวรัส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PYMoV และ CMV ตามลำดับ

Bhat และคณะ (2013) ได้รายงานความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV ที่ก่อโรคในพริกไทยอย่างได้ผล ซึ่งเทคนิคดังกล่าวที่พัฒนาได้มีความไว (sensitivity) สูงมากกว่าการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค PCR มากถึง 100 เท่า

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

พริกไทยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ในแต่ละปีสามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศจากการส่งออกพริกไทยได้มากถึงปีละประมาณ 30-60 ล้านบาท โดยแหล่งที่มีการปลูกพริกไทยมากที่สุดคือ อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ซึ่งมีพื้นที่ปลูกมากถึงร้อยละ 98 ของพื้นที่ปลูกทั่วทั้งประเทศ รองมาได้แก่ จังหวัด ระยอง และ ตราด ตามลำดับ ในปัจจุบันแม้ว่าราคาพริกไทยอ่อนและพริกไทยแห้งจะมีราคาสูงมากถึงกิโลกรัมละ 100-200 บาท อย่างไรก็ตามพื้นที่เพาะปลูกพริกไทยในจังหวัดจันทบุรีกลับลดลงอย่างต่อเนื่องจนน่าวิตก โดยจากผลการสำรวจของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ในปี 2547 จังหวัดจันทบุรีมีพื้นที่เพาะปลูกพริกไทยประมาณ 19,829 ไร่ ให้ผลผลิต 14,204 ตัน แต่จากผลการสำรวจในปัจจุบันปี พ.ศ. 2557 จังหวัดจันทบุรีเหลือพื้นที่เพาะปลูกพริกไทยเพียง 13,349 ไร่ และให้ผลผลิตเพียง 6,364 ตัน ผลผลิตลดลงจากในอดีตประมาณ 50% ซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อการส่งออกพริกไทยที่มีปริมาณไม่เพียงพอ รวมถึงการขาดแคลนพริกไทยที่จะใช้บริโภคภายในประเทศอีกด้วย สาเหตุสำคัญที่ทำให้พื้นที่เพาะปลูกพริกไทยในจังหวัดจันทบุรีลดลงเป็นผลสืบเนื่องมากจากการเข้าทำลายของโรคพืช ที่ทำให้ต้นพริกไทยได้รับความเสียหายโดยตรง ผลผลิตพริกไทยลดลง ในทางอ้อมการเข้าทำลายของโรคพืชส่งผลให้ต้นทุนการผลิตพริกไทยเพิ่มสูงขึ้นจากการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืช ด้วยปัจจัยเหล่านี้เกษตรกรจึงเปลี่ยนไปเพาะปลูกพืชชนิดอื่นทดแทนการปลูกพริกไทย ปัญหาดังกล่าวหากไม่รีบแก้ไข ในอนาคตประเทศไทยอาจจำเป็นต้องนำเข้าพริกไทยจากต่างประเทศเพื่อมาบริโภคเพิ่มมากขึ้น รวมถึงการทำสวนพริกไทยในจังหวัดจันทบุรีก็จะกลายเป็นเพียงอดีตไปในที่สุด

จากผลการสำรวจโรคของพริกไทยในแปลงเกษตรกรในอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี พบว่าต้นพริกไทยเกือบทั้งหมดในพื้นที่สำรวจแสดงอาการใบด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน (mosaic) ใบพริกไทยเสียรูปร่าง (leaf distortion) และลดขนาด รวมถึงต้นพริกไทยแสดงอาการแคระแกร็นให้เห็นอย่างชัดเจน ซึ่งอาการทั้งหมดดังกล่าวเป็นลักษณะอาการของโรคพืชซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส โดยเชื้อไวรัสที่มีรายงานพบแพร่ระบาดและทำความเสียหายให้กับพริกไทยตามแหล่งปลูกต่างๆ ทั่วโลก มีอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) และ เชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Bhat and Siju, 2007) ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้จะพบร่วมกันในต้นพริกไทยเป็นโรค (Bhat *et al*., 2013) อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้มีรูปร่างของอนุภาคและสารพันธุกรรมที่แตกต่างกัน โดยเชื้อ PYMoV มีอนุภาครูปร่างคล้ายกระสวย (bacilliform) และมีสารพันธุกรรมเป็นชนิด DNA สายคู่ (dsDNA) ในขณะที่เชื้อ CMV มีอนุภาครูปร่างเป็นทรงกลม (isometric) และมีสารพันธุกรรมเป็นชนิด RNA สายเดี่ยว (ssRNA) ตามลำดับ (Bhat and Siju, 2007; Bhat *et al*., 2013) ในปัจจุบันพบเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ แพร่กระจายอยู่ในประเทศที่เป็นแหล่งปลูกพริกไทย ได้แก่ ประเทศบราซิล อินเดีย ศรีลังกา มาเลเซีย อินเดีย ฟิลิปปินส์ เวียดนาม รวมถึงประเทศไทย (Lockhart *et al*., 1997; Bhat and Siju, 2007; Bhat *et al*.,

2013) การแพร่กระจายของเชื้อ PYMoV และ CMV ในแหล่งปลูกพริกไทยเป็นไปอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเกษตรกรใช้ท่อนพันธุ์ของต้นพริกไทยเป็นโรคไปปลูก ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการควบคุมการแพร่กระจายของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ คือ การให้เกษตรกรใช้ท่อนพันธุ์พริกไทยที่ปราศจากโรคไปปลูกในแปลง (Silva *et al*., 2002; Bhat *et al*., 2013)

การคัดเลือกต้นพริกไทยเพื่อให้ได้คุณสมบัติตามที่ต้องการดังกล่าวข้างต้นก่อนลงปลูกจำเป็นจะต้องใช้วิธีการตรวจสอบที่แม่นยำ รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ วิธีการตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV ที่นิยมในปัจจุบันสามารถทำได้โดยการตรวจสอบในระดับชีวโมเลกุล โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) (Bhat *et al*., 2012), Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Ali *et al*., 2012) และ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Bhat *et al*., 2013) ตามลำดับ แม้ว่าเทคนิคดังกล่าวจะมีความไว (sensitivity) สูง อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบค่อนข้างนาน รวมถึงค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างในแต่ละครั้งค่อนข้างสูง เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวที่เกิดขึ้นได้มีความพยายามพัฒนาเทคนิคที่เรียกว่า multiplex RT-PCR (Bhat and Siju, 2007; Özdemir, 2009; Hu *et al*., 2011) ที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่มีสารพันธุกรรมแตกต่างกันได้หลายชนิด ในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยใส่คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อโรคแต่ละชนิดลงในปฏิกิริยา เทคนิคดังกล่าวมีความไวสูง และเสียค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างในแต่ละครั้งน้อยกว่าการตรวจสอบด้วยทางชีวโมเลกุลที่ใช้กันทั่วไป (Elfath *et al*., 2000) จากข้อดีที่กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้นำเทคนิค multiplex RT-PCR มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ เชื้อ CMV เพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกต้นพริกไทยปลอดเชื้อไวรัส แต่ทั้งนี้เทคนิค multiplex RT-PCR มีข้อจำกัดในเรื่องขององค์ประกอบของปฏิกิริยาที่ต้องมีความเหมาะสม (Özdemir, 2009) จึงจะสามารถเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นเพื่อให้การตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV ในต้นพริกไทยเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการ multiplex RT-PCR เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อไวรัสเป้าหมาย

3. วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

ในแหล่งปลูกพริกไทยส่งออกทั่วโลก เกษตรกรผู้ปลูกมักประสบปัญหาจากการเข้าทำลายของโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส ได้แก่ *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) และ เชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Bhat and Siju, 2007) ซึ่งพริกไทยที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้จะแสดงอาการใบด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน (mosaic) ใบพริกไทยเสียรูปร่าง (leaf distortion) และลดขนาดลง รวมถึงต้นพริกไทยแสดงอาการแคระแกร็น อาการทั้งหมดนี้ส่งผลกระทบโดยตรงต่อผลผลิตพริกไทย (ภาพที่ 1) โดยความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของ

เชื้อไวรัสและสภาพแวดล้อมในขณะนั้น ซึ่งเกษตรกรอาจยังคงเก็บผลผลิตได้เพียงบางส่วนหรือเก็บผลผลิตไม่ได้เลย

แม้ว่าการควบคุมโรคของพริกไทยที่เกิดจากเชื้อไวรัสจะสามารถทำได้โดยการใช้ท่อนพันธุ์พริกไทยที่ปราศจากโรค อย่างไรก็ตามการตรวจดูต้นพริกไทยที่ไม่เป็นโรคจากลักษณะอาการที่เกิดขึ้นกับใบและลำต้นเพื่อคัดเลือกต้นพริกไทยปลอดโรคทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากในบางครั้งอาการที่พบในสภาพธรรมชาติไม่ชัดเจน (Silva *et al*., 2002)

ทั้งนี้ในต่างประเทศได้มีรายงานความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิค multiplex RT-PCR เพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV ในพริกไทยเป็นโรคได้ในคราวเดียวกันโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสแต่ละชนิด (Bhat and Siju, 2007) ดังนั้นการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการคัดเลือกพริกไทยปลอดเชื้อไวรัสในประเทศไทย จึงน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพริกไทยในจังหวัดจันทบุรีอย่างได้ผลได้

ภาพที่ 1 แสดงผลผลิตของต้นพริกไทยปกติ (ซ้าย) และผลผลิตของต้นพริกไทยติดเชื้อไวรัส (ขวา)

วัตถุประสงค์ (Objective)

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค multiplex RT-PCR เพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกพริกไทยปลอดเชื้อไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

1. แหล่งของเชื้อ PYMoV และ CMV

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 sub-group I (CMV ไอโซเลท 30RS) ซึ่งใช้เป็น positive control ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยเลี้ยงเชื้อไวรัสไว้ในต้นลำโพง (*Datura stramonium* L.)

2. คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex RT-PCR

Forward primer และ reverse primer สำหรับใช้เพิ่มปริมาณเชื้อ PYMoV ใช้ตามการรายงานของ Bhat and Siju (2007) ซึ่งออกแบบมาจากยีน ในส่วน Open reading frame I (ORFI) ของเชื้อ PYMoV (GenBank accession no. DQ83 6226) 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 ใช้ไพรเมอร์จำนวน 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 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'-CGACTTAATAAGACGTTAGCAGC-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

3. 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

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR

4.1 การหาความเข้มข้นของ DNA และ RNA ที่เหมาะสม

หาความเข้มข้นของ total DNA และ total RNA ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ด้วยเทคนิค multiplex 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 ลงในหลอดปฏิกิริยา ปริมาตรหลอดละ 25 ไมโครลิตร คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PYMoV (PYMoV-F และ PYMoV-R) และ CMV subgroup I (CMV-F และ CMV-R; ; CMV I-Fและ CMVI-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^{TM}) 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 multiplex RT-PCR

4.2 การหาอุณหภูมิของ annealing temperature ที่เหมาะสม

หาอุณหภูมิในส่วนของ annealing temperature ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณ total DNA ของเชื้อ PYMoV และ total RNA ของเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR โดยใช้ความเข้มข้นของ total DNA และ total RNA ที่ได้จากผลการทดลองในเบื้องต้น โดยเตรียมปฏิกิริยาทั้งสิ้น 8 หลอด หลอดละปริมาตร 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 multiplex RT-PCR

4.3 การหาอัตราส่วนคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

หาอัตราส่วนคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex 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 ตรวจสอบอัตราส่วนของคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม จากความเข้มของแถบ DNA ของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ที่ปรากฏบน 2% agarose gel electrophoresis

5. การตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV ในพริกไทยด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR

ทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค multiplex RT-PCR ด้วยการตรวจสอบเชื้อไวรัส PYMoV และ CMV subgroup I จากตัวอย่างใบพริกไทยที่เก็บมาจากต้นพริกไทยที่แสดงอาการคล้ายติดเชื้อไวรัส ได้แก่ ใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบด่างประ ใบมีจุดสีเหลือง ใบเสียรูปร่าง จำนวนทั้งสิ้น 9 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกพริกไทย ในอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี เปรียบเทียบกับการตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV จากตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR ตามลำดับ

ผลการวิจัย (Results)

1. แหล่งของเชื้อ PYMoV และ CMV

การคัดเลือกตัวอย่างต้นพริกไทยที่แสดงอาการติดเชื้อ *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) เพียงชนิดเดียวสำหรับใช้เป็น positive control ในการศึกษาครั้งนี้ จำนวนทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค PCR และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PYMoV และ RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV subgroup I ภายหลังทำการตรวจสอบขนาดของ DNA ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis แล้ว พบว่าทุกตัวอย่างติดเชื้อ PYMoV เพียงชนิดเดียว โดยให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส ยืนยันแถบ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส ที่เพิ่มปริมาณได้ว่าเป็นเชื้อ PYMoV ด้วยการส่ง DNA ที่เพิ่มปริมาณได้จากใบพริกไทยที่เก็บได้จากต้นพริกไทยตัวอย่างที่ 4 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณได้ 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) แม้ว่าได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดี่ยวมาใช้เป็น positive control จากกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งเก็บรักษาเชื้อไวรัสไว้ในต้นลำโพง (*Datura stramonium* L.) มาใช้ในการทดลอง อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบเชื้อ CMV อีกครั้ง ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV subgroup I ตามการรายงานของ Yu *et al*. (2005) ผลที่ได้พบว่าตัวอย่างดังกล่าวยังคงให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อ CMV subgroup I โดยจะปรากฏแถบ DNA ขนาดประมาณ 500 คู่เบส

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR

2.1 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 ผลที่ได้พบว่าทั้ง 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

อย่างไรก็ตามในปฏิกิริยาชุดที่ 2 ซึ่งใช้คู่ไพรเมอร์ PYMoV (PYMoV-F และ PYMoV-R) และ CMV (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) (ภาพที่ 2ก) เช่นเดียวกับ positive control ที่ใช้คือ ตัวอย่างเชื้อ PY-MoV ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PYMoV-F และ PYMoV-R และเชื้อ CMV ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CMV I-F และ CMV I-R เมื่อพิจารณาความเข้มของแถบ DNA ของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ที่ได้ในแต่ละปฏิกิริยาของชุดที่ 2 พบว่าหากใช้ total DNA ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 นาโนกรัม และ total RNA ความเข้มข้น 100 และ 200 นาโนกรัม ตามลำดับ ให้แถบ DNA ของเชื้อ PYMoV และ CMV ที่เข้มและชัดเจน มากกว่าใช้ total DNA ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 นาโนกรัม และ total RNA ความเข้มข้น 300 นาโนกรัม (ภาพที่ 2ก) โดยความเข้มข้นต่ำสุดของ total DNA และ total RNA ที่สามารถใช้ในปฏิกิริยา multiplex RT-PCR ได้คือ 10 นาโนกรัม และ 100 นาโนกรัม ตามลำดับ ซึ่งในการศึกษานี้เลือกใช้ความเข้มข้นของ total DNA และ RNA ดังกล่าว ไปใช้ทดสอบหา annealing temperature ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา multiplex RT-PCR ขั้นตอนต่อไป

2.2 การหาอุณหภูมิของ annealing temperature ที่เหมาะสม

ผลการตรวจสอบขนาด DNA ของเชื้อ PYMoV และ CMV 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 (ภาพที่ 2ข) โดยการใช้ annealing temperature ที่ 55.8 องศาเซลเซียส ให้แถบ DNA ของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด เข้มและชัดเจนกว่าการใช้ annealing temperature อื่นๆ

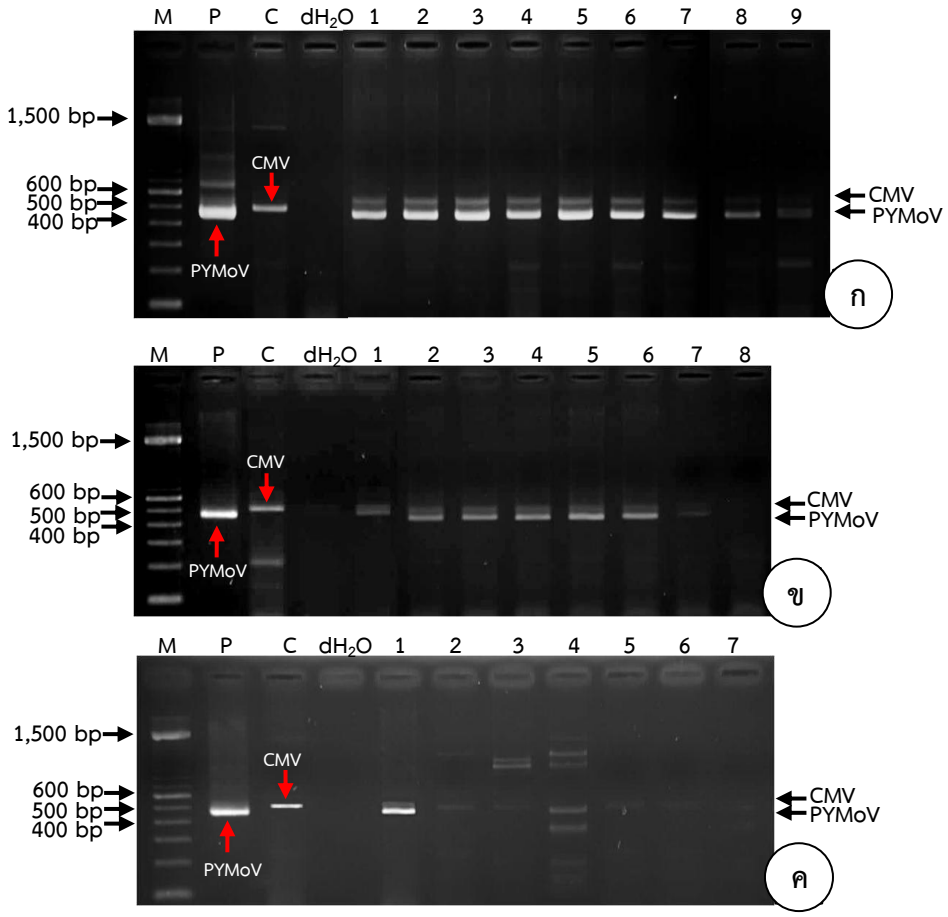
2.3 การหาอัตราส่วนคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

หาอัตราส่วนคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex 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 PY-MoV และ CMV ที่ขนาดประมาณ 450 คู่เบส และ 500 คู่เบส ด้วย 2% agarose gel electrophoresis พบว่าคู่ไพรเมอร์อัตราส่วนที่เหมาะสมและสามารถเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ได้

คือ 1:1 ในขณะที่คู่ไพรเมอร์อัตราส่วนอื่นๆ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ (ภาพที่ 2ค)

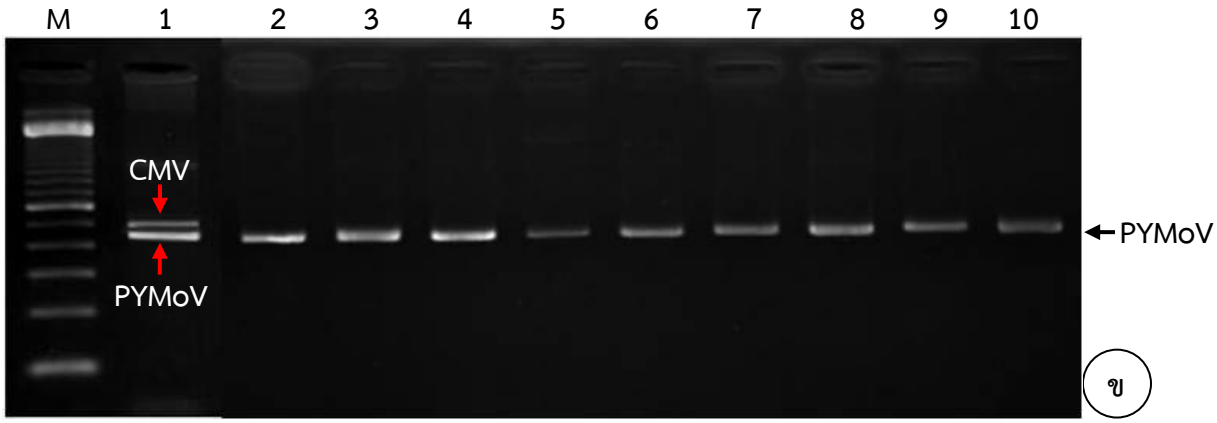
3. การตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV ในพริกไทยด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR

ผลการทดสอบประสิทธิภาพเทคนิค multiplex RT-PCR ด้วยการตรวจสอบเชื้อไวรัส PYMoV และ CMV subgroup I จากตัวอย่างใบพริกไทยที่เก็บมาจากต้นพริกไทยที่แสดงอาการคล้ายติดเชื้อไวรัส (ภาพที่ 3ก) จำนวน 9 ตัวอย่าง ในแปลงปลูกพริกไทย อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี พบว่าทุกตัวอย่างให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส เพียงแถบเดียว (ภาพที่ 3ข)



ภาพที่ 2 การหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้น DNA และ RNA ต้นแบบ (ก) อุณหภูมิ annealing (ข) และอัตราส่วนคู่ไพรเมอร์ (ค) สำหรับการตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR กำหนด ช่อง M คือ 100 bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) ช่อง P และ C (ก-ค) คือ positive control ของเชื้อ PYMoV และ CMV ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR ตามลำดับ ช่อง dH_2O (ก-ค) คือ negative control ในขณะที่ ช่อง 1-9 (ก) คือ ความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบ ได้แก่ 10 นาโนกรัม 50 นาโนกรัม และ 100 นาโนกรัม ที่ผสมกับ RNA ต้นแบบ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม (ช่อง 1-3) 200 นาโนกรัม (ช่อง 4-6) และ 300 นาโนกรัม (ช่อง 7-9) ตามลำดับ ช่อง 1-8 (ข) คือ การทดสอบอุณหภูมิ annealing ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 40.8, 42.3, 45.4, 50.0, 55.8, 60.6, 63.3 และ 64.8 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยใช้ total DNA ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม และ total RNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ช่อง 1-7 (ค) คือการทดสอบอัตราส่วนคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ได้แก่ 1: 1, 1: 2, 1: 3, 1: 4, 2:1, 3: 1 และ 4:1 ตามลำดับ

ก



ข

ภาพที่ 3 การตรวจสอบเชื้อ PYMoV และเชื้อ CMV subgroup I จากตัวอย่างใบพริกไทยที่แสดงอาการด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ด่างประ ใบมีจุดเหลือง และเสียรูปร่าง จำนวนทั้งสิ้น 9 ตัวอย่าง (ก) ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR ที่พัฒนาได้ (ข) ช่อง M คือ 100 bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) ช่องที่ 1 คือ ตัวอย่างที่มีเชื้อ PYMoV และ CMV (mixed infection) ช่อง 2-10 คือ ตัวอย่างใบพริกไทย ตัวอย่างที่ 1-9 ตามลำดับ

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

การคัดเลือกตัวอย่างต้นพริกไทยที่ติดเชื้อ PYMoV เพียงชนิดเดียว โดยใช้เทคนิค PCR และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PYMoV และ RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV subgroup I ผลที่ได้พบว่าตัวอย่างใบพริกไทยที่นำมาตรวจสอบทั้งสิ้น จำนวน 5 ตัวอย่าง (ต้น) ให้แถบ DNA ขนาด 450 คู่เบส สอดคล้องกับการรายงานของ Bhat and Siju (2007) ที่ทำการตรวจสอบเชื้อ PYMoV ที่ก่อโรคในพริกไทยในประเทศอินเดียและใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกัน อย่างไรก็ตามไม่พบว่าตัวอย่างต้นพริกไทยทั้งหมดที่นำมาตรวจสอบปรากฏแถบ DNA ขนาดประมาณ 500 คู่เบส (CMV) แสดงว่าตัวอย่างต้นพริกไทยที่เก็บมาติดเชื้อ PYMoV เพียงชนิดเดียว

การใช้คู่ไพรเมอร์ PYMoV (PYMoV-F และ PYMoV-R) และ CMV (CMV-F และ CMV-R) สำหรับการตรวจสอบตัวอย่างใบพริกไทยที่ติดเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR ให้แถบ DNA ขนาด 450 คู่เบส ของเชื้อ PYMoV เท่านั้น ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่คู่ไพรเมอร์ของเชื้อ CMV ที่ใช้ในปฏิกิริยา ไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ตรวจสอบเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR ทั้งนี้เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวมาใช้ตรวจสอบเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค RT-PCR ก็ไม่พบแถบ DNA ขนาด 650 คู่เบส เช่นเดียวกัน

การตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ในพริกไทยด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR ที่พัฒนาได้ พบว่าทุกตัวอย่างให้แถบ DNA ขนาด 450 คู่เบส เพียงแถบเดียว ผลที่ได้สอดคล้องกับการตรวจสอบเชื้อ PYMoV จากตัวอย่าง ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งพบแถบ DNA ขนาด 450 คู่เบส และการตรวจสอบเชื้อ CMV subgroup I จากตัวอย่าง ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ไม่พบแถบ DNA ขนาด 500 คู่เบส เช่นเดียวกัน แสดงว่าเทคนิค multiplex RT-PCR ที่พัฒนาได้ในการศึกษาครั้งนี้ มีประสิทธิภาพ สามารถตรวจสอบตัวอย่างต้นพริกไทยติดเชื้อ PYMoV และ CMV ได้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบเชื้อไวรัส PYMoV ด้วยเทคนิค PCR และเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเนื่องจากจำนวนตัวอย่างต้นพริกไทยที่นำมาใช้ในการตรวจสอบมีจำนวนค่อนข้างน้อย ซึ่งอาจส่งผลโดยตรงต่อความถูกต้องและแม่นยำในการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคดังกล่าว ดังนั้นจึงควรตรวจสอบตัวอย่างพริกไทยทั้งที่แสดงอาการคล้ายติดเชื้อไวรัสและไม่แสดงอาการติดเชื้อไวรัส (Symptomless) ในแปลงปลูกเพิ่มเติม

สรุปผล (Summary)

1. แหล่งของเชื้อ PYMoV และ CMV

ในการศึกษานี้คัดเลือกตัวอย่างต้นพริกไทยที่ติดเชื้อ PYMoV เพียงชนิดเดียว เพื่อนำมาใช้เป็น positive control โดยใช้เทคนิค PCR และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PYMoV และ RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV subgroup I ในส่วนของเชื้อ CMV subgroup I (CMV ไอโซเลท 30RS) ที่นำมาใช้เป็น positive control ได้รับมาจากกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อ PYMoV และ CMV sub-group I ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR

ความเข้มข้นของ DNA และ RNA ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RT-PCR ในการศึกษานี้ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PYMoV (PYMoV-F และ PYMoV-R) และ CMV (CMV I-F และ CMV I-R) พบว่าใช้ total DNA ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 นาโนกรัม และ total RNA ความเข้มข้น 100 และ 200 นาโนกรัม ตามลำดับ จะให้แถบ DNA ของเชื้อ PYMoV และ CMV ที่เข้มและชัดเจน และความเข้มข้นต่ำสุดของ total DNA และ total RNA ที่สามารถใช้ในปฏิกิริยา multiplex RT-PCR ได้คือ 10 นาโนกรัม และ 100 นาโนกรัม ตามลำดับ อุณหภูมิของ annealing ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา คือ 55.8 องศาเซลเซียส อัตราส่วนคู่ไพรเมอร์ PYMoV : CMV (PYMoV-F และ PYMoV-R : CMV I-F และ CMV I-R) ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา multiplex RT-PCR ในการศึกษานี้ คือ 1:1

3. การตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV ในพริกไทยด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR

ประสิทธิภาพของเทคนิค multiplex RT-PCR ที่พัฒนาได้ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถตรวจสอบเชื้อ PYMoV และ CMV subgroup I ได้ โดยให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบเชื้อไวรัส PYMoV และ CMV subgroup I ด้วยเทคนิค PCR และเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส ตามลำดับ

ผลผลิต (Output)

10.1) บทความวิจัย

มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม และ รัชนี ฮงประยูร. 2561. การใช้เทคนิค duplex RT-PCR สำหรับตรวจสอบเชื้อ *Piper yellow mottle virus* และ *Cucumber mosaic virus* ที่ก่อโรคในพริกไทย. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร:** 49 (3) 207-216.

รายงานสรุปการเงิน ประจำปีงบประมาณ 2557

รหัสโครงการ (NRMS 13 หลัก).....-.....

โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ: การพัฒนาเทคนิค multiplex RT-PCR เพื่อใช้ในการคัดเลือกต้นพริกไทยปลอดเชื้อไวรัส

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.)...มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม.....

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2558

ระยะเวลาดำเนินการ...1.....ปี .....-..... เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2558

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	**7,200**	**7,200**	**0**
2. ค่าจ้าง	**96,000**	**96,000**	**0**
3. ค่าวัสดุ	**800**	**800**	**0**
4. ค่าใช้สอย	**121,000**	**121,000**	**0**
5. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ **5.1ค่าบำรุงสถาบัน ร้อยละ 10**	**25,000**	**25,000**	**0**
รวม	**250,000**	**250,000**	**0**

<u>จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ</u>

งวดที่ 1 (50%) .....125,000..... บาท เมื่อวันที่ 21 พฤศจิกายน พ.ศ. 2557

งวดที่ 2 (50%) .....125,000.....บาท เมื่อวันที่ 22 พฤษภาคม พ.ศ. 2558

รวม .....250,000 บาท (สองแสนห้าหมื่นบาทถ้วน).....

.....	.....
ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน	ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ
วันที่ 30 ตุลาคม พ.ศ. 2562	วันที่ 30 ตุลาคม พ.ศ. 2562

บรรณานุกรม (Bibliography)

รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. 2535. พืชเครื่องเทศและสมุนไพร. การศาสนา กรมการศาสนา, กรุงเทพ.วัฒนา สวรรยาธิปัติ. 2531. การปลูกพริกไทย. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

รัชนี ฮงประยูร. 2549. **บทปฏิบัติการซีรัมวิทยาทางด้านโรคพืช.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 86 หน้า.

Ali, A. and M. Kobayashi. 2010. Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in pepper. **Journal of Virological Methods** 163: 234-237.

Ali, S., M. Akhtar, K.S. Singh and Q. A. Naqvi. 2012. RT-PCR and CP gene based molecular characterization of *a Cucumber mosaic cucumovirus* from Aligarh, U.P., India. **Agricultural Sciences** 3: 971-978.

Bharat, H. 1952. Etudes sur le dépérissement des poiverières en Indochine. **Archives des Recherches Agronomiques au Cambodge au Laos et au Vietnam 13**, 75-92.

Bhat, A.I., S. Devasahayam, M.N. Venugopal and R. Suseela Bhai. 2005 Distribution and incidence of viral disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Karnataka and Kerala, India. **Journal of Plantation Crops.** 33: 59-64.

_____ 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. **Current Science** 93: 973-975.

_____ , A. Siljo and S. Devasahayam. 2012. Occurrence of symptomless source of *Piper yellow mottle virus* in black pepper (*Piper nigrum* L.) varieties and a wild Piper species. **Arch. Phytopathology Plant Protect.** 45: 1000-1009

_____ 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: 190-196.

Elfath, M.E., A.M. Ashshi, R.J. Cooper and P.E. Klapper. 2000. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. **Clinical Microbiology Reviews.** 13: 559-570.

Gulati-Sakhuja, A., L.S. John, N. Alberto and L. Hsing-Yeh. 2009. Production of polyclonal antibodies against *Pelargonium zonate spot virus* coat protein expressed in *Escherichia coli* and application for immunodiagnosis. **J. Virol. Methods** 160: 29-37.

Hareesh, P.S. and Bhat, A.I. 2010. Seed transmission of *Piper yellow mottle virus* in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Journal of Plantation Crops** 38: 62-65.

Hu, M.X., K. Zhou and J.L. Liao. 2011. Multiplex PCR for the imultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. **Phytopathology** 101:1270-1277.

Holliday, P. 1959. Suspected virus in black pepper. **Commonwealth Phytopathological News** 5: 49-52.

Koohapitagtam, M. and R. Hongprayoon. 2013. Identification of *Cucumber mosaic virus* Affecting Chili in the South of Thailand by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **Agricul. Sci. J.** 44 (2): 171-180.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.

Lot, H., J. Marrou, J. B. Quiot and C. Esvan. 1972. Contribution a l'etude de virus de la mosaTque du concombre (CMV). II. Methods de purification rapide du virus. **Ann. Phytopathology** 4: 25-38.

Lockhart, B.E.L., K. Kiratiya-Angul, P. Jones, L.Eng, P. de Silva, N.E.Olszewski N.E., N. Lockhart, N. Deema and J. Sangalang. 1997. Identification of *Piper yellow mottle virus* a mealybug-transmitted badnavirus infecting Piper spp. In Southeast Asia. **European Journal of Plant Pathology** 103: 303-311.

Nemat, S. B., R. K. Mohammad and N. Z. Shaheen. 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. **Virus Genes** 32:277-288.

Ozdemir, Z. 2009. Development of multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* using pure cultures. **J. Plant Pathol.** 91: 495-497.

Prakasam, V., K.T. Subbaraja and C.M. Bhakthavasalu. 1990. Mosaic disease – a new record in black pepper in lower palneys. **Indian Cocoa, Arecanut and Spice Journal 13**: 104.

Sarma, Y.R., G. Kiranmai, P. Sreenivasulu, M. Anandaraj, M, Hema, M.Venkatramana, A.K. Murthy and V.R. Reddy. 2001. Partial characterization and identification of virus associated with stunt disease of black pepper (Piper nigrum) in South India. **Current Science** 80: 459-462.

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 Lankra. **Plant Pathol.** 51: 537-545.