

# การใช้เทคนิค LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP)

## ตรวจหาเชื้อราไฟทอปธอร่าในทุเรียน

### DETECTION OF *PHYTOPHTHORA* SPP. IN DURIAN USING LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) METHOD

เดือนเต็ม ทองเผือก<sup>1</sup> จิรภัทร จันทมาลี<sup>1</sup> ศิริรัตน์ วชิรเลขพันธ์<sup>2</sup> และ

สุพิชฌาย์ อัศววิศวงษ์<sup>3\*</sup>

Dueantem Thongphueak<sup>1</sup>, Jirapat Chanthamalee<sup>1</sup>, Sirirat Wachiralurpan<sup>2</sup>,

and Suphitcha Augkarawaritsawong<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

<sup>2</sup>ศูนย์เทคโนโลยีซ่อมบำรุงรักษา สำนักวิจัยและบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

<sup>3</sup>คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University

<sup>2</sup>Maintenance Technology Center, Institute for Scientific and Technological Research and Services, King

Mongkut's University of Technology Thonburi

<sup>3</sup>Faculty of Medical Technology, Rangsit University

\*corresponding author e-mail: suphitcha.a@rsu.ac.th

(Received: 1 September 2022; Revised: 21 November 2022; Accepted: 22 November 2022)

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการเกิดโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนจากเชื้อ *Phytophthora palmivora* โดยเก็บตัวอย่างจากต้นทุเรียนที่แสดงอาการของโรคจากสวนทุเรียนในอำเภอเขาฉกรรจ์ และอำเภอแก่งหางแมว จังหวัดจันทบุรี จำนวน 20 ตัวอย่าง พบเชื้อรา *P. palmivora* จำนวน 12 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบเชื้อ *P. palmivora* จำนวน 8 ตัวอย่าง จากการคัดแยกเชื้อและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. palmivora* โดยการเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์ พบว่า เชื้อที่แยกได้มีรูปร่างลักษณะของโคโลนีเป็นแบบ Rosette สปอร์แรงเจียมีลักษณะเป็นวงรี เป็นแบบ Ovoid ภายใตกล้องจุลทรรศน์ การเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแครอต พบว่า สามารถเจริญเติบโตได้ดี การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *P. palmivora* โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแลมป์ (LAMP) ร่วมกับดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ (Dipstick DNA biosensor) พบว่า สามารถตรวจจับกับยีนเป้าหมายได้ทั้ง 12 ตัวอย่าง การตรวจสอบความไว พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบเชื้อได้ คือ  $10^{-5}$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับ

เชื้ออื่น พบว่า ไม่เกิดปฏิกิริยาการข้ามกับเชื้อราอื่นๆ แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *P. palmivora* ดังนั้น วิธีตรวจวิเคราะห์เชื้อรา *P. palmivora* ในทุเรียน ด้วยเทคนิค แลมป์ร่วมกับดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบเป็นวิธีการที่ทำได้อย่างรวดเร็ว มีความแม่นยำสูง สามารถทำได้ง่าย โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ภายในเวลา 60–90 นาที และใช้ปริมาณ ดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย การตรวจวิเคราะห์เชื้อได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ สามารถใช้เทคนิคนี้เพื่อเฝ้าระวังและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคได้

**คำสำคัญ:** ไฟทอปทอรา ปาล์มมิโวลา ดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ แลมป์

### Abstract

The research was to study root rot and stem rot of durian disease from *Phytophthora palmivora*. A total of 20 samples of durian disease symptoms were collected from Khao Khitchakut District and Kaeng Hang Maeo District, Chanthaburi Province, and 12 samples of *P. palmivora* and 8 samples were not detected. The characterisation of *P. palmivora* colony morphology was tested by slide culture was found that the isolated had a rosette colony. Light microscopy showed that sporangium was ovoid. When cultured on carrot agar, it grew well. The analysis of *P. palmivora* by Loop-Mediated Isothermal amplification (LAMP) Method combined with dipstick DNA biosensor was found to detect 12 sample. The sensitivity of LAMP for *P. palmivora* detection was found that the lowest concentration was  $10^{-5}$  ug/ml. The detection of specificity primer to showed no cross-reactivity with other fungal. The analytical method are specificity to *P. palmivora*. The LAMP specific, but it did not detect another fungus. Therefore, the analysis of *P. palmivora* in durian using LAMP technique with dipstick DNA biosensor was a rapid method. It was used for the analysis of *P. palmivora* with high accuracy, easy use, without expensive tools, within 60–90 minutes and using very little DNA volume. The diagnosis of infection can be analyzation to rapidly and efficiently this technique can be used to monitor and control the spread of disease.

**Keywords:** *Phytophthora*, *Palmivora*, Dipstick DNA biosensor, LAMP

## บทนำ

ทุเรียน เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของไทยที่นิยมปลูกกันมากในภาคตะวันออกและภาคใต้ ปัจจุบันนอกจากจะผลิตทุเรียนเพื่อบริโภคในประเทศแล้วยังมีการผลิตเพื่อส่งออกไปยังต่างประเทศทั้งในรูปของผลสดและแปรรูปในลักษณะต่างๆ ซึ่งมีแนวโน้มทางการตลาดที่ดี สายพันธุ์ที่นิยมปลูก ได้แก่ พันธุ์หมอนทอง พันธุ์ก้านยาว พันธุ์ชะนี และพันธุ์กระดุมทอง เป็นต้น แต่การปลูกทุเรียนมักพบปัญหาศัตรูพืชและโรคหลายชนิด โรคที่พบได้ทั่วไปในทุเรียนส่วนมากมาจากเชื้อรา ได้แก่ โรคใบจุด (Leaf Spot) โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) โรคราแป้ง (Powdery mildew) โรคราสีชมพู (Pink disease) และโรครากเน่าและโคนเน่า เป็นต้น โรคที่สำคัญของทุเรียนที่เป็นปัญหาของเกษตรกรชาวสวนทุเรียน คือ โรครากเน่าและโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *P. palmivora* เชื้อราชนิดนี้จะก่อให้เกิดโรคได้ทุกส่วนของทุเรียนตั้งแต่รากที่อยู่ใต้ดิน ลำต้นและใบ รวมทั้งผลทุเรียน โดยเชื้อราจะเข้าทำลายระบบรากและโคนต้น เกิดแผลที่ต้นหรือกิ่งทำให้เน่าเป็นจุด มีความฉ่ำน้ำ เปื่อยและเนื้อไม้จะเป็นสีน้ำตาลเข้มและมีเมือกไหลออกมา หากอาการเน่าลุกลามจะทำให้ใบร่วงโดยเริ่มจากปลายกิ่งใบจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแห้งเหี่ยว ทำให้ร่วงหล่น รากแก้วและรากฝอยถูกทำลายเน่าเป็นสีน้ำตาล ทำให้ต้นทุเรียนทรุดโทรมและตายในที่สุด (Lim & Chan, 1986) ด้วยเหตุนี้ทุเรียนจึงเป็นไม้ผลที่ต้องการการดูแลรักษาอย่างดี โดยเฉพาะการเข้าทำลายของโรคและแมลงซึ่งเป็นปัญหาหลักที่พบเสมอทุกปี การระบาดของโรคสามารถแพร่กระจายอยู่ทั่วทุกพื้นที่ของแหล่งปลูก ซึ่งจะพบได้ทั่วไปในเขตพื้นที่ร้อนชื้น และแพร่กระจายโดยการพัดพาของลม ฝน หรือน้ำ ทำให้สปอร์ของเชื้อแพร่กระจายไปยังที่ต่างๆ เมื่อสปอร์ของเชื้อมีความชื้นที่เหมาะสมก็สามารถเจริญเติบโตเป็นเส้นใยของเชื้อราเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืช เป็นสาเหตุให้คุณภาพผลผลิตและราคาของทุเรียนลดลง (Sangchote et al., 2004) ดังนั้นเกษตรกรที่ทำสวนทุเรียนควรได้เรียนรู้เกี่ยวกับโรคของทุเรียน และการป้องกันกำจัดโรคชนิดต่างๆ ให้ถูกต้อง เพื่อให้ทุเรียนที่ผลิตได้มีคุณภาพดี

ดังนั้นการวินิจฉัยโรคทุเรียนในระยะเริ่มแรกจึงมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรค รวมทั้งป้องกันการแพร่กระจายของโรคไปยังส่วนต่างๆ ของทุเรียน วิธีการตรวจสอบเชื้อก่อโรคด้วยวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการมีขั้นตอนที่ซับซ้อนและใช้ระยะเวลานานกว่าที่จะยืนยันชนิดของเชื้อได้ ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยามาใช้ในการทำนายการเกิดโรคเพิ่มมากขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอของเชื้อที่ก่อโรคในบริเวณที่จำเพาะเพื่อตรวจสอบความแตกต่างของยีนที่ผิดปกติหรือยีนที่ทำให้เกิดโรค เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ใช้ตรวจวิเคราะห์มีหลายวิธี ได้แก่ เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP เทคนิค Restriction fragment length polymorphism; RFLP และเทคนิค Polymerase Chain Reaction; PCR เป็นต้น โดยมีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เทคนิค Real-time Polymerase Chain Reaction ตรวจหาเชื้อรา *Phytophthora*

*palmivora* ในระยะเริ่มแรกของปาล์มน้ำมัน ด้วยโพรบ (Probes) และไพรเมอร์ (Primers) ที่มีความจำเพาะในการวิเคราะห์เชื้อราดังกล่าว (Alvarez et al., 2010) ซึ่งวิธีการต่างๆ ดังกล่าวต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงและต้องอาศัยเทคนิคพื้นฐานในการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส (Gel electrophoresis) จึงเป็นข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์

จากข้อจำกัดของระยะเวลานานและเครื่องมือที่มีราคาแพงในการตรวจวิเคราะห์ จึงมีแนวคิดในการนำวิธี Loop mediated isothermal amplification; LAMP (Notomi et al., 2015) มาใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์เชื้อรา *Phytophthora* spp. โดยอาศัยหลักการของการเพิ่มขยายยีนโดยใช้ไพรเมอร์ (Primer) ที่สามารถตรวจสอบยีนที่มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายได้ การเพิ่มขยายยีนจะใช้อุณหภูมิเพียงอุณหภูมิเดียว ภายในระยะเวลา 30–60 นาที และสามารถตรวจสอบยีนที่เพิ่มขยายได้ไปในขั้นตอนเดียวกัน (Li et al., 2017) โดยไม่จำเป็นต้องใช้เจลอิเล็กโตรโฟลิซิส วิธีอ่านผลสามารถสังเกตได้จากความขุ่น (Turbidity) ของปฏิกิริยาแลมป์ที่เกิดขึ้น โดยความขุ่นเกิดจากการจับกันระหว่าง Magnesium ions กับ Pyrophosphate ions ในปฏิกิริยาแลมป์และเกิดเป็นตะกอนสีขาวของ “Magnesium–DNA pyrophosphate complex” จึงสามารถสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า ถ้ามีความขุ่นแสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Notomi et al., 2015) การสังเกตความขุ่นด้วยตาเปล่ามักเกิดความลำเอียง (Bias) ในการรายงานผล ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคแลมป์ร่วมกับวิธีดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ง่าย สะดวก และรวดเร็วมากขึ้นในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Phytophthora* spp. รวมทั้งให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถนำไปใช้ในงานตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยได้ เทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการตรวจวิเคราะห์โรคแทนวิธีการเดิมที่ต้องใช้เวลานานและต้องอาศัยเครื่องมือที่ราคาแพง

การตรวจเชื้อ *Phytophthora* spp. ด้วยวิธีแลมป์ร่วมกับวิธีดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ ซึ่งเป็นเทคนิค DNA biosensor หลักการของ DNA biosensor ต้องมีส่วนของสารชีวภาพทำปฏิกิริยากับสารสารตัวอย่าง โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ซึ่งจะมีความจำเพาะสูงกับสารตัวอย่าง ทำให้มีความแม่นยำสูงในการตรวจวิเคราะห์ สามารถตรวจสอบยีนเป้าหมายที่มีความจำเพาะต่อเชื้อได้อย่างถูกต้อง (Zasada et al., 2020) และตรวจสอบกับตัวอย่างจำนวนมากได้ โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง (Lü et al., 2019) นอกจากนี้ยังให้ผลการตรวจแบบรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจหาเชื้อด้วยวิธีมาตรฐาน ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคแลมป์ร่วมกับวิธี LFD สามารถตรวจคัดกรองเชื้อ *Phytophthora* spp. เพื่อป้องกันและเฝ้าระวังการเกิดโรครากเน่าและโคนเน่าได้ในระยะเริ่มแรกที่มีการเกิดโรคในทุเรียน เพื่อหาแนวทางในการป้องกันและกำจัดโรคได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม นอกจากนี้ยัง

เป็นการช่วยเหลือเกษตรกรในการลดการใช้สารเคมีและลดต้นทุนการผลิต โดยสามารถผลิตทุเรียนที่มีคุณภาพดีได้มาตรฐานการส่งออกมากยิ่งขึ้น

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างจากต้นทุเรียนที่แสดงอาการของโรครากเน่าและโคนเน่า โดยเก็บตัวอย่างจากเปลือกไม้บริเวณลำต้น กิ่ง และใบไม้ จากแหล่งปลูกทุเรียนในจังหวัดจันทบุรี ได้แก่ สวนทุเรียนในอำเภอแก่งหางแมว จำนวน 10 ตัวอย่าง และสวนทุเรียนในอำเภอเขาฉกรรจ์ จำนวน 10 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 20 ตัวอย่าง

### 2. การตัดแยกเชื้อ *Phytophthora palmivora*

นำตัวอย่างที่ได้จากต้นทุเรียนมาตัดแยกเชื้อ โดยนำตัวอย่างที่เก็บได้มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร นำไปแช่ 10% Clorox แล้วเขย่าเบาๆ หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น Sterilization 3 ครั้ง แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Carrot agar; CA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-14 วัน และยืนยันเชื้อด้วยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### 3. การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ดูการเจริญเติบโตและรูปร่างเส้นใยของเชื้อ *P. palmivora* ที่เจริญบนอาหาร CA เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นตรวจสอบรูปร่าง และขนาดของ Sporangium โดยใช้เข็มเขี่ยตัดชิ้นวันที่มีเชื้อ *P. palmivora* ไปวางลงในจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีน้ำกลั่นหนึ่งชามเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเมื่อครบเวลานำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน ตรวจสอบ Sporangium ของเชื้อ *P. palmivora* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

### 4. การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีของ Bust n' Grab Protocol

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร CA ที่อุณหภูมิห้อง นำเส้นใยของเชื้อลงใน Lysis buffer 200 ไมโครลิตร และแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปให้ความร้อนใน Heat box 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และเขย่าผสมสาร 30 วินาที ทำวิธีการดังกล่าวซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติม Chloroform 200 ไมโครลิตร และเขย่าผสมสาร 2 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 20,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำส่วนใสผสมกับ 100 % Ethanol 400 ไมโครลิตร และเขย่าผสมสาร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 20,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออกแล้วล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 20,000 รอบ

ตอนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใส รอให้ตะกอนแห้งแล้วเติม TE buffer 40 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคแลมบ์

### 5. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีแลมบ์

การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธีแลมบ์และทดสอบด้วยดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Phytophthora* spp. ดังตารางที่ 1 ซึ่งฐานข้อมูลของไพรเมอร์ได้มาจาก (Genbank:DQ 163014.1) การทดสอบปฏิกิริยาแลมบ์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยเติมสารต่างๆ ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) ดังนี้ ไพรเมอร์ F3 ไพรเมอร์ B3 ไพรเมอร์ FIP ไพรเมอร์ BIP ไพรเมอร์ LF และ ไพรเมอร์ LB อย่างละ 2 ไมโครโมลาร์ dNTP 1.6 มิลลิโมลาร์ Betaine 0.5 โมลาร์  $MgSO_4$  0.4 มิลลิโมลาร์ *Bst*2 4 ยูนิต Triton X-100 4% และ ดีเอ็นเอแม่แบบ 1 ไมโครโมลาร์ นำหลอดส่วนผสมไปต้มในเครื่องให้ความร้อน (Heating Block) อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ก่อนนำมาทดสอบด้วยดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาแลมบ์ (Dai, Wu, & Kang, 2015)

| ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับดีเอ็นเอ (5' –3')                    |
|--------------|-------------------------------------------|
| F3           | GCGGAAGGGACTACACCT                        |
| B3           | AACAACAACACCGAGGCC                        |
| FIP          | CTCACTTCAACAGCCCCGCC–GAAGTGTGCTGCGTCGTG   |
| BIP          | TCGGCTAAAGTGACGGCTTTGA–CAACCTGCAACCACCGAA |
| LF           | ACAGAGCAAGAAGCGAATTAGAG                   |
| LB           | GCTGCGAGTGGTTTGTGACT                      |

### 6. การตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ

ผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาแลมบ์ คือ ดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยนำ ดีเอ็นเอเป้าหมาย มาติดฉลากด้วย biotin และนำมาไฮบริไดเซชัน (Hybridization) กับ DNA probe-FITC จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยวิธีดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ

### 7. ทดสอบความไวของปฏิกิริยาแลมบ์ (Sensitivity)

การทดสอบความไว (Sensitivity) โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อราที่สกัดได้ไปวัดความเข้มข้น จากนั้นเจือจางแบบลำดับส่วน (10 Fold serial dilution) ตั้งแต่  $10^0$ – $10^{-9}$  แล้วนำดีเอ็นเอนั้นมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคแลมบ์ และนำผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาแลมบ์ คือ DNA target ที่ติดฉลากด้วย Biotin แล้วทำให้เกิดการไฮบริไดเซชันกับ DNA probe-FITC และนำไปดำเนินการตรวจสอบด้วยวิธีดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ

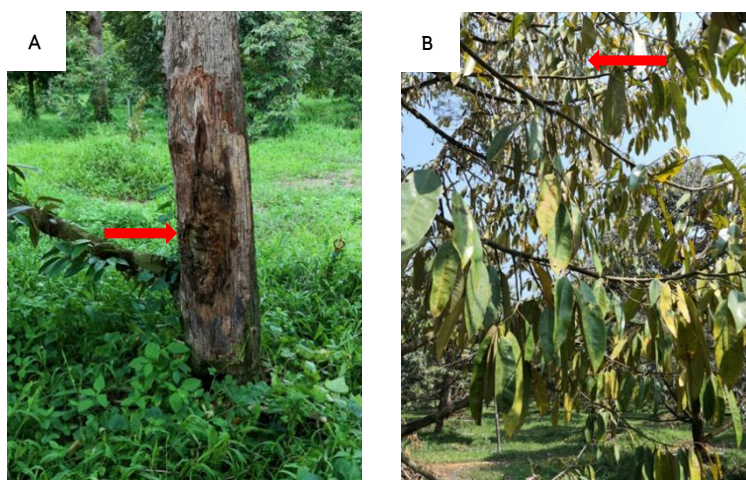
## 8. การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

การทดสอบความจำเพาะของเชื้อที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. และ *Rhizobium* sp. โดยเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน แล้วนำไปสกัดสารพันธุกรรม จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป้วยร่วมกับวิธีดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบต่อไป

## ผลการวิจัย

### 1. การเก็บตัวอย่าง

สำรวจและเก็บตัวอย่างจากสวนทุเรียนจังหวัดจันทบุรี ในอำเภอเขาฉกรรจ์ จำนวน 10 ตัวอย่าง และอำเภอแก่งหางแมว จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างทุเรียนที่แสดงอาการของโรครากเน่าโคนเน่าจากสวนของเกษตรกร ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง สังเกตลักษณะรอยโรคของทุเรียนที่เป็นโรครากเน่าโคนเน่า โดยรากจะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลและเน่าโคนต้นจะมีลักษณะเปลือกแตก มีเมือกไหลออกมาจากเปลือกของต้น ส่วนมากพบอาการบริเวณโคนต้นและกิ่งที่มีขนาดใหญ่ รอยโรคที่ใบมีอาการเน่าเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือน้ำตาลดำตรงบริเวณใบยอดอ่อนจะเน่าแห้งเป็นสีดำ เชื้อราทำให้ดอกแห้งและเน่า ผลทุเรียนที่เป็นโรคจะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล อาการเน่าลุกลามเป็นผลทั้งผล และอาจมีเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราเจริญอยู่ด้วย ดังภาพที่ 1

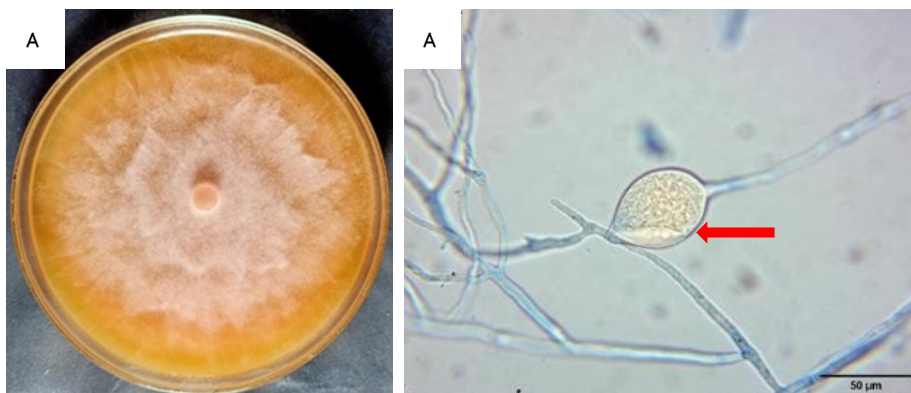


ภาพที่ 1 ลักษณะของโรครากเน่าโคนเน่า A) ลักษณะของโรครากเน่าโคนเน่าบริเวณลำต้นทุเรียน และ B) ลักษณะของโรครากเน่าโคนเน่าบริเวณใบของทุเรียน



## 2. การศึกษาลักษณะของเชื้อรา

จากการศึกษาการคัดแยกเชื้อราในอำเภอลำปางพบว่ามีเชื้อราที่คัดแยกได้จากสวนทุเรียนเป็นรา *Phytophthora palmivora* จำนวน 12 ตัวอย่าง และจำนวน 8 ตัวอย่าง ไม่พบการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง เชื้อราที่คัดแยกได้มีระยะเวลาในการเจริญเติบโตบนอาหารรุ้นแครอท จำนวน 5-7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ลักษณะของเชื้อรา พบว่า เชื้อราสามารถเจริญปกคลุมทั่วทั้งบริเวณผิวหน้าอาหารในจานเพาะเชื้อ ลักษณะเส้นใยของเชื้อราบนอาหารรุ้นแครอทมีสีขาว เส้นใยฟู เปรียบเป็นชั้นซ้อนกัน ดังภาพที่ 2 เมื่อนำเส้นใยมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า สร้างเส้นใยไม่มีผนังกัน และสร้างสปอร์แรงเจียม (Sporangium) ที่มีลักษณะเป็นวงรีที่มีขนาดแตกต่างกัน มี Oospore ขนาดเล็ก เชื้อราสร้างสปอร์ที่มีผนังหนา การศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดของ Sporangium ของเชื้อ พบว่า เชื้อสร้าง Sporangia มีหลายรูปแบบ รูปร่างรีหรือรูปไข่ (Ovoid) รูปค่อนข้างยาวรี (Elongated ellipsoid) ดังภาพที่ 2



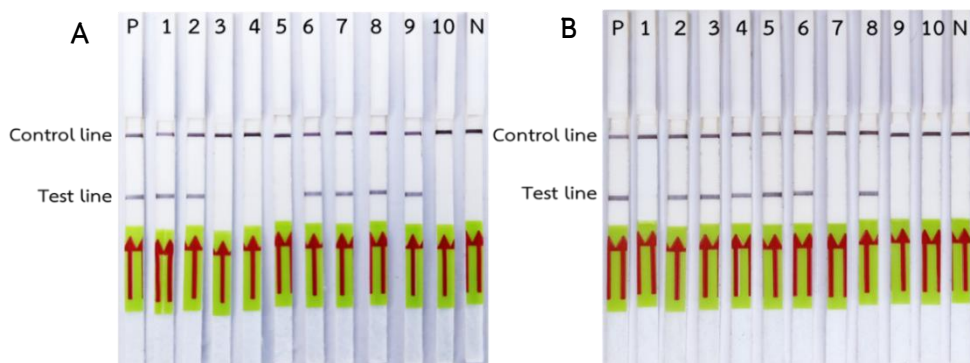
ภาพที่ 2 A) ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* บนอาหารรุ้นแครอท

B) ลักษณะ sporangium ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

## 3. การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธีแลมปร่วมกับวิธีดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ

นำเชื้อ *P. palmivora* ที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำเส้นใยเชื้อราที่บริสุทธิ์มาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายของเชื้อ *P. palmivora* ด้วยวิธีแลมป ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส และนำไปดำเนินการตรวจสอบด้วยวิธีดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ พบว่า โพรเมอร์สามารถจับกับยีนเป้าหมายได้จำนวน 12 ตัวอย่าง จากจำนวน 20 ตัวอย่าง ดังภาพที่ 3

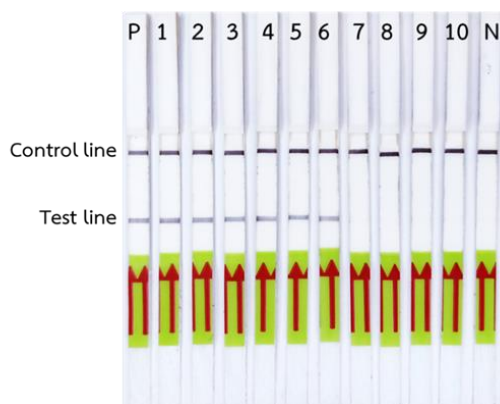




**ภาพที่ 3** การตรวจเชื้อราด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับวิธีดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบจำนวน 12 ตัวอย่าง จากทั้งหมด จำนวน 20 ตัวอย่าง A) อ้าเภอแก่งหางแมว ซึ่ง P: ชุดควบคุมผลบวก 1-10: ตัวอย่างที่ 1-10 และ N: ชุดควบคุมผลลบ และ B) อ้าเภอเขาดีชมภู ซึ่ง P: ชุดควบคุมผลบวก, 1-10: ตัวอย่างที่ 1-10 และ N: ชุดควบคุมผลลบ \* Control line: 1 ชีต (ขึ้นที่ Control line เพียงอย่างเดียว) = ผลลบ และ \* Test line: 2 ชีต (ขึ้นที่ชีต Control line และ Test line) = ผลบวก

#### 4. การทดสอบความไว (Sensitivity)

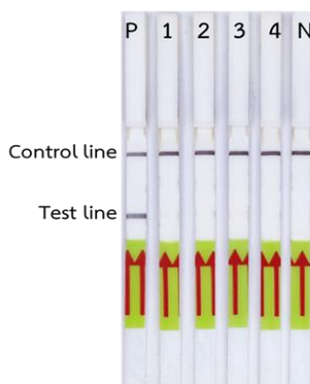
จากการศึกษาความไวของการวิเคราะห์เชื้อ *P. palmivora* ที่สามารถตรวจสอบการเกิดโรคในทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ug/ml ที่เจือจางแบบลำดับส่วนลงทีละ 10 เท่า (10 Fold serial dilution) ตั้งแต่  $10^0$ – $10^{-9}$  พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อได้ คือ ความเข้มข้นที่  $10^{-5}$  เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีแลมป์ร่วมกับดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ ดังภาพที่ 4



**ภาพที่ 4** การทดสอบความไวของเชื้อ *Phytophthora palmivora* ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับวิธีดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ ซึ่ง P : ชุดควบคุมผลบวก 1 :  $50 \times 10^0$  2 :  $50 \times 10^{-1}$  3 :  $50 \times 10^{-2}$  4 :  $50 \times 10^{-3}$  5 :  $50 \times 10^{-4}$  6 :  $50 \times 10^{-5}$  7 :  $50 \times 10^{-6}$  8 :  $50 \times 10^{-7}$  9 :  $50 \times 10^{-8}$  10 :  $50 \times 10^{-9}$  และ N : ชุดควบคุมผลลบ

#### 5. การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อทดสอบที่ใช้วิเคราะห์ความจำเพาะ ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. และ *Rhizobium* sp. มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ พบว่า เชื้ออื่นๆ ที่นำมาทดสอบไม่เกิด DNA product ในปฏิกิริยาแลมป์ แสดงว่า วิธีการที่ใช้วิเคราะห์เชื้อมีความจำเพาะเจาะจง โดยไม่เกิดปฏิกิริยาการข้ามกับเชื้อราอื่นๆ ดังภาพที่ 5



**ภาพที่ 5** การทดสอบความจำเพาะของเชื้อ *Phytophthora palmivora* ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับวิธีดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ ซึ่ง P : ชุดควบคุมผลบวก 1 : *C. gloeosporioides* 2 : *Aspergillus* sp. 3 : *Penicillium* sp. 4 : *Rhizobium* sp. และ N : ชุดควบคุมผลลบ

## อภิปรายผล

จากการศึกษาการคัดแยกเชื้อราที่ก่อโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนในห้องปฏิบัติการด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้นแครอท พบเส้นใยของเชื้อราที่มีลักษณะฟู สีขาว เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เชื้อราสร้าง Sporangia มีรูปร่างเป็นรีหรือรูปไข่ ซึ่งการศึกษาดังกล่าวข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Hunter & Kunimoto, 1974)

เทคนิคแลมป์มีขั้นตอนการทำงานไม่ซับซ้อน โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายในปฏิกิริยาแลมป์ (Tomita et al., 2008) และใช้เอนไซม์ *Bst* 2 polymerase ซึ่งสามารถแยกดีเอ็นเอเกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยวได้ด้วยอุณหภูมิเดียว คือ 63 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องมืออย่างง่ายและราคาไม่สูงมาก เทคนิคแลมป์จึงเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Dai Tingting, 2015) ที่ศึกษาองค์ประกอบของไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *P. palmivora* ด้วยเทคนิคแลมป์ โดยตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคอันตรายในต้นปาล์มและมีผลต่อผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งสามารถติดเชื้อในราก ลำต้น ใบ ดอก และผล กลไกการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแลมป์จะใช้ดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อย สำหรับระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหนึ่งรอบของปฏิกิริยาแลมป์สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้  $10^9$  Copies โดยใช้เวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง 30 นาที ข้อดีของเทคนิคแลมป์อีกประการหนึ่ง คือสามารถดูผลของการตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยตาเปล่า (Visual detection) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของ Magnesium pyrophosphate ที่เกิดจากการรวมกันของ Pyrophosphate ion จาก dNTPs กับ Magnesium ion จากแลมป์ Reaction buffer ทำให้เกิดตะกอนสีขาวขึ้นสามารถสังเกตด้วยตาเปล่า (Sattabongkot et al., 2014) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เทคนิคแลมป์เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอต่างๆ มากขึ้น เพราะสามารถทำปฏิกิริยาได้ง่ายและแม่นยำ มีขั้นตอนการทำงานไม่ซับซ้อน

วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อรา *P. palmivora* ในทุเรียนด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบจะมีแถบด้านบนคือ control line และแถบล่างคือ test line ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จะต้องเป็นดีเอ็นเอที่สามารถจับเข้าคู่ (complementary) กับ DNA probe-FITC เมื่อจุ่มแผ่น Dipstick ลงในตัวอย่างจะเกิดแถบสีในแผ่น Dipstick หากตรวจไม่พบตัวอย่างจะเกิดแถบสีที่ Control line เพียงแถบเดียว แต่หากตรวจพบตัวอย่างจะเกิดแถบสีทั้ง Control line และ Test line ดังนั้น เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคการตรวจหาโมเลกุลของดีเอ็นเอในระดับอนุชีววิทยาได้อย่างรวดเร็ว มีความแม่นยำสูงในการตรวจวิเคราะห์ สามารถทำได้ง่าย โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และในปฏิกิริยาแลมป์สามารถใช้เอนไซม์และ *Bst*2 DNA polymerase ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพียงอุณหภูมิเดียว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเหมาะสมต่อการนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อรา *P. palmivora* ในตัวอย่างทุเรียนได้เป็นจำนวนมากภายในระยะเวลา 60–90 นาที โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย หากตรวจวิเคราะห์เชื้อได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ จะเป็น

การเฝ้าระวังและสามารถควบคุมการแพร่ระบาดของโรคในระยะเริ่มต้นได้ ในการทดลองครั้งนี้ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้ได้มากกว่าร้อยละ 60 เพื่อให้เกิดความแม่นยำมากยิ่งขึ้น

### สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างเชื้อราที่ก่อโรครากเน่าและโคนเน่าในทุเรียนจากสวนทุเรียน จำนวน 2 แห่ง ในอำเภอหาดขามและอำเภอแก่งหางแมว จังหวัดจันทบุรี พบว่า ทุเรียนที่มีลักษณะของโรครากเน่าโคนเน่าบริเวณลำต้นจะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล เปลือกแตกบริเวณโคนต้น มียางหรือเมือกไหลออกมาจากเปลือกของลำต้น ส่วนมากจะพบอาการของโรคบริเวณโคนต้นและกิ่งที่มีขนาดใหญ่ เมื่อศึกษาการคัดแยกเชื้อรา พบว่า เป็นเชื้อ *P. palmivora* จำนวน 12 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อ จำนวน 8 ตัวอย่าง จากจำนวน 20 ตัวอย่าง จากต้นทุเรียนที่แสดงอาการโรครากเน่าและโคนเน่า ผลการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อ *P. palmivora* บนอาหารวุ้นแครอท จำนวน 5-7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เส้นใยของเชื้อราที่มีลักษณะเหมือนกันทั้ง 12 ตัวอย่าง คือ ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสามารถเจริญแพร่กระจายบนผิวหน้าอาหารในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะเส้นใยของเชื้อราบนอาหารวุ้นแครอทเป็นสีขาว เส้นใยฟู เรียงเป็นชั้นซ้อนกัน และสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA และเมื่อส่องเส้นใยของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า สร้างเส้นใยไม่มีผนังกัน และสร้างสปอร์แรงเจียมเป็นวงรีที่มีขนาดแตกต่างกัน มี Oospore ขนาดเล็ก เชื้อราสร้างสปอร์ที่มีผนังหนาสร้าง Sporangia มีหลายรูปแบบ รูปร่างรีหรือรูปไข่ (Ovoid) ค่อนข้างยาว (Elongated ellipsoid)

จากการศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจเชื้อ *P. palmivora* ด้วยเทคนิคแลมป์ร่วมกับวิธีดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ พบว่า สามารถตรวจเชื้อ *P. palmivora* ได้ จำนวน 12 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบเชื้อ *P. palmivora* จำนวน 8 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 20 ตัวอย่าง เทคนิคแลมป์ใช้ไพรเมอร์ จำนวน 6 ไพรเมอร์ ที่จำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งจดจำบนยีนที่สนใจ ทำให้เทคนิคนี้มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายได้ดี โดยใช้เพียงอุณหภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียวที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ Bst 2 polymerase ด้วยเครื่องมือที่ใช้งานได้ง่ายและราคาไม่สูง และใช้เวลาไม่นานในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาแลมป์

การศึกษาค่าความไวของเชื้อ *P. palmivora* ในการตรวจสอบโรคในทุเรียนที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ug/ml) ที่เจือจางแบบลำดับส่วน  $10^0$ - $10^{-9}$  พบว่า ความไวของเทคนิคแลมป์ร่วมกับดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบที่ใช้ตรวจสอบเชื้อมีค่าความเข้มข้นที่  $10^{-5}$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบเชื้อ *P. palmivora* ในทุเรียนได้ เทคนิคนี้จึงสามารถใช้ตรวจปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อได้ถึงแม้ว่าจะมีดีเอ็นเอในปริมาณน้อย

การตรวจหาความจำเพาะเพื่อตรวจสอบการติดเชื้อในทุเรียน โดยใช้ดีเอ็นเอจากเชื้ออื่นๆ ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *C. gloeosporioides* *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. และ *Rhizobium* sp. ด้วยเทคนิคแลมปร่วมกับดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์แบบแถบ พบว่า มีความจำเพาะ เนื่องจากไม่พบปฏิกิริยาการข้ามกันกับเชื้ออื่นๆ ซึ่งเหมาะต่อการนำวิธีการดังกล่าวมาใช้วิเคราะห์เพื่อหาเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* ในทุเรียนได้

#### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สทว.) ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อสำหรับงานวิจัย

#### เอกสารอ้างอิง

- Alvarez, E., Marroquín-Guzmán, M., Mejía, J.F., & Pardo, J.M. (2010). Early detection of *Phytophthora palmivora* in oil palm, using real-time polymerase chain reaction (QPCR) and molecular beacon probes. **APS Caribbean Division**, 101, S253–S256.
- Dai, T., Wu, X., & Kang, Z. (2015). **LAMP (loop-mediated isothermal amplification) detection primer combination for *phytophthora palmivora*, and LAMP detection kit and LAMP detection method thereof CN 104313176 A**. Rui test precision medical testing (Shanghai) Co., Ltd.
- Hunter, J., & Kunimoto, R. (1974). Dispersal of *Phytophthora palmivora*. **Phytopathology**, 64, 202–206.
- Li, Y., Fan, P., Zhou, S., & Zhang, L. (2017). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. **Microbial pathogenesis**, 107, 54–61.
- Lim, T., & Chan, L. (1986). Fruit rot of durian caused by *Phytophthora palmivora*. **PERTANIKA.**, 9(3), 269–276.
- Lü, P., He, Y., Lin, F., Pan, Y., Yu, Q., Guo, Z., . . . Fu, Y. (2019). Rapid detection of *Bombyx mori* bidensovirus by loop-mediated isothermal amplification based lateral flow dipstick assay for field applications. **Journal of invertebrate pathology**, 163, 75–81.
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., & Kanda, H. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. **Journal of microbiology**, 53(1), 1–5.
- Sangchote, S., Poonpolgul, S., Sdoodee, R., Kanjanamaneesathian, M., Baothong, T., & Lumyong, P. (2004). 4.3 *Phytophthora* Diseases in Thailand. **Diversity and management of *Phytophthora* in Southeast Asia**, 77, 1–102.

- Sattabongkot, J., Tsuboi, T., Han, E.-T., Bantuchai, S., & Buates, S. (2014). Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of malaria infections in an area of endemicity in Thailand. **Journal of clinical microbiology**, **52**(5), 1471–1477.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature protocols**, **3**(5), 877–882.
- Zasada, A.A., Wiatrzyk, A., Czajka, U., Brodzik, K., Formińska, K., Mosiej, E., . . . Wdowiak, K. (2020). Application of loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric and lateral flow dipstick visualization as the potential point-of-care testing for *Corynebacterium diphtheriae*. **BMC Infectious Diseases**, **20**(1), 1–9.