รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

.....

1. ชุดโครงการวิจัย : **วิจัยและพัฒนาอารักขาพืช**

2. **โครงการวิจัย** : **วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล เพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร**

กิจกรรม : **การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและการส่งออก**

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : **การตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne enterolobii* ด้วยเทคนิคแลมป์**

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : **Detection of Root-knot Nematode *Meloidogyne enterolobii* using Loop Mediated Isothermal Amplification PCR Technique**

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : ไตรเดช ข่ายทอง **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ธิติยา สารพัฒน์ **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ทิพวรรณ กันหาญาติ **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. **บทคัดย่อ** : การทดสอบการใช้เทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification PCR ในการตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ดำเนินการที่กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เก็บตัวอย่างดินจากสวนฝรั่ง จ. นครปฐม และสมุทรสาคร รวม 24 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 16 ตัวอย่าง เลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ประชากรที่บริสุทธิ์ 9 ตัวอย่าง ตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทางสัณฐานวิทยา โดยใช้ลักษณะ perineal pattern ของตัวเต็มวัยเพศเมีย ลักษณะของตัวเต็มวัยเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สอง และตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ Me-F/Me-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 236 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์จำเพาะ MK7-F/MK7-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 520 คู่เบส ซึ่งยืนยันว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ทดสอบการตรวจสอบชนิดด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification PCR พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เป็นวิธีการที่มีความจำเพาะเจาะจง มีความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเอของ *M. enterolobii* ได้ถึงความเข้มข้น 15 พิโคกรัม

Abstract : Verification of Loop Mediated Isothermal Amplification PCR technique to for the root-knot nematode *M. enterolobii* was carried out at the Nematology Section, Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development office. Soil samples were collected from guava orchards at Nakhon Pathom and Samut Sakhon Province. Root-knot nematodes were detected in 16 samples and 9 isolates were purified and maintained in

กรมวิชาการเกษตร

tomato roots. Root-knot nematodes were further identified as *M. enterolobii* by the morphology of perineal patterns, male and juveniles, and confirmed with PCR technique using specific primer Me-F/Me-R and MK7-F/MK7-R which obtained DNA fragments of 236 and 520 bases respectively. Loop Mediated Isothermal Amplification PCR of *M. enterolobii* was performed and found that the optimum condition was 30 minutes at 60 degree Celsius. LAMP-PCR was found to be specific with *M. enterolobii* and the sensitivity was 15 picograms DNA concentration.

6. คำนำ : เทคนิคแลมป์ (Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)) พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ *Bst* DNA polymerase ที่อุณหภูมิคงที่ 60 ถึง 65 องศาเซลเซียส และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบอย่างจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการถึง 4 เส้น ประกอบด้วย 6 ตำแหน่ง ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการเพิ่มปริมาณนั้น ทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง (Notomi *et al.,* 2000) วิธีนี้จะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาสั้นมากไม่เกิน 1 ชั่วโมง โดยตรวจผลการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอได้จากความขุ่น (turbidity) ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการจับกันของ pyrophosphate ions กับ magnesium ions เกิดเป็นตะกอน magnesium pyrophosphate สีขาวขึ้นในสารละลายซึ่งสังเกตได้ด้วยตาเปล่า โดยเทคนิคแลมป์นี้ใช้เพียงตู้บ่มเชื้อที่ตั้งอุณหภูมิ 60 ถึง 65 องศาเซลเซียส ไม่ต้องการผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบ ขั้นตอนในการทดสอบไม่ยุ่งยาก และให้ผลการทดสอบภายในเวลา 1-2 ชั่วโมง เทคนิคแลมป์พีซีอาร์มีการนำไปผลิตเป็นชุด kits ในเชิงการค้าเพื่อตรวจสอบเชื้อหลายชนิด เช่น ไวรัส แบคทีเรีย รา และปรสิตที่ก่อโรคในมนุษย์ (Mori and Notomi, 2009) สำหรับการนำมาใช้ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมีรายงานการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่สำคัญบางชนิด เช่น ไส้เดือนฝอยศัตรูต้นสน (pinewood nematode) *Bursaphelenchus xylophilus* (Kikuchi et al., 2009) ไส้เดือนฝอยรากโพรง *Radopholus similis* (Peng *et al*., 2012) ไส้เดือนฝอยศัตรูส้ม *Tylenchulus semipenetrans* (Lin *et al*., 2016) ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. (Niu *et al*., 2011), ไส้เดือนฝอยรากปม *M. hapla* (Peng *et al*., 2017) สำหรับไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* นั้น Niu *et al*. (2012) ได้ประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคแลมป์ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ที่แยกจากตัวอย่างรากและตัวอย่างดิน โดยตรวจบริเวณของ 5s rDNA-IGS2 พบว่า มีความจำเพาะต่อประชากรของ *M. enterolobii* สามารถตรวจติดตามได้ที่ปริมาณดีเอ็นต่ำสุด 10 fg และ He *et al*. (2013) ใช้เทคนิคแลมป์ ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* จากตัวอย่างพืช โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS ระหว่าง *M. enterolobii* และไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆ

ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne enterolobii* เป็นไส้เดือนฝอยรากปมชนิดสำคัญ มีพืชอาศัยกว้าง ทั้งพืชปลูกที่เป็นพืชเศรษฐกิจ และวัชพืช เข้าทำลายได้ทั้งพืชประเภทที่ลำต้นมีเนื้อไม้ (woody stem) เช่น ไม้ยืนต้น และไม่มีเนื้อไม้ (herbaceous stem) เช่น ไม้ล้มลุก และที่สำคัญอย่างยิ่งคือสามารถเข้าทำลายพืชหลายชนิดที่มียีนต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม (Castagnone-Sereno, 2012; Kiewnick *et al*., 2009) ได้ ซึ่ง

เป็นอุปสรรคต่อการใช้พันธุ์ต้านทานในการป้องกันกำจัด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *M. enterolobii* มีความสามารถในการเข้าทำลาย และอัตราการขยายพันธุ์สูงกว่าไส้เดือนฝอยรากปมที่พบการแพร่ระบาดอยู่ทั่วไป เช่น *M. incognita* หรือ *M. arenaria* ไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* พบครั้งแรกที่มณฑลไห่หนาน ประเทศจีน ปัจจุบันพบในทวีปต่างๆ ทั่วโลก ในประเทศไทยมีรายงานการพบไส้เดือนฝอยรากปมชนิดนี้ในสวนฝรั่ง จ. ราชบุรี และ จ. นครปฐม ในปี พ.ศ. 2555 ซึ่งตรวจยืนยันโดยใช้ esterase phenotype และ PCR ในยีนส่วนไมโตคอนเดรีย (Jindapunnapat, 2012) ในปี ค.ศ. 2010 *M. enterolobii* อยู่ในบัญชีรายชื่อศัตรูพืชประเภท A2 ของ European Plant Protection Organization ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่พบในสหภาพยุโรป แต่มีการควบคุมเช่นเดียวกับศัตรูพืชกักกัน (Castagnone-Sereno, 2012) จากความสามารถในการแพร่กระจายและตั้งถิ่นฐานของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดนี้ทำให้หลายประเทศประกาศให้ *M. enterolobii* เป็นศัตรูพืชกักกัน (Elling, 2013) การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ให้ถูกต้องแม่นยำจึงมีความจำเป็น เพื่อวางแผนในการป้องกันกำจัด เทคนิคแลมป์พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่มีความเหมาะสมในการนำไปปฏิบัติในภาคสนาม หรือห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องมือวิเคราะห์ราคาสูง ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ได้มีผู้ออกแบบไว้แล้ว อย่างไรก็ตามการนำมาใช้ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ในประเทศไทย ควรมีการทดสอบเพื่อให้เกิดความมั่นใจถึงประสิทธิภาพ ความถูกต้องแม่นยำ และข้อจำกัดต่าง ๆ ก่อนการนำไปใช้

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน อุปกรณ์สำหรับแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินและส่วนของพืช อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช สารฆ่าแมลง ปุ๋ยเคมี กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ สไลด์ ถ้วยนับตัวอย่าง อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา เช่น เครื่องปั่นเหวี่ยง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส

- วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างและจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้สัณฐานวิทยา

<u>การเก็บตัวอย่างดิน และรากพืช</u>

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยรากปม โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 20 จุดต่อแปลง ความลึก ประมาณ 15-20 เซนติเมตร โดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดิน เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว คลุกเคล้าเข้าด้วยกันให้ได้ตัวอย่างดินอย่างน้อยแปลงละ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ และชนิดพืชปลูก รวมทั้งเก็บตัวอย่างราก หรือส่วนของพืชที่แสดงอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม

<u>การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและพืช</u>

แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน 250 กรัมโดยวิธีการกวนตัวอย่างดินในน้ำปริมาตร 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่างและนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรอง ที่

กรมวิชาการเกษตร

วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แยกไส้เดือนฝอยรากปมจากพืชโดยการคีบกลุ่มไข่จากรากหรือส่วนของพืชโดยตรง

<u>การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง</u>

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนปลูกในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปมในกระถาง หลังจากนั้น 45 วัน ล้างรากมะเขือเทศด้วยน้ำสะอาด เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคีบกลุ่มไข่ 1 กลุ่มจากรากด้วยปากคีบ นำไปแช่ในน้ำสะอาดในถ้วยนับตัวอย่าง ตรวจดูการฟักของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยและไข่ใส่ลงในกระถางที่ปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน เลี้ยงไว้ประมาณ 60 วัน เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมชนิดเดียวกันที่บริสุทธิ์ หากเป็นตัวอย่างรากที่มีกลุ่มไข่ จะเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคีบกลุ่มไข่มาแช่ในน้ำกลั่น ตรวจดูการฟักของตัวอ่อนระยะที่สอง แล้วนำไปเทใส่ในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนที่ปลูกในกระถางในดินอบฆ่าเชื้อ

<u>การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา</u>

ตรวจลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้น โดยแยกตัวเต็มวัยไส้เดือนฝอยรากปมเพศเมียจากรากมะเขือเทศ แช่ใน lactic acid 45% นาน 30 นาที ตัดส่วนของผนังลำตัว (cuticle) บริเวณส่วนก้นวางบนสไลด์ในหยดกลีเซอรอล ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง เตรียมไส้เดือนฝอยเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐาน โดยคงสภาพไส้เดือนฝอยตามวิธีการของ Seinhorst (1959) ตรวจสอบรูปร่างลักษณะทางสัณฐาน วัดขนาดส่วนต่างๆ เปรียบเทียบกับลักษณะของไส้เดือนฝอยรากปม M. enterolobii ในเอกสารวิชาการ (Yang and Eisenback, 1983; Rammah and Hirschmann, 1988) โดยตรวจสอบลักษณะต่างๆ เช่น ลักษณะส่วนหัวของตัวเต็มวัยเพศเมีย ส่วน hyaline region บริเวณหางของตัวอ่อนระยะที่สอง (EPPO, 2011)

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง และตรวจสอบชนิดด้วยเทคนิค PCR

การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการตาม Schizas *et al.,* 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เขี่ยไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช่ส่วนปลายของ pipette tip ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55°C ใน water bath เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟ เป็นเวลา 6 นาที ถ้าเตาไมโครเวฟเป็นชนิด 750 วัตต์ (สามารถปรับเวลาตามกำลังไฟของเตาไมโครเวฟให้ได้ 4,500 วัตต์-นาที ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม)

ศรีวิชัยการเกษตร

ตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ MK7-F: 5'GATCAGAGGCGGGCGCATTGCGA 3' และ MK7-R : 5'CGAACTCGCTCGAACTCGAC 3' และคู่ไพรเมอร์ Me-F: 5'AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG 3' และ Me-R: 5'TCAGTTCAGGCAGGATCAACC 3' ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใส่ GoTaq® Green Master Mix (Promega) 10 ไมโครลิตร forward และ reverse primer (ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ DNA template 1 ไมโครลิตร ในหลอด PCR ขนาด 0.2 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที อุณภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สำหรับคู่ไพรเมอร์ MK7-F/MK7-R ,และอุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สำหรับคู่ไพรเมอร์ Me-F/Me-R, อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทั้งหมด 40 รอบ ตามด้วย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจด้วยเจลอีเอ็กโตรโฟรีซีส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที

3. การทดสอบเทคนิคแลมป์พีซีอาร์

<u>การทดสอบสภาวะที่เหมาะสม</u>

ทำปฏิกิริยาแลมป์ตามวิธีการของ Notomi *et al*. (2000) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย Niu *et al*. (2012) ซึ่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 5S rDNA-IGS2 ในปฏิกิริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x *Bst* DNA polymerase buffer 2.5 µL, 1.4mM dNTP, FIP และ BIP primers อย่างละ 1.6 µM, F3 และ B3 outer primers อย่างละ 0.2 µM, LF and LB primers อย่างละ 0.8 µM, 0.8 M betaine, 8 U *Bst* DNA polymerase และ 1 µL purified genomic DNA ซึ่งมีดีเอ็นเอประมาณ 10 นาโนกรัม หาสภาวะที่เหมาะสมโดยทำปฏิกิริยาที่ 60-65 องศาเซลเซียส นาน 30 45 60 หรือ 75 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำผลผลิตปฏิกิริยาที่ได้ไปตรวจด้วยเจลอีเอ็กโตรโฟรีซีส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที หรือตรวจสอบโดยเติมสาร 1:10 fluorescent dye SYBR Green I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และตรวจภายใต้แสง UV

<u>การทดสอบความไว (sensitivity)</u>

ทดสอบความไวของปฏิกิริยา โดยการทำ 10-fold dilution ของดีเอ็นเอไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR (ใช้คู่ไพรเมอร์ MeF3/B3) โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

<u>การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)</u>

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์พีซีอาร์ โดยทดสอบกับดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆ ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลอื่นๆ เช่น *Radopholus Pratylenchus Hirschmaniella Rotylenchulus Tylenchorhynchus Helicotylenchus* รวมทั้งไส้เดือนฝอยที่ไม่ใช่ศัตรูพืชชนิดต่างๆ ที่มักพบในตัวอย่างดิน ซึ่งเป็นตัวอย่างไส้เดือนฝอยจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์

ศรีวิชัยการเกษตร

เปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR ที่ใช้ universal primers สำหรับไส้เดือนฝอย เช่น VRF1/F2 และคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* เช่น SCAR marker Mk7-F/R ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลของปฏิกิริยาแลมป์ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์เปรียบเทียบกับ conventional PCR ผลการตรวจปมรากมะเขือเทศด้วยเทคนิคแลมป์เปรียบเทียบกับ conventional PCR ผลการตรวจปมรากพืชจากแปลงปลูกของเกษตรกรด้วยเทคนิคแลมป์เปรียบเทียบกับ conventional PCR

- การวิเคราะห์ผลการทดลอง
- เปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ กัน
- เปรียบเทียบความไวของเทคนิคแลมป์กับ conventional PCR โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่างๆ

เวลาและสถานที่ : - เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2563
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง :

1. การเก็บตัวอย่างดิน การแยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย

เก็บตัวอย่างดินจากสวนฝรั่งจำนวน 24 ตัวอย่าง จาก อ. สามพราน จ. นครปฐม 5 ตัวอย่าง อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร 4 ตัวอย่าง อ. กระทุ่มแบน จ. สมุทรสาคร 15 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 16 ตัวอย่าง ปลูกมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ ในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ครบวงจรชีวิตและสร้างกลุ่มไข่ เพื่อใช้เตรียมประชากรไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์โดยการเลี้ยงจาก 1 กลุ่มไข่ เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมได้ 9 ตัวอย่าง จาก ต.หนองนกไข่ อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร 4 ตัวอย่าง ต.เกษตรพัฒนา อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร 3 ตัวอย่าง ต. ท่าไม้ อ.กระทุ่มแบน จ. สมุทรสาคร 1 ตัวอย่าง และ ต. บ้านใหม่ อ. สามพราน จ. นครปฐม 1 ตัวอย่าง (Table 1)

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้ จาก perineal pattern ของตัวเต็มวัยเพศเมีย ลักษณะของตัวเต็มวัยเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สอง เปรียบเทียบกับ OEPP/EPPO Bulletin (2016) 46 (2), 190-201 พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* (Figure 2)

ตัวเต็มวัยเพศเมีย

Perineal pattern มีลักษณะกลมหรือรูปไข่ ส่วน dorsal arch ค่อนข้างสูงส่วนใหญ่มีลักษณะโค้งมน

ตัวเต็มวัยเพศผู้

มี labial disk ลักษณะกลมมีขนาดใหญ่ซึ่งรวมเข้ากับ medial lips กลายเป็น dorsoventrally elongate lip region ส่วน labial disk นูนขึ้นเล็กน้อย medial lips มีลักษณะ crescent-shaped ส่วน lip

ศรีวิชาการเกษตร

region มีลักษณะสูง โค้งมน แยกออกจากลำตัวเล็กน้อย หางสั้นโค้งมน phasmids มีขนาดเล็ก ลักษณะเป็นรู อยู่ระดับเดียวกับ anus

ตัวอ่อนระยะที่สอง

ยาวประมาณ 436.6 (405.0-472.9) ไมโครเมตร hemizonid อยู่เหนือ excretory pore ประมาณ 1-2 annules lateral lips มีขนาดใหญ่ ลักษณะเป็นสามเหลี่ยม ส่วนหัวมีลักษณะปลายตัด (truncate) stylet knob ใหญ่และกลม หางแหลม ปลายหางมน ส่วน hyaline tail terminus ชัดเจน

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง และตรวจสอบชนิดด้วยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการตาม Schizas *et al.,* 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) นำไปตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ MK7-F/ MK7-R และคู่ไพรเมอร์ Me-F/Me-R ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจด้วยเจลอีเอ็กโตรโฟรีซีส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปมด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *M. enterolobii* โดยคู่ไพรเมอร์ Me-F/Me-R ได้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาขนาด 236 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์ MK7-F/MK7-R ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาขนาด 520 คู่เบส ซึ่งตรงกับ *M. enterolobii* (Figure 3)

3. การทดสอบเทคนิคแลมป์พีซีอาร์

เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* แต่ละไอโซเลต สกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* และไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ เช่น *M. incognita* และ *M. javanica* และไส้เดือนฝอยชนิดต่าง ๆ สำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง

<u>การทดสอบสภาวะที่เหมาะสม</u>

ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP-PCR ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Figure 4)

<u>การทดสอบความไว (sensitivity)</u>

ทดสอบความไวของปฏิกิริยา โดยการทำ 10-fold dilution ของดีเอ็นเอไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR (ใช้คู่ไพรเมอร์ MeF3/B3) พบว่าสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของ *M. enterolobii* ได้ถึงความเข้มข้น 15 พิโคกรัม (Figure 5)

<u>การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)</u>

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์พีซีอาร์ โดยทดสอบกับดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆ ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลอื่นๆ เช่น *Radopholus Pratylenchus Hirschmaniella Rotylenchulus Tylenchorhynchus Helicotylenchus* รวมทั้งไส้เดือนฝอยที่ไม่ใช่ศัตรูพืชชนิดต่างๆ ที่มักพบในตัวอย่างดิน ซึ่งเป็นตัวอย่างไส้เดือนฝอยจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย พบว่าเทคนิคแลมป์พีซีอาร์มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* (Figure 6)

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ :

กรมวิชาการเกษตร

การใช้เทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* เป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็วใช้เวลาประมาณ 30 นาที มีความจำเพาะเจาะจง มีความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเอของ *M. enterolobii* ได้ถึงความเข้มข้น 15 พิโคกรัม

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

11. เอกสารอ้างอิง :

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ มนตรี เอี่ยมวิมังสา และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2558. *Pasteuria penetrans* แบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม. หน้า 193-200. *ใน*: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 12 20-22 ตุลาคม 2558 ณ โรงแรมดุสิต ไอส์แลนด์ รีสอร์ท จังหวัดเชียงราย.

Adiko, A. and S.R. Gowen. 1999. Effects of Spores of *Pasteuria penetrans* on the Motility of Second-stage Juveniles of *Meloidogyne incognita*. Russian Journal of Nematology. 7: 5-6.

Ali D.D., P.M. Ali, B.A. Ghaffar and M.S. Ahmed. 2005. The Effect of Different Initial Densities of Nematode (*Meloidogyne javanica*) on the Build-up of *Pasteuria penetrans* Population. Journal of Zhejiang University Science. 6B: 113-118.

Alves, F.R., L.G. de Freitas, P.R.P. Martinelli, S. Ferras and L.A. Maffia.2008. Influence of Inoculum Densities of *Meloidogyne* spp. and Host Plant Age on the Mass Production of *Pasteuria penetrans*. Nematologia Brasileira. 32: 13-19.

Cetintas, R. and D.W. Dickson. 2004. Persistence and Suppressiveness of *Pasteuria penetrans* to *Meloidogyne arenaria* Race 1. Journal of Nematology. 36: 540-549.

Chaudhary K. K. and R. K. Kaul. 2013. Efficacy of *Pasteuria penetrans* and Various Oil Seed Cakes in Management of *Meloidogyne incognita* in Chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Agricultural Science and Technology. 15: 617-626.

Chen, Z.X., D.W. Dickson, R. McSorley, D.J. Mitchell, and T.E. Hewlett. 1996. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by Soil Application of Endospores of *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology. 28: 159-168.

Chen, Z.X. and D.W. Dickson. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, Ecology, and Biological Control Potential. Journal of Nematology. 30: 313-340.

Daudi, A.T. and S.R. Gowen. 1992. The Potential for Managing Root-knot Nematodes by Use of *Pasteuria penetrans* and Oxamyl Nematologia Mediterranea. 20: 241-244.

Frans, A.A., M.De Leij, K.G. Davies and B.R. Kerry. 1992. The Use of *Verticillium chlamydosporium* Goddard and *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr Alone and

in Combination to Control Plant Parasitic Root-knot Nematodes: *Meloidogyne* spp. Fundamental and Applied Nematology. 15: 235-242.

Gowen, S, K.G. Davies and B. Pembroke. 2008. Potential Use of *Pasteuria* spp. in the Management of Plant Parasitic Nematodes. Pp. 205-219 in Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes. Ciancio, A. and K.G. Mukerji, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Hewlett, T.E. and D.W. Dickson. 1993. A Centrifugation Method for Attaching Endospores of *Pasteuria* spp. to Nematodes. Supplement to Journal of Nematology 25(4S): 785-788.

Hussey, R.S., and K.R. Barker. 1973. A Comparison of Methods of Collecting Inocula of *Meloidogyne* spp., Including a New Technique. Plant Disease Reporter. 57: 1025-1028.

Khaithong, T.,M. Iemwimangsa, T. Sarapat and P. Thammakijjawat. 2012. Collection of *Pasteuria penetrans* in Thailand. Page 133. *In*: The International Conference on Tropical and Sub-tropical Plant Diseases. Feb. 7-10, 2012. Chiang Mai, Thailand.

Melki, K.C., I.O. Giannakou, R. Pembroke and S.R. Gowen. 1998.The cumulative build-up of *Pasteuria penetrans* spores in root-knot nematode infested soil and the effect of soil applied fungicides on its infectivity. Fundamental and Applied Nematology. 21: 679-683.

Table 1 Number of samples and locations.

No.	Location			RKN detection	Me Morpho logical ID	Me PCR ID
	Sub District	District	Province			
1	Ban Mai	Sam Phran	Nakhon Pathom	✗	✗	✗
2	Ban Mai	Sam Phran	Nakhon Pathom	✓	✓	✓
3	Tha Mai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
4	Ban Mai	Sam Phran	Nakhon Pathom	✗	✗	✗
5	Bang Chang	Sam Phran	Nakhon Pathom	✗	✗	✗
6	Bang Chang	Sam Phran	Nakhon Pathom	✗	✗	✗
7	Kaset Phatthana	Ban Phaeo	Samut Sakhon	✓	✓	✓
8	Kaset Phatthana	Ban Phaeo	Samut Sakhon	✓	✓	✓
9	Kaset Phatthana	Ban Phaeo	Samut Sakhon	✓	✓	✓
10	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
11	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓

กรมวิชาการเกษตร

12	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
13	Khlong Tan	Ban Phaeo	Samut Sakhon	×	×	×
14	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
15	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
16	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
17	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
18	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
19	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
20	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
21	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
22	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
23	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
24	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×

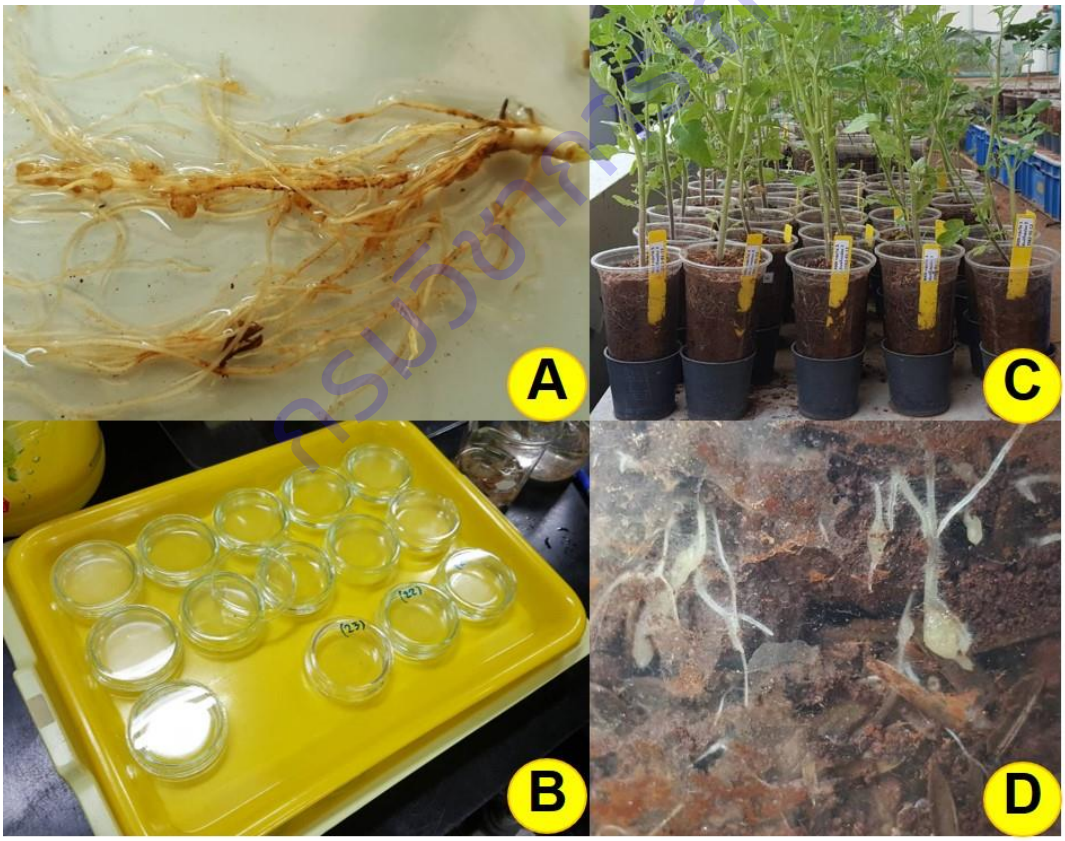


Figure 1 (A) Galled tomato root from tomato plant grown in soil samples from fields infested with root-knot nematodes. (B) Single eggmass was detached from the root and placed in sterile water (C) Hatched juveniles were inoculated into tomato plants grown in sterile soil (D) pure nematode population were obtained and used for further study.

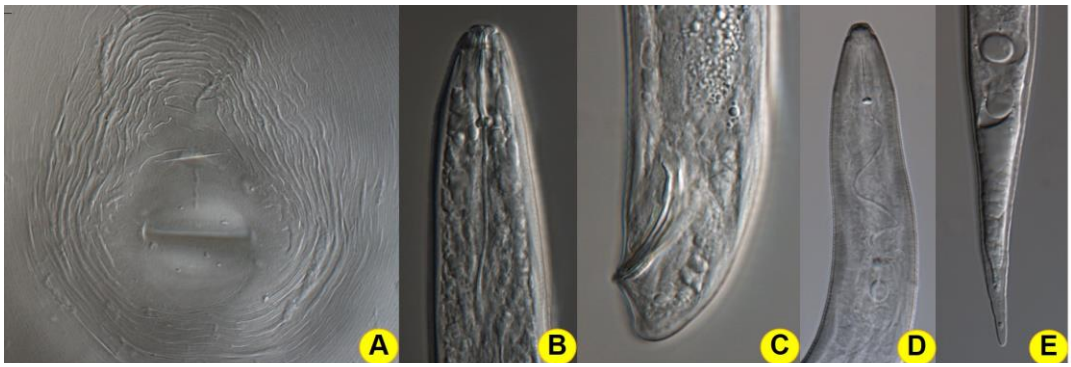
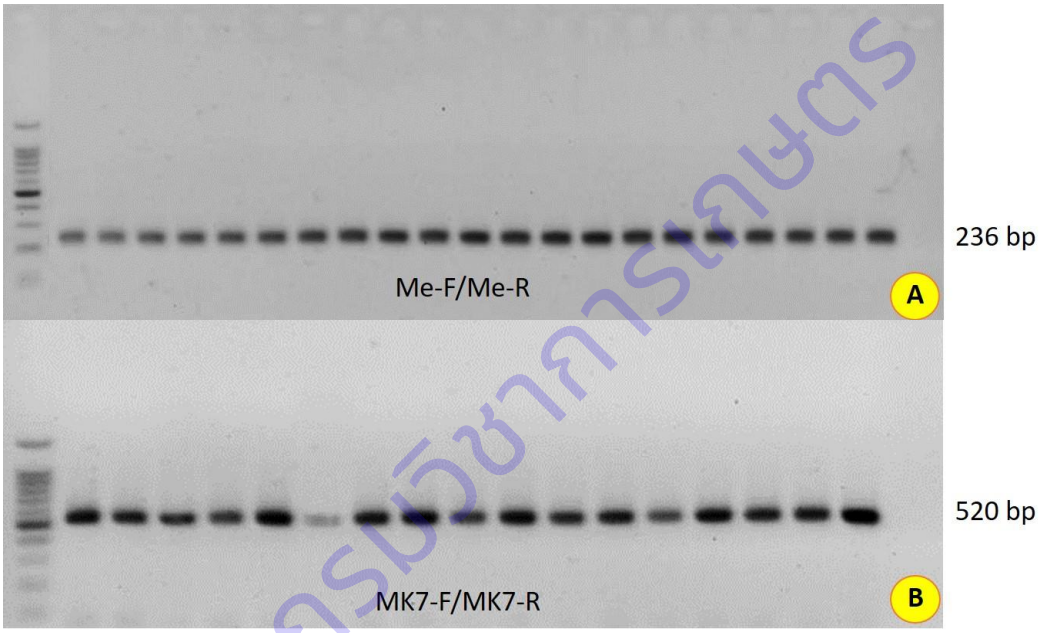


Figure 2 (A) Female perineal pattern (B, C) head and tail region of male and (D, E) head and tail of second stage juvenile of *M. enterolobii*.



กรมวิชาการเกษตร

Figure 3 (A) Detection of *M. enterolobii* with Me-F/Me-R primers yielded 236 bp fragment and (B) Detection of *M. enterolobii* with MK7-F/MK7-R primers yielded 520 bp fragment.

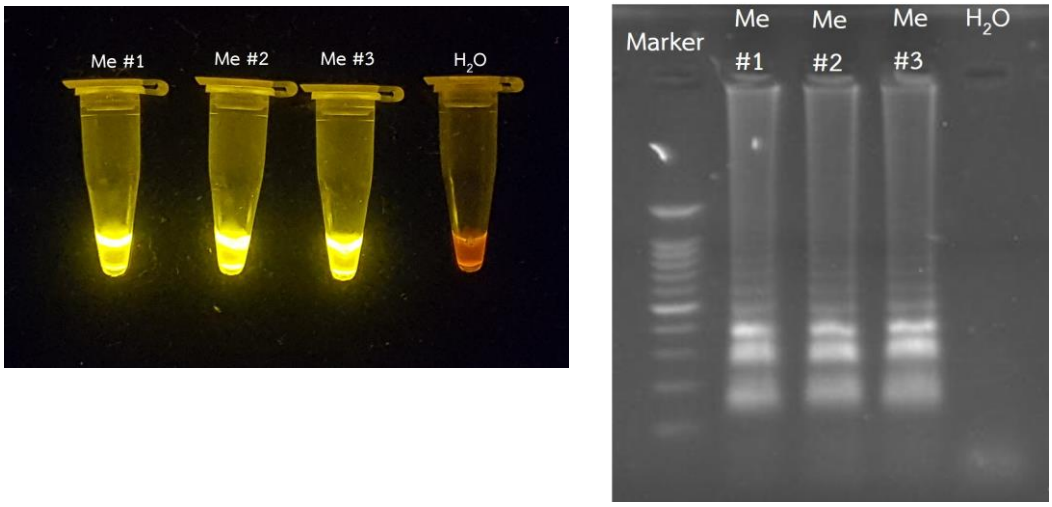


Figure 4 Detection of *M. enterolobii* with LAMP PCR

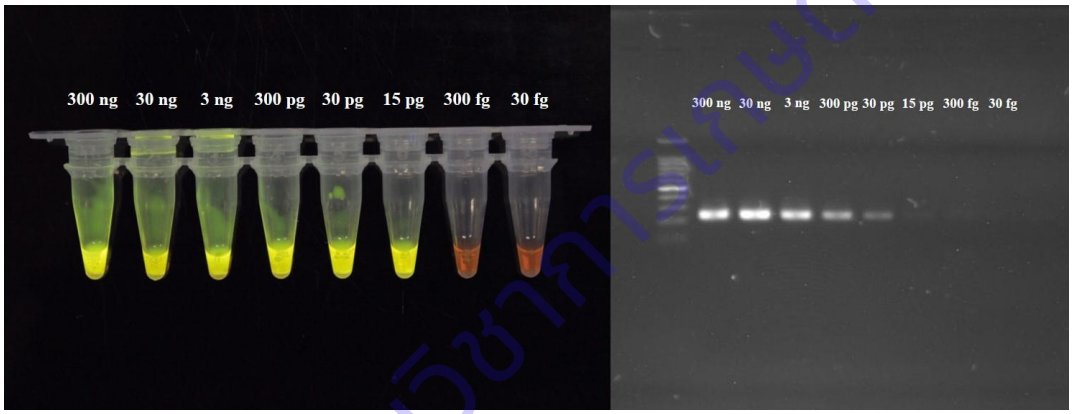


Figure 5 Sensitivity of LAMP-PCR to detect *M. enterolobii* compare with conventional PCR. LAMP-PCR could detect 15 pg DNA concentration.

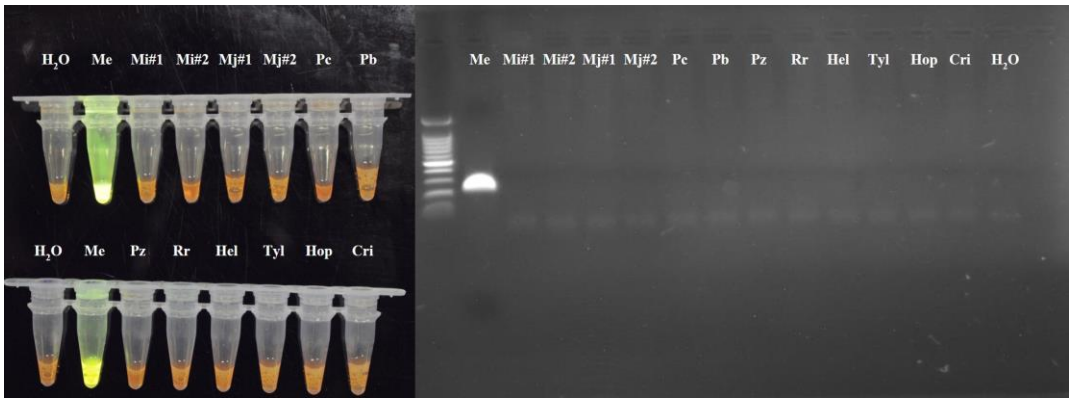


Figure 6 Specificity of LAMP-PCR to detect *M. enterolobii* (Me = *Meoidogyne enterolobii*, Mi = *Meloidogyne incognita*, Mj = *Meloidogyne javanica*, Pc= *Pratylenchus coffeae*, Pb = *Pratylenchus brachyurus*, Pz = *Pratylenchus zeae*, Rr = *Rotylenchulus reniformis*, Hel = *Helicotylenchus* sp., Tyl = *Tylenchorhynchus* sp., Hop = *Hoplolaimus* sp. Cri = *Criconemoides* sp.)