

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สำรวจและกำหนดจุดเก็บตัวอย่างในนาข้าวจังหวัดเชียงใหม่

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา โรคใบไหม้ในจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 7 อำเภอ คือ ฝาง เชียงดาว แม่แตง แม่ริม หางดง จอมทอง และแม่วาง (ภาพที่ 1) โดยกำหนดจุดเก็บรวบรวมตัวอย่างดังนี้คือ

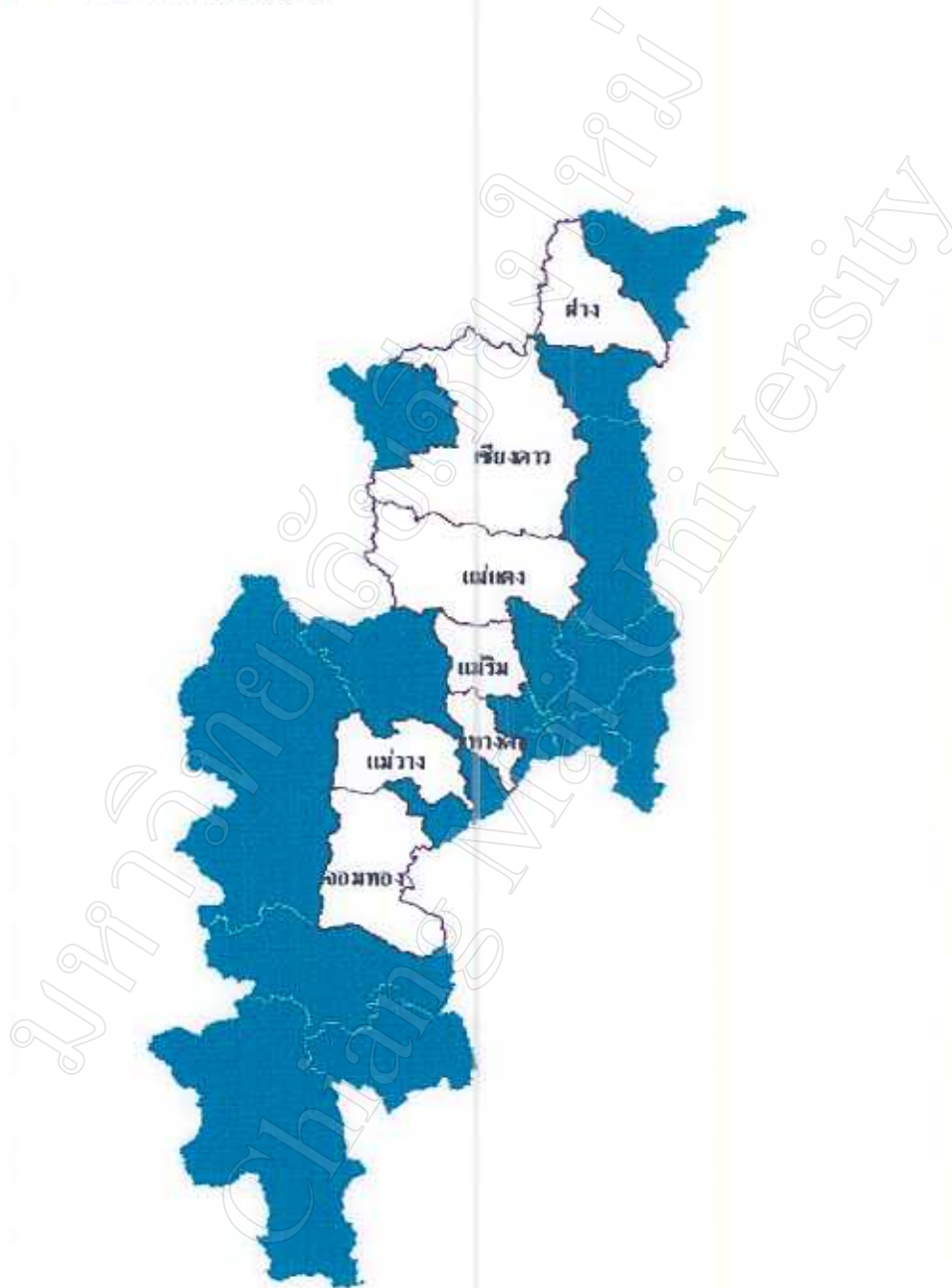
- 1.1 อำเภอฝาง บ้านหนองต๋ม ค.เวียง บ้านห้วยบอน ค.เวียง บ้านหนองบัว ค.สันทราย
- 1.2 อำเภอเชียงดาว บ้านทุ่งกะลา ค.แม่นะ บ้านสบคาบ ค.แม่นะ
- 1.3 อำเภอแม่แตง บ้านหนองหล่ม ค. ขี้เหล็ก บ้านดงป่าสัน ค.ขี้เหล็ก
บ้านหนองโค้ง ค.ขี้เหล็ก
- 1.4 อำเภอแม่ริม บ้านห้วยน้ำริน ค.ขี้เหล็ก
- 1.5 อำเภอแม่วาง บ้านแพะประทาน ค.ทุ่งปี๋ บ้านพันคน ค.ทุ่งปี๋ บ้านภาค ค.บ้านภาค
- 1.6 อำเภอหางดง บ้านจอมทอง ค.บ้านแหวน บ้านจอมทอง ค.บ้านแหวน
บ้านถวาย ค.ขุนคอง บ้านถวาย ค.ขุนคอง
- 1.7 อำเภอจอมทอง บ้านภาค-สบเตี๊ยะ ค.สบเตี๊ยะ บ้านภาค-สบเตี๊ยะ ค.สบเตี๊ยะ

(รวมทั้งยังได้ตัวอย่างเชื้อราโรคใบไหม้จากข้าวบาร์เลย์จากจังหวัดลำปาง ข้าวหอมมะลิ จากกรมวิชาการเกษตรจากจังหวัดศรีสะเกษ สุรินทร์ และร้อยเอ็ด)

2. การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างพืช

นำส่วนของตัวอย่างที่แสดงอาการโรคใบไหม้มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แฉะชิ้นส่วนเหล่านี้ในน้ำยา Clorox 2% นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว 3 ครั้ง (หรือจนหมดกลิ่นน้ำยา Clorox) ซับชิ้นส่วนบนกระดาษทิชชูที่นิ่งมาเชื้อแล้ว วางชิ้นส่วนเหล่านี้บนกระดาษทิชชูที่พรมด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อพอชื้นในจานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน เพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์ ใช้ Pasteur's pipette ที่ดึงบริเวณปลายให้แหลมและโค้งเป็นมุมฉากลงไฟทิ้งไว้พอเย็นและกลุ่มสปอร์เชื้อราที่เจริญบนชิ้นส่วนเหล่านี้ไปเคลือบบน water agar 4% (ผสม streptomycin ความเข้มข้น 10 mg/ml) เคลี่ยให้เชื้อรากระจายทั่วหน้าวัน ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นใช้ Pasteur's pipette ที่ลงไฟทิ้งไว้จนเย็นตัดชิ้นส่วนบริเวณสปอร์เดี่ยวไปเลี้ยงบนอาหาร Prune agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องให้แสง

ฟลูออเรสเซนซ์สลับกับ near UV อย่างละ 12 ชั่วโมง เก็บเชื้อราแต่ละตัวอย่างบน slant culture และ paper-culture เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 1 แผนที่อำเภอที่สำรวจโรคใบไหม้ในจังหวัดเชียงใหม่

3. การเตรียมดีเอ็นเอจากเชื้อราใช้วิธีการของ Lee and Taylor (1990)

เลี้ยงเชื้อราแต่ละตัวอย่างบนอาหาร Prune agar ที่อุณหภูมิห้องนาน 7-10 วัน โดยให้แสงฟลูออเรสเซนซ์สลับกับ near UV อย่างละ 12 ชั่วโมง จากนั้นตัดชิ้นวุ้นด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 ซม. จำนวน 10-15 ชิ้นไปเลี้ยงใน Fries medium ปริมาตร 50 ml ที่บรรจุใน flask ขนาด 125 ml นาน 10 วัน บดเส้นใยเชื้อราที่ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วกับ liquid nitrogen ในโถรงบขนาดเล็ก ตักเส้นใยเชื้อราที่บดแล้วจำนวน 30 mg ใส่ในหลอด eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ผสม lysis buffer 400 μ l ให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา จากนั้นนำหลอด eppendorf tube แช่ใน water bath อุณหภูมิ 65 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมส่วนผสมของ Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) โดยปริมาตร 400 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 14,000 rpm ต่อ นาที นาน 15 นาที ดูเฉพาะส่วนใสข้างบนใส่หลอด eppendorf tube หลอดใหม่ เดิม 0.03 เท่าโดยปริมาตรของ 3M sodium acetate และ 0.5 เท่าโดยปริมาตรของ isopropanol กลับหลอดเบาๆ เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C นานอย่างน้อย 30 นาที (หรือข้ามคืน) นำไปปั่นที่ 14,000 rpm ต่อ นาที นาน 15 นาที ที่ส่วนใสและล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ตากดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนด้วย 1×TE เก็บที่ 4°C หรือ -20°C และนำไปตรวจความเข้มข้นโดย gel electrophoresis กับตัวอย่าง DNA ความเข้มข้นมาตรฐาน

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราด้วยเทคนิค PCR-based method (IRRI protocol)

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของ PCR content

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μ l)
น้ำ	10.0
B-9 buffer	2.5
dNTP	7.5
Primer Pot2-1	1.25
Primer Pot2-2	1.25
Taq. Polymerase	1.0
DNA template (25-50 ng)	1.0
Total	25.0

PCR profile

- I. 95°C, 5 min; 1×
- II. 94°C, 1 min, 62°C, 1 min, 65°C, 10 min; 4×
- III. 94°C, 30 sec, 62°C, 1 min, 65°C, 10 min; 26×
- IV. 65°C, 15 min; 1×
- V. 4°C soak

5. การตรวจแยกแถบดีเอ็นเอ (agarose gel electrophoresis)

วางถาดเจลและหัวเสียบในชุดเตรียมเจล เตรียมเจลที่มีส่วนผสมของ 0.75% Synergel กับ 0.5% agarose gel ใส่ใน 0.5×TBE buffer ปริมาตร 300 ml (หนาประมาณ 0.5 ซม.) เมื่อ Synergel และ Agarose gel แข็งตัวดีแล้ว ขกถาดเจลออกจากชุดเตรียมเจลเบาๆ วางใน electrophoresis chamber โดยให้ด้านที่มีหลุมอยู่ทางด้านซ้ายลง ดึงหัวเสียบออกอย่างระวัง เท 0.5×TBE buffer ลงใน electrophoresis chamber ให้ท่วมเจลพอสมควร นำ amplified product 15.0 µl ผสมกับ 10× loading dye 2.0 µl หยอดลงในช่องเจล (หยอด 1 kb ladder 5.0 µl ในช่องแรกของทุกเจล) ปลั๊กยกรแสไฟฟ้าไหลผ่านเครื่อง electrophoresis 120 โวลต์นาน 8 ชม. นำแผ่นเจลย้อมด้วย 10 mg/ml ของ ethidium bromide (50 µl ใน 0.5×TBE buffer 500 µl) นาน 30 นาที นำแผ่นเจลตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator และถ่ายภาพบันทึกผลการทดลอง

6. การวิเคราะห์ลักษณะ DNA fingerprinting

ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Gel Compare II แบบ UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) จัดแบ่งกลุ่มตัวอย่างเชื้อราที่ได้จากข้าวและวัชพืชจำนวน 344 สายพันธุ์

7. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของ crude extract toxins (CET) เชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคใบไหม้ของข้าว

7.1 การเตรียม CET

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร Prune agar นาน 14 วัน ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 ซม. ใส่ในอาหารเหลว Modified Fries medium (ซึ่งประกอบด้วย สูตรอาหาร Fries medium จำนวน 60 มิลลิลิตร และเมล็ดข้าว 0.5 กรัม) จำนวน 60 มิลลิลิตรที่บรรจุใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 27°C และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีนาน 14 วัน นำของเหลวที่ได้กรองผ่านผ้าขาวบาง 3 ชั้นเพื่อเอาเส้นใยและอาหารส่วนที่เป็นเมล็ดข้าวออก

และกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 อีกครั้งหนึ่ง นำ CET ที่ได้ไปลดปริมาตรให้เหลือ 10 % จากปริมาตรเริ่มต้น ด้วยเครื่องกลั่นสารระเหยภายใต้ความดัน (rotary evaporator)

7.2 การเตรียมตัวอย่างพันธุ์ข้าวทดสอบ (international differential series host)

ใช้พันธุ์ข้าวทดสอบ 2 ชุดคือ ชุดข้าว japonica จำนวน 24 สายพันธุ์และชุดข้าว indica จำนวน 10 สายพันธุ์ (ตารางภาคผนวก ง และจ) ปลูกในกระถางในเรือนเพาะชำ เมื่อต้นข้าวอายุ 21-30 วัน เก็บใบข้าวมาตัดให้เป็นชิ้นยาว 6 เซนติเมตร (ซม.) และตัดปลายใบที่แหลมทิ้ง โดยเก็บใบข้าวใบที่ 2-3 โดยนับจากใบยอด นำไปผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในสารละลาย Clorox 5 % เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อ 2 ครั้ง นำใบข้าวติดบนแผ่นพลาสติกและวางไว้ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองชุบน้ำวางรองไว้ที่ก้นจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีความชื้น ทำแผ่นขนาดเท่าปลายปากกาโดยใช้เข็มกลดบริเวณกึ่งกลางใบข้าว จากนั้นเจือจาง CET ลงโดยผสมกับน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อ โดยใช้อัตราส่วน CET ค่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 และ 1:2 ใช้ micropipette ดูด CET ที่เจือจาง 30 μ l หยดบนรอยแผลที่ทำไว้ การทดลองใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ บ่มใบพืชที่หยด CET ที่เจือจาง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ภายใต้แสงนานเวลา 5 วัน ตรวจวัดผลการตอบสนองของใบข้าวต่อ CET โดยวัดระดับความรุนแรงของแผลโรคโดยแบ่งออกเป็น 5 ระดับ (ภาคผนวก ฉ)