



## Srinakharinwirot University Journal of Sciences and Technology



Volume 17, Issue 1, January - June 2025, Pages 1 – 11 ISSN 2985-2641 (Online)

Research Article

### การพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR สำหรับ *Tomato brown rugose fruit virus* ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกเชิงการค้าของไทย

Development of virus detection by RT-PCR for *tomato brown rugose fruit virus* in commercial tomato and pepper seed in Thailand

พริมา พิริยางกูร<sup>1</sup>, ปรียพรรณ พงศาพิชญ์<sup>2</sup>, วาสนา รุ่งสว่าง<sup>2</sup>, รัชณี ฮงประยูร<sup>3</sup>, อีรวศิษฐ์ แพทย์สมาน<sup>4\*</sup>

Pharima Phiriyangkul<sup>1</sup>, Preyapan Pongsapich<sup>2</sup>, Wasana Rungsawang<sup>2</sup>, Ratchanee Hongprayoon<sup>3</sup>,  
Teewasit Phatsaman<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
วิทยาเขตกำแพงแสน

<sup>1</sup>Department of Science and Bioinnovation, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University,  
Kamphaeng Saen Campus.

<sup>2</sup>กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

<sup>2</sup>Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office,  
Department of Agriculture.

<sup>3</sup>ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

<sup>3</sup>Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus.

<sup>4</sup>ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์  
วิจัยและนวัตกรรม

<sup>4</sup>Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Office of the Permanent Secretary, Ministry of Higher  
Education, Science, Research and Innovation.

\*Corresponding author, e-mail: phat\_goe3@hotmail.com

**Received:** 8 March 2024; **Revised:** 19 September 2024; **Accepted:** 19 September 2024

#### บทคัดย่อ

เชื้อ *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) ซึ่งเป็นเชื้อกักกันที่สามารถเข้าทำลายมะเขือเทศและพริก อีกทั้งยังมีการเฝ้าระวังและมาตรการสุขอนามัยพืชในประเทศไทยกำหนดให้มีการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าหรือส่งออก

ไม่ให้พบเชื้อ ToBRFV ดังนั้นวิธีการตรวจสอบเชื้อ ToBRFV ในเมล็ดพันธุ์จึงมีความสำคัญยิ่ง งานวิจัยนี้ศึกษาการตรวจหาเชื้อ ToBRFV ด้วยเทคนิค reverse transcription-PCR (RT-PCR) เนื่องจากยังไม่มี การพบโรคนี้ในประเทศไทยจึงใช้ positive control เป็นพลาสมิดสายผสม pMA-RQ-REF ซึ่งมียีนเป้าหมายคือ replicase gene ขนาด 560 bp เติมนลงไปในตัวอย่าง อาร์เอ็นเอที่สกัดจากเมล็ดพริกและมะเขือเทศปกติ นำไปสังเคราะห์ cDNA จากนั้นตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR แล้ววิเคราะห์ ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ผลการตรวจสอบพบว่า วิธีการนี้มีความจำเพาะสูงร้อยละ 100 กับเชื้อไวรัส ToBRFV โดยไม่ทำปฏิกิริยากับไวรัสชนิดอื่นรวม 13 ชนิด ใน 5 จี้นัส ทดสอบความไวโดยใช้ยีน replicase ที่มีความเข้มข้น เริ่มต้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เจือจางในน้ำกลั่นและน้ำบัคเมล็ด พบว่ามีความไวถึงระดับ  $1 \times 10^{-6}$  เฟมโตกรัม ต่อไมโครลิตร และ 100 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจเชื้อ ToBRFV ด้วยวิธี RT-PCR จากงานวิจัยนี้และวิธี Real-time RT-PCR ที่วิเคราะห์โดยกลุ่มวิจัยกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการ เกษตร ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ทางการค้า จำนวน 245 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ จำนวน 71 ตัวอย่าง และเมล็ดพันธุ์พริก จำนวน 174 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลการตรวจสอบที่ตรงกันร้อยละ 100 โดยไม่พบเชื้อ ToBRFV ในทุกตัวอย่าง

**คำสำคัญ:** การตรวจสอบ; โรคไวรัสพริก; โรคไวรัสมะเขือเทศ; มาตรการสุขอนามัย; เทคนิคชีวโมเลกุล

## Abstract

*Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) is a quarantine pest, which infected in tomato and pepper seeds. The surveillance and phytosanitary measures in Thailand require inspection of imported or exported seeds to ensure that ToBRFV is not detected. Detection method for ToBRFV in tomato and pepper seeds by molecular techniques was carried out. A pMA-RQ-REF recombinant plasmid encompassing TOBRFV replicase gene of 560 bp was amplified and subsequently transformed into *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$ . Six transformants were randomly selected and analyzed. The result showed that all of them contained the insert with 100% identity to those reported in the GenBank. Since there have been no report of this virus in Thailand, therefore total RNA was extracted from healthy pepper and tomato seeds for cDNA synthesis. The pMA-RQ-REF recombinant plasmid was spiked into the cDNA for positive control preparation. Detection method was performed using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) which the PCR product at 560 bp was obtained. The developed method was highly specific to ToBRFV without cross reaction to other 13 virus species in 5 genera. Sensitivity test for TOBRFV detection was conducted by diluting the amplified replicase gene at 100 ng/ $\mu$ l in deionized water, pepper and tomato seed sap. The result show a sensitivity at  $1 \times 10^{-6}$  pg/ $\mu$ l and 100 pg/ $\mu$ l, respectively. Evaluation of the developed method by testing commercial seeds including 71 tomato samples and 174 pepper samples showed negative results to those performed by Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture with Real-time RT-PCR technique.

**Keywords:** Detection; Virus Diseases of Pepper; Virus Diseases of Tomato; Phytosanitation; Molecular Techniques

## บทนำ

มะเขือเทศและพริกเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อการบริโภคในอันดับต้นของประเทศ นอกจากนั้นยังมีการส่งออกในรูปแบบผลิตภัณฑ์เป็นจำนวนมาก [1] อย่างไรก็ตามปัญหาใหญ่ของการปลูกมะเขือเทศและพริกมีสาเหตุจากโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเป็นปัญหาสำคัญ ซึ่งยังไม่มีสารเคมีในการป้องกันกำจัด ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการเฝ้าระวังเพื่อควบคุมเชื้อที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานโรค เชื้อไวรัสในจีนัส *Tobamovirus* หลายชนิดมีรายงานการเข้าทำลายมะเขือเทศและพริกในประเทศไทย ได้แก่ Tobacco mosaic virus (TMV), Tomato mosaic virus (ToMV) และ Pepper mild mottle virus (PMMoV) [1] ไวรัสทั้งสามชนิดนี้มีคุณสมบัติที่คล้ายกันคือมีความคงทนสูง และสามารถติดกับเมล็ดได้ [2-3] ปัจจุบัน tobamovirus อีกชนิดหนึ่งที่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทยและจัดเป็นศัตรูพืชกักกันของพืชทั้งสองชนิด ได้แก่ ToBRFV ซึ่งมีรายงานครั้งแรกในประเทศจอร์แดนในปี พ.ศ. 2558 [4] และได้พบปัญหาของโรคนี้ต่อมาในอีกหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ [5] และจีน [6] รวมทั้งในหลายประเทศในสหภาพยุโรป เช่น เนเธอร์แลนด์ เยอรมนี และออสเตรีย เนื่องจากมาตรการจัดการความเสี่ยงในเรื่องการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกจะต้องมีการรับรองว่ามาจากประเทศหรือแหล่งผลิตที่ปลอดจาก ToBRFV [4-5]

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าหลายประเทศมีความพยายามในการผลิตแอนติบอดีต่อ ToBRFV แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่จำเพาะกับเชื้อ ToBRFV เพียงชนิดเดียว แต่กลับทำปฏิกิริยากับไวรัสในจีนัส *Tobamovirus* อีกหลายชนิด ได้แก่ TMV, ToMV และ PMMoV เนื่องจากเชื้อไวรัสดังกล่าวมีโครงสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคที่คล้ายกันมากถึงประมาณร้อยละ 86-90 [5, 7] งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายในการตรวจหาเชื้อ ToBRFV ในเมล็ดมะเขือเทศและพริกด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล โดยมุ่งเน้นให้เป็นวิธีการตรวจสอบที่แม่นยำ รวดเร็ว น่าเชื่อถือ เพื่อประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังและมาตรการสุขอนามัยพืชซึ่งมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วน จากรายงานของ Alkowni และคณะ (2019) ที่พบว่าได้ทำการศึกษาการจัดตำแหน่งของลำดับจีโนมสำหรับไวรัสในจีนัส *Tobamovirus* ทั้งหมด โดยดึงข้อมูลมาจาก GenBank และได้ทำการค้นหาเอกลักษณ์ที่มีความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอของเชื้อ ToBRFV บริเวณตำแหน่งยีน replicase สามารถใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อ ToBRFV [8-9] นอกจากนั้นเทคนิคทางอณูชีววิทยา ได้แก่ RT-PCR และ Real-time RT-PCR จึงมีความสำคัญในการใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจเชื้อ ToBRFV ในเมล็ดพันธุ์พริกและมะเขือเทศนำเข้าของประเทศปลายทาง ตามข้อบังคับการดำเนินการของคณะกรรมการ EU 2020/1191 โดยกำหนดให้การตรวจเมล็ดพันธุ์พริกและมะเขือเทศต้องไม่พบเชื้อ ToBRFV ร้อยละ 100 [10] ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไวรัสดังกล่าวภายในประเทศให้มีความแม่นยำ รวดเร็วและเป็นที่ยอมรับ เพื่อเตรียมความพร้อมในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของเชื้อ ToBRFV ในเมล็ดพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Tomato brown rugose fruit virus* ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริก ด้วยวิธีการ RT-PCR สำหรับเตรียมความพร้อมในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของเชื้อ ToBRFV จากเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้ามาในประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## วิธีดำเนินการวิจัย

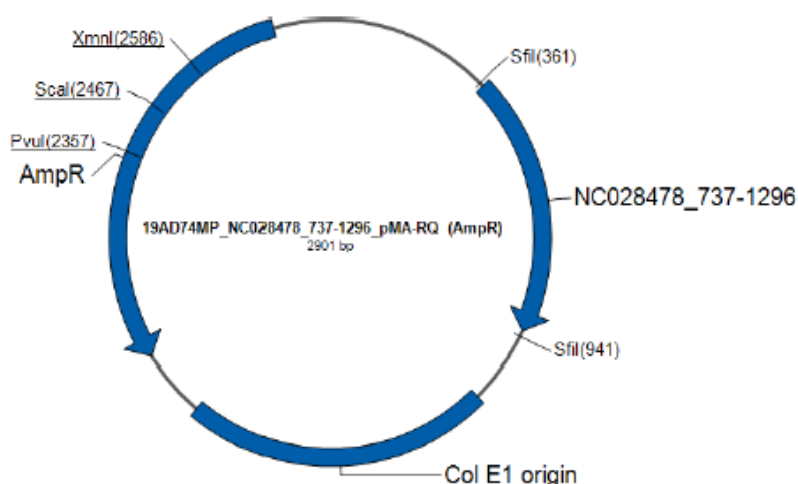
### 1. โพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหา ToBRFV ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และตัวอย่างเมล็ดมะเขือเทศและพริก

สังเคราะห์ไพรเมอร์ (1st BASE, Singapore) ที่มีความจำเพาะกับยีน replicase ของเชื้อ ToBRFV ได้แก่ forward primer: ToBRFV – F: 5' AATGTCCATGTTTGTACGCC 3' และ reverse primer: ToBRFV – R: 5' CGAATGTGATTTAAACTGTGAAT 3' [8] และตัวอย่างเมล็ดมะเขือเทศและพริกทางการค้าได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 245 ตัวอย่าง

### 2. การเตรียม positive control ของเชื้อ ToBRFV

#### 2.1 การสังเคราะห์ยีน replicase ของเชื้อ ToBRFV

นำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pMA-RQ (AmpR) ที่มียีน replicase (pMA-RQ-REF) (ภาพที่ 1) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร โดยยีน replicase สังเคราะห์จากยีนในฐานข้อมูล GenBank accession no. NC028478 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 737-1296 [5] ซึ่งเป็นยีน replicase ของเชื้อ ToBRFV มีขนาด 560 bp



ภาพที่ 1 การสร้างพลาสมิด pMA-RQ-REF (Invirogen, USA) ที่มียีนของ ToBRFV (NC028478)

#### 2.2 การเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสม pMA-RQ-REF สำหรับใช้เป็น positive control

นำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pMA-RQ-REF มาถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี heat shock transformation [11] โดยใช้พลาสมิดสายผสมที่ได้จากการสังเคราะห์ (Invirogen, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ competent cell ของเชื้อ *E. coli* DH5 $\alpha$  ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มส่วนผสมบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จากนั้นบ่มบนน้ำแข็งอีก 5 นาที เติมน้ำอาหาร 2xYT ปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบนเครื่อง Incubator shaker (Labnet, USA) ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์แล้วดูดอาหารทิ้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง 2xYT ที่มีแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีมา จำนวน 6 โคโลนี เพื่อตรวจสอบการสอดแทรก (insert) ของชั้นยีน ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสำหรับยีน replicase ดังรายละเอียดในข้อที่ 1

### 3. วิธีการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ในระดับห้องปฏิบัติการ

#### 3.1 การเตรียมตัวอย่างเมล็ดและการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่าง

ตัวอย่างเมล็ดมะเขือเทศและพริกทางการค้า จำนวน 245 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ จำนวน 71 ตัวอย่าง และเมล็ดพันธุ์พริก จำนวน 174 ตัวอย่าง การสุ่มตัวอย่างเมล็ดเพื่อการตรวจสอบดำเนินการตามมาตรฐานของ International Seed Federation [12] โดยสุ่มมา จำนวน 3,000 เมล็ด แบ่งเป็นตัวอย่างย่อย (sub-sample) จำนวน 1,000 เมล็ดต่อตัวอย่าง นำเมล็ดแต่ละ sub-sample มาบดให้ละเอียดเป็นผงแห้งโดยเติมไนโตรเจนเหลวในโถงที่นิ่งฆ่าเชื้อ จากนั้น ตักตัวอย่างดังกล่าวน้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำสกัดละลาย FARB extraction buffer ซึ่งมาพร้อมกับชุดสกัดทางการค้า FavorPrep Plant Total RNA Mini Kit (Favorgen, Taiwan) ใช้อัตราส่วน 1:10 (W/V) นำสารแขวนลอยเมล็ดมาสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีการในคู่มือของชุดสกัด ตรวจสอบคุณภาพของ Total RNA ด้วย agarose gel electrophoresis และสังเกตอาร์เอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอกับ 100 bp Plus markers (Thermo Fisher Scientific, USA)

#### 3.2 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ ToBRFV ด้วยเทคนิค RT-PCR

สังเคราะห์ cDNA โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังนี้ Total RNA จากข้อ 3.1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 5X Reaction buffer 2 ไมโครลิตร, 10 ไมโครโมลาร์ Reverse primer (gene specific primer) 1 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP 1 ไมโครลิตร, RevertAid reverse transcriptase 0.25 ไมโครลิตร (Thermo Fisher Scientific, USA) และ deionized water (dH<sub>2</sub>O) 3.75 ไมโครลิตร โดยใช้อุณหภูมิในการสังเคราะห์ cDNA ดังนี้ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จำนวน 1 รอบ และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อได้ cDNA จึงนำมาเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยเตรียมส่วนผสม 2X Green PCR Master Mix 12.50 ไมโครลิตร (Thermo Fisher Scientific, USA), 10 ไมโครโมลาร์ ToBRFV-Forward primer 1 ไมโครลิตร, 10 ไมโครโมลาร์ ToBRFV-Reverse primer 1 ไมโครลิตร, dH<sub>2</sub>O 8.50 ไมโครลิตร และ cDNA 2 ไมโครลิตร สำหรับ Positive control ใช้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pMA-RQ-REF ที่มียีน replicase ของเชื้อ ToBRFV และ Negative control ใช้น้ำกลั่นโดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่ 52 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที [10, 13] ด้วยเครื่อง thermal cycler (Biometra Thermocycler T-Gradient, USA) นำผลผลิตดีเอ็นเอปริมาตร 4 ไมโครลิตรไปตรวจสอบขนาดโดยใช้ 1 % agarose gel electrophoresis ใน Tris-borate buffer และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea) ตรวจแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอกับ 100 bp Plus markers

### 4. การทดสอบความจำเพาะของวิธีการ (Specificity test)

ทดสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจหาเชื้อ ToBRFV โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน replicase ของเชื้อ ToBRFV ทดสอบกับเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพริกและมะเขือเทศทั้งที่อยู่ในจีนัสเดียวกันและต่างจีนัส รวม 13 ชนิด ทดสอบวิธีการ RT-PCR โดยการสกัดอาร์เอ็นเอไวรัสจากใบพืชที่ติดเชื้อไวรัส ได้แก่ จีนัส *Tobamovirus* ได้แก่ TMV, PMMoV, ToMV, Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), Odontoglossum ringspot virus (ORSV) จีนัส *Potyvirus* ได้แก่ Chilli veinal mottle virus (ChVMV), Potato virus Y (PVY), Papaya ringspot virus (PRSV) และ Sugarcane mosaic

virus (SCMV) จีนัส *Cucumovirus* ได้แก่ Cucumber mosaic virus (CMV) จีนัส *Tospovirus* ได้แก่ Watermelon silver mottle virus (WSMoV) และ Melon yellow spot virus (MYSV) และทดสอบความจำเพาะวิธีการ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอไวรัสจากใบพืชที่ติดเชื้อไวรัสจีนัส *Begomovirus* คือ Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV)

### 5. การทดสอบความไวของวิธีการ (Sensitivity test)

เนื่องจากเชื้อ ToBRFV เป็นศัตรูพืชที่พบบ่อยในประเทศไทย จึงไม่มีตัวอย่างพืชที่เป็นโรคนี้นในการทดสอบ จำเป็นต้องใช้พลาสมิดสายผสม pMA-RQ-REF ซึ่งมี replicase gene ของเชื้อ ToBRFV เป็นตัวอย่างในการทดสอบความไวของวิธีการ โดยปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร [8] นำไปเจือจางในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแบบ 10 เท่า (10-fold dilutions) ตั้งแต่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-16}$  รวมทั้งสิ้น 16 ระดับการเจือจาง จากนั้นตรวจสอบยีน replicase ด้วยวิธีการ PCR ตามวิธีการข้อที่ 3.2

การเตรียมตัวอย่างน้ำบดเมล็ดมะเขือเทศและพริกอย่างละ 6 ตัวอย่าง โดยใช้เมล็ดมะเขือเทศหรือพริกจำนวน 1,000 เมล็ดต่อตัวอย่าง บดให้ละเอียดเป็นผงแบ่งด้วยไนโตรเจนเหลวในโถงที่นิ่งฆ่าเชื้อ นำเมล็ดที่บดละเอียดน้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิตร ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน จากนั้นปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว  $5,000 \times g$  นาน 10 นาที [8] แล้วเติมยีน replicase ที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยเจือจางแบบ 10 เท่า ตั้งแต่  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-4}$  รวมทั้งสิ้น 4 ระดับการเจือจาง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปตรวจสอบยีน replicase ด้วยวิธีการ PCR ตามวิธีการข้อที่ 3.2

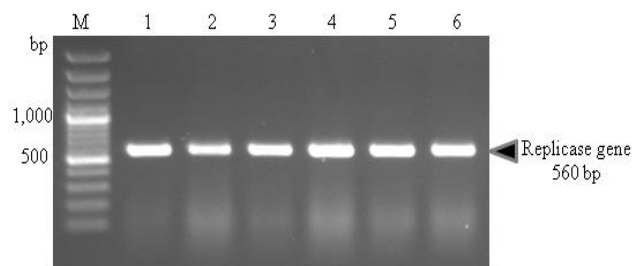
### 6. การทดสอบวิธีการในการตรวจเมล็ดพันธุ์ทางการค้า

นำเมล็ดพันธุ์ทางการค้า จำนวน 245 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ จำนวน 71 ตัวอย่าง และเมล็ดพันธุ์พริก จำนวน 174 ตัวอย่าง สกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีการข้อที่ 3.1 จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่สกัดแบ่งเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองแรกนำมาตรวจสอบตามวิธีการในข้อ 3.2 ด้วยคู่มือสำหรับยีน replicase และการทดลองที่สองนำมาตรวจสอบด้วยวิธี Real-time RT-PCR ที่ดำเนินการโดยกลุ่มวิจัยกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จากนั้นนำผลการตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบกับทั้งสองการทดลอง

## ผลการวิจัย

### 1. การเตรียม positive control ของเชื้อ ToBRFV

คัดเลือก transformants ที่ได้จากการโคลนยีน replicase เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* DH5 $\alpha$  จำนวน 6 โคลนี นำมาตรวจสอบการสอดแทรกของยีนด้วยวิธี PCR พบว่าทั้ง 6 โคลนี มีผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 560 bp (ภาพที่ 2) เมื่อนำโคลนที่ให้ผลบวกส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เหมือนกับที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ที่ค่า identity เท่ากับร้อยละ 100 เช่นเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้นแบบ คือ NC028478



**ภาพที่ 2** ผลผลิต PCR ด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะยีน replicase (แถวที่ 1-6) เปรียบเทียบกับเครื่องหมายโมเลกุล 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific, USA) (M)

## 2. วิธีการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ในระดับห้องปฏิบัติการ

### 2.1 การเตรียมตัวอย่างเมล็ดและการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่าง

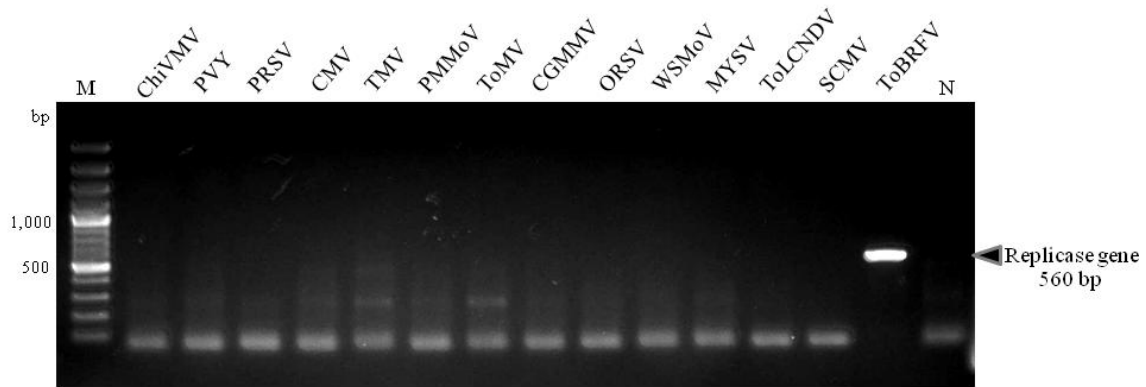
การสกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ดพริกปติ จำนวน 6 ตัวอย่าง และมะเขือเทศปกติ จำนวน 6 ตัวอย่าง ด้วยชุดสกัด FavorPrep™ Plant Total RNA Kit เมื่อตรวจสอบอาร์เอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis พบแถบอาร์เอ็นเอในทุกตัวอย่าง จำนวน 2 แถบ คือ 18S rRNA และ 28S rRNA ซึ่งเป็น RNA ที่พบมากที่สุดในพื้นที่พืชและเมล็ดพืช [14] แสดงให้เห็นว่า Total RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างเมล็ดมีคุณภาพดีสามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR ได้

### 2.2 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ ToBRFV ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากกระบวนการ RT ได้ cDNA ของ total RNA ที่สกัดจากเมล็ดพริกและมะเขือเทศปกติ เมื่อเติมพลาสติกสายผสม pMA-RQ-REF ลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาเพื่อใช้เป็น positive control และตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน replicase พบผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 560 bp ตรงตามขนาดของยีนเป้าหมาย (ภาพที่ 2) โดยไม่มีปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

## 3. การทดสอบความจำเพาะของวิธีการ

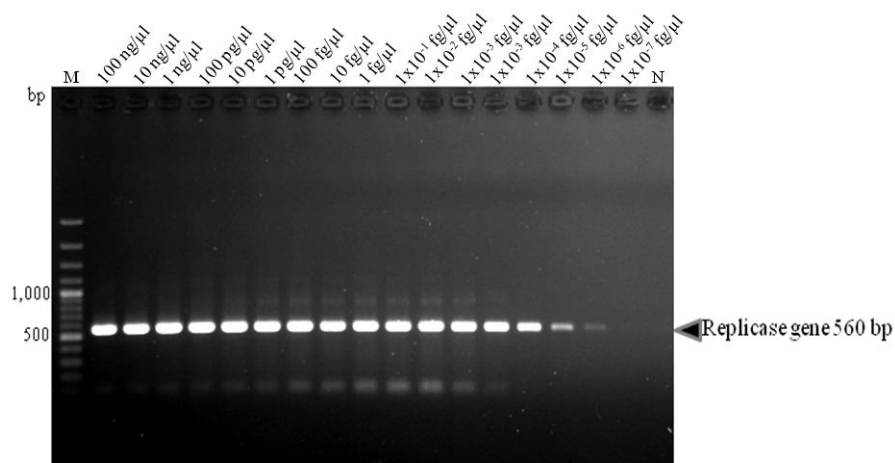
การทดสอบความจำเพาะของวิธีการ RT-PCR และ PCR กับเชื้อไวรัส 13 ชนิด ที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ พบว่า วิธีการนี้สามารถตรวจสอบเชื้อ ToBRFV ได้อย่างจำเพาะและมีความแม่นยำสูงร้อยละ 100 (ภาพที่ 3) โดยให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Raed et al. [9] ซึ่งตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกันสำหรับยีน replicase ของเชื้อ ToBRFV ในไวรัสชนิดอื่น 7 ชนิด ได้แก่ TMV, ToMV, CGMMV, TMGMV, PMMoV, ORSV และ Cucumber fruit mottle mosaic virus (CFMMV)



ภาพที่ 3 ความจำเพาะของวิธีการ RT-PCR และ PCR กับเชื้อไวรัส 13 ชนิด ที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ และดีเอ็นเอ (N = Negative control)

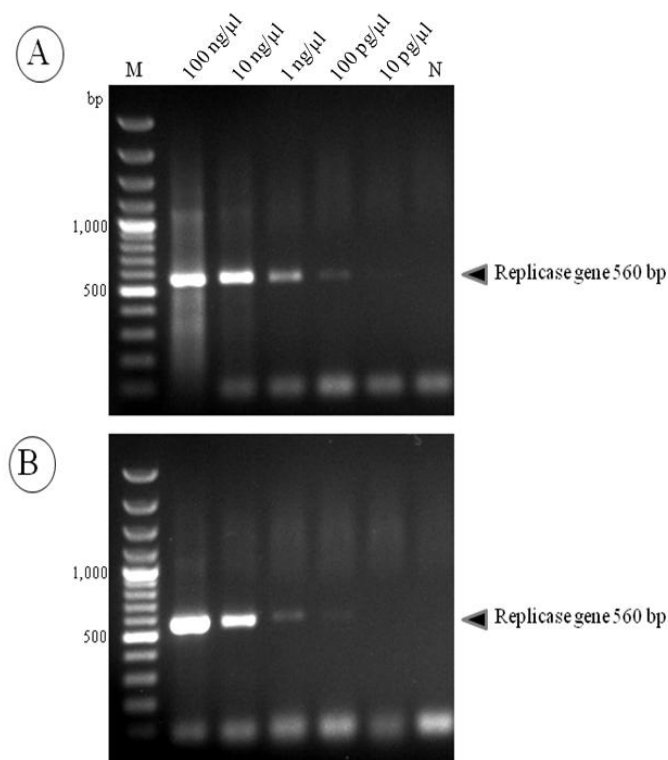
#### 4. การทดสอบความไวของวิธีการ

การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ ToBRFV พบว่าสามารถตรวจสอบยีน replicase ได้ถึงระดับการเจือจาง  $10^{-15}$  ( $1 \times 10^{-6}$  เฟมโตกรัมต่อไมโครลิตร) จากความเข้มข้นเริ่มต้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 4) ต่างจากรายงานของ Alkowni et al. [8] และ Ling et al. [15] ที่สามารถตรวจ RNA ของเชื้อ ToBRFV ได้ถึงระดับการเจือจาง  $10^{-4}$  (2.25 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร) จากความเข้มข้นเริ่มต้น 22.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยวิธีการ RT-PCR ถึงแม้ว่าวิธีการตรวจสอบยีน replicase ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้มีความไวสูงกว่าถึง 10 เท่า ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ แต่พบว่าการทดสอบความไวการตรวจเชื้อ ToBRFV โดยเจือจางยีน replicase ของเชื้อ ToBRFV ในน้ำบัคเมสส์ดพรักและมะเขือเทศปกติ สามารถตรวจได้ระดับการเจือจางเพียง  $10^{-3}$  (100 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร) (ภาพที่ 5) ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ามีสารที่รบกวนการเกิดปฏิกิริยา PCR ในน้ำบัคเมสส์ดพรักและมะเขือเทศ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังมีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ ToBRFV ได้



ภาพที่ 4 ความไวในการตรวจเชื้อ ToBRFV ด้วยวิธี RT-PCR ระดับการเจือจาง 16 ความเข้มข้น ( $10^{-1}$  ถึง  $10^{-16}$ ) จากความเข้มข้นเริ่มต้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (N= Negative control)





ภาพที่ 5 ความไวในการตรวจเชื้อ ToBRFV ด้วยวิธี RT-PCR ตัวอย่างน้ำบดเมล็ดพริก (A) และเมล็ดมะเขือเทศ (B) ที่ระดับการเจือจาง 4 ความเข้มข้น ( $10^{-1}$  ถึง  $10^{-4}$ ) จากความเข้มข้นเริ่มต้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

### 5. การทดสอบวิธีการในการตรวจเมล็ดพันธุ์ทางการค้า

จากการตรวจเมล็ดพันธุ์ทางการค้า จำนวน 245 ตัวอย่าง ด้วยตัวอย่างอาร์เอ็นเอชนิดเดียวกัน ไม่พบเชื้อ ToBRFV ในทุกตัวอย่างกับวิธี RT-PCR ที่พัฒนาวิธีการขึ้น ซึ่งผลการตรวจวิเคราะห์สอดคล้องกับผลตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้ส่งให้กลุ่มวิจัยกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรตรวจด้วยวิธี Real-time RT-PCR ทุกตัวอย่าง โดยผลที่ได้ไม่มีปฏิกิริยารบกวนจากน้ำบดเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกทางการค้า การพัฒนาวิธีการตรวจนี้จึงเหมาะสำหรับเผ่าระวังและเตรียมพร้อมในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ ToBRFV ในเมล็ดพันธุ์อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้ตรวจเมล็ดพันธุ์พริกและมะเขือเทศการนำเข้าของประเทศปลายทาง

### สรุปและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ ToBRFV ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลที่รวดเร็วแม่นยำ เพื่อการเผ่าระวัง แต่เนื่องจากเชื้อ ToBRFV เป็นเชื้อที่กักกัน จึงจำเป็นต้องใช้พลาสมิดดีสายผสม pMA-RQ-REF ที่มียีน replicase ของเชื้อไวรัสชนิดนี้เป็น positive control มีขนาด 560 bp หลังจากการเพิ่มปริมาณพลาสมิดดังกล่าวใน *E. coli* DH5 $\alpha$  พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ที่ค่า identity เท่ากับร้อยละ 100 ส่วนการเตรียมตัวอย่างเมล็ดพริกและมะเขือเทศที่ใช้ในการตรวจสอบ ทำโดยการบดเมล็ดปกติด้วยไนโตรเจนเหลวและสกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ด สังเคราะห์ cDNA และนำมาเติมพลาสมิดดีสายผสม pMA-RQ-REF เพื่อใช้เป็น positive control ตรวจสอบด้วยวิธี PCR ได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 560 bp ตรงตามยีนเป้าหมาย

การทดสอบความใช้ได้ของวิธี RT-PCR ด้านความจำเพาะต่อเชื้อ ToBRFV พบว่า มีความจำเพาะสูงกับเชื้อไวรัสชนิดนี้ โดยไม่ทำปฏิกิริยากับไวรัสชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ ได้แก่ TMV, PMMoV, ToMV, CGMMV, ORSV, ChVMV, PVY, PRSV, SCMV, CMV, WSMoV, MYSV และ ToLCNDV มีความไวในการตรวจเชื้อ ToBRFV ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อและน้ำบดเมล็ดพริกและมะเขือเทศที่ระดับ  $1 \times 10^{-6}$  เฟมโตกรัมต่อไมโครลิตร และ 100 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับจากการตรวจเมล็ดพันธุ์ทางการค้า จำนวน 245 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อ ToBRFV ด้วยวิธี RT-PCR และ Real-time RT-PCR ซึ่งให้ผลการตรวจที่สอดคล้องกัน

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ในโครงการการพัฒนาวีธีการตรวจสอบเชื้อไวรัส ToBRFV เพื่อใช้ในมาตรการสุขอนามัยของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริก รหัสโครงการ AG-BIO/63-003-006

## เอกสารอ้างอิง

- [1] Thai Seed Trade Association (THASTA). (2016). *The volume and value of exports of controlled seed for commercial purposes 2016*. Retrieved September 18, 2024, from <http://www.thasta.com>
- [2] Wetter, C. (1984). Serological identification of four tobamovirus species infecting pepper. *Plant Disease*, 68(7), 597–599.
- [3] Zaitlin, M. (2000). *Tobacco mosaic virus*. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No. 370, pp. 1-13.
- [4] Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B. W., and Turina, M. (2016). A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives Virology*, 161(2), 503-506.
- [5] Neta, L., Elisheva, S., Victoria, R., Ilana, B., Moshe, L., Ilan, L., Nadav, E., Yehudit, T., Noa, S., Ahmad, A. R., Nadav, E., Ami, H., Liron, Y., Oded L., and Aviv, D. (2017). A new israeli tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. *PLoS One*, 12(1), Article e0170429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>
- [6] Yan, Z. Y., Ma, H. Y., Han, S. L., Geng, C., Tian, Y. P., and Li, X. D. (2019). First report of tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in China. *Plant Disease*, 103, Article 2973.
- [7] Adams, M. J., Antoniw, J. F., and Kreuze, J. (2009). Virgaviridae: A new family of rod-shaped plant viruses. *Archives Virology*, 154(12), 1967-1972.
- [8] Alkowni, A., Alabdallah, O., and Fadda, Z. (2019). Molecular identification of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine. *Journal of Plant Pathology*, 101, 719-723.
- [9] Raed, A., Osama, A., and Ziad, F. (2019). Molecular identification of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine. *Journal of Plant Pathology*, 101, 719-723.
- [10] The European Commission. (2020). *Commission implementing regulation (EU) 2020/1191 of 11 August 2020*. Official Journal of the European Union. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020R1191&from=EN>

- [11] Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual vols. 1, 2 and 3*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [12] International Seed Federation. (2019). *Detection of infectious tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in tomato and pepper seed, Version 1.3*. Retrieved September 18, 2024, from [https://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2019/09/Tomato-ToBRFV\\_2019.09.pdf](https://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2019/09/Tomato-ToBRFV_2019.09.pdf)
- [13] Levitzky, N., Smith, E., Lachman, O., Luria, N., Mizrahi, Y., Bakelman, H., Sela, N., Laskar, O., Milrot, E., and Dombrovsky, A. (2019). The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of Tomato brown rugose fruit virus contributing to disease spread in tomatoes. *PLoS One*, 1(1), Article e0210871.
- [14] Ermei, C., Yuxin, Z., Qianchun, W., Shengqing, S., and Zeping, J. (2016). Isolation of high-quality RNA from *platycladus orientalis* and other cupressaceae plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 21-27.
- [15] Ling, K.-S., Tian, T., Gurung, S., Salati, R., and Gilliard, A. (2019). First report of tomato brown rugose fruit virus infecting greenhouse tomato in the United States. *Plant Disease*, 103(6), Article 1439.