สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างใบไม้ที่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ ไม่มีรอยโรคจากป่าชายเลนภาคตะวันออกและภาคกลาง 5 จังหวัด ได้แก่ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และ กรุงเทพฯ จำนวน 5 แหล่ง คือ พิพิธภัณฑ์นิเวศป่าชายเลน โรงเรียนบางปะกงบวรวิทยายน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนฯ ต. เสม็ด อ. เมือง จ. ชลบุรี ศูนย์เรียนรู้ระบบนิเวศป่าชายเลนชุมชนสมุทรเจดีย์เทศบาลระยอง จ.ระยอง ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตำบลคลองขุด อ. ท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี และศูนย์เรียนรู้ธรรมชาติชายทะเลบางขุนเทียน อ. บางขุนเทียน กรุงเทพฯ ทำการเก็บตัวอย่างใบพืชชายเลนที่สมบูรณ์ไม่มีรอยโรค 5 ชนิด ชนิดพืชละ 3 ใบ/แหล่ง/ครั้ง โดยเก็บจากพืชชนิดเดียวกันที่มีในแหล่งเดียวกัน 2-3 ต้น ใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาด นำมาแยกราเอนโดไฟท์ในห้องปฏิบัติการ พืชที่นำมาศึกษาและแหล่งที่มาแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายละเอียดตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่ศึกษา

ใบไม้	จำนวนใบ	แหล่งตัวอย่าง	เวลาเก็บตัวอย่าง
พังกาหัวสุมดอกขาว	3	ท่าใหม่	ต.ค. 2553
	3	บางปะกง	ม.ค. 2554
	3	ระยอง	พ.ค. 2554
โพธิ์ทะเล	3	ท่าใหม่	ต.ค. 2553
	3	บางปะกง	ม.ค. 2554
	3	ระยอง	พ.ค. 2554
	3	บางขุนเทียน	พ.ค. 2554
ลำพู	3	ท่าใหม่	ต.ค. 2553
	3	ชลบุรี	ธ.ค. 2553
ลำแพน	3	ท่าใหม่	ต.ค. 2553
	3	ชลบุรี	ธ.ค. 2553
โปรงขาว	3	ระยอง	พ.ค. 2554
ผักเบี้ย	3	บางขุนเทียน	พ.ค. 2554

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 22 มิ.ย. 2555
เลขทะเบียน 246125
เลขเรียกหนังสือ

2. การเตรียมราโรคพืช

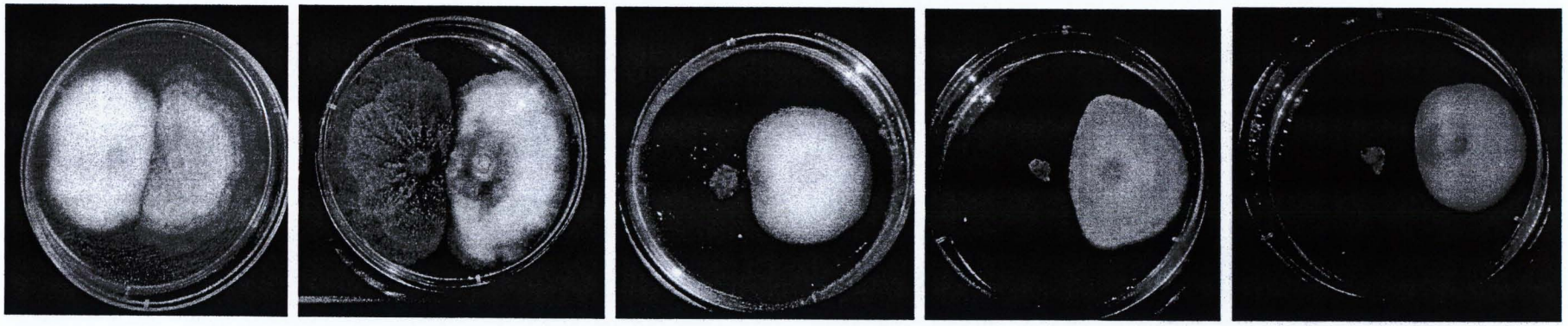
ราโรคพืช *Alternaria blassicicola* DoAC 1098 จัดซื้อจากกรมวิชาการเกษตร ใช้เป็นราทดสอบในการตรวจผลการยับยั้งการเจริญ นำราเลี้ยงราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-28°C) จนเจริญดี ตัดส่วนขอบโคโลนีมาเลี้ยงซ้ำในหลอดทดลอง เมื่อเจริญดี ปิดทับด้วยน้ำมัน paraffin เก็บป็น stock culture เมื่อจะทดสอบจึงนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนเจริญดีอีกครั้งหนึ่ง

3. การแยกราเอนโดไฟท์จากใบพืชและศึกษาลักษณะเบื้องต้น

แยกราเอนโดไฟท์จากใบพืชชายเลนชนิดต่างๆ โดย นำใบพืชปกติมาตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 5×5 มิลลิเมตร แช่ใน 70% แอลกอฮอล์ นาน 2 นาที และแช่ในสารละลาย 10% chorox นาน 1-2 นาที ขึ้นกับความหนาและชนิดของใบ จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำมาซับบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ นำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อเชื้อเจริญใช้เข็มเขี่ยเชื้อตัดเส้นใยราแต่ละชนิดที่พบ วางบนจานอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน และย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการเจริญของเชื้อ ลักษณะโคโลนี ลักษณะเส้นใยและการสร้างสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope

4. การศึกษาปฏิสัมพันธ์รูปแบบ antibiosis ระหว่างราทดสอบกับราโรคพืชโดยวิธี dual culture

ใช้ cork borer (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) เจาะวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของราทะเลที่ต้องการตรวจหาสารยับยั้ง นำมาเลี้ยงร่วมกับราโรคพืช โดยวิธี dual culture บนอาหาร PDA และ PDA ที่ลดความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่ง (0.5x PDA, Difco) นำชิ้นวุ้นของราทั้งสองชนิดมาวางห่างกันประมาณ 2.5 เซนติเมตร (Shearer and Zare-Maivan, 1988) วัน บ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตผลปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis โดยสังเกตการถูกยับยั้งการเจริญของราโรคพืชทุกวัน บันทึกระดับการเกิด antibiosis เป็น 4 ระดับ ดังนี้ ผลลบ (0) ไม่เกิด antibiosis หรือให้ผลบวกไม่ชัดเจน 1+ ผลบวกอ่อน คือระยะถูกยับยั้ง ≤2 มิลลิเมตร 2+ ผลบวก ปานกลาง ระยะถูกยับยั้ง >2 - ≤ 6 มิลลิเมตร 3+ ผลบวกแรง ระยะถูกยับยั้ง > 6 - ≤10 มิลลิเมตร 4+ ผลบวกแรงมาก ระยะถูกยับยั้ง >10 มิลลิเมตร ตัวอย่างผลบวกระดับต่างๆ แสดงในภาพที่ 8



ก ข ค ง จ

ภาพที่ 8 ระดับของปฏิสัมพันธ์ ที่เกิดเมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์ (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร) ร่วมกับราโรคพืช (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร) โดยวิธี dual culture: ก. ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis, ข ปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis ระดับอ่อน 1+ ระยะถูกยับยั้ง ≤2 มิลลิเมตร; ค. ปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis ระดับปานกลาง 2+ ระยะถูกยับยั้ง >2 - ≤ 6มิลลิเมตร; ง ปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis ระดับแรง 3+ ระยะถูกยับยั้ง > 6 -≤10 มิลลิเมตร; จ. ปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis ระดับแรงมาก ระยะ ถูกยับยั้ง >10 มิลลิเมตร

5. การเตรียมหัวเชื้อและสารสกัด

ใช้ cork borer เจาะบริเวณขอบโคโลนี มาเลี้ยงซ้ำบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 –10 วัน ใช้ cork borer (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) เจาะบริเวณขอบโคโลนี 5 ชิ้น ใส่ในอาหาร production medium 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงทั้งหมด 2 ขวด ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง เพื่อแยกส่วนของน้ำหมักและเส้นใยราออกจากกัน นำน้ำหมักของราที่ได้ มาแยกสกัดด้วย ethyl acetate หลังจากนั้นนำไปเพิ่มความเข้มข้นโดยเครื่อง evaporator ละลายสารสกัดที่ได้มาจากอาหาร 100 มิลลิลิตร ด้วย 10 % dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. การศึกษาความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของราโรคพืช

เลี้ยงราโรคพืชไว้บนจานอาหาร LNA หรือ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 วัน วัดระยะห่างจากปลายเส้นใยของรา 1 เซนติเมตร หยดสารสกัด 25 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น disc มาตรฐาน (Whatman, USA) ที่ปลอดเชื้อ รอให้แห้ง นำ disc ที่ชุบสารสกัดวางบนผิวหน้าของอาหารให้ขอบ disc ห่างจากปลายเส้นใยของรา 1 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจผลการยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืช เทียบกับ disc ชุบสารละลาย 0.5% DMSO ที่ทำให้แห้งแล้ว ยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง

7. การจำแนกชนิดเชื้อราทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาโครงสร้างของราโดยเทคนิคการเพาะเชื้อบนจานอาหารและบนสไลด์ (slide culture) สังเกตลักษณะของโคโลนี และการสร้างสปอร์ จากนั้นบันทึกลักษณะการเจริญ วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี ถ่ายภาพลักษณะของโคโลนี รวมทั้งทั้งสปอร์ แล้วนำไปศึกษาลักษณะรูปร่างของราอย่างละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound พร้อมทั้งถ่ายภาพลักษณะสำคัญต่างๆ ของราเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดต่อไป สำหรับการจำแนกชนิดของราตัวอย่างทางด้านอนุกรมวิธาน

8. การจักจำแนกทางอณูพันธุศาสตร์

8.1. การสกัดดีเอ็นเอ ใช้วิธีของ Atkins & Clark (2004)

นำเส้นใยรามาทำให้แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว บดเส้นใยให้เป็นผง ทำให้เส้นใยแตกด้วย lysis buffer (100 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA และ 2% SDS) สกัดโปรตีนด้วย Phenol และ Chloroform-Isoamyalcohol ภายหลังตกตะกอน DNA ด้วย ethanol ตกตะกอนและเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C

8.2. การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 2 µl มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา พีซีอาร์ โดยผสมองค์ประกอบต่าง ๆ ตามลำดับ ลงในหลอดสำหรับทำพีซีอาร์ ดังแสดงในตารางที่ 3 ไพร์เมอร์ที่ใช้เป็นคู่ไพร์เมอร์ยูนิเวอร์ซัลสำหรับเพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA NS1 และ NS8 (White *et al.*, 1990) แสดงดังตารางที่ 4 นำหลอดปฏิกิริยาที่เตรียมได้ ไปดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ในเครื่อง thermal cycler ซึ่งดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นจำนวน 35 รอบ โดยสภาวะของการดำเนินปฏิกิริยามีขั้นตอนการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังแสดงในตารางที่ 5 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 18S rRNA

องค์ประกอบ	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	35	-
10X reaction buffer	5.0	1X
50 mM $MgCl_2$	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP (mix)	1.0	0.2 mM
10 µM Primer - NS 1 (Forward) - NS 8 (Reward)	 2.5 2.5	 0.5 µM 0.5 µM
100 ng μl^{-1} DNA template	2.0	100 ng
5 U μl^{-1} *Pfu* DNA polymerase	0.5	2.5 U
ปริมาตรรวม	50	-

ตารางที่ 4 คู่ไพร์เมอร์ยูนิเวอร์ซัล NS1 และ NS8

ไพร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	Tm (^{o}C)	ขนาดผลิตภัณฑ์
NS1 NS8	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA	56 65	1,800

* ขนาดผลิตภัณฑ์ที่ได้ตัดข้อมูลส่วนอินทรอนแล้ว

ตารางที่ 5 ขั้นตอนของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้ต่อรอบ	จำนวนรอบ
Initial	96	2 นาที	1
denaturation	94	45 วินาที	35
Denaturation	55	30 วินาที	
Annealing	72	2 นาที	
Extension	72	10 นาที	1
Final extension			

8.3. การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยการเซนตริฟิวจ์ ตามวิธีของชุด Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promeca)

8..4.. การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำบริสุทธิ์แล้ว ส่งไปยัง บริษัท ไบโอดีไซน์ จำกัด เพื่ออ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพร์เมอร์ชุดเดียวกับที่ทำพีซีอาร์ (NS1 และ NS8)

8..5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของราทะเลที่ศึกษา โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลสาธารณะในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม Basic alignment search tool (BlastN) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของราแต่ละไอโซเลทที่ได้จากการอ่านโดยใช้ไพร์เมอร์แต่ละเส้นมาสร้าง contig โดยใช้โปรแกรม BioEdit

8..6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของราทะเลทั้ง 3 ไอโซเลทที่ศึกษา รวมทั้งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันของราชนิดต่าง ๆ จาก GenBank มาจัดเรียง และนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสร้างแผนภูมิคลาโดแกรม (cladogram) ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ) โดยใช้โปรแกรม Mega5 โมเดลที่คำนวณทรี คือ p-distance ทดสอบความถูกต้องของทรีโดยวิธี Bootstrapping (1,000 ซ้ำ)