รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : **วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช**

2. โครงการวิจัย : **อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ**

กิจกรรมที่ 3 : **วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ**

กิจกรรมย่อยที่ 3.2 : **การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยอณูชีววิธี**

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : **การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมาด้วยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)**

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Detection of *Ralstonia solanacearum* in Curcuma by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : **ทิพวรรณ กันหาญาติ**
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : **ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล**
บูรณี พั่ววงษ์แพทย์
รุ่งนภา ทองเครื่ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

การทดสอบใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจสอบเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2556 – กันยายน 2558 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิคงที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิสพบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันได การทดสอบความจำเพาะในการตรวจ พบว่าเทคนิค LAMP มีความจำเพาะเจาะจงสามารถตรวจสอบเชื้อ *R. solanacearum* ที่พบในประเทศไทยได้ถูกต้องทุกสายพันธุ์และไม่เกิดผลบวกกับเชื้อแบคทีเรียที่มีโอกาสพบได้ในดิน โดยมีความไวในการตรวจ 10^4 CFU/ml และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวิธีการตรวจสอบเชื้อในหัวพันธุ์ปทุมมาได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ พัฒนาวิธีการตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยตาเปล่าเพื่อให้สะดวกต่อการปฏิบัติงาน โดยใช้สารเรืองแสง SYBR Green I ในการตรวจ พบว่าเมื่อเติมสารเรืองแสงในตัวอย่างที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเกิดขึ้น สารมีการเปลี่ยนแปลงโดยปรากฏ

การเรืองแสงของสารเป็นสีเขียว ส่วนตัวอย่างที่ไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสารดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส

Abstract

Loop-mediated amplification (LAMP) was conducted to detect *Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt of curcuma during October 2013 – September 2015. Reaction condition was optimized to complete in 30 min at 65°C and showed a typical ladder-like pattern after electrophoresis in an agarose gel. The specificity of LAMP was determined using *R. solanacearum* from Bacterial Culture Collection. The LAMP reaction could be detected all *R. solanacearum* strains and discriminated them from other bacteria. The sensitivity of this technique was at 10^4 CFU/ml. Visual inspection using SYBR Green I was developed and evaluated to detect the presence of *R. solanacearum* in curcuma. The samples giving positive reaction showed a green color with the addition of SYBR Green I, while the negative control remained orange. Detection of amplification products could be accomplished by visual inspection using SYBR Green I as well as agarose gel electrophoresis. It could be indicated that the LAMP technique is a potential, easy and rapid tool to detect *R. solanacearum* in curcuma.

6. คำนำ

ปทุมมาเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย สามารถส่งออกทำรายได้เข้าสู่ประเทศถึง 15-30 ล้านบาทต่อปี ซึ่งส่วนมากจะทำการปลูกปทุมมาเพื่อการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศในรูปของหัวพันธุ์ โดยผลิตหัวพันธุ์เพื่อการจำหน่ายปีละไม่ต่ำกว่า 2 ล้านหัวต่อปี (อรวรรณ, 2548) แต่ปัญหาสำคัญในการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาคือ โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ระบาดทำความเสียหายให้กับเกษตรกรและผู้ส่งออก เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์ปทุมมาได้และเป็นเชื้อโรคที่สำคัญทางกักกันพืช ถ้าพบเชื้อนี้ติดไปกับหัวพันธุ์ที่ส่งออก หัวพันธุ์เหล่านั้นจะถูกเผาทำลายทันที ทำให้ไม่สามารถส่งออกได้ จึงต้องหาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ การใช้วิธีทางเซรุ่มวิทยามีข้อจำกัดในการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อซาโปรไฟต์ชนิดอื่นๆ ทำให้เกิดผิดพลาดในการตรวจสอบ นอกจากนี้วิธีทางเซรุ่มวิทยายังมีความไวในการตรวจสอบต่ำกว่าวิธีทางอณูชีววิทยา เทคนิค PCR เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่เฉพาะเจาะจง ตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยในตัวอย่างพืชได้ โดยจะใช้เวลาในการตรวจสอบนานประมาณ 3-4 ชั่วโมงขึ้นไป แต่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีความแม่นยำสูง เช่น เครื่อง PCR เครื่อง real time PCR ซึ่งมีราคาแพง และยังมีขั้นตอนการตรวจสอบยีนที่เพิ่มได้โดยใช้เครื่องมือเฉพาะ ทำให้ไม่สามารถนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กหรือใช้ในภาคสนามได้ ในปี ค.ศ. 2000 ได้มีรายงานการพัฒนาวิธีเพิ่มขยายยีนด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ขึ้นมาโดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่นชื่อ Tsugunori Notomi และคณะ ซึ่งได้ช่วยแก้ปัญหาที่สำคัญของเทคนิค PCR คือไม่ต้องใช้เครื่อง PCR เนื่องจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายยีน สามารถเกิดที่อุณหภูมิเดียวคือประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส และตรวจสอบยีนที่เพิ่มจำนวนได้ในขั้นตอนเดียวกัน (Natomi *et al*., 2000) เทคนิคนี้จึงเหมาะกับ

ประเทศที่กำลังพัฒนาหรือห้องปฏิบัติการเล็กๆ หรือสำหรับปฏิบัติการในภาคสนามได้ดี และสามารถนำไปปรับใช้ในงานกักกันพืชต่อไปในอนาคตได้

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น หลอดแก้ว จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลูป ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปิเปต

2. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น เครื่องชั่ง ตู้ควบคุมอุณหภูมิ หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermalcycler) เครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation)

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและทำปฏิกิริยา LAMP

4. เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

5. หัวพันธุ์ปทุมมา

- วิธีการ

1. เตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *R. solanacearum* ที่มีเก็บรวบรวมไว้ใน culture collection ของกลุ่มงานบักเตรีวิทยา และแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่นๆ มาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การสกัดดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรีย

ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 ลูป ละลายในบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นเติมด้วย Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมด้วยบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมด้วย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAamp Spin Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที นำ QIAamp Spin Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3. ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP

ทำการทดสอบหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใช้ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร เติมในปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2.0 μM FIP และ BIP, 0.4 μM F3 และ B3, 2.0 μM F loop และ B loop, 0.4 μM dNTPs, 1.0 M Betaine, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 6 mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100 และ 8U *Bst* DNA polymerase แล้วทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 60 และ 65 องศา

เซลเซียส และทดสอบเวลาที่ใช้นาน 30 และ 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

4. ตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากเทคนิค LAMP

ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิสเพื่อดูผลของปฏิกิริยา โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2% ใน 0.5X TBE (88.9 mM Tris, 8.9 mM boric acid, 2.5 mM EDTA) และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

5. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *R. solanacearum*

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใช้ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร เติมในปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2.0 μM FIP และ BIP, 0.4 μM F3 และ B3, 2.0 μM F loop และ B loop, 0.4 μM dNTPs, 1.0 M Betaine, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 6 mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100 และ 8U *Bst* DNA polymerase ทำปฏิกิริยาที่สภาวะที่เหมาะสม แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส

6. ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *R. solanacearum*

เลี้ยงเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จากปทุมมาบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง $O.D._{600\ nm}$ เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-8} เท่า จากนั้นเกลี่ยเชื้อให้กระจายบนอาหารด้วยวิธี spread plate บนอาหาร Triphenyltetrazolium chloride (TZC) ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น และใช้ suspension ที่เหลือแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร สำหรับเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใช้ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ส่วนที่เหลือเก็บไว้ทำซ้ำ 3 ซ้ำ ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส

7. ทดสอบเทคนิค LAMP ในการตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* จากตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมา

เตรียมตัวอย่างสำหรับทำปฏิกิริยา LAMP โดยนำหัวพันธุ์ปทุมมามาตัดแช่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อให้ท่วม ตั้งทิ้งไว้นาน 15 นาที ผสมกับเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จากปทุมมาความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-8} เท่า ใช้ส่วนน้ำใสสำหรับเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส และเตรียมตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมาที่ต้องการตรวจตัดแช่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อให้ท่วม ตั้งทิ้งไว้นาน 15 นาที นำส่วนน้ำใสมาแยกเชื้อ *R. solanacearum* โดยเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และใช้ส่วนน้ำใสสำหรับเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิสและตรวจด้วยตาเปล่า (visual detection) โดยใช้สารเรืองแสง SYBR Green I (Invitrogen) ที่ความเข้มข้น 1:10 เติมลงไปในหลอดหลังทำปฏิกิริยาเสร็จ สังเกตการเรืองแสงของสาร

- เวลาและสถานที่

ต.ค. 56 – ก.ย. 58 ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมและตรวจสอบผลของปฏิกิริยา LAMP

สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจเชื้อ *R. solanacearum* เริ่มจากเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2.0 µM FIP และ BIP, 0.4 µM F3 และ B3, 2.0 µM F loop และ B loop (ตารางที่ 1), 0.4 µM dNTPs, 1.0 M Betaine, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 6 mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100 และ 8U *Bst* DNA polymerase บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส พบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันไดซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP (Natomi *et al*., 2000) ในการทดสอบหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 และ 60 นาที ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Lenarčič *et al*. (2014) ซึ่งใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Isothermal Master Mix (Optigene Ltd., Horsham, UK) และเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase (New England Biolab, USA) ที่ใช้ในการทดลองมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตคือ 65 องศาเซลเซียส เทคนิค LAMP สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้อุณหภูมิเดียว (isothermal) ในช่วงอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส และไม่ต้องอาศัยกระบวนการแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบก่อน เนื่องจากเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase มีคุณสมบัติแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวได้ (strand displacement) อย่างไรก็ตาม การแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบก่อนและการเติม loop primer จะช่วยย่นระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วยิ่งขึ้น (Nagamine *et al*., 2002)

2. การทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *R. solanacearum*

การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *R. solanacearum* โดยนำเชื้อ *R. solanacearum* ที่มีอยู่ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชที่แยกได้จากหลายพืชอาศัยได้แก่ มันฝรั่ง ยาสูบ พริก มะเขือเทศ มะเขือยาว มะเขือเปราะ ยูคาลิปตัส ถั่วลิสง ขิง บัวสวรรค์ และปทุมมา (ตารางที่ 2) มาทดสอบ พบว่าสามารถตรวจเชื้อ *R. solanacearum* ได้ถูกต้องทุกสายพันธุ์และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและซาโปรไฟต์ที่มีโอกาสพบได้ในดินหรือผิวพืช ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi* และ *Pantoea* sp. (รูปที่ 1) โดยมีความไวในการตรวจสอบเชื้อ 10^4 CFU/ml (รูปที่ 2) สอดคล้องกับรายงานของ Kubota *et al*. (2008) และ Lenarčič *et al*. (2014) ที่ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *R. solanacearum* เช่นเดียวกัน

3. การทดสอบเทคนิค LAMP ในการตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* จากตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมา

การทดสอบเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *R. solanacearum* จากตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมาที่ผสมกับเชื้อ *R. solanacearum* ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบความไว สามารถตรวจพบเชื้อที่ 10^4 CFU/ml และผลการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมาที่ต้องการตรวจตัดแช่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้ส่วนน้ำใสสำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส พบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันไดในทุกตัวอย่างที่แยกได้เชื้อ *R. solanacearum* บนอาหาร PSA ส่วนการตรวจสอบผลด้วยตาเปล่า โดยเติมสารเรืองแสง SYBR Green I อัตราตามรายงานของ Iwamoto *et al*. (2003) ลงไปในหลอดหลังทำปฏิกิริยาเสร็จ พบว่าสารเรืองแสง SYBR Green I เปลี่ยนจากสีส้มเป็นเรืองแสงสีเขียวในทุกตัวอย่างที่แยกได้เชื้อ *R. solanacearum* บนอาหาร PSA สอดคล้องกับการตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส (รูปที่ 3)

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค LAMP มาประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อสาเหตุโรคในคน สัตว์ และเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ความไวในการตรวจสอบขึ้นอยู่กับตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ คุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบ และวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบผล สำหรับเชื้อสาเหตุโรคพืชได้มีการนำเทคนิค LAMP มาใช้ในตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* พบว่าสามารถตรวจเชื้อได้ถูกต้อง ไม่เกิดผลบวกกับแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent pseudomonads ชนิดอื่นๆ โดยมีความไวในการตรวจ 6.9×10^3 CFU/ml (Li *et al*., 2009) Rigano *et al*. (2010) ใช้เทคนิค LAMP ตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ได้ดีเช่นกัน สามารถตรวจดีเอ็นเอของเชื้อได้ที่ความเข้มข้น 10 fg และจากตัวอย่างพืชความเข้มข้นเชื้อ 18 CFU รายงานของ Yasuhara-Bell *et al*. (2013) ซึ่งใช้ LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* สาเหตุโรคแผลสะเก็ด (bacterial canker) ของมะเขือเทศโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากส่วนของยีน *micA* พบว่ามีความจำเพาะสูงสามารถตรวจเชื้อได้ถูกต้องทั้ง 351 สายพันธุ์ และการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคข้าวที่สำคัญได้แก่ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* โดยใช้ LAMP พบว่าสามารถตรวจดีเอ็นเอของเชื้อได้ที่ 1 pg-10 fg และที่ 10^4-10^5 CFU/ml เมื่อตรวจจากตัวอย่างใบและเมล็ด (Lang *et al*., 2014) จากข้อดีในด้านความรวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในอุณหภูมิเดียวโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิหรือ heat block ได้ LAMP จึงเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่น่าจะเข้ามามีบทบาทและใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชแบบรู้ผลเร็วโดยเฉพาะอย่างยิ่งในห้องปฏิบัติการที่มีทรัพยากรจำกัด

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ *R. solanacearum* ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที การทดสอบความจำเพาะในการตรวจ พบว่าเทคนิค LAMP มีความจำเพาะเจาะจงสามารถตรวจสอบเชื้อ *R. solanacearum* ที่พบในประเทศไทยได้ถูกต้องทุกสายพันธุ์และไม่เกิดผลบวกกับเชื้อแบคทีเรียที่มีโอกาสพบได้ในดิน โดยมีความไวในการตรวจ 10^4 CFU/ml สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวิธีการตรวจสอบเชื้อในหัวพันธุ์ปทุมมาได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ และตรวจสอบผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาได้ทั้งวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิสและตรวจด้วยตาเปล่า

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำเทคนิค LAMP ไปพัฒนาต่อเพื่อใช้ในการตรวจเชื้อ *R. solanacearum* จากตัวอย่างพืชอื่นๆ นอกเหนือจากหัวพันธุ์ปทุมมา

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

-

12. เอกสารอ้างอิง

อรวรรณ วิชัยลักษณ์. 2548. เอกสารวิชาการเรื่องปทุมมา. เอกสารเผยแพร่ กลุ่มส่งเสริมการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ กรมส่งเสริมการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ. 131 หน้า.

Iwamoto T., T. Sonobe and K. Hayashi. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium* and *M. intracellulare* in sputum samples. *J. Clinical Microbiology* 41: 2616-2622.

Kubota R., B.G. Vine, A.M. Alvarez and D.M. Jenkins. 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathol*. 98: 1045-1051.

Lang J.M., P. Langlois, M.H. Nguyen, L.R. Triplett, L. Purdie, T.A. Holton, A. Djikeng, C.M. Vera Cruz, V. Verdier and J.E. Leach. 2014. Sensitive detection of *Xanthomonas oryzae* pathovars oryzae and oryzicola by Loop-mediated isothermal amplification. *Appl Environ Microbiol*. 80: 4519-4530.

Lenarčič R., D. Morisset, M. Pric, P. Llop, M. Ravnikar and T. Dreo. 2014. Loop-mediated isothermal amplification of specific endonuclease gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. PloS ONE 9(4) : e96027. doi: 10.1371/journal.pone.0096027.

Li X., J. Nie , L. Ward , M. Madani, T. Hsiang, Y. Zhao and S.H.D. Boer. 2009. Comparative genomics-guided loop-mediated isothermal amplification for characterization of *Pseudomonas syringae* pv. p*haseolicola*. *J. Appl. Microbiol*.107: 717-726.

Nagamine K., T. Hase and T. Notomi. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* 16: 223-229.

Notomi T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Wananabe, N. Amino and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 28: e63.

Rigano L.A., M.R. Maran, A.P. Castagnar, A.M. Amarala and A.A. Vojnov. 2010. Rapid and sensitive detection of citrus bacterial canker by loop-mediated isothermal amplification combined with simple visual evaluation method. BMC *Microbiol*.10: 176.

Yasuhara-Bell J., R. Kubota, D. M. Jenkins and A. M. Alvarez. 2013. Loop-mediated amplification of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis micA* gene is highly specific. *Phytopathol.* 103: 1220-1226.

13. ภาคผนวก

-

ตารางที่ 1 ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยเทคนิค LAMP

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	อ้างอิง
F3_RS_egl	5'-GAGCAACTACATCTATCCGTC-3'	Lenarčič *et al.*
B3_RS_egl	5'-CATCAGCCCGAAGATGAC-3'	(2014)
FIP_RS_egl	5'-ACAGCTCGTTCGCGTCGACGACAGCGCGACCTACTA-3'	
FIP_RS_egl	5'-GGTTCGTCAACGCCGTGAGATCACGTTGCCGTAGTAG-3'	
FLoop_RS_egl	5'-GTTCATGCCCTTGTTCTTG-3'	
BLoop_RS_egl	5'-GCTCGATCCGCACAACTA-3'	

ตารางที่ 2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP

เชื้อแบคทีเรีย	สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งที่มา
Ralstonia solanacearum	RS402	มันฝรั่ง	เชียงใหม่
	RS555	มันฝรั่ง	เชียงใหม่
	RS556	มันฝรั่ง	เชียงใหม่
	RS1162	มันฝรั่ง	เชียงใหม่
	RS1251	มันฝรั่ง	เชียงใหม่
	RS1254	มันฝรั่ง	ลำพูน
	RS1257	มันฝรั่ง	ตาก
	RS1262	มันฝรั่ง	เชียงใหม่
	RS1277	มันฝรั่ง	เลย
	RS2338	มันฝรั่ง	ตาก
	RS2339	มันฝรั่ง	ตาก
	RS2581	มันฝรั่ง	ตาก
	RS2583	มันฝรั่ง	ตาก
	RS2584	มันฝรั่ง	ตาก
	RS2585	มันฝรั่ง	ตาก
	RS2586	มันฝรั่ง	ตาก
	RS2587	มันฝรั่ง	ตาก

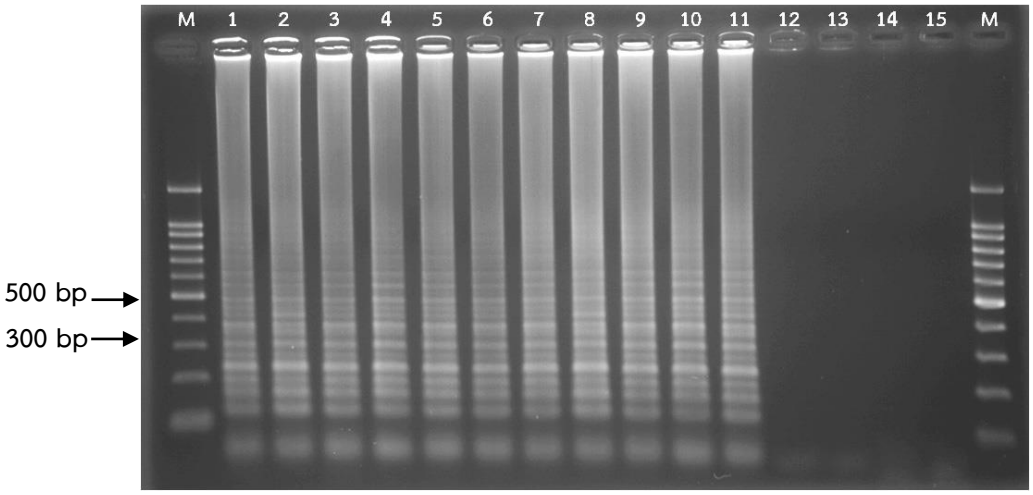
ตารางที่ 2 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งที่มา
R. solanacearum	RS264	มะเขือเทศ	นครปฐม
	RS1289	มะเขือเทศ	ลำปาง
	RS1391	มะเขือเทศ	ขอนแก่น
	RS1398	มะเขือเทศ	สกลนคร
	RS1406	มะเขือเทศ	นครพนม
	RS1421	มะเขือเทศ	ตาก
	RS1494	มะเขือเทศ	เชียงราย
	RS1607	มะเขือเทศ	หนองคาย
	RS21	มะเขือเทศ	ขอนแก่น
	RS1011	มะเขือยาว	ตรัง
	RS1506	มะเขือยาว	สุราษฎร์ธานี
	RS1341	มะเขือเปราะ	น่าน
	RS1355	มะเขือเปราะ	ปทุมธานี
	RS2327	มะเขือเปราะ	จันทบุรี
	RS525	ยาสูบ	สงขลา
	RS1401	ยาสูบ	นครพนม
	RS2204	ยาสูบ	เพชรบูรณ์
	RS1105	พริกขี้หนู	ประจวบคีรีขันธ์
	RS1382	พริกหยวก	กรุงเทพฯ
	RS1431	พริกชี้ฟ้า	เชียงราย
	RS1473	พริกหยวก	เชียงราย
	RS1496	พริกหนุ่ม	เชียงราย
	RS1563	พริกขี้หนู	ศรีสะเกษ
	RS1602	พริก	สกลนคร
	RS2323	พริก	สระแก้ว
	RS2577	พริก	แพร่
	RSS	พริก	เชียงใหม่
	RS1205	ถั่วลิสง	นครสวรรค์
	RS1461	ถั่วลิสง	นครสวรรค์
	RS1372	ยูคาลิปตัส	ฉะเชิงเทรา
	RS1374	ยูคาลิปตัส	ฉะเชิงเทรา
	RS1387	ดาวเรือง	กรุงเทพฯ

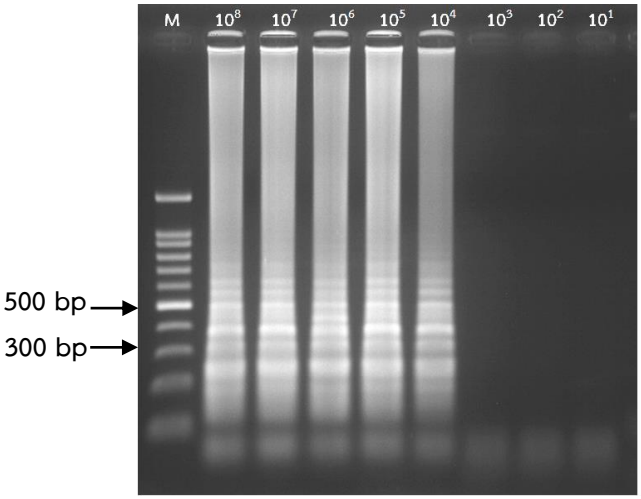
ตารางที่ 2 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งที่มา
R. solanacearum	RS1350	ขิง	เชียงราย
	RS1380	ขิง	เลย
	RS2156	ขิง	เพชรบูรณ์
	RS1217	บัวสวรรค์	เชียงใหม่
	RS1352	บัวสวรรค์	เชียงใหม่
	RS1438	ปทุมมา	เชียงราย
	RS1439	ปทุมมา	ลำพูน
	RS1476	ปทุมมา	เชียงราย
	RS1481	ปทุมมา	เชียงใหม่
	RS1512	ปทุมมา	เชียงราย
	RS2423	ปทุมมา	กาญจนบุรี
Erwinia carotovora subsp. *carotovora*	E681	หน่อไม้ฝรั่ง	เพชรบูรณ์
E. chrysanthemi	Ech	ว่านหางจระเข้	กาญจนบุรี
Pantoea sp.	Pan	ดิน	นครปฐม

[1/] เครื่องหมาย + คือ เกิดปฏิกิริยาเป็นบวก โดยพบแถบดีเอ็นเอแบบขั้นบันไดซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP เครื่องหมาย - คือ เกิดปฏิกิริยาเป็นลบ

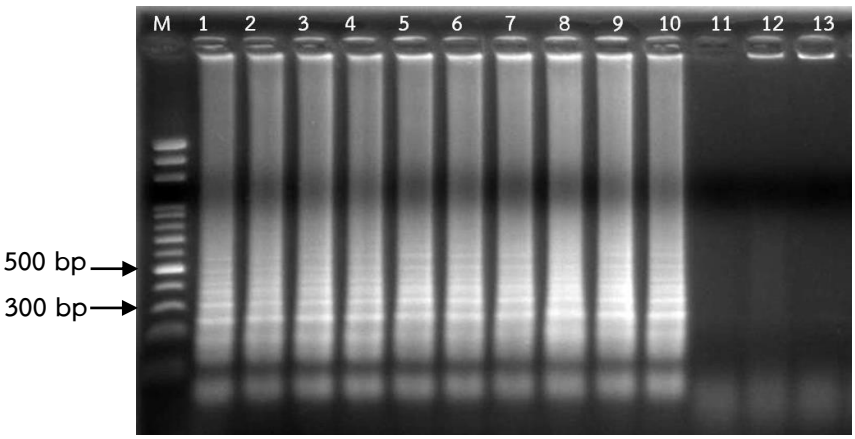


รูปที่ 1 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *R. solanacearum* โดย M คือ Gel Pilot 100 bp plus ladder, lane 1-11 คือ เชื้อ *R. solanacearum*, lane 12 คือ เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora*, lane 13 คือ เชื้อ *E. chrysanthemi*, lane 14 คือ เชื้อ *Pantoae* sp. และ lane 15 คือ dH_2O (negative control)

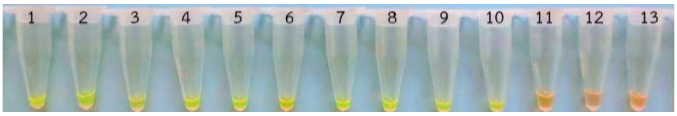


รูปที่ 2 ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *R. solanacearum* ความเข้มข้น 10^8 ถึง 10 CFU/ml ตามลำดับ โดย M คือ Gel Pilot 100 bp plus ladder

ก



ข



รูปที่ 3 ทดสอบเทคนิค LAMP ในการตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* จากตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมา (ก) ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส (ข) ตรวจด้วยตาเปล่าหลังเติมสาร SYBR Green I โดย M คือ Bio-100 bp DNA Ladder, lane 1-10 คือ หัวพันธุ์ปทุมมาที่มีเชื้อ *R. solanacearum*, lane 11-12 คือ หัวพันธุ์ปทุมมาปลอดเชื้อ และ lane 13 คือ dH_2O (negative control)