การใช้เทคนิค LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION; LAMP ตรวจหาเชื้อ *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* ในมะม่วงน้ำดอกไม้

DETECTION OF *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* IN "NAM DOK MAI" MANGO USING LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) METHOD

เดือนเต็ม ทองเผือก* ศศิธร พุทธรักษ์ และ จิรภัทร จันทมาลี

Dueantem Thongphueak*, Sasithorn Bhudharak, and Jirapat Chanthamalee

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University

*corresponding author e-mail: dueantem.t@rbru.ac.th

(Received: 31 August 2021; Revised: 22 November 2021; Accepted: 30 November 2021)

บทคัดย่อ

การศึกษาเทคนิคทางด้านอณูพันธุศาสตร์ในการตรวจสอบเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ในมะม่วงน้ำดอกไม้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ ด้วยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) โดยงานวิจัยนี้ได้ศึกษาลักษณะของเชื้อรา *C. gloeosporioides* การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี LAMP รวมทั้งการตรวจสอบค่าความไวและความจำเพาะของเชื้อ *C. Gloeosporioides* จากการศึกษามะม่วงน้ำดอกไม้ที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *C. gloeosporioides* พบว่า เชื้อเจริญได้ช้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) โคโลนีมีสีขาวอมเทา โคนิเดียเป็นเซลล์เดียว รูปไข่ และไม่มีสี สร้างสปอร์รูปทรงกระบอก การทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อด้วยเทคนิค LAMP พบว่า สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อได้รวดเร็ว จากการทดลองสามารถพบได้ 20 ตัวอย่าง การทดสอบค่าความไว พบว่าความไวของเชื้อที่ตรวจสอบได้ คือ $50x10^{-4}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการตรวจวิเคราะห์ความจำเพาะของเชื้อ พบว่าสามารถตรวจเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้อย่างจำเพาะ โดยไม่จับกับเชื้อชนิดอื่น วิธีตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วยเทคนิคแลมป์เป็นการตรวจดีเอ็นเอในระดับอณูชีววิทยาซึ่งมีความแม่นยำสูง และสะดวกรวดเร็ว สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้เป็นจำนวนมากโดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย

คำสำคัญ: แอนแทรคโนส ดีเอ็นเอไบโอเซ็นเซอร์ แลมป์

Abstract

The molecular genetic techniques for detection of *Colletotrichum gloeosporioides* in "Nam Dok Mai" mango was studied. The objective of this research was to develop analytical methods for *C. Gloeosporioides* of causing anthracnose in Nam Dok Mai mango by using Loop–Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique. In this research, the characteristics of *C. gloeosporioides* was analyzed by LAMP method. The sensitivity and specificity of C. *Gloeosporioides* were also investigated. The study of the anthracnose disease symptoms in "Nam Dok Mai" mango which caused by *Colletotrichum gloeosporioides* infection showed that slow colony growth on potato dextrose agar; PDA grayish white colony, Single cell conidia, oval and colorless and cylindrical spores. The determination of LAMP, It was found that the analyzed from the experiments 20 samples. The study of the sensitivity of DNA detection was found at $50x10^{-4}$ µg/ml. The detection of specificity for other bacteria was found that it did not show any cross–reactivity with other bacterial species. The LAMP technique is a highly accurate DNA at the molecular biology and rapid test. The analyzed most number of samples by using a few of DNA.

Keywords: Anthracnose, DNA biosensor, LAMP

บทนำ

มะม่วง เป็นพืชที่ปลูกได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ มีการเจริญเติบโตเร็ว ทนต่อโรคและแมลงศัตรูพืช นิยมปลูกเพื่อรับประทานผลสามารถรับประทานได้ทั้งผลดิบและผลสุก มีหลากหลายสายพันธุ์ มะม่วงที่ได้รับความนิยมและส่งออกมากที่สุด คือ มะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง และน้ำดอกไม้เบอร์ 4 เพราะเป็นมะม่วงที่มีลักษณะดี รับประทานผลสุก ผลสุกมีสีเหลืองนวล รสหวานและมีกลิ่นหอม จึงได้รับความนิยมสูงสุด (Ganogpichayagrai et al., 2016) แต่ยังพบปัญหาเกี่ยวกับการปลูกมะม่วงน้ำดอกไม้และปัจจัยต่างๆ หลายประการ การปลูกมะม่วงน้ำดอกไม้มีการบริหารจัดการสวนแบบผสมผสาน เพื่อป้องกันกำจัดโรคพืชที่จะเข้ามาทำลายและก่อความเสียหายให้กับต้นและผลของมะม่วงในระหว่างกระบวนการผลิต โรคพืชในมะม่วงมีหลายชนิดซึ่งแต่ละชนิดจะมีลักษณะอาการของโรคแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสาเหตุของการเกิดโรคนั้นๆ โรคที่สร้างความเสียหายให้กับมะม่วงมากที่สุด คือ โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose)

สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Tovar–Pedraza et al., 2020) สามารถเข้าทำลายมะม่วงได้ทุกส่วน ได้แก่ ลำต้น ยอด ใบ ดอก และผล เป็นต้น โดยเชื้อสามารถเข้าทำลายเซลล์พืชโดยตรงแต่ยังไม่แสดงอาการของโรคซึ่งเป็นการเข้าทำลายแบบแฝง (Quiescent infection) และจะแสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนเมื่อผลผลิตเริ่มแก่หรือสุก (Arauz, 2000) การเข้าทำลายของเชื้อโรคชนิดนี้จะเริ่มตั้งแต่มะม่วงอยู่ในระยะต้นกล้าจนถึงระยะหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต ซึ่งเชื้อจะแฝงอยู่ในแปลงปลูก การระบาดของโรคจะพบได้ทั่วไปในเขตพื้นที่ร้อนชื้น หากมีการระบาดของโรคแพร่กระจายอยู่ทั่วทุกพื้นที่ของแปลงปลูก โดยการพัดพาของลม ฝน หรือแมลง ทำให้สปอร์ของเชื้อแพร่กระจายไปยังที่ต่างๆ เมื่อสปอร์ของเชื้อมีความชื้นที่เหมาะสมก็สามารถเจริญเติบโตเป็นเส้นใยของเชื้อรา เมื่อเส้นใยของเชื้อราเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชในขั้นรุนแรง ทำให้พืชมีอาการใบแห้ง บิดเบี้ยว และร่วงหล่น ช่อดอกแห้ง ไม่ติดผล ผลร่วง และเน่าหลังการเก็บเกี่ยว เป็นสาเหตุให้คุณภาพผลผลิตลดลง (F.F.Fu et al., 2020) การป้องกันและกำจัดโรคโดยการตัดแต่งกิ่งมะม่วงที่เป็นโรคและเผาทำลายแหล่งสะสมของเชื้อสามารถลดปริมาณเชื้อได้เป็นอย่างดี การใช้สารเคมีโดยฉีดพ่นยาฆ่าแมลงและยาป้องกันเชื้อราเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ป้องกันกำจัดโรคในมะม่วง จะใช้ในช่วงที่เชื้อโรคเริ่มเข้าทำลายเซลล์พืช และช่วงที่มะม่วงมีความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค เช่น แตกใบอ่อน การออกดอก และติดผล เป็นต้น การใช้สารเคมีสามารถทำลายเชื้อได้ทันทีและมีประสิทธิภาพในการทำลายสูง การฉีดพ่นเป็นประจำอย่างสม่ำเสมอช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคและลดความเสียหายของผลผลิตได้เป็นอย่างดี

การเข้าทำลายมะม่วงของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไม่สามารถคาดการณ์การเกิดโรคในมะม่วงได้จนกว่ามะม่วงจะแสดงอาการของโรค การวินิจฉัยโรคในระยะเริ่มแรกจึงมีความสำคัญในการป้องการเกิดโรครวมทั้งป้องกันการแพร่กระจายของโรคไปยังส่วนต่างๆ ของมะม่วง (Ren et al., 2020) วิธีการตรวจสอบเชื้อก่อโรคด้วยวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการมีขั้นตอนที่ซับซ้อนและใช้ระยะเวลานานกว่าที่จะยืนยันชนิดของเชื้อได้ ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยามาใช้ในการทำนายการเกิดโรคเพิ่มมากขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอของเชื้อที่ก่อโรคในบริเวณที่จำเพาะเพื่อตรวจสอบความแตกต่างของยีนที่ผิดปกติหรือยีนที่ทำให้เกิดโรค เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ เทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification; LAMP (S. Fu et al., 2011) มาใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์เชื้อ *C. gloeosporioides* โดยอาศัยหลักการของการเพิ่มขยายยีนโดยใช้ไพรเมอร์ที่สามารถตรวจสอบยีนที่มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายได้ การเพิ่มขยายยีนจะใช้อุณหภูมิเพียงอุณหภูมิเดียว ภายในระยะเวลา 30–60 นาที และสามารถตรวจสอบยีนที่เพิ่มขยายได้ไปในขั้นตอนเดียวกัน โดยสังเกตความขุ่นเกิดจากการจับกันระหว่าง Magnesium ions กับ Pyrophosphate ions ในปฏิกิริยา LAMP และเกิดเป็นตะกอนสีขาวของ

"Magnesium–DNA pyrophosphate complex" จึงสามารถสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า ถ้ามีความขุ่นแสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Mori et al., 2001)

ดังนั้นจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ ด้วยเทคนิค LAMP เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ โดยงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ด้วยเทคนิค LAMP และตรวจสอบค่าความไว ค่าความจำเพาะของเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีการที่แม่นยำ สามารถนำมาใช้จำแนกชนิดเชื้อราเพื่อลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้ระยะเวลานาน ทำให้สะดวกและรวดเร็วในการตรวจสอบโรค (Lan et al., 2020) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายของเชื้อด้วยเครื่องมืออย่างง่ายและราคาไม่สูงมาก จึงเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ ในการใช้ตรวจหาเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ในพืชชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเฝ้าระวังและป้องกันโรคกับพืชได้หลากหลายชนิด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรที่ปลูกพืชชนิดอื่นๆ ที่ประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคแอนแทรคโนส

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

รวบรวมข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการสำรวจและเก็บตัวอย่างมะม่วงสายพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองที่มีรอยโรคของเชื้อราจากร้านค้าในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี จำนวน 20 ตัวอย่าง พิจารณาจำแนกตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์ นำตัวอย่างมาสังเกตลักษณะรอยโรคของมะม่วง

2. การคัดแยกเชื้อราบริสุทธิ์

เก็บตัวอย่างผลมะม่วงสายพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส นำมาแยกเชื้อราด้วยวิธี Tissue transplanting ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของการ Dionisio de Guzman Alvindia และ Mark Anthony Angeles Mangoba โดยล้างชิ้นส่วนของพืชบริเวณเปลือกของผลมะม่วงด้วยน้ำไหลเป็นเวลา 15 นาที และตัดชิ้นส่วนผลมะม่วงที่เป็นโรคที่ติดกับชิ้นส่วนปกติเป็นชิ้นขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อชิ้นส่วนมะม่วงที่ตัดแล้วด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ (Sodium hypochlorite) 10% เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยวิธีการเขย่าในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นเวลา 1 นาที ทั้งหมด 3 ครั้ง ซับให้แห้งและนำมาวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar; PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5–7 วัน คัดเลือกเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยสีขาวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใหม่ และเก็บเชื้อราบริสุทธิ์เพื่อนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป (De Guzman Alvindia & Mangoba, 2020)

3. การศึกษาลักษณะของเชื้อรา

การศึกษาลักษณะของเชื้อราด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนแผ่นสไลด์ (Slide culture) ซึ่งใช้สำหรับศึกษาลักษณะโครงสร้างต่างๆ ของเชื้อรา โดยเตรียมแผ่นสไลด์มาวางบนแท่งแก้วงอใส่ลงไปในจานเพาะเชื้อ และใส่สำลีลงไปด้านข้างของจานเพาะเชื้อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ จากนั้นตัดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 0.5X0.5 เซนติเมตร วางบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ และใช้เข็มเขี่ยเชื้อราที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเส้นใยของเชื้อรามาแตะตรงขอบด้านข้างของชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บนแผ่นสไลด์ทั้งหมด 4 ด้าน และวางกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) ลงบนชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5–10 วัน จากนั้นนำไปตรวจลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รุ่น ECLIPSE E 200 ยี่ห้อ Nikon)

4. การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยงเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหาร PDA เก็บเสนใยของเชื้อราลงใน Microcentrifuge tube สกัดดีเอ็นเอโดยวิธี Bust n' Grab โดยเขี่ยเส้นใยของเชื้อราลงใน Microcentrifuge tube เติม Lysis buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บดเส้นใยให้ละเอียด จากนั้นนำไปทำ Heat shock โดยแช่ในน้ำแข็งแห้งเป็นระยะเวลา 2 นาที และแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที ทำ Heat shock ทั้งหมด 3 ครั้ง เสร็จแล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge 3 นาที ที่ความเร็ว 20,000 รอบต่อนาที ดูดส่วนใสที่มีสารพันธุกรรมอยู่ด้านบนของหลอดปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงหลอด Centrifuge ใหม่ และเติมเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็นไว้ ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งหลอด Centrifuge ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5 นาที และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที และดูดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนไปทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 5 นาที เก็บดีเอ็นเอใน TE buffer ปริมาตร 25–50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส โดยดัดแปลงมาจาก (Harju, Fedosyuk & Peterson, 2004)

5. การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธี LAMP

ในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธี LAMP ส่วนประกอบของปฏิกิริยา LAMP (ปริมาตร 25 ไมโครลิตร) ดังนี้ dNTP 1.6 มิลลิโมลาร์ (mM) *Bst*2 4 ยูนิต (Unit) $MgSO_4$ 0.4 มิลลิโมลาร์ 10X Thermopol 0.5 โมลาร์ (M) Betaine 0.5 โมลาร์ Primer F3 Primer B3 Primer B Primer F Primer FIP และ Primer BIF อย่างละ 2 ไมโครโมลาร์ (µM) และเติมดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอลงไปปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่อง Dry thermal block ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และตรวจสอบผลผลิต LAMP ด้วยวิธี Gel electrophoresis

โดยใช้ 2% Agarose ที่ผสม Red Saft Nucleic Acid Staining Solution 20,000x (บริษัท iNtRON Biotechnology ประเทศเกาหลี) แล้วตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transilluminator การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธี LAMP ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. gloeosporioides* โดยใช้ยีน Glutamine synthetase (GS) (GenBank ID: DQ792872.1) มีขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับ 181 คู่เบส (base pair (bp)) โดยดัดแปลงมาจาก (Wang et al., 2017) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยมีขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับ 181 คู่เบส (Wang et al., 2017)

Primer type	Sequence (5′ –3′)	Length
F3	GCTGCAGCCGGAAAATCC	18 nt
B3	GGCAGACTCGGAGAGACC	18 nt
FIP	ACCGGCTCAGCTGCAACGCACACGAGCAAAAGGATACGC	39 nt
BIP	TAATGCCTTTCACGACCTGCGGCCGAGGCAATGATTCCTCAA	42 nt
LF	CGGGCCAACGCTGGAAAA	18 nt
LB	GGCGCAACAAAGCTGGG	17 nt

6. ทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP

นำดีเอ็นเอของเชื้อราที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางแบบลำดับส่วน (10 fold serial dilution) ตั้งแต่ 10^{-1}–10^{-9} แล้วนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค LAMP จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วย 2% Agarose gel electrophoresis (Wu, Hu, & Zhang, 2019)

7. การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

เชื้อที่ใช้ทดสอบความจำเพาะ ได้แก่ *Phytophthora palmivora Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *และ Rhizobium* sp. โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5–10 วัน แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค LAMP และตรวจสอบด้วย 2% Agarose gel electrophoresis

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อราบริสุทธิ์

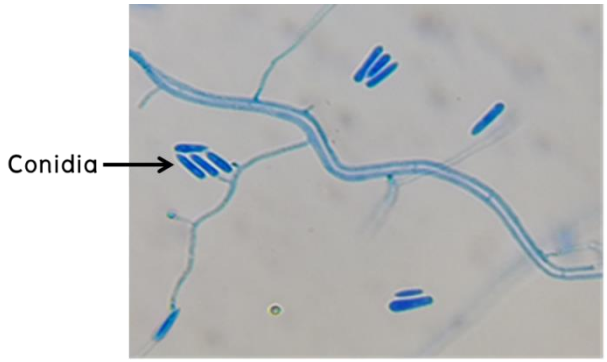
จากการศึกษาลักษณะโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงน้ำดอกไม้ พบว่า ผลมะม่วงมีลักษณะเป็นจุดทรงกลมสีน้ำตาลหรือสีดำ มีขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ และสามารถลุกลามทั่วผลมะม่วงให้ผลมะม่วงเกิดการเน่าเสียทั้งผลได้ และจากการนำชิ้นส่วนของเปลือกมะม่วงที่เป็นโรคแอนแทรคโนสมาศึกษาลักษณะเส้นใยของเชื้อราบนอาหาร PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5–10 วัน โดยคัดแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ พบว่า เชื้อราเจริญเติบโตได้ช้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เริ่มแรกจะมีลักษณะเส้นใยเป็น

สีขาวเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเทา ของโคโลนีเรียบเจริญเป็นวงแหวน (Concentric ring) ต่อมาเส้นใยของเชื้อราจะสร้างสปอร์สีส้ม เส้นใยฟูเล็กน้อย ดังภาพที่ 1

ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

2. การศึกษาลักษณะของเชื้อรา

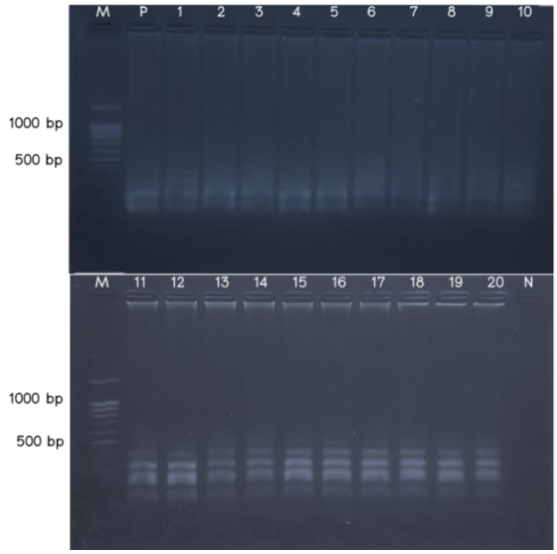
การศึกษาลักษณะของเชื้อราด้วยวิธี Slide culture ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า เส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สร้างกลุ่มโคนิเดีย (Conidia) ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์เดียว ทรงกระบอก (Oblong) หรือรูปไข่ (Ovoid) ไม่มีผนังกั้น และไม่มีสี ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โคนิเดียของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

3. การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธี LAMP

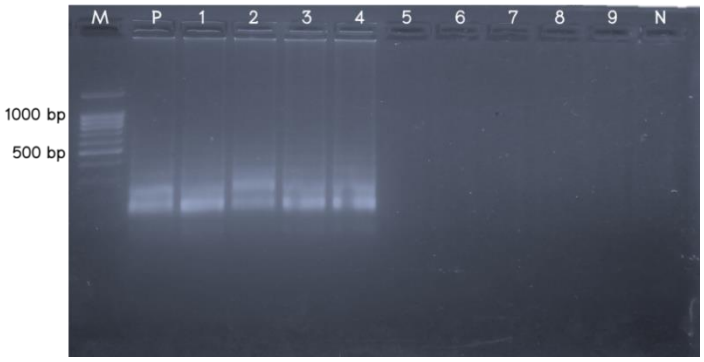
สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี LAMP ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์สามารถจับกับยีนเป้าหมาย ได้ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การตรวจ *C. gloeosporioides* ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis 20 ตัวอย่าง, M: DNA marker, P: positive control, 1–20: ตัวอย่างที่ 1–20 และ N: negative (น้ำกลั่น)

4. การทดสอบความไว (Sensitivity)

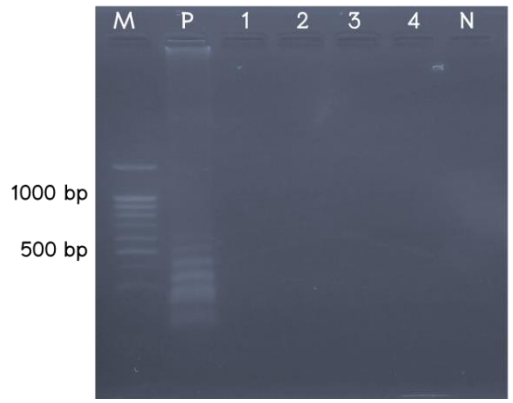
การทดสอบความไวเชิงวินิจฉัยของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่สามารถตรวจสอบการเกิดโรคในมะม่วง ด้วยวิธี Loop mediated isothermal amplification; LAMP โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางแบบลำดับส่วน 10 เท่า (10 Fold serial dilution) ตั้งแต่ 10^{-1}–10^{-9} พบว่า สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ $50x10^{-4}$ หรือ 0.005 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การทดสอบความไวของเชื้อ *C. gloeosporioides* ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis M: DNA marker, P: positive control (*C. gloeosporioides*) 1: $50x10^{-1}$, 2: $50x10^{-2}$ 3: $50x10^{-3}$ 4: $50x10^{-4}$ 5: $50x10^{-5}$ 6: $50x10^{-6}$ 7: $50x10^{-7}$ 8: $50x10^{-8}$ 9: $50x10^{-9}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ N: negative control (น้ำกลั่น)

5. การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อทดสอบที่ใช้วิเคราะห์ความจำเพาะ ได้แก่ *Phytophthora palmivora*, *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. และ *Rhizobium* sp. มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เชื้อราชนิดอื่นที่ใช้วิเคราะห์ความจำเพาะไม่เกิดการข้ามกันของเชื้อ *C. gloeosporioides* ในปฏิกิริยา LAMP เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย 2% Agarose gel electrophoresis ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การทดสอบความจำเพาะของเชื้อ *C. gloeosporioides* ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis M: DNA marker P: positive control (*C. gloeosporioides*) 1: *P. palmivora* 2: *Aspergillus* sp. 3: *Penicillium* sp. 4: *Rhizobium* sp. และ N:negative control (น้ำกลั่น)

อภิปรายผล

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวิเคราะห์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ ด้วยเทคนิค LAMP ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย โดยทดสอบตัวอย่างมะม่วงน้ำดอกไม้จำนวน 20 ตัวอย่าง ทดสอบความไว และความจำเพาะ จากการทดสอบตัวอย่างในมะม่วงน้ำดอกไม้ด้วยเทคนิค LAMP และนำมาตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis พบว่า ได้ผลบวกจำนวน 20 ตัวอย่าง การทดสอบความไวของเทคนิค LAMP พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่ 0.005 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถตรวจพบปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อใน Agarose gel electrophoresis ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Wang et al.,2017 ที่ศึกษาเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในถั่วเหลือง โดยรายงานว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ คือ 1 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (pg/ml) สำหรับการทดสอบความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย พบว่า ยีนที่นำมาทดสอบมีความจำเพาะต่อเชื้อ *C. gloeosporioides* โดยไม่เกิดการจับกับดีเอ็นเอของเชื้ออื่นๆ ที่นำมาทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang et al.,

2017 ที่รายงานว่า ยีน glutamine synthetase (GS) มีความจำเพาะต่อเชื้อ *C. gloeosporioides* และไม่พบการจับกันของเชื้อ *Colletotrichum* สายพันธุ์อื่นๆ และเชื้อราชนิดอื่นๆ ซึ่งการศึกษางานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเครื่องมืออย่างง่ายสำหรับการวินิจฉัยโรคแอนแทรคโนสที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *C. gloeosporioides* โดยตรวจสอบเชื้อได้แม้มีปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย และไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ โดยพบว่า มีผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang et al., 2017 ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์ในการตรวจภาคสนามให้กับเกษตรกรได้ด้วยวิธีการทดสอบอย่างรวดเร็ว

การศึกษาเส้นใยของเชื้อราบนอาหาร PDA พบว่า เชื้อราสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และมีลักษณะเส้นใยฟูสีขาว หรือมีสีเทาเมื่อเชื้อเจริญโดยใช้ระยะเวลานานมากขึ้น โคโลนีขอบเรียบเจริญเป็นวงแหวน สร้างสปอร์สีส้ม การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อ *C. gloeosporioides* พบว่า เชื้อสามารถสร้างกลุ่มโคนิเดีย มีลักษณะเป็นเซลล์เดียว ทรงกระบอกหรือรูปไข่ ไม่มีผนังกั้น และไม่มีสี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Kwodaga, Sowley & Badii, 2020) ที่ได้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากมันเทศ พบว่า เชื้อราที่จำแนกได้มีลักษณะของโคนิเดียทรงกระบอก ปลายทั้งสองข้างมีลักษณะมน ไม่มี Setae ใน *C. gloeosporioides*, *C. musae* และ Unidentified species *Colletotrichum* spp. 10 ชนิด

ดังนั้นวิธีตรวจวินิจฉัยโรคแอนแทรคโนสที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในมะม่วงน้ำดอกไม้ ด้วยเทคนิค LAMP สามารถตรวจวินิจฉัยได้ด้วยอุปกรณ์ที่ราคาไม่แพง และตรวจสอบเชื้อได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว สำหรับงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในต้นกล้าที่ปลูกในระยะเริ่มแรกเพื่อตรวจสอบการติดเชื้อของต้นกล้าในการเพาะปลูกซึ่งมีความสำคัญมาก หากต้นกล้าติดเชื้อสามารถหาแนวทางในการกำจัดเชื้อได้อย่างรวดเร็วเพื่อประสิทธิภาพในการเพาะปลูก นอกจากนี้ยังเป็นการเฝ้าระวังและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคในพืชชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเฝ้าระวังและป้องกันโรคให้กับพืชชนิดอื่นได้

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *C.gloeosporioides* เพื่อการวินิจฉัยโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ สามารถตรวจได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งใช้อุณหภูมิคงที่ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยใช้เครื่องมืออย่างง่ายด้วยเครื่อง Dry thermal block ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยโรคในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อได้ แม้มีปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อเพียงเล็กน้อย โดยมีค่าความไวของการตรวจวิเคราะห์เชื้อ $50x10^{-4}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถตรวจเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้อย่างจำเพาะ โดยไม่จับกับเชื้อชนิดอื่น ดังนั้นเทคนิค LAMP จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยเชื้อราที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคแอนแทรคโนสได้ นอกจากนี้ยังสามารถวินิจฉัยด้วยอุปกรณ์และเครื่องมือที่มีราคาไม่สูงมาก และ

สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสามารถใช้เป็นแนวทางในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *C. gloeosporioides* ในมะม่วงที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส และสามารถนำไปใช้ในการตรวจเชื้อให้กับเกษตรกรได้ นอกจากนั้นยังสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อพัฒนาการตรวจสอบวินิจฉัยเชื้อ *C. gloeosporioides* ในพืชชนิดอื่นที่อาจแสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อกับพืชชนิดอื่นๆ ได้อย่างหลากหลายมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

เอกสารอ้างอิง

Arauz, L.F. (2000). Mango Anthracnose: Economic Impact and Current Options For Integrated Managaement. **Plant Dis, 84**(6), 600–611.

De Guzman Alvindia, D., & Mangoba, M.A.A. (2020). Bioactivities of Allium longicuspis Regel against anthracnose of mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). **Sci Rep, 10**(1), 11367.

Fu, F.F., Hao, Z., Wang, P., Lu, Y., Xue, L. J., Wei, G., . . . , & Chen, J. (2020). Genome Sequence and Comparative Analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolated from Liriodendron Leaves. **Phytopathology, 110**(7), 1260–1269.

Fu, S., Qu, G., Guo, S., Ma, L., Zhang, N., Zhang, S., . . . , & Shen, Z. (2011). Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. **Appl Biochem Biotechnol, 163**(7), 845–850.

Ganogpichayagrai, A., Rungsihirunrat, K., Palanuvej, C., & Ruangrungsi, N. (2016). Characterization of Mangifera indica cultivars in Thailand based on macroscopic, microscopic, and genetic characters. **J Adv Pharm Technol Res, 7**(4), 127–133.

Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K.R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. **BMC Biotechnol, 4**, 8.

Kwodaga, J.K., Sowley, E.N.K., & Badii, B.K. (2020). Morphological and molecular characterisation of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) isolates obtained from Dioscorea rotundata (Poir). **African Journal of Biotechnology, 19**(5), 231–239.

Lan, C., Yao, J., Yang, X., Ruan, H., Yu, D., & Jiang, J. (2020). Specific and sensitive detection of the guava fruit anthracnose pathogen (*Colletotrichum gloeosporioides*) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. **Can J Microbiol, 66**(1), 17–24.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., & Notomi, T. (2001). Detection of loop–mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. **Biochem Biophys Res Commun, 289**(1), 150–154.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop–mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res, 28**(12), E63.

Ren, Y., Xue, Y., Tian, D., Zhang, L., Xiao, G., & He, J. (2020). Improvement of Postharvest Anthracnose Resistance in Mango Fruit by Nitric Oxide and the Possible Mechanisms Involved. **J Agric Food Chem, 68**(52), 15460–15467.

Tovar–Pedraza, J.M., Mora–Aguilera, J.A., Nava–Diaz, C., Lima, N.B., Michereff, S.J., Sandoval–Islas, J.S., . . . Leyva–Mir, S.G. (2020). Distribution and Pathogenicity of *Colletotrichum* Species Associated With Mango Anthracnose in Mexico. **Plant Dis, 104**(1), 137–146.

Wang, S., Ye, W., Tian, Q., Dong, S., & Zheng, X. (2017). Rapid detection of *Colletotrichum gloeosporioides* using a loop–mediated isothermal amplification assay. **Australasian Plant Pathol, 46**, 493–498.

Wu, J.Y., Hu, X.R., & Zhang, C.Q. (2019). Molecular Detection of QoI Resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Strawberry Anthracnose Based on Loop–Mediated Isothermal Amplification Assay. **Plant Dis, 103**(6), 1319–1325.