รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : โครงการวิจัยและพัฒนาด้านเมล็ดพันธุ์พืช
2. **โครงการวิจัย** : โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

   กิจกรรม : -

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium sporotrichiodes, Fusarium moniliforme* และ *Cephalosporium acremonium* ที่ปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดส่งออก

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of Multiplex Polymerase Chain Reaction Technique for Detection of *Fusarium sporotrichiodes, Fusarium moniliforme* and *Cephalosporium acremonium* Contaminated in Exported Maize Seeds

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต สังกัด ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

   ผู้ร่วมงาน

ภภัสสร วัฒนกุลภาคิน	สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก
นิภาภรณ์ พรรณรา	สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่
สุมนา จำปา	สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่
สนอง บัวเกตุ	สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

5. **บทคัดย่อ**

เชื้อรา *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium* และ *Fusarium sporotrichiodes* เป็นเชื้อสาเหตุโรคในข้าวโพดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและธัญพืชอื่นๆทั่วโลก โดยเชื้อ *Fusarium moniliforme* ซึ่งมีการผลิตสารพิษที่มีความเป็นพิษสูงต่อคนและสัตว์ที่บริโภคข้าวโพดหรือผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดที่ปนเปื้อนเชื้อหรือสารพิษจากเชื้อ นอกจากนี้เชื้อ *Cephalosporium acremonium* และ *Fusarium sporotrichiodes* เป็นเชื้อสาเหตุโรคในข้าวโพดส่งผลต่อผลผลิตข้าวโพดซึ่งนำไปสู่การสูญเสียทางเศรษฐกิจ ดังนั้นหลายๆประเทศจึงกำหนดเป็นเชื้อกักกัน อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่พบเชื้อ *Fusarium sporotrichiodes* แต่พบเชื้อกักกันชนิดอื่นคือ เชื้อ *Bipolaris maydis* ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยเชื้อกักกันทั้ง 3 สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย ให้มีความรวดเร็ว ถูกต้อง และแม่นยำ เพื่อนำไปตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชเพื่อการส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจึงเป็นสิ่งจำเป็น และยังช่วยในระบบการจัดการเชื้อในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์อีกด้วย จากการพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อใช้ตรวจเชื้อกักกันทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าชุดไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium* และ *Bipolaris maydis* ได้แก่ Fum5-Fum6, F-R และ JB589-JB591 ตามลำดับ

โดยไพรเมอร์ Fum5-Fum6 ถูกออกแบบจากบริเวณยีน polyketide synthase ส่วนไพรเมอร์ F-R และ JB589-JB591ออกแบบจากบริเวณ 18S rRNA gene ไพรเมอร์ที่ใช้ต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มขยายขนาดที่มีขนาดจำเพาะของแต่ละคู่เบสแต่ละเชื้อ 180 bp (*Cephalosporium acremonium*), 425 bp (*Fusarium moniliforme*) และ 346 bp (*Bipolaris maydis*) และเมื่อนำไปทดสอบความไวและความถูกต้องของวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดพบว่าสามารถตรวจได้ในระดับที่เมล็ดข้าวโพดติดเชื้อต่ำสุด 1%

Abstract

Fusarium moniliforme, Cephalosporium acremonium and *Fusarium sporotrichiodes* are economic important fungal pathogen of maize and other cereals worldwide. *Fusarium moniliforme* produce mycotoxin which are a potential health hazard for humans and animals that consume maize and maize products frequently. Maize diseases directly affect the production of corn, potentially leading to great economic losses. Therefore, many countries have quarantined maize seed that are infected with specific fungal pathogens. *Fusarium sporotrichiodes* not found in Thailand but we found *Bipolaris maydis* that is quarantined fungal pathogen. Therefore, in this study the development of polymerase chain reaction (PCR) detection methods to identify three quarantined fungal pathogen. The pathogen specific primer sets Fum5-Fum6, F-R and JB589-JB591 were tested for *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium* and *Bipolaris maydis*, respectively. The Fum5-Fum6 primer set was designed from polyketide synthase gene region; the F-R and JB589-JB591 were designed from 18S rRNA gene. The quarantine fungal pathogen primer pairs were amplified to specific number of base pairs in each of the following fungal pathogen: 180 bp (*Cephalosporium acremonium*), 425 bp (*Fusarium moniliforme*) and 346 bp (*Bipolaris maydis*). The detection limit for multiplex pcr primer sets was 1% of maize seed that are infected with specific fungal pathogens.

6. คำนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ไปยังหลายประเทศทั่วโลกเพื่อเป็นเมล็ดพันธุ์และวัตถุดิบหลักที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเอเชีย-แปซิฟิก ภูมิภาคอาเซียน และประเทศแถบเอเชียใต้ มีปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นจากปี 2555 และต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการส่งออกข้าวโพดเพื่อไปจำหน่ายยังต่างประเทศจะมีขั้นตอนการกักกันพืช และการปฏิบัติตามกฎระเบียบควบคุมการนำเข้าหรือการส่งออกเมล็ดพันธุ์ เพื่อควบคุมการเคลื่อนไหวของศัตรูพืชที่ติดมากับผลิตผลหรือเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ ซึ่งศัตรูพืชคือ แมลงและเชื้อโรค สำหรับเชื้อโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ส่วนใหญ่จะพบเชื้อราซึ่งเป็นเชื้อราที่มีอยู่ทั่วไปในโรงเก็บและเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคสามารถติดต่อผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้แม้ในอัตราต่ำและเชื้อราบางชนิดยังสามารถผลิตสารพิษ เช่น *Fusarium moniliforme* มีการผลิตสารพิษ (mycotoxins) ที่มีความเป็นพิษสูงต่อคนและสัตว์ (Moller *et al*., 1999) ดังนั้นเชื้อราชนิดนี้จึงจัดเป็นเชื้อโรคที่อยู่ในรายชื่อสิ่งต้องห้ามในหลายๆ ประเทศผู้นำเข้า และส่งออก

เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดรวมถึงประเทศไทยตามพระราชบัญญัติกักพืชพ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 ซึ่งกำหนดให้ข้าวโพดเป็นพืชกำกัด ต้องมีใบปลอดโรคก่อนที่จะส่งออกหรือนำเข้าจากต่างประเทศ โดยเชื้อ *Cephalosporium acremonium* ห้ามตรวจพบสำหรับการส่งออกไปประเทศศรีลังกา ส่วนเชื้อรา *Bipolaris maydis* ห้ามตรวจพบสำหรับการส่งออกไปประเทศบังคลาเทศและประเทศแซมเบีย หากประเทศปลายทางตรวจพบเชื้อราดังกล่าวจะปฏิเสธการรับซื้อหรือเผาทำลายเมล็ดพันธุ์ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ ดังนั้น การนำเข้า ส่งออก ต้องมีวิธีการตรวจเชื้อที่มีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการตรวจสอบโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มีวิธีที่ใช้ตรวจสอบเชื้อรา คือ การตรวจสอบโดยเพาะเมล็ดพันธุ์บนกระดาษชื้น (Blotter method) ซึ่งเป็นวิธีที่เลียนแบบจากธรรมชาติ โดยเพาะเมล็ดพันธุ์ในที่ชื้น เมื่อเมล็ดงอกเชื้อโรคที่ติดมาก็เจริญตามออกมา เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบเฉพาะเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ ทำได้โดยวางเมล็ดพันธุ์ลงบนกระดาษกรอง ที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มในตู้เพาะที่อุณหภูมิ 28^0 ซ ภายใต้แสง NUV (near ultra violet ที่ความยาวคลื่น 365 nm) เป็นเวลา 7 วัน จึงนำมาตรวจดูเชื้อราภายใต้กล้องสเตอริโอ โดยใช้ลักษณะรูปร่างของเชื้อราที่พบเห็นทั้งลักษณะของเส้นใยเชื้อรา (hypha) ก้านชูสปอร์ (conidiophores) แตกกิ่งก้านหรือไม่แตกกิ่งก้าน สร้างผนังกั้น (septum) หรือไม่สร้าง รูปร่างของสปอร์ (conidial shape/spore shape) และจำนวนเซลล์ และโครงสร้างที่ให้กำเนิดสปอร์ (fruiting body) (Mathur and Kongsdal, 2003) ซึ่งต้องอาศัยความรู้และประสบการณ์ในการตรวจสอบ นอกจากนี้ยังพบเชื้อราชนิดอื่นที่เจริญพร้อมกัน มีการสร้างเส้นใยปกคลุมบนเมล็ดข้าวโพดทำให้ยากต่อการตรวจสอบเชื้อ และต้องใช้เวลาในการเพาะเชื้อนานประมาณ 7 วัน ซึ่งมีความไม่เหมาะสมต่อวิธีการและต่อปริมาณตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ในจำนวนมาก ดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นวิธีทางชีววิทยาในระดับโมเลกุลที่มีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูงให้ผลที่แม่นยำ เชื่อถือได้และรวดเร็ว สามารถทราบผลได้ในเวลา 1-2 วัน เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงจากเทคนิคพีซีอาร์พื้นฐานโดยทำให้สามารถเพิ่มขยายหลายๆ ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน ซึ่งสามารถนำมาตรวจสอบเชื้อมากกว่า 1 ชนิด ในการทำปฏิกิริยาหลอดเดียวกันเทคนิคนี้นิยมนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดส่งออก 3 สายพันธุ์ ได้แก่เชื้อ *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis* และ *Cephalosporium acremonium* พร้อมกันในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 1 ครั้ง ซึ่งเทคนิคนี้จะมีประสิทธิภาพสูง แม่นยำ และรวดเร็วในการตรวจสอบ

วิธีการตรวจสอบเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสันฐานวิทยา/โครงสร้างของเชื้อราเป็นวิธีที่ใช้กันมานานและยังคงถือเป็นวิธีมาตรฐานแต่วิธีการดังกล่าวยังมีความไม่เหมาะสมทั้งในเรื่องความถูกต้องและระยะเวลาในการตรวจสอบ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ขึ้นมากมายสำหรับการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ ทั้งน้ำ อาหาร ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม และสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์โดยมีรายงานการศึกษาไว้อย่างต่อเนื่อง (Frampton and Restaino, 1993) เทคนิคใหม่ ๆ ดังกล่าวมีประสิทธิภาพแตกต่างกันออกไปและมีความแตกต่างกันในรายละเอียดของวิธีการ ส่วนใหญ่จะเน้นในเรื่องของความสะดวกและรวดเร็วในการตรวจ โดยไม่พึ่งการเพาะเชื้อซึ่งอาศัยเวลานาน ทำให้ได้รับความสนใจมากเนื่องจากสามารถทราบผลได้เร็ว ตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละมากๆ และยังแก้ปัญหาในกรณีของเชื้อที่เจริญช้า เชื้อที่เพาะไม่ขึ้น หรือการที่เชื้อตายก่อนการตรวจสอบ ซึ่งเทคนิคที่น่าสนใจในการนำมาปรับใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างกว้างขวางและเป็นรูปธรรมได้มากยิ่งขึ้นกว่าเดิมเป็นเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ได้แก่ เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจในตัวอย่างได้อย่างจำเพาะ แต่เทคนิคพีซีอาร์ทั่วไปสามารถใช้ในการจัดจำแนกเชื้อครั้งละ 1 สายพันธุ์ ทำ

ให้เสียเวลาและมีค่าใช้จ่ายสูง ในปัจจุบันเทคนิคพีซีอาร์ได้มีการพัฒนาตลอดเวลา ทำให้สามารถตรวจสอบเชื้อมากกว่า 1 ชนิด ในการทำปฏิกิริยาหลอดเดียวกัน เรียกว่าเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR) ซึ่งเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์จะใช้ไพรเมอร์มากกว่า 2 คู่ ขึ้นไปในการทำปฏิกิริยาพร้อมๆ กัน โดยไพรเมอร์แต่ละคู่จะได้รับการออกแบบให้จำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายแต่ละตัวและต้องไม่มีเบสคู่สมกลับมาจับกันเอง เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มีความรวดเร็วในการตรวจสอบใช้เวลาเพียง 1 วันก็สามารถทราบผล (Markoulatos *et al*., 2002) แต่ปัญหาที่มักเกิดขึ้นบ่อยในการทำพีซีอาร์ คือ ไม่ได้ผลผลิตพีซีอาร์ หรือได้ในปริมาณต่ำ หรือได้แบบไม่จำเพาะ เกิดขึ้นซึ่งมักเกิดจากความไม่คุณลักษณะของไพร์เมอร์ที่ออกแบบ และสภาวะในการเพิ่มปริมาณจากความผิดพลาดของไพรเมอร์ การเกิดไพรเมอร์-ไดเมอร์ เป็นต้น การลดหรือการกำจัดปัญหาที่เกิดดังกล่าวทำได้โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมหลายๆ องค์ประกอบรวมทั้งการใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะสูงเพื่อให้ได้ผลิตผลจากปฏิกริยาพีซีอาร์เป็นตามที่ต้องการ

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์: เครื่องพีซีอาร์, เครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอ, เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า, เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง, อ่างทำน้ำร้อน, โกร่งบดยา, หลอดปั่นแยกตะกอนขนาด 1.5 มิลลิลิตร, ปิเปตดูดสารปรับปริมาตรได้ขนาด 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), ไพรเมอร์สังเคราะห์จาก Bio Basic Inc.

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

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

นำเชื้อรา *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis* และ *Cephalosporium acremonium* ที่แยกมาจากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยดูลักษณะเส้นใย รูปร่างสปอร์ ลักษณะก้านชูสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่างๆ

2. การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อราและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญเก็บเกี่ยวเส้นใยใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างเส้นใยด้วยสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 M และบดให้เป็นผงละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงตึงผิว (nanodrop) ที่ใช้ปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง/ครั้ง โดยทำการวัดที่ค่าการดูดซับแสง (Absorbance) ที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) ซึ่งหน่วยความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดได้คือ นาโนกรัม/ไมโครลิตร ส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จะดูจากสัดส่วนการดูดซับแสงของตัวอย่างที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) และ 280 นาโนเมตร (A280) ซึ่งหากดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูง

ควรมีค่าเท่ากับ 1.8 (A260/A280 = 1.8) หากค่าสัดส่วนที่ได้มีค่าน้อย กว่า 1.8 แสดงว่าผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนจากโปรตีน หรือสารเคมีอื่นๆ นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีสโดยใช้ ในอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TBE buffer ที่ 80 Volt เป็นเวลา 30 นาที ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสีย้อม SYBR safe โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Molecular weight Marker) ตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต บันทึกผลด้วยการถ่ายภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอ

3. การหายีนเป้าหมายและออกแบบไพรเมอร์

การหายีนเป้าหมายที่มีความจำเพาะต่อเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ สำหรับเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของของเชื้อรา การออกแบบ primer ใช้โปรแกรม Primer3 โดย Primer sequence ที่ถูกเลือกนำมาใช้เหล่านี้ได้ผ่านการตรวจสอบความจำเพาะโดยใช้โปรแกรม Blast ของ NCBI

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละชนิดโดยวิธีพีซีอาร์

เตรียม PCR reaction mixture โดยปรับพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ ปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ความเข้มข้นของ primer ปริมาณของ Taq DNA polymerase จากนั้นนำใส่ลงในเครื่อง Thermal cycler ตั้งอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบให้เหมาะสมตามชนิดของเชื้อ

5. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

ทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ 2 วิธี คือ ใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ต่อดีเอ็นเอต้นแบบจากเชื้อหลายชนิดผสมกัน และใช้ไพรเมอร์ผสมต่อดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ชนิด ร่วมกับการใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อราชนิดอื่นอีก 2 ชนิด คือ *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis* และ *Cephalosporium acremonium* จากนั้นนำมาทำพีซีอาร์ตามสภาวะที่เหมาะสม

6. การทดสอบความไวของวิธีพีซีอาร์

ทำการทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อมาเจือจางที่ความเข้มข้น 100 ng, 10 ng, 5 ng, 2.5 ng, 100 pg, 50 pg และ 10 pg จากนั้นนำมาทำพีซีอาร์ตามสภาวะที่เหมาะสม

7. การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มขยายไปหาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อราที่ต้องการ

8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละชนิดโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

โดยการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ความเข้มข้นของ primer อุณหภูมิ annealing, extension time, ปริมาณของ Taq DNA polymerase และจำนวนรอบที่ใช้ในปฏิกิริยา

9. การทดสอบความไวและความถูกต้องของวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด

นำเมล็ดข้าวโพดมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที และตากทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นแบ่งเมล็ดข้าวโพดมาจำนวนหนึ่ง จุ่มในสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis* และ *Cephalosporium acremonium* ที่มีความเข้มข้นของแต่ละเชื้อ $2x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเมล็ดมาตากไว้ให้แห้งบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อภายในอุณหภูมิห้อง ตรวจสอบประสิทธิภาพการปลูกเชื้อในเมล็ดข้าวโพด โดยการหยิบเมล็ดที่ปลูกเชื้อแล้วด้วยปากคีบที่สะอาดวางบนกระดาษชื้น (blotter method) ที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ วาง 20 เมล็ดต่อจาน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง NUV ที่ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวันหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน นำเมล็ดมาตรวจดูภายใต้กล้อง stereo microscope คัดเลือกเมล็ด

ที่ติดเชื้อมาปะปนกับเมล็ดปกติ โดยใน 100 เมล็ดให้มีเมล็ดที่ติดเชื้อ 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 เมล็ด ทำการสกัดดีเอ็นเอและนำไปเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยใช้วิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในสภาวะที่เหมาะสมตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีสโดยใช้ ในอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TBE buffer ที่ 80 Volt เป็นเวลา 30 นาที ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสีย้อม SYBR safe โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Molecular weight Marker) ตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต บันทึกผลด้วยการถ่ายภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอ

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561 รวม 2 ปี

สถานที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

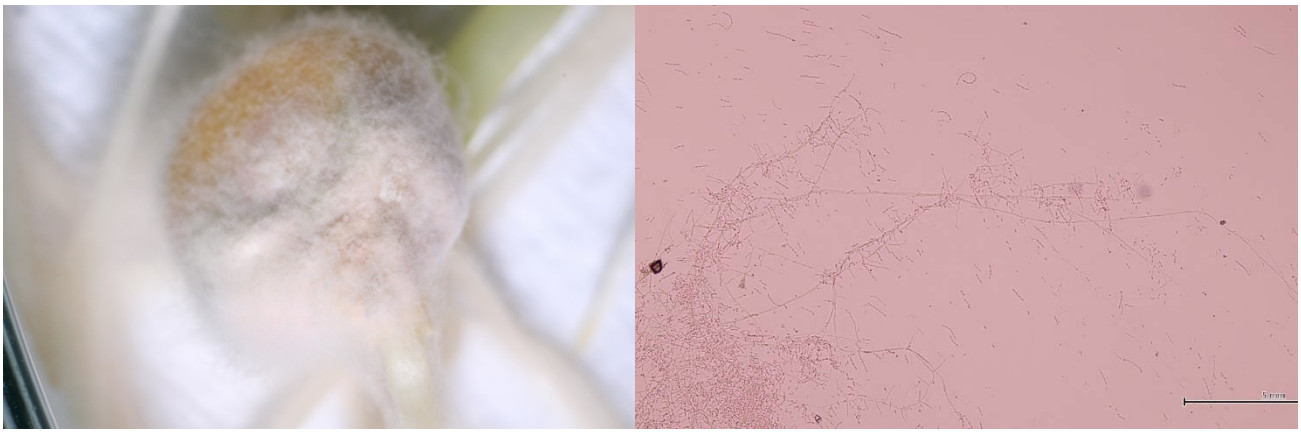
8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

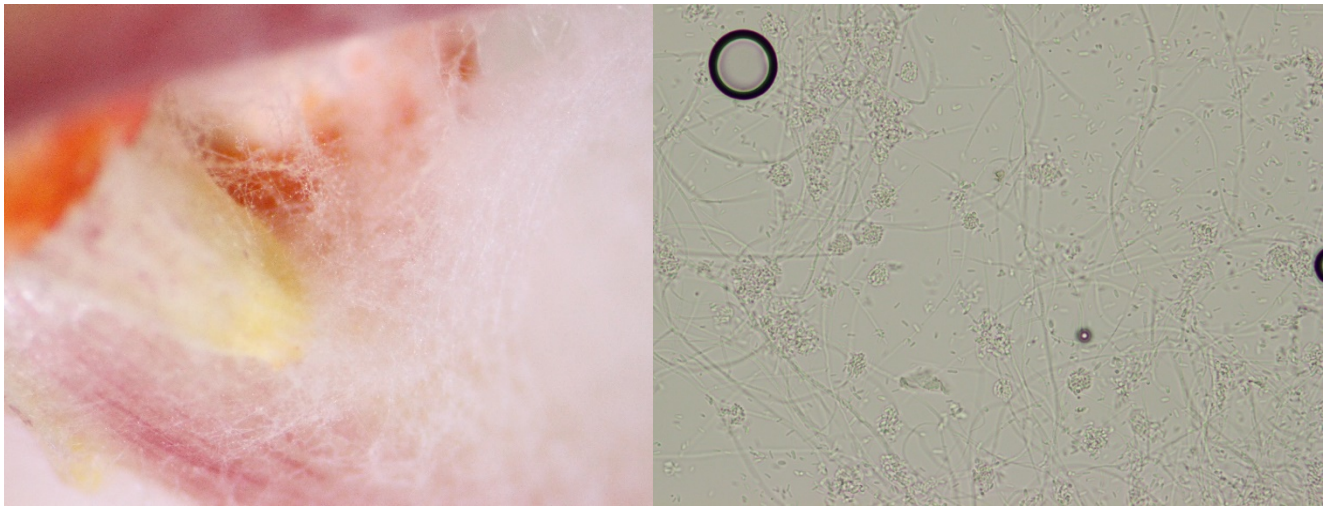
เชื้อรา *Fusarium moniliforme* เส้นใย มีผนังกั้น สีขาวอมชมพู ก้านชูสปอร์ ตั้งตรงจะพบอยู่แบบเดี่ยวๆ สีขาวอมชมพูพบโคนิเดียที่ส่วนปลายสปอร์ แบบแรกเรียกว่า มาโครโคนิเดียมมีขนาดใหญ่ รูปร่างยาวตรง โค้งแหลมเรียวที่ปลาย มีผนังกั้น 4-6 เซลล์ แบบที่สองเรียกว่าไมโครโคนิเดียมมีขนาดเล็กรูปร่างคล้ายกระบอก (clavate) มี 1-2 เซลล์ สร้างเป็นเส้นสายต่อกันเป็นลูกโซ่จำนวนมาก บนแขนงเส้นใยเชื้อรา ลักษณะเชื้อราที่ตรวจพบบนเมล็ดพันธุ์ เชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวฟูสปอร์ขนาดเล็กสร้างเป็นเส้นสายยาวคล้ายลูกโซ่กระจายตัวบนผิวเมล็ด (ภาพที่ 1)

เชื้อรา *Cephalosporium acremonium* เป็นเชื้อราชนิดที่มีผนังกั้น ไม่มีสีเส้นใยมีสีขาวอาจมีสีชมพูหรือสีเหลือง ลักษณะจำเพาะของเชื้อคือ ก้านชูยาว เรียว (delicate) คล้ายเส้นผม (hair-in appearance) โคนิเดียมีเซลล์เดียว รูปรี (elliptical) หรือรูปไข่อยู่เป็นกลุ่ม (irregular cluaters) ที่ปลายก้านชู ลักษณะเชื้อราที่ตรวจพบบนเมล็ดพันธุ์ เชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว สปอร์ขนาดเล็กสร้างจับตัวเป็นหยดน้ำ (ภาพที่ 2)

เชื้อรา *Bipolaris maydis* เชื้อมีสปอร์ยาวโค้ง ปลายเรียวมน ไม่มี hilum เส้นใยสีเขียวมะกอก (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 1 ลักษณะเชื้อรา *Fusarium moniliforme* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดและโครงสร้างไมโครโคนิเดีย



ภาพที่ 2 ลักษณะเชื้อรา *Cephalosporium acremonium* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดและโครงสร้างโคนิเดีย

ภาพที่ 3 ลักษณะเชื้อรา *Bipolaris maydis* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดและโครงสร้างโคนิเดีย

2. การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Bipolaris maydis, Fusarium moniliforme, Cephalosporium acremonium, Aspergillus niger, Aspergillus flavus และ Penicillium sp.* ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป พบว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูงมีค่าเท่ากับ 1.8 (A260/A280 = 1.8) โดยเชื้อ *Fusarium moniliforme* มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 19.8 ng/µl ขณะที่เชื้อ *Cephalosporium acremonium* มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 23.5 ng/µl ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้จากทั้งสองเชื้อมีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ดีเอ็นเอที่สกัดได้ยังมีปริมาณไม่มากเนื่องจากขั้นตอนสกัดไม่ได้มีการใช้ไนโตรเจนเหลว อาจจะทำให้การย่อยผนังเซลล์เชื้อราไม่สมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ สามารถนำไปใช้ต่อในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณด้วยพีซีอาร์ต่อไป

3. การหายีนเป้าหมายและออกแบบไพรเมอร์

จากการหายีนเป้าหมายที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis* และ *Cephalosporium acremonium* เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Primer3 โดยเชื้อ *Fusarium moniliforme* ได้ยีนเป้าหมายคือ polyketide synthase, *gao*B และบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) region และเชื้อ *Bipolaris maydis* และเชื้อ *Cephalosporium acremonium* ได้ยีนเป้าหมายคือ 18S rRNA สำหรับนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต่อไป ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ได้แต่ละชนิดแสดงดังในตารางที่ 1 ซึ่งปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ได้แก่ ความยาวของไพรเมอร์ ซึ่งโดยทั่วไปควรจะอยู่ในช่วง 18-22 เบส ค่าอุณหภูมิการหลอม (Tm) ของไพรเมอร์ควรจะมีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก เนื่องจากต้องใช้ทำปฏิกริยาไปพร้อมกันของแต่ละคู่ไพรเมอร์ ควรอยู่ในช่วง 55°C-60°C ความแตกต่างของค่า Tm ของแต่ละไพรเมอร์ไม่ควรเกิน 3°-5° C ความจำเพาะของไพรเมอร์เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณาในการออกแบบไพรเมอร์ต่อลำดับเบสของบริเวณเป้าหมาย เนื่องจากในการเตรียมมัลติเพล็กซ์จะมีองค์ประกอบที่เกิดการแข่งขันกันจับได้หลายบริเวณอยู่ในหลอดเดียวกัน และปัจจัยสุดท้ายคือหลีกเลี่ยงการเกิดไพรเมอร์ไดเมอร์ คือ ไพรเมอร์เกิดการจับกันเองซึ่งสามารถตรวจสอบได้ในขณะที่ทำการออกแบบ ซึ่งในการทำมัลติเพล็กซ์มีไพรเมอร์ที่เติมลงไปหลายคู่จึงมีโอกาสเพิ่มขยายขนาดดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะได้

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายในเชื้อราแต่ละชนิด

เชื้อราเป้าหมาย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5′⟶3′)	ยีนเป้าหมาย	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย(bp)
Fusarium moniliforme	Fum1F: GAG GCC CGA GCG AGC ACT GG Fum4R: CCA GCC GCG GAA ATT AGG GAT GTG	polyketide synthase	1456
	Fum5F: GTC CTA CGC GAT ACA TCC CAC CAC AAT Fum6R: GAT CAA GCT CGG GGC CGT CGT TCA TAG	polyketide synthase	419
	Fum5F: GTC CTA CGC GAT ACA TCC CAC CAC AAT Fum4R: CCA GCC GCG GAA ATT AGG GAT GTG	polyketide synthase	534
	Fum1F: CGA GGC CCG AGC GAG CAC TGG Fum6R: GAT CAA GCT CGG GGC CGT CGT TCA TAG	polyketide synthase	1340
	FUM1F: CCATCACAGTGGGACACAGT FUM1R: CGTATCGTCAGCATGATGTAGC ITS F: AACTCCCAAACCCCTGTGAACATA, ITS R: TTTAACGGCGTGGCCGC	polyketide synthase internal transcribed spacer (ITS) region	183 431
	FV-F2: CACTGGTGGTAACGATGCG FV-R: CACCCTGAGTGCCCTTGGTG	*gao*B	370
Fusarium sporotrichiodes	Fspor F1: CGCACAACGCAAACTCATC LanspoR1: TACAAGAAGACGTGGCGATAT	tri5 gene	641
Cephalosporium acremonium	nu-SSU-F: AAGGCATGGAATAATAATAGGA nu-SSU-R: TTGCAAT GCCT ATCC CCAGGA ARS-F: TCCTCCTAAACCTCATGCATTT ARS-R: ACGCAAAAACAGCCAAAGAC pyr4-F: TCTTTGAGGACCGCAAGTTT pyr4-R: GTCCTCGTCATCATCGTCCT	18S rRNA gene	285

	IPS-F: GGTCGCTCTTCTGATTTTCG IPS-R: GTTCACCGCGTAAAAGAAGC cds-F: GCTTTTGCTGATGCCTTAAAA cds-R: GCACTTCATCCTGCAAGTAAAA 18S-F: GGAACCCCATACCCTTCACT 18S-R: GGCGGTCCTATAAACCAACA 5.8S-F: AGCGTCATTTCAACCCTCAG 5.8S-R: CCTACCTGATCCGAGGTCAA pks1-F: CCGATACTTTCTGCCAGCTC pks1-R: GAGGCCTGCTTATTCACAGC F: CTAGGCTCTCCAACCCATTG R: AGCCAAGAGATCCGTTGTTG FMR 8303-F: CCTGTCTGAGCGTCATTTCA FMR 8303-R: CAGCGGGTATTCCTACCTGA		
Bipolaris maydis	JB589F: CCT TTT TTT TAT GCA GTT GCA JB591R: CTC CTG ATA CAG AGT GCA AAA	18S rRNA gene	346
	JB589F: CCT TTT TTT TAT GCA GTT GCA JB596R: GAG GTC AAA AGT TAA AAA TCG TAA	18S rRNA gene	397
	JB587F: CAG TTG CAA TCA GCG TCA GTA JB596R: GAG GTC AAA AGT TAA AAA TCG TAA	18S rRNA gene	331
	JB587F: CAG TTG CAA TCA GCG TCA GTA JB591R: CTC CTG ATA CAG AGT GCA AAA	18S rRNA gene	333

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยทำการทดสอบไพรเมอร์ทั้งหมด 24 คู่ โดยใช้น้ำยา PCR master mix (One PCR) ยี่ห้อ Genedirect® โดยมีองค์ประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อดังนี้

PCR reaction mixture	ปริมาตรที่เติม (ไมโครลิตร)
Template DNA	0.5
Forward Primer	0.5
Reverse Primer	0.5
Master Mix (One PCR)	
Distilled Water	Up to 25
Total reaction volume	25

และสภาวะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

PCR Steps		อุณหภูมิ	เวลา
Initial denature		93°C	7 นาที
35 รอบ	Denaturation	93°C	30 วินาที
	Annealing	60°C	1 นาที
	Extention	72°C	3 นาที
Final extension		72°C	7 นาที

พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis, Cephalosporium acremonium, Aspergillus niger, Aspergillus flavus และ Penicillium sp.* ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน และบางไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ และมีการเกิดไพรเมอร์ ไดเมอร์ สรุปดังแสดงในตารางที่ 2 เนื่องจากการเพิ่มขยายดีเอ็นเอใช้สภาวะเดียวกันทั้งหมดซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมต่อบางคู่ไพรเมอร์และอย่างไรก็ตามในขั้นตอนนี้จะทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis, Cephalosporium acremonium* ในสภาวะเดียวกันเพื่อนำไปสู่ขั้นตอนการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ และสามารถคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ Fum5-Fum6 สำหรับเชื้อ *Fusarium moniliforme* คู่ไพรเมอร์ JB589-JB591 สำหรับเชื้อ *Bipolaris maydis* และคู่ไพรเมอร์ F-R *Cephalosporium acremonium* เนื่องจากให้ขนาดที่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 2 การทดสอบไพรเมอร์ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Fusarium moniliforme, Bipolaris maydis, Cephalosporium acremonium, Aspergillus niger, Aspergillus flavus และ Penicillium sp.*

Primer/Fungi	*Fusarium moniliforme*	*Bipolaris maydis*	*Cephalosporium acremonium*	*Aspergillus niger*	*Aspergillus flavus*	*Penicillium sp.*
Fum 1-4	+	-	-	-	-	-
Fum 5-6	+	-	-	-	-	-
Fum 5-4	+	-	-	-	-	-
Fum 1-6	+	-	-	-	-	-
FUM1	+	-	-	-	-	-
ITS F-R	+	+	+	-	-	-
FV F2-R	+	-	-	+	-	-
Fverti-FR	+	-	-	+	-	-
53-6FR	+	+	+	+	+	+
Acr_str_AcS351-Acr_str_AcS391	-	-	+	-	-	-
LrDNAF63-LR3	-	-		+	+	-
Cep F1-R2	+	-	+	+	-	-
Cep F3-R4	+	-	+	+	+	-
Cep F5-R6	+	-	+	-	-	-

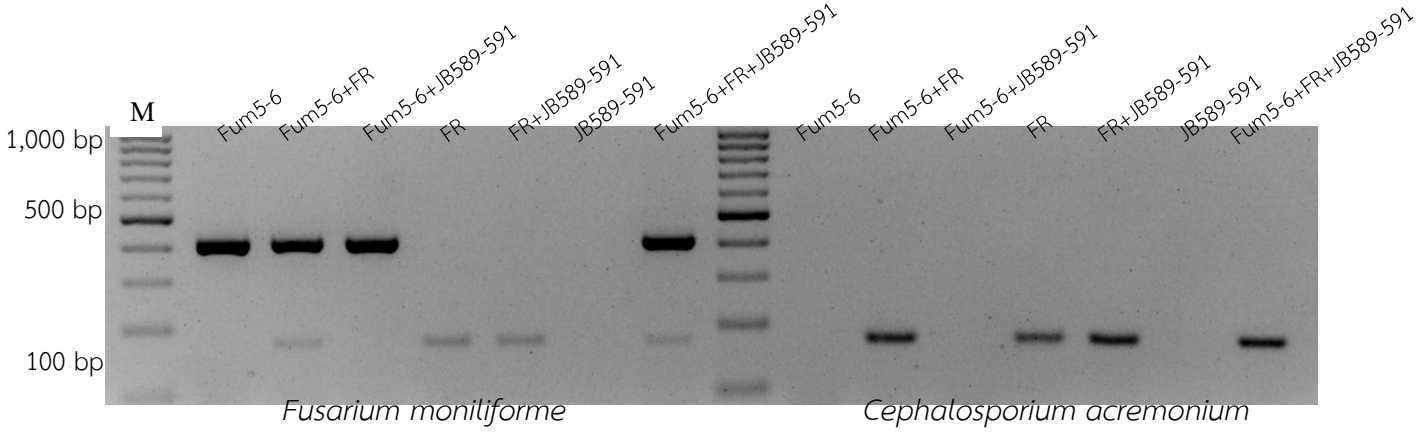
18S	+	+	+	+	+	+
FR	-	-	+	-	-	-
FHK	+	-	+	-	-	-
5.8S	+	-	+	-	-	-
IPS	-	-	+	-	-	-
JB589-591	-	+	-	-	-	-
JB589-596	-	+	-	-	-	-
JB587-596	-	+	-	-	-	-
ITS1-4	+	+	+	+	+	+

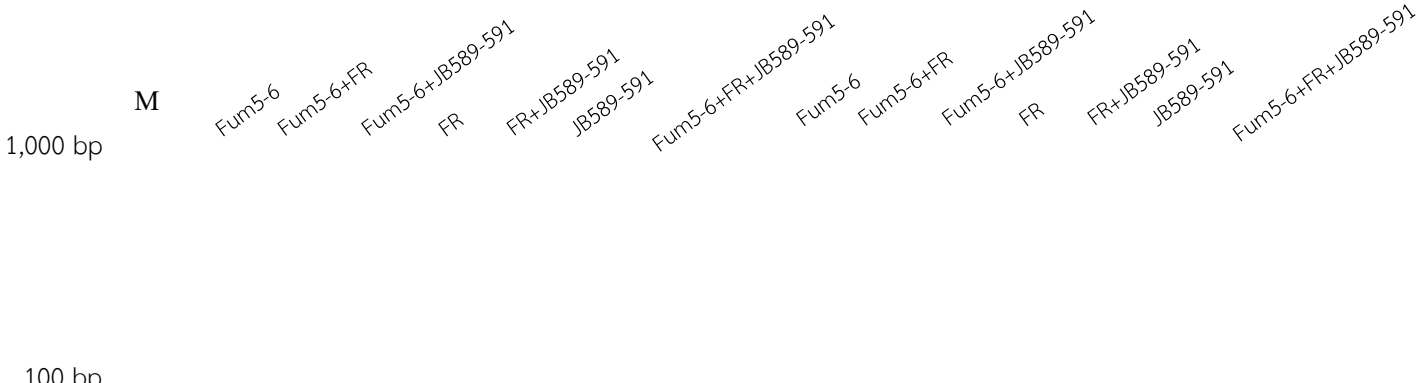
+ = เพิ่มขยายดีเอ็นเอได้

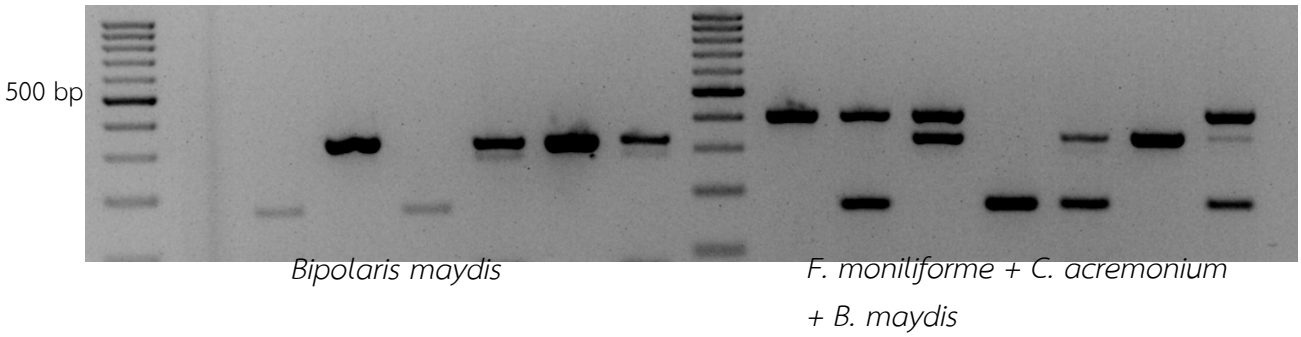
- = ไม่สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอได้

5. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

จากไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือกได้จากขั้นตอนข้างต้น จึงทำมาทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ โดยทดสอบกับไพรเมอร์ 1 คู่ ไพรเมอร์ผสม 2 คู่ และไพรเมอร์ผสม 3 คู่ กับดีเอ็นเอของเชื้อรา 1 สายพันธุ์ และดีเอ็นเอของเชื้อราผสม 3 สายพันธุ์เพื่อดูความจำเพาะ โดยใช้สภาวะการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเหมือนกัน พบว่าไพรเมอร์ Fum5-6 สามารถเพิ่มขยายขนาดดีเอ็นเอเฉพาะเชื้อ *Fusarium moniliforme* เมื่อในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีไพรเมอร์ 1, 2 และ 3 คู่ โดยให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 425 bp เช่นเดียวกับไพรเมอร์ JB589-591 สามารถเพิ่มขยายขนาดดีเอ็นเอของเชื้อ *Bipolaris maydis* ได้เท่านั้น เมื่อในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีไพรเมอร์ 1, 2 และ 3 คู่ โดยให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 346 bp ส่วนไพรเมอร์ FR ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดสำหรับเชื้อ *Cephalosporium acremonium* โดยให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 180 bp (ภาพที่ 4)



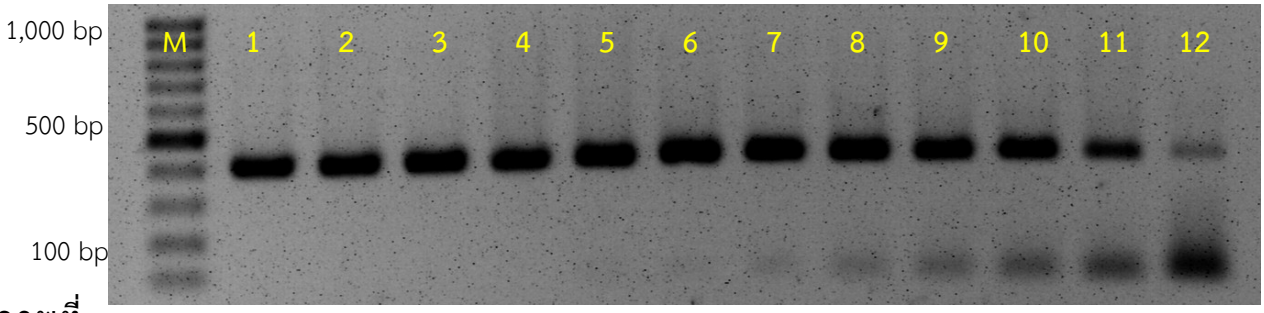




ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Fusarium moniliforme, Cephalosporium acremonium, Bipolaris maydis* และเชื้อผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ต่อความจำเพาะของไพรเมอร์

6. การทดสอบความไวของวิธีพีซีอาร์

จากการทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อรา *Fusarium moniliforme* โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อราเป้าหมายมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำมาทำพีซีอาร์ตามสภาวะที่เหมาะสม พบว่าไพรเมอร์ Fum5-6 มีความสามารถในการตรวจเชื้อได้ในระดับต่ำสุดของปริมาณเชื้อที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 39.06 pg ซึ่งยังให้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจน แต่เมื่อดีเอ็นเอลดลงเหลือ 19.53 pg พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีความเลือนลางแต่แถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์เห็นชัดเจนดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การทดสอบความไวของไพรเมอร์ Fum 5-6 ต่อเชื้อรา *Fusarium moniliforme* เมื่อเจือจางปริมาณดีเอ็นเอในปริมาณต่างๆ lane 1 = 100 ng; lane 2 = 20 ng; lane 3 = 10 ng; lane 4 = 5 ng; lane 5 = 2.5 ng; lane 6 = 1.25 ng; lane 7 = 625 pg; lane 8 = 312.5 pg; lane 9 = 156.25 pg; lane 10 = 78.125 pg; lane 11 = 39.06 pg; lane 12 = 19.53 pg

7. การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส

การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส จากการนำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มขยายด้วยไพรเมอร์ Fum 1-4 ไปหาลำดับเบส พบมีความเหมือนกับเชื้อรา *Fusarium moniliforme* (syn. *Gibberella moniliformis*) ถึง 99% และในการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสที่ผ่านการเพิ่มขยายด้วยไพรเมอร์ Fum 5-6 ไปหาลำดับเบสพบว่า มีความเหมือนกับเชื้อรา *Fusarium moniliforme* (syn. *Gibberella moniliformis*) ถึง 99% การตรวจสอบความถูกต้อง

ของลำดับเบส จากการนำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มขยายด้วยไพรเมอร์ FR ไปหาลำดับเบสพบว่าเป็นเชื้อรา *Cephalosporium acremonium* (syn. *Acremonium strictum*) ส่วนไพรเมอร์ JB 589-591 ไปหาลำดับเบส พบมีความเหมือนกับเชื้อรา *Bipolaris maydis* ถึง 99% เช่นเดียวกัน

Gibberella moniliformis polyketide synthase (PKS11) gene, partial cds

Sequence ID: AY495601.1Length: 8298Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 3760 to 4754GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1757 bits(951)	0.0	982/995(99%)	10/995(1%)	Plus/Plus

```
Query  4     GTGCTTGTCG--ATTGGCCCTCACAGCGCATTATCTGGACCACTCCGTCAAATCTTCAAG  61
             ||| ||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3760  GTGTTTGTCGAAATTGGCCCTCACAGCGCATTATCTGGACCACTCCGTCAAATCTTCAAG  3819

Query  62    GCTCATGGCAGGGGTAAAGAAGCCTATGTCTCAGCTATGATTCGTGGCGAAGACTGCACT  121
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3820  GCTCATGGCAGGGGTAAAGAAGCCTATGTCTCAGCTATGATTCGTGGCGAAGACTGCACT  3879

Query  122   GAGTCGTTGCTCAAGCTTGCTGGTGAGCTATTCTGCCATGGGACATCACTCCAGTTGTCA  181
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3880  GAGTCGTTGCTCAAGCTTGCTGGTGAGCTATTCTGCCATGGGACATCACTCCAGTTGTCA  3939

Query  182   AATGTCACTGCCGACGGTGATGTTGTAGTCGACTTGCCCCCTTATCCATGGAACCATGAC  241
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3940  AATGTCACTGCCGACGGTGATGTTGTAGTCGACTTGCCCCCTTATCCATGGAACCATGAC  3999

Query  242   CGAGAATATTGGTCTGAGAGCCGAGTCAGCAAGGATTGGAGATTCCGCAAATTCCCCAAC  301
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4000  CGAGAATATTGGTCTGAGAGCCGAGTCAGCAAGGATTGGAGATTCCGCAAATTCCCCAAC  4059

Query  302   CATGAGCTCCTTGGCTCACGAACCCTTGAAAGCAGCAGTCTACAACCTGAGTGGCGCAAT  361
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4060  CATGAGCTCCTTGGCTCACGAACCCTTGAAAGCAGCAGTCTACAACCTGAGTGGCGCAAT  4119
```

```
Query  362   TTGATCAGGCTTGATGGGATTCCGTGGCTCCGAGATCACCAGGTCCTCAATGACGTTGTC  421
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4120  TTGATCAGGCTTGATGGGATTCCGTGGCTCCGAGATCACCAGGTCCTCAATGACGTTGTC  4179

Query  422   TTTCCTTGCGCGGGCTACCTAGCGATGGCGGTGGAAGCGGTCCGACAGGTAGCTGGCACA  481
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4180  TTTCCTTGCGCGGGCTACCTAGCGATGGCGGTGGAAGCGGTCCGACAGGTAGCTGGCACA  4239

Query  482   TCTGAAATAGGAGGCTTCACTCTGAAAAGTGTTGTCGTCCAGTCTGCTCTGGTTCTGACC  541
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4240  TCTGAAATAGGAGGCTTCACTCTGAAAAGTGTTGTCGTCCAGTCTGCTCTGGTTCTGACC  4299

Query  542   GAATCGAAACCGGTGGAAGTACTTACAAGTCTAAGACCAGTTAGGTTAACCAACACTCTG  601
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  4300  GAATCGAAACCGGTGGAAGTACTTACAAGTCTAAGACCAGTCAGGTTAACCAACACTCTG  4359

Query  602   GACTCGGCTTGGTGGGAATTCTCCATCGTAGCACACAATGGCACCAGCTGGATCAAGCAC  661
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4360  GACTCGGCTTGGTGGGAATTCTCCATCGTAGCACACAATGGCACCAGCTGGATCAAGCAC  4419

Query  662   TGCGAGGGACAGGTCAGGCCAGGCCAGGATGCTCATCAGAAAACGGCCGTCTTGCCGCAA  721
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4420  TGCGAGGGACAGGTCAGGCCAGGCCAGGATGCTCATCAGAAAACGGCCGTCTTGCCGCAA  4479

Query  722   AGCGAGCCCATCAGCCAACACTACCCCCGCCTCGTGGACAATTTGTATCCTGAGCTTCTG  781
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4480  AGCGAGCCCATCAGCCAACACTACCCCCGCCTCGTGGACAATTTGTATCCTGAGCTTCTG  4539

Query  782   AGAATCGGCTTACGATATGGGCCCTCTTTCCGTGGTCTGGACAATGTCTCGTGTGTGCCA  841
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4540  AGAATCGGCTTACGATATGGGCCCTCTTTCCGTGGTCTGGACAATGTCTCGTGTGTGCCA  4599

Query  842   AATGGCAAGAAGGCCGCCGCAATGCTACGCGAAACAACAGTATCTGAGTCGTCCTACGCG  901
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4600  AATGGCAAGAAGGCCGCCGCAATGCTACGCGAAACAACAGTATCTGAGTCGTCCTACGCG  4659

Query  902   ATACATCCCACCACA-TCGAC-ACTGC-TC-AGCTG--TTTCCCTGCTAGCTGCGACG-A  954
             |||||||||||||||| ||||| ||||| || |||||  |||||||||||||||||||| |
```

```
Sbjct  4660  ATACATCCCACCACAATCGACCACTGCCTCCAGCTGTTTTTCCCTGCTAGCTGCGACGGA  4719

Query  955   GCA-TCTACAGAGTCGAGAAGCTGTGCGTTCCCAC  988
             ||| ||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  4720  GCATTCTACAGAGCCGAGAAGCTGTGCGTTCCCAC  4754
```

Acremonium strictum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), clone (53)33

Sequence ID: AM161135.1Length: 537Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 73 to 347GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
497 bits(269)	6e-137	274/276(99%)	2/276(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    AGCGCGCGGTGCCTCCGGGCTCCGGGCGTCCGCCGGGGACAACCAAACCCTGATTTTATC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  73   AGCGCGCGGTGCCTCCGGGCTCCGGGCGTCCGCCGGGGACAACCAAACCCTGATTTTATC  132

Query  61   GTGTATCTCTGAGGGGCGAAAGCCCGAAAACAAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGAT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  133  GTGTATCTCTGAGGGGCGAAAGCCCGAAAACAAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGAT  192

Query  121  CTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193  CTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  252

Query  181  AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCGGCACTCCGGCGGGCA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253  AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCGGCACTCCGGCGGGCA  312

Query  241  TGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAGG-CCC  275
            |||||||||||||||||||||||||| ||||| |||
Sbjct  313  TGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCC-TCAGGGCCC  347
```

Bipolaris maydis MWIT1 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence

Sequence ID: LC326252.1Length: 560Number of Matches: 1

Range 1: 171 to 470GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
547 bits(296)	7e-152	299/300(99%)	1/300(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    TGT-ATTATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG  59
            ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  171  TGTAATTATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG  230

Query  60   CGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA  119
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  231  CGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA  290

Query  120  CATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAG  179
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  291  CATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAG  350

Query  180  CTTTGCTTGGTGTTGGGCGTTTTTGTCTCCCTCTTTGCTGGGAGACTCGCCTTAAAACGA  239
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  351  CTTTGCTTGGTGTTGGGCGTTTTTGTCTCCCTCTTTGCTGGGAGACTCGCCTTAAAACGA  410

Query  240  TTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATATTTTGCACTCTGTATCAGGAGA  299
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  411  TTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATATTTTGCACTCTGTATCAGGAGA  470
```

8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละชนิดโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงจากเทคนิคพีซีอาร์พื้นฐานโดยทำให้สามารถเพิ่มขยายหลายๆ ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน ไพรเมอร์แต่ละคู่ต้องออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เป็นคู่สม (Complementary) กันและให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีขนาดความยาวแตกต่างกัน เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์ผลผลิตเหล่านั้นโดยวิธี agarose gel electrophoresis ได้ ซึ่งข้อสำคัญสำหรับเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ คือ ต้องปรับหาสภาวะพอเหมาะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ให้สามารถเพิ่มขยายทุกๆดีเอ็นเอเป้าหมายได้ประสิทธิภาพดีเท่าเทียมกันซึ่งนับว่าเป็นข้อจำกัดของเทคนิคนี้ เนื่องจากมีหลายองค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีความสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเข้มข้นแมกนีเซียม (วัชรี, 2536)

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อรา *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium* และ *Bipolaris maydis* พบว่าการใช้น้ำยาพีซีอาร์ MultiMax PCR Solution สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละชนิดโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ได้ซึ่งในปฏิกริยามีองค์ประกอบดังนี้

PCR reaction mixture	ปริมาตรที่เติม (ไมโครลิตร)
Template DNA	1
Primer mix (final conc. 3μM each)	2
2X Master/MultiMax PCR Solution	10
Distilled Water	Up to 20
Total reaction volume	20

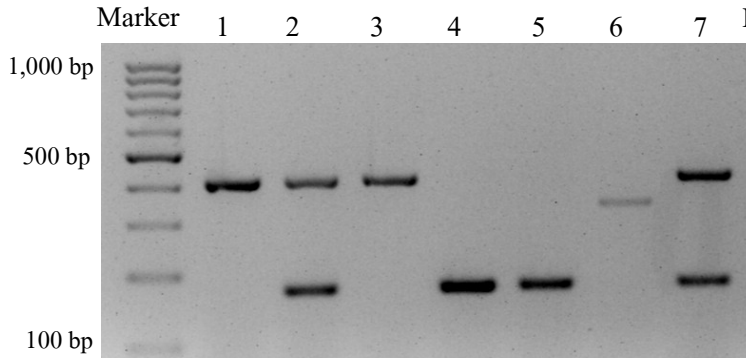
และกำหนดสภาวะของการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ดังนี้

PCR Steps		อุณหภูมิ	เวลา
Initial denature		95°C	5 นาที
35 รอบ	Denaturation	95°C	20 วินาที
	Annealing	60°C	1 นาที
	Extention	72°C	1 นาที
Final extension		72°C	5 นาที

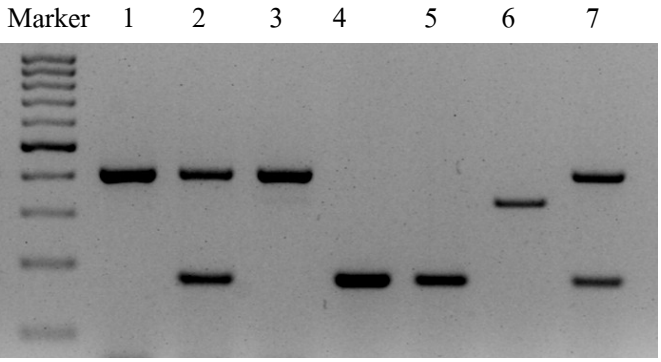
9. การทดสอบความไวและความถูกต้องของวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด

ในการศึกษาความไวของมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์นั้นเทียบได้กับ PCR ชุดเดียว เนื่องจากไพรเมอร์แต่ละคู่ต้องการอุณหภูมิและระยะเวลาในการหลอมที่แตกต่างกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการกำหนดอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม จากการนำเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดมาจุ่มในสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Fusarium moniliforme*, *Bipolaris maydis* และ *Cephalosporium acremonium* และคัดเลือกเมล็ดที่ติดเชื้อมาปะปนกับเมล็ดปกติ โดยใน 100 เมล็ดให้มีเมล็ดที่ติดเชื้อในระดับต่างๆ กัน ทำการสกัดดีเอ็นเอและนำไปเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยทดสอบไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้และเปรียบเทียบกับมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าในระดับที่เมล็ดข้าวโพดติดเชื้อทุกระดับให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนเมื่อใช้ไพรเมอร์ Fum5-6 (lane 1, 2, 3 และ 7) โดยมีขนาด 425 bp ขณะที่ไพรเมอร์ FR (lane 2, 4, 5 และ 7) มีขนาด 180 bp ส่วนไพรเมอร์ JB589-JB591 ให้แถบดีเอ็นเอที่ค่อนข้างจางที่สุด (lane 3, 5, 6 และ 7) โดยมีขนาด 346 bp ซึ่งต้องมีเมล็ดข้าวโพดที่ติดเชื้อ 20 เมล็ดต่อเมล็ดปกติ 80 เมล็ดขึ้นไปจึงจะแสดงแถบดีเอ็นเอได้ชัด จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความไวของไพรเมอร์ทั้ง 3 ที่ทดสอบในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดจริงมีระดับไม่เท่ากัน ซึ่งต้องมีทดสอบเพิ่มและเปรียบเทียบผลกับวิธีการดั้งเดิมจนกว่าจะแน่ใจว่าผลที่ได้ถูกต้อง

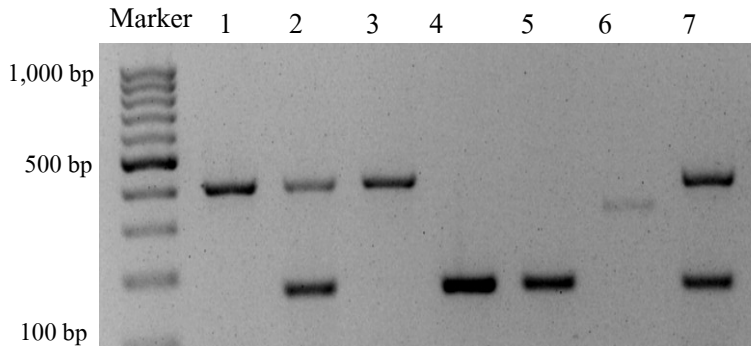
เมล็ดข้าวโพดที่ติดเชื้อ 1 เมล็ดต่อเมล็ดปกติ 99 เมล็ด



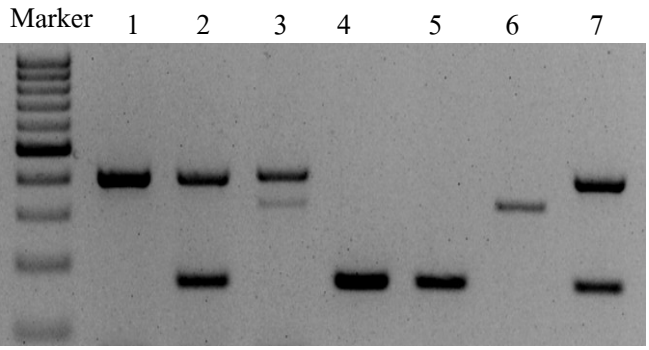
เมล็ดข้าวโพดที่ติดเชื้อ 2 เมล็ดต่อเมล็ดปกติ 98 เมล็ด



เมล็ดข้าวโพดที่ติดเชื้อ 4 เมล็ดต่อเมล็ดปกติ 96 เมล็ด



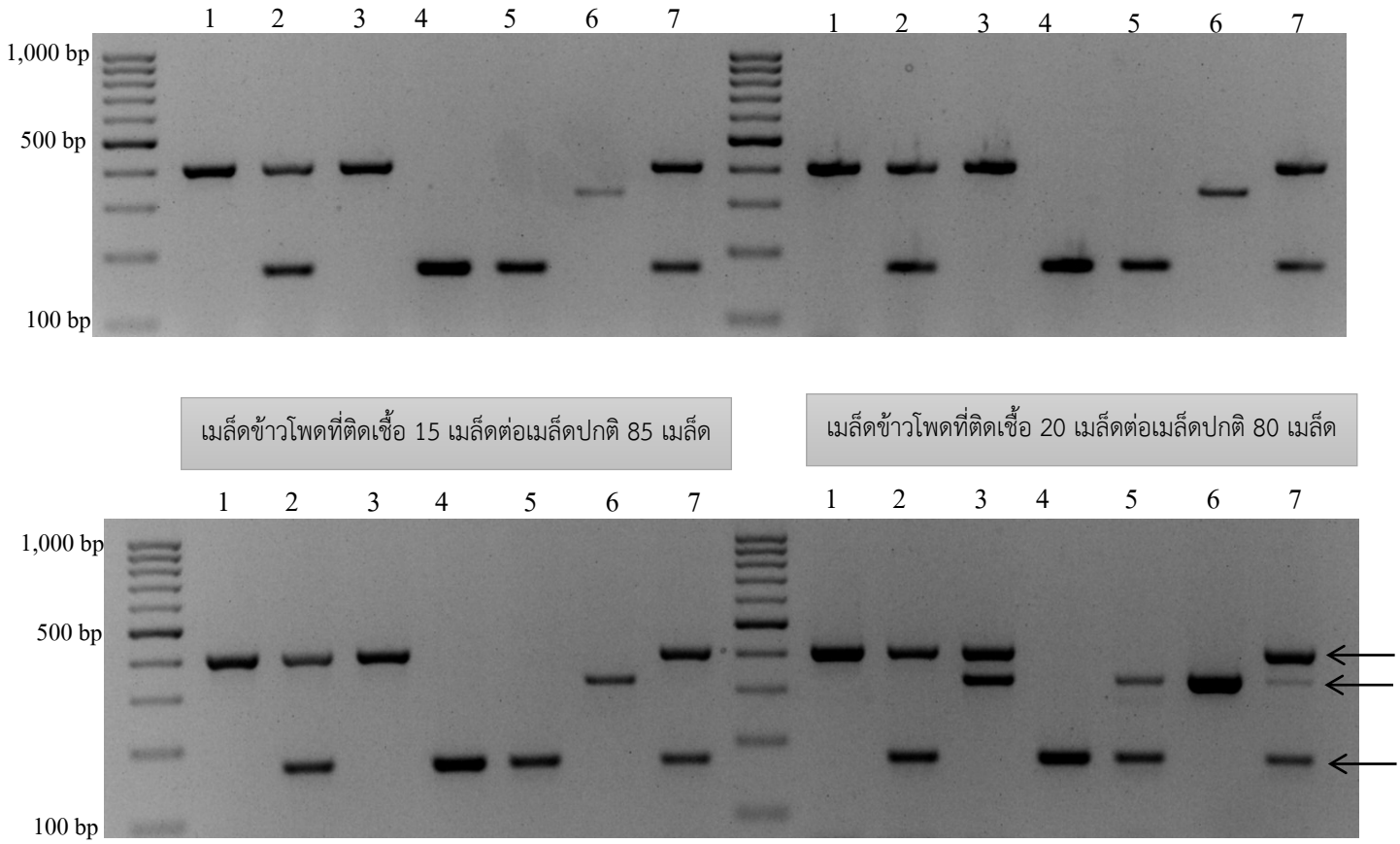
เมล็ดข้าวโพดที่ติดเชื้อ 6 เมล็ดต่อเมล็ดปกติ 94 เมล็ด



เมล็ดข้าวโพดที่ติดเชื้อ 8 เมล็ดต่อเมล็ดปกติ 92 เมล็ด

เมล็ดข้าวโพดที่ติดเชื้อ 10 เมล็ดต่อเมล็ดปกติ 90 เมล็ด

Marker



ภาพที่ 6 ผลของการทดสอบความไวและความถูกต้องของไพรเมอร์ 1, 2 และ 3 คู่ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่ติดเชื้อผสม 3 สายพันธุ์ คือ *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium* และ *Bipolaris maydis* ในระดับต่างๆกัน Lane 1 = ไพรเมอร์ Fum5-6; lane 2 = ไพรเมอร์ Fum5-6 + FR; lane 3 = ไพรเมอร์ Fum5-6 + JB589-591; lane 4 = ไพรเมอร์ FR; lane 5 = ไพรเมอร์ FR + JB589-591; lane 6 = ไพรเมอร์ JB589-591; lane 7 = ไพรเมอร์ Fum5-6 + FR + JB589-591

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. เชื้อรา *Fusarium moniliforme*, *Bipolaris maydis* และ *Cephalosporium acremonium* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคในข้าวโพดที่สำคัญทางเศรษฐกิจ จึงเป็นเชื้อกักกันในหลายๆประเทศ แต่การตรวจสอบเชื้อราที่ปนเปื้อนบน

เมล็ดพันธุ์เพื่อการนำเข้าและส่งออกจะใช้วิธีการทั่วไปคือเพาะบนกระดาษชื้นและดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อต้องใช้ความชำนาญของเจ้าหน้าที่ตรวจสอบ

2. ในการตรวจสอบสภาพจริงบนเมล็ดพันธุ์จะมีเชื้ออยู่หลายชนิดทั้งเชื้อในโรงเก็บ เช่น *Aspergillus niger, Aspergillus flavus และ Penicillium sp.* ที่มักเจริญได้รวดเร็ว และคลุมผิวเมล็ดเกือบทั้งหมด ทำให้การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคทำได้ยาก และมีโอกาสผิดพลาดได้จึงควรมีวิธีที่สามารถตรวจสอบได้รวดเร็วและแม่นยำและมีระดับความไวที่ต้องการ

3. เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจเชื้อกักกันทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium* และ *Bipolaris maydis* โดยชุดไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ Fum5-Fum6, F-R และ JB589-JB591 ตามลำดับ โดยไพรเมอร์ Fum5-Fum6 ถูกออกแบบจากบริเวณยีน polyketide synthase ส่วนไพรเมอร์ F-R และ JB589-JB591ออกแบบจากบริเวณ 18S rRNA gene ไพรเมอร์ที่ใช้ต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มขยายขนาดที่มีขนาดจำเพาะของแต่ละคู่เบสแต่ละเชื้อ 180 bp (*Cephalosporium acremonium*), 425 bp (*Fusarium moniliforme*) และ 346 bp (*Bipolaris maydis*)

4. เมื่อนำไปทดสอบความไวและความถูกต้องของวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดพบว่าสามารถตรวจได้ในระดับที่เมล็ดข้าวโพดติดเชื้อต่ำสุด 1%

5. วิธีนี้ยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคในกรณีที่ข้าวโพดปนเปื้อนด้วยเชื้อโรคต่างๆ มากมาย เนื่องจากไพรเมอร์คู่ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีปฏิกิริยาตอบสนองโดยเฉพาะกับเชื้อโรคเป้าหมาย แต่ไม่ตอบสนองกับเชื้อโรคอื่น เช่น *Aspergillus niger, Aspergillus flavus และ Penicillium sp.*

6. แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการนำเทคนิคนี้ไปทดสอบในตัวอย่างข้าวโพดจริงเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้กันอยู่ทั่วไปคือการเพาะบนกระดาษชื้นอีกหลายครั้งๆ เพื่อให้มั่นใจว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจตัวอย่างได้จริง และมีความแม่นยำสูง เพื่อให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากลต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ให้ระบุผลงานที่สิ้นสุด ได้นำไปใช้ประโยชน์อย่างไร พัฒนาต่อหรือถ่ายทอด หรือเผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย (ระบุเป็นข้อๆ)

1. ได้วิธีการทดสอบที่ให้ผลรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และเป็นที่ยอมรับ

2. สามารถนำผลการวิจัยมาให้บริการตรวจสอบสุขอนามัยในเมล็ดพันธุ์พืชเพื่อรับรองการปลอดศัตรูพืชสำหรับการส่งออกแก่บริษัทเมล็ดพันธุ์

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง :

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎี &การประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology. โรงพิมพ์เรือนแก้ว กรุงเทพฯ. 208 หน้า.

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.

Mathur S.B. and O. Kongsdal. 2003. Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi, 1st Edition. Bassersdorf, Switzerland : International Seed Testing Association, 425 p.

Markoulatos, P., N. Siafakas and M. Moncany. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. J. Clinical Laboratory Anal. 16:47-51.

MöllerJerzy E. M., J. Chełkowski. 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.