บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อราบริสุทธิ์

จากการศึกษาลักษณะโรคแอนแทคโนสของมะม่วงน้ำดอกไม้ พบว่าผลมะม่วงมีลักษณะเป็นจุดทรงกลมสีน้ำตาลหรือสีดำ มีขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ และสามารถลุกลามทั่วผลมะม่วงทำให้ผลมะม่วงเกิดการเน่าเสียทั้งผลได้ ดังภาพที่ 4.1 และจากการนำชิ้นส่วนของเปลือกมะม่วงที่เป็นโรคแอนแทรคโนสมาศึกษาลักษณะเส้นใยของเชื้อราบนอาหาร PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5-10 วัน โดยคัดแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ พบว่าเชื้อราเจริญเติบโตได้ช้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เริ่มแรกจะมีลักษณะเส้นใยเป็นสีขาว เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเทา ขอบโคโลนีเรียบเจริญเป็นวงแหวน (concentric ring) ต่อมาเส้นใยของเชื้อราจะสร้างสปอร์สีส้ม เส้นใยฟูเล็กน้อย ดังภาพที่ 4.2

ภาพที่ 4.1 ลักษณะอาการของโรคแอนแทคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้

ลิขสิทธิ์ของ ... รรณ

ภาพที่ 4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

2. การศึกษาลักษณะของเชื้อรา

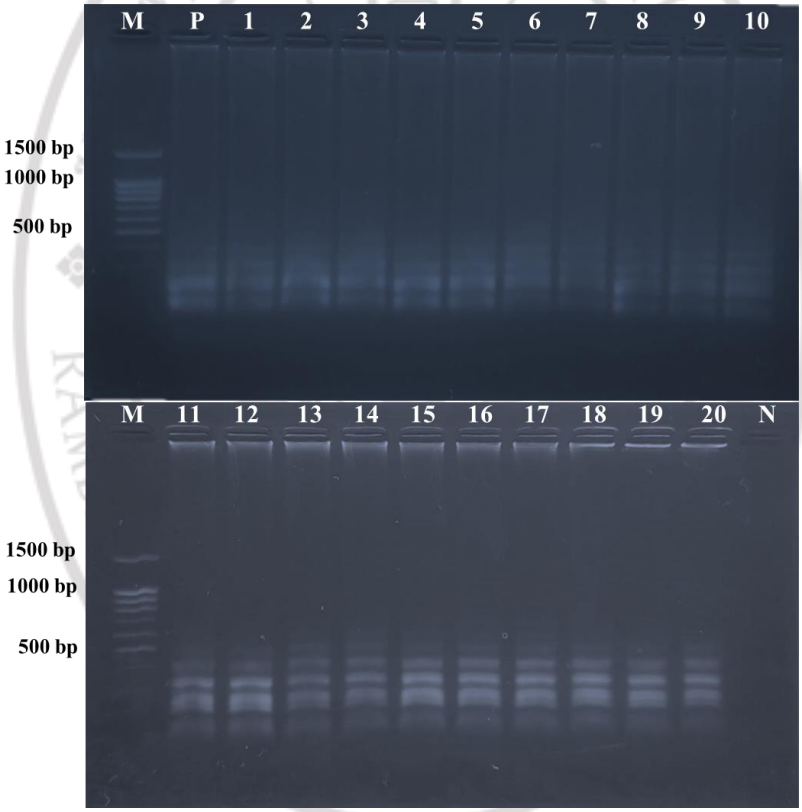
การศึกษาลักษณะของเชื้อราด้วยวิธี slide culture ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สร้างกลุ่มโคนิเดีย (conidia) ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์เดียว ทรงกระบอก (oblong) หรือรูปไข่ (ovoid) ไม่มีผนังกั้น และไม่มีสี โคนิเดียมีขนาด 2 X 4.9 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 4.3

ภาพที่ 4.3 โคนิเดียของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

ลิขสิทธิ์ขอ พรรณี

3. การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธี loop mediated isothermal amplification (LAMP)

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี loop mediated isothermal amplification (LAMP) ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์สามารถจับกับยีนเป้าหมาย ได้ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง มีขนาดไพรเมอร์ 220 bp แสดงดังภาพที่ 4.4

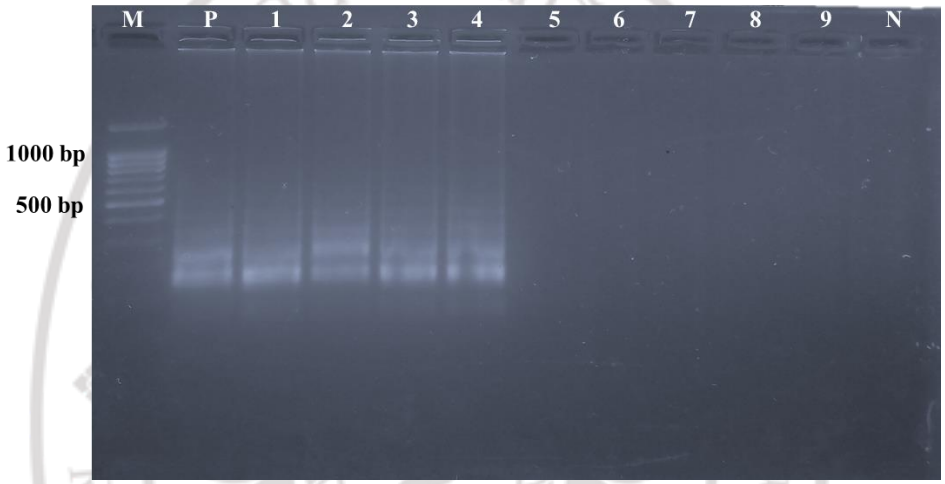


ภาพที่ 4.4 การตรวจ *C. gloeosporioides* ด้วยเทคนิค loop mediated isothermal amplification (LAMP) 20ตัวอย่าง, M: DNA marker, P: positive control, 1-20: ตัวอย่างที่ 1-20 และ N: negative

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

4. การทดสอบความไว (Sensitivity)

การทดสอบความไวเชิงวินิจฉัยของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่สามารถตรวจสอบการเกิดโรคในมะม่วง ด้วยวิธี loop mediated isothermal amplification (LAMP) โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้น 50 ug/ml ที่เจือจางแบบลำดับส่วน 10 เท่า (10 fold serial dilution) ตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-9} พบว่า สามารถตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดจากดีเอ็นเอของเชื้อได้ 10^{-4} ดังภาพที่ 4.5

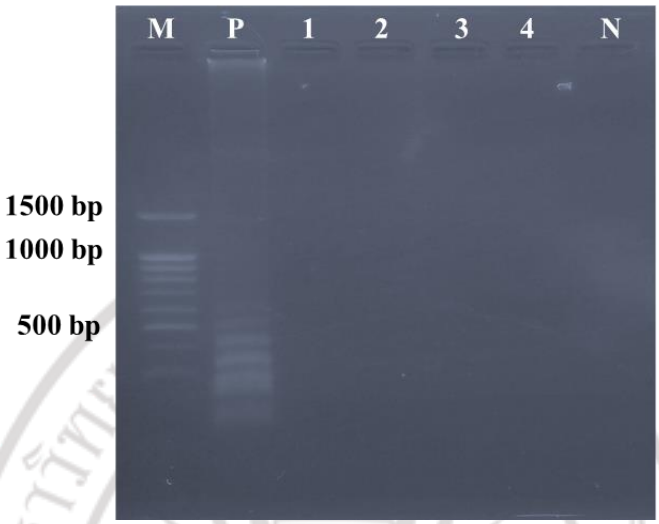


ภาพที่ 4.5 การทดสอบความไวของเชื้อ *C. gloeosporioides* ด้วยเทคนิค LAMP, M: DNA marker, P: positive control, 1: $50x10^{-1}$, 2: $50x10^{-2}$, 3: $50x10^{-3}$, 4: $50x10^{-4}$, 5: $50x10^{-5}$, 6: $50x10^{-6}$, 7: $50x10^{-7}$, 8: $50x10^{-8}$, 9: $50x10^{-9}$ (ug/ml) และ N: negative control

5. การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อทดสอบที่ใช้วิเคราะห์ความจำเพาะ ได้แก่ *Phytophthora palmivora*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Rhizobium* sp. มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้น 50 ug/ml พบว่า เชื้อราชนิดอื่นที่ใช้วิเคราะห์ความจำเพาะไม่เกิดการข้ามกันของเชื้อ *C. gloeosporioides* ในปฏิกิริยา LAMP เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย 2% Agarose gel electrophoresis ดังภาพที่ 4.6

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ภาพที่ 4.6 การทดสอบความจำเพาะของเชื้อ *C. gloeosporioides* ด้วยเทคนิค LAMP, M: DNA marker, P: positive control, 1: *P. palmivora*, 2: *Aspergillus* sp., 3: *Penicillium* sp., 4: *Rhizobium* sp. และ N: negative control

RAMBHAI BARNI RAJABHAT UNIVERSITY
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี