การตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium moniliforme* Sheld ปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดโดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ยีนที่จำเพาะต่อการผลิตสารพิษฟูโมนิซิน

Detection Method for *Fusarium moniliforme* Sheld Contaminated on Maize Seeds by Using PCR Technique with the Specified Fumonisin Gene

ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต[1] พรนิภา ถาโน[1] และ ฉันทนา คงนคร[1]

Supalak Sattayasamitsathit[1], Pornipa Thano[1] and Janana Kongnakorn[1]

บทคัดย่อ: *Fusarium moniliforme* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชในข้าวโพดและผลิตสารพิษฟูโมนิซินซึ่งมีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ วิธีการดั้งเดิมในการตรวจสอบเชื้อราที่ปนเปื้อนอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งต้องใช้เวลานาน มีความไวและความจำเพาะต่ำ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเปรียบเทียบไพรเมอร์เพื่อการตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ผลิตสารพิษฟูโมนิซินสำหรับการตรวจสอบเชื้อ *F. moniliforme* และทดสอบความจำเพาะเมื่อมีดีเอ็นเอของเชื้อราชนิดอื่น ๆ ปะปน ได้แก่ *Bipolaris maydis*, *Cephalosporium acremonium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* sp. และ *Penicillium sp.* และทดสอบในเมล็ดข้าวโพดที่ทำให้ติดเชื้อ *F. moniliforme* ในระดับต่าง ๆ พบว่า ไพรเมอร์ที่คัดเลือกสามารถตรวจสอบเชื้อ *F. moniliforme* ที่สร้างสารพิษฟูโมนิซินได้ทุกชนิดโดยมีปริมาณ *F. moniliforme* ต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้คือ 2% และสามารถตรวจสอบเมล็ดที่ติดเชื้อโดยไม่มีผลกระทบต่อเชื้อราต่างชนิดจึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *F. moniliforme* ในตัวอย่างข้าวโพดได้

คำสำคัญ: เชื้อราฟิวซาเรียม โมนิลิฟอร์ม, โรคต้นเน่า, เมล็ดพันธุ์ข้าวโพด, เทคนิคพีซีอาร์, สารพิษฟูโมนิซิน

ABSTRACT: *Fusarium moniliforme* is a fungal pathogen infect to maize. The fungi produce fumonisin which is associated with toxic effects in humans and animals. The traditional methods for detection of fungal contamination based on morphological characteristics. The method is time-consuming and show low sensitivity and specificity. Therefore, the objective of this study was to determine a PCR based on the fumonisin producing gene for *Fusarium moniliforme*. The DNA of the *Bipolaris maydis*, *Cephalosporium acremonium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* sp. and *Penicillium sp.* isolates was analyzed by conventional PCR. In maize samples inoculated with

[1]ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก 65130

[1]Phitsanulok Seed Research and Development Center, Wangthong, Phitsanulok 65130

F. moniliforme conidia, the detection limit of the PCR was 2%. The contaminated maize samples with various percent were analyzed by PCR based on the mycotoxin gene. These results suggest that all tested primers used in this study can be used for F. *moniliforme* detection in maize samples without interfering from the DNA from other fungal.

Key words: *Fusarium moniliforme* sheld, stalk rot, maize seeds, PCR technique, fumonisin

1. บทนำ

ประเทศไทยมีการผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพื่อเป็นเมล็ดพันธุ์และวัตถุดิบหลักที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์เป็นจำนวนมาก ซึ่งพบว่า เมล็ดข้าวโพดมีเชื้อโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และส่วนใหญ่จะพบเชื้อราซึ่งเป็นเชื้อราที่มีอยู่ทั่วไปในโรงเก็บและเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคสามารถติดต่อผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้แม้ในอัตราต่ำ นอกจากนี้เชื้อราบางชนิดยังสามารถผลิตสารพิษ เช่น *Fusarium moniliforme* มีการผลิตฟูโมนิซินซึ่งเป็นสารพิษกลุ่มอนุพันธ์โพลีคีไทด์ที่มีความเป็นพิษสูงต่อคนและสัตว์ ซึ่งลักษณะอาการต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นเมื่อได้รับฟูโมนิซินเข้าไป คือเกิดพิษต่อระบบประสาท ตับ ไต หัวใจ สมองบวม ทำให้เซลล์ตายรวมทั้งอาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งในหลอดอาหาร มีรายงานว่า สารพิษฟูโมนิซินมีทั้งหมด 7 ชนิดคือ ฟูโมนิซิน เอ1 เอ2 บี1 บี2 บี3 บี4 และ ซี1 ส่วนชนิดที่พบมากที่สุดและมีพิษรุนแรงได้แก่ ฟูโมนิซิน บี1 และบี2 (Bacon, 1994) นอกจากผลิตสารพิษแล้วเชื้อรา *Fusarium moniliforme* Sheld ยังเป็นสาเหตุของโรคต้นเน่า (Möller et al., 1999) ซึ่งพบทั่วไปในแหล่งที่มีการปลูกข้าวโพดและมักพบระบาดในระยะที่ข้าวโพดออกดอก อาการรุนแรงมากขึ้นเมื่อข้าวโพดติดฝัก โดยจะพบอาการบริเวณรากและลำต้นส่วนล่าง ทำให้พืชตายก่อนแก่ ฝักเล็กเมล็ดลีบ สภาพดินเป็นกรด ดินร่วนปนทรายโรคจะรุนแรงมาก ลักษณะอาการ ใบ ต้น ที่เป็นโรคสลดสีเขียวอมเทา ต่อมาจะไหม้แห้งตาย ลำต้นส่วนล่างไม่แข็งแรง จะมีลักษณะเป็นแผลสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม บริเวณแผลจะแห้งยุบตัวลง ลำต้นแตกหรือฉีกบริเวณเหนือดิน เมื่อผ่าดูจะพบเส้นใยของเชื้อราสีขาวปกคลุม บริเวณแผลภายในลำต้น จะมีลักษณะเป็นสีชมพูหรือม่วง ต่อมาลำต้นจะกลวงเพราะถูกเชื้อรายย่อยสลาย เมื่อถูกลมพัดต้นหักล้มได้ง่าย การแพร่ระบาด เชื้อราติดมากับเมล็ด หรืออาศัยในดินและเศษซากพืชที่เป็นโรคนี้ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมประกอบกับบริเวณราก ลำต้นข้าวโพด ถูกแมลงทำลายทำให้เกิดแผล เชื้อโรคจะเข้าทำลายได้ง่ายขึ้น เชื้อโรคสามารถแพร่กระจายอยู่ในลำต้นทั้งที่ไม่แสดงอาการโรค เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม แผลจะแตกสร้างสปอร์มากมาย และสามารถแพร่กระจายไปตามลม (ชุติมันต์ และคณะ, 2547)

ในปัจจุบันห้องปฏิบัติตรวจสอบโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มีวิธีที่ใช้ตรวจสอบเชื้อรา คือ การตรวจสอบโดยเพาะเมล็ดพันธุ์บนกระดาษชื้น (Blotter method) ซึ่งเป็นวิธีที่เลียนแบบจากธรรมชาติ โดยเพาะเมล็ดพันธุ์ในที่ชื้น เมื่อเมล็ดงอกเชื้อโรคที่ติดมาก็เจริญตามออกมา เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบเฉพาะเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และในการตรวจสอบพบว่าจะมีเชื้อราชนิดอื่นที่เจริญพร้อมกัน มีการสร้างเส้นใยปกคลุมบนเมล็ด

ข้าวโพดทำให้ยากต่อการตรวจสอบเชื้อ ดังนั้น การจำแนกเชื้อราต้องอาศัยความรู้และประสบการณ์ในการตรวจสอบ และต้องใช้เวลาในการเพาะเชื้อนานประมาณ 7 วัน ซึ่งมีความไม่เหมาะสมต่อวิธีการและต่อปริมาณตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ในจำนวนมาก ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ ๆ ขึ้นมากมายสำหรับการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ ทั้งน้ำ อาหาร ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม และสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์โดยมีรายงานการศึกษาไว้อย่างต่อเนื่อง (Frampton and Restaino, 1993) เทคนิคใหม่ ๆ ดังกล่าวมีประสิทธิภาพแตกต่างกันออกไปและมีความแตกต่างกันในรายละเอียดของวิธีการ ส่วนใหญ่จะเน้นในเรื่องของความสะดวกและรวดเร็วในการตรวจ โดยไม่พึ่งการเพาะเชื้อซึ่งอาศัยเวลานาน ทำให้ได้รับความสนใจมาก เนื่องจากสามารถทราบผลได้เร็ว ตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละมาก ๆ และยังแก้ปัญหาในกรณีของเชื้อที่เจริญช้า เชื้อที่เพาะไม่ขึ้นหรือการที่เชื้อตายก่อนการตรวจสอบ ซึ่งเทคนิคที่น่าสนใจในการนำมาปรับใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างกว้างขวางและเป็นรูปธรรมได้มากยิ่งขึ้นกว่าเดิมเป็นเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ได้แก่ เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจในตัวอย่างได้อย่างจำเพาะ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิคพีซีอาร์ที่ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับยีนที่ผลิตสารพิษฟูโมนิซินของเชื้อ *Fusarium moniliforme*

2. วิธีการศึกษา

อุปกรณ์

เครื่องพีซีอาร์ เครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอ เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง อ่างทำน้ำร้อน โกร่งบดยา เครื่องบดเมล็ดพันธุ์ หลอดปั่นแยกตะกอนขนาด 1.5 มิลลิลิตร และปิเปตดูดสารปรับปริมาตรได้ขนาด 1 - 1000 ไมโครลิตร

สารเคมี

Tris-base, Glycine, Boric acid, Loading dye, DNA ladder, SYBR®safe, 2-Mercaptoethanol, Cetyltrimethylamonium bromide, Chloroform, Isoamyl alcohol, Absolute ethanol, Ammonium acetate, Ethylene diamine tetraacetate, Master Mix 2X (Gene direct), 2X Master/MultiMAX PCR Kit (intron) และไพรเมอร์สังเคราะห์จาก Bio Basic Inc.

เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา *Bipolaris maydis*, *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* sp. และ *Penicillium* sp.

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

นำเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ที่แยกมาจากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยดูลักษณะเส้นใย รูปร่างสปอร์ ลักษณะก้านชูสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่างๆ

2. การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อราและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญเก็บเกี่ยวเส้นใยใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างเส้นใยด้วยสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 M และบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงตึงผิว (nanodrop) ตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีสโดยใช้ ในอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TBE buffer ที่ 80 Volt เป็นเวลา 50 นาที ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสีย้อม SYBR®safe โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Molecular weight marker) ตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต บันทึกผลด้วยการถ่ายภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอ

3. ยีนเป้าหมายและออกแบบไพรเมอร์

รวบรวมผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการตรวจสอบยีนเป้าหมายที่สร้างสารพิษฟูโมนิซิน ดังแสดง Table 1

Table 1 Primer sequences for fumonisin producing

Primer	Sequence (5′→3′)	Gene	Product size (bp)
Fum1F Fum4R	GAG GCC CGA GCG AGC ACT GG CCA GCC GCG GAA ATT AGG GAT GTG	polyketide synthase (Baird *et al.*, 2008)	1456
Fum5F Fum6R	GTC CTA CGC GAT ACA TCC CAC CAC AAT GAT CAA GCT CGG GGC CGT CGT TCA TAG	polyketide synthase (Baird *et al.*, 2008)	419
Fum5F Fum4R	GTC CTA CGC GAT ACA TCC CAC CAC AAT CCA GCC GCG GAA ATT AGG GAT GTG	polyketide synthase (Baird *et al.*, 2008)	534
Fum1F Fum6R	CGA GGC CCG AGC GAG CAC TGG GAT CAA GCT CGG GGC CGT CGT TCA TAG	polyketide synthase (Baird *et al.*, 2008)	1340
FUM1F FUM1R	CCA TCA CAG TGG GAC ACA GT CGT ATC GTC AGC ATG ATG TAG C	polyketide synthase (Bluhm *et al.*, 2004)	183
FV-F2 FV-R	CAC TGG TGG TAA CGA TGC G CAC CCT GAG TGC CCT TGG TG	*gao*B (Faria *et al.*, 2012)	370

4. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ต่อดีเอ็นเอต้นแบบจากเชื้อหลายชนิดผสมกัน จากนั้นนำมาทำพีซีอาร์ตามสภาวะที่เหมาะสม

5. การทดสอบความไวและความถูกต้องในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด

นำเมล็ดข้าวโพดมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที และตากทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นแบ่งเมล็ดข้าวโพดมาจำนวนหนึ่ง จุ่มในสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *Fusarium moniliforme*, ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเมล็ดมาตากไว้ให้แห้งบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อภายในอุณหภูมิห้อง ตรวจสอบประสิทธิภาพการปลูกเชื้อในเมล็ดข้าวโพด โดยการหยิบเมล็ดที่ปลูกเชื้อแล้วด้วยปากคีบที่สะอาดวางบนกระดาษชื้น (blotter method) ที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ วาง 20 เมล็ดต่อจาน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง NUV ที่ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน นำเมล็ดมาตรวจดูภายใต้กล้อง stereo microscope คัดเลือกเมล็ดที่ติดเชื้อมาปะปนกับเมล็ดปกติ โดยใน 100 เมล็ดให้มีเมล็ดที่ติดเชื้อ 1 2 4 6 8 10 20 และ 40 เมล็ด และเมล็ดที่ติดเชื้อตามธรรมชาติซึ่งตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธีการเพาะบนกระดาษชื้น (blotter method) นำเมล็ดทั้งหมดในแต่ละระดับการติดเชื้อมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเมล็ดพันธุ์ ผลิตภัณฑ์ Retsch รุ่น ZM200 และสุ่มมา 1 กรัม เพื่อสกัดดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีสโดยใช้ในอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TBE buffer ที่ 80 Volt เป็นเวลา 60 นาที ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสีย้อม SYBR®safe โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Molecular weight marker) ตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต บันทึกผลด้วยการถ่ายภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอ

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* รูปร่างเชื้อรา เส้นใย มีผนังกั้น สีขาวอมชมพู ก้านชูสปอร์ ตั้งตรงจะพบอยู่แบบเดี่ยว ๆ สีขาวอมชมพูพบโคนิเดียที่ส่วนปลายสปอร์ แบบแรกเรียกว่ามาโครโคนิเดียมมีขนาดใหญ่ รูปร่างยาวตรง โค้งแหลมเรียวที่ปลาย มีผนังกั้น 4 - 6 เซลล์ แบบที่สองเรียกว่าไมโครโคนิเดียมมีขนาดเล็กรูปร่างคล้ายกระบอก (clavate) มี 1 - 2 เซลล์ สร้างเป็นเส้นสายต่อกันเป็นลูกโซ่จำนวนมาก บนแขนงเส้นใยเชื้อรา ลักษณะเชื้อราที่ตรวจพบบนเมล็ดพันธุ์ เชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวฟูสปอร์ขนาดเล็กสร้างเป็นเส้นสายยาวคล้ายลูกโซ่กระจายตัวบนผิวเมล็ด (Figure 1) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Fusarium moniliforme* บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อราสร้างเส้นใยฟูสีขาวเจริญอย่างรวดเร็วเมื่อมีอายุมากขึ้นเส้นใยมีสีชมพู ชมพูม่วงจนถึงสีชมพูอมม่วง เมื่ออายุ 12 วัน สร้าง sporodochium สีส้มบนผิวหน้าอาหาร โคโลนีด้านใต้วุ้นอาหารมีสีม่วงหรือม่วงคราม พบการสร้างเม็ด sclerotium สีเขียวอมน้ำเงินกระจายในวุ้นอาหาร ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกเชื้อคือ conidiophore เป็นแบบ monophialide ไม่มีการสร้าง polyphialide และมีการสร้าง microconidium ทั้งแบบเป็นกลุ่มและแบบต่อกันเป็นลูกโซ่ที่มีความยาวมาก บางครั้งมีจำนวนถึง 50 conidium ต่อ 1 ลูกโซ่ (Nelson *et al.*, 1983)

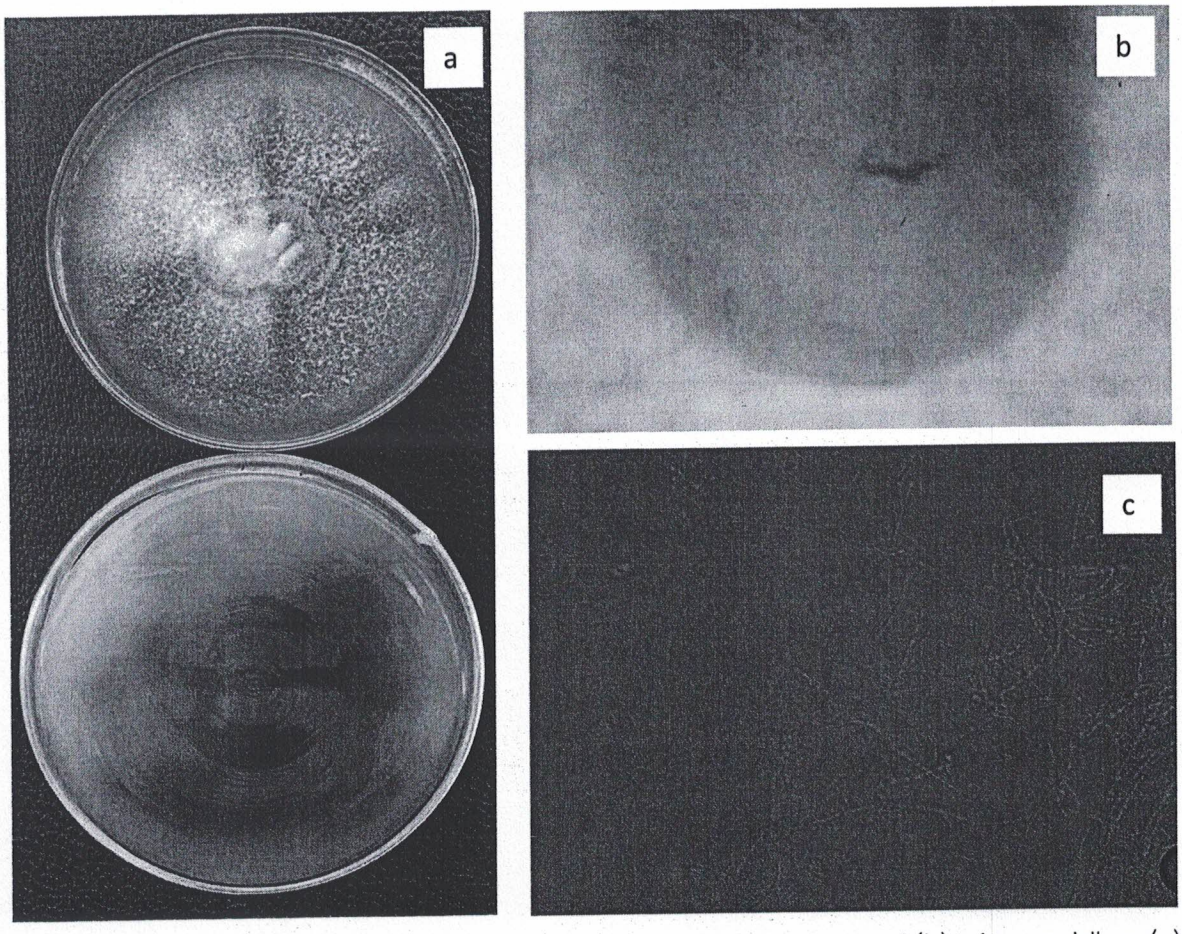

Figure 1 *Fusarium moniliforme* growth on PDA medium (a) and maize seed (b) microconidium (c)

2. สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อรา โดยทดสอบไพรเมอร์ทั้งหมด 6 คู่ โดยใช้น้ำยา PCR master mix (One PCR) ของ Genedirect® โดยมีองค์ประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อดังนี้ DNA ที่ผ่านการทำให้เจือจางให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, Master Mix 2X ปริมาตร 25 ไมโครลิตร, forward primer (25 µM/µl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร reverse primer (25 µM/µl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย ddH2O ให้ได้ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร นำส่วนผสมที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมการเพิ่มปริมาณ (PCR Profile) ที่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังนี้

PCR Steps		Temperature	Time
Initial denature		93°C	7 min
35 cycle	Denaturation	93°C	30 sec
	Annealing	60°C	1 min
	Extension	72°C	3 min
Final extension		72°C	7 min

พบว่าสภาวะดังกล่าวซึ่งใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากันทุกไพรเมอร์ คือ 60 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Fusarium moniliforme* ได้ทั้ง 6 คู่ไพรเมอร์ ให้โดยให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน (Figure 2) โดยคู่ไพรเมอร์ Fum1F-4R ให้แถบดีเอ็นมีขนาด 1456 bp คู่ไพรเมอร์ Fum5F-6R ให้แถบดีเอ็นมีขนาด 419 bp คู่ไพรเมอร์ Fum5F-4R ให้แถบดีเอ็นมีขนาด 534 bp คู่ไพรเมอร์ Fum1F-6R ให้แถบดีเอ็นมีขนาด 1340 bp คู่ไพรเมอร์ FUM1F-1R ให้แถบดีเอ็นมีขนาด 183 bp และคู่ไพรเมอร์ FV-F2-R ให้แถบดีเอ็นมีขนาด 370 bp แต่อย่างไรก็ตาม คู่ไพรเมอร์ Fum1F-4R และคู่ไพรเมอร์ FUM1F-1R ยังมีแถบดีเอ็นเอจาง ๆ ที่เกิดขึ้นร่วมด้วยจึงยังไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้จึงต้องทำการปรับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing

3. ความจำเพาะของไพรเมอร์

จากไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือกได้จากขั้นตอนข้างต้น นำมาทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ โดยทดสอบกับไพรเมอร์ 1 คู่ และดีเอ็นเอของเชื้อราผสมเพื่อดูความจำเพาะ โดยใช้สภาวะการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเดียวกัน พบว่า ไพรเมอร์ Fum5F-6R สามารถเพิ่มขยายขนาดดีเอ็นเอเฉพาะเชื้อ *Fusarium moniliforme* โดยให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 419 bp โดยไม่มีผลกระทบต่อเชื้อราต่างชนิด (Figure 3)

4. ความไวและความถูกต้องในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด

นำเมล็ดข้าวโพดมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที และตากทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นแบ่งเมล็ดข้าวโพดมาจำนวนหนึ่ง จุ่มในสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ที่มีความเข้มข้น 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร คัดเลือกเมล็ดที่ติดเชื้อมาปะปนกับเมล็ดปกติ โดยใน 100 เมล็ดให้มีเมล็ดที่ติดเชื้อ 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30 และ 40% และนำไปสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มดีเอ็นเอโดยใช้ 6 คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ผลิตสารพิษฟูโมนิซิน ได้แก่ Fum1F-4R, Fum5F-6R, Fum5F-4R, Fum1F-6R, FUM1F-1R และ FV-F2-R พบว่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ คือ 2% ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนในทุกคู่ไพรเมอร์ทดสอบและยังสามารถตรวจสอบเมล็ดที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้ดังแสดง Figure 4

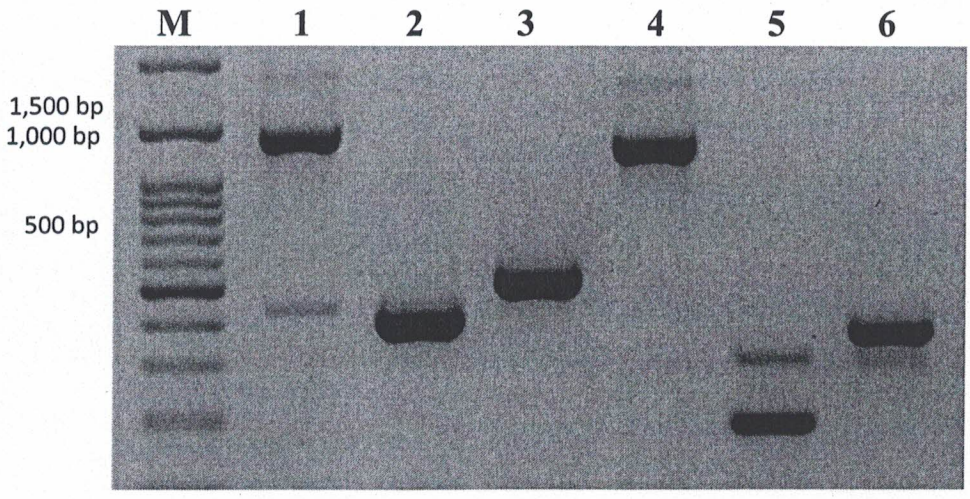

Figure 2 Agarose gel demonstrating for testing primer for fumonisin gene; lane 1: Fum1F-4R; lane 2: Fum5F-6R; lane 3: Fum5F-4R; lane 4: Fum1F-6R; lane 5: FUM1F-1R and lane 6: FV-F2-R

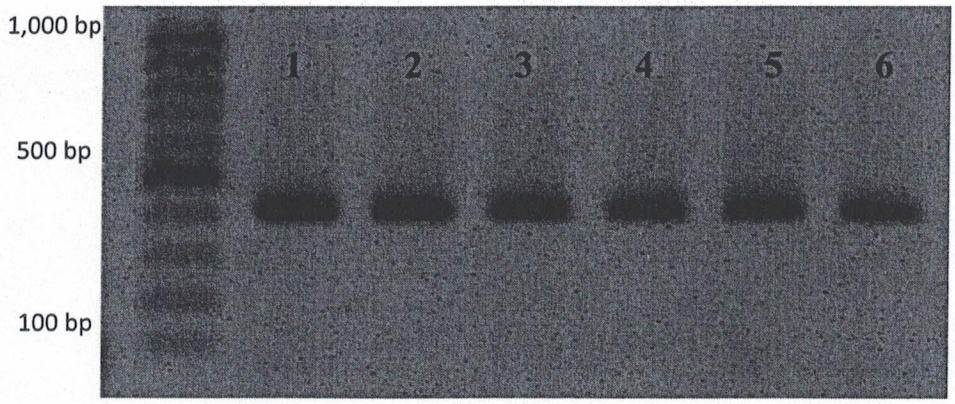

Figure 3 Agarose gel demonstrating specificity of primer Fum5-6R for *Fusarium moniliforme* lane 1: *F. moniliforme*; lane 2: *F. moniliforme* + *C. acremonium*; lane 3: *F. moniliforme* + *B. maydis*; lane 4: *F. moniliforme* + *C. acremonium* + *B. maydis*; lane 5: *F. moniliforme* + *A. niger* + *A. flavus* + *Penicillium* sp. + *Rhizopus* sp. Lane 6: *F. moniliforme* + *C. acremonium* + *B. maydis*+ *A. niger* + *A. flavus* + *Penicillium* sp. + *Rhizopus* sp.

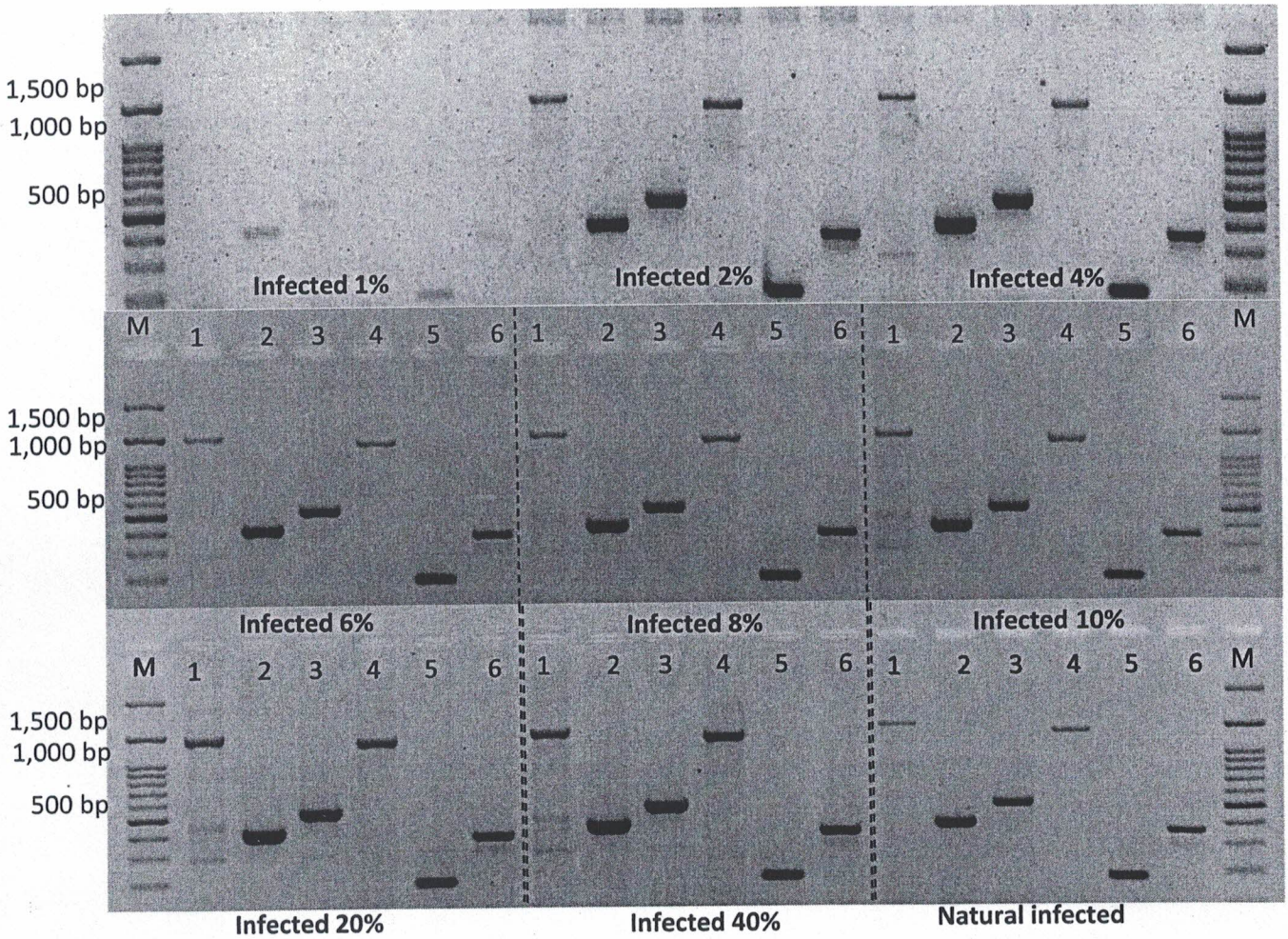

Figure 4 Agarose gel demonstrating the sensitivity and specificity of primer on different level of fungi infected maize seed lane 1: Fum1F-4R; lane 2: Fum5F-6R; lane 3: Fum5F-4R; lane 4: Fum1F-6R; lane 5: FUM1F-1R and lane 6: FV-F2-R

4. สรุป

เทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจเชื้อ *Fusarium moniliforme* ได้โดยไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนได้จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ Fum5F-6R, Fum5F-4R และ FUM1F-1R มีขนาดจำเพาะของแต่ละคู่เบสโดยให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 419 bp, 534 bp และ 183 bp ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบความไวและความถูกต้องในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดพบว่าสามารถตรวจได้ในระดับที่เมล็ดข้าวโพดติดเชื้อต่ำสุด 2%

5. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา, โกมินทร์ วิโรจน์วัฒนกุล และ อดิศักดิ์ คำนวณศิลป์. 2547. **โรคข้าวโพดและการป้องกันกำจัด**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

Bacon, C.W. and P.E. Nelson. 1994. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium monliforme* and *Fusarium proliferatum*. **J. Food. Prot.** 57: 514-521.

Baird, R., H.K. Abbas, G. Windham, P. Williams, S. Baird, P. Ma, R. Kelley, L. Hawkins and M. Scruggs. 2008. Identification of select fumonisin forming Fusarium species using PCR applications of the polyketide synthase gene and its relationship to fumonisin production in vitro. **Int. J. Mol. Sci.** 9: 554-570.

Bluhm, B.H., M.A. Cousin and C.P. Woloshuk. 2004. Multiplex real-time PCR detection of fumonisin - producing and trichothecene-producing groups of fusarium species. **J. Food Prot.** 67: 536-543.

Faria, C.B., C.A.L. Abe, C.N. da Silva, D.J. Tessmann and I.P. Barbosa-Tessmann. 2012. New PCR assays for the identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, and other species of the *Gibberella fujikuroi* complex. **Int. J. Mol. Sci.** 13: 115-132.

Frampton, E.W. and L. Restaino. 1993. Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. **J. Appl. Bacteriol.** 74: 223-233.

Möller, E.M., J. Chelkowski and H. Geiger. 1999. Species-specific PCR assays for the fungal pathogens *Fusarium moniliforme* and *Fusarium subglutinans* and their application to diagnose maize ear rot disease. **J. Phytopatho.** 147 (9): 497-508.

Nelson, P.E., T.A. Toussoun and W.F.O. Marasas. 1983. **Fusarium species: An illustrated manual for identification**. Pennsylvania State University Press, Pennsylvania.