

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. การสำรวจเชื้อไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้ชนิดต่างๆ ในภาคเหนือ
เก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราไมคอร์ไรซา จากแหล่งต่างๆ ดังนี้

แหล่งที่มา	สัญลักษณ์
บ้านต้นเหี่ยว ตำบลยางเนิ้ง อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่	YA
สถานีวิจัยห้วยฮ่องไคร้ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่	DO
บ้านป่าไม้ อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่	PH
บ้านน้ำคำ อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่	CD
อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่	MT
บ้านนาบัว ตำบลเมืองยาว อำเภอห้างฉัตร จังหวัดลำปาง	NC
อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน	PD
อำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงราย	MA

การย้อมรากเพื่อตรวจหาเชื้อไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ตัวอย่าง

คัดเลือกรากกล้วยไม้ที่สมบูรณ์ โดยสุ่มมาตัวอย่างละ 3 ราก ล้างให้สะอาด แช่ใน 1% chloral hydrate นาน 10 นาที ใน water bath อุณหภูมิ 90 °C 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง แช่ใน 1% HCl นาน 3-4 นาที แล้วเททิ้ง แช่ใน 0.01 % acid fuchsin – lactic acid นาน 40 นาที ใน water bath ที่อุณหภูมิ 90 °C นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากตัวอย่างพืช

คัดเลือกรากกล้วยไม้ที่สมบูรณ์โดยกลุ่มมาตัวอย่างละ 10 ราก มาตัดเป็นชิ้นขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จุ่มชิ้นรากในแอลกอฮอล์ 95% นาน 1 นาที จากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย calcium hypochlorite เข้มข้น 5% นาน 5 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง (หรือล้างจนหมดกลิ่นน้ำยาฆ่าเชื้อ) ซับชิ้นส่วนด้วยกระดาษชำระที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA (potato dextrose agar) เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบที่ลักษณะเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกจำนวน และชนิดเชื้อราที่พบ และเก็บเชื้อราบริสุทธิ์ใน slant เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การทดสอบผลของเชื้อราไมคอร์ไรซาที่มีต่อกล้วยไม้เอื้องแซะและลูกผสม

เอื้องแซะ

ใช้ต้นกล้วยไม้ที่มีอายุ 2 เดือนที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 4 ต้นในขวดอาหารจำนวน 15 ต้น นำส่วนปลายของกลุ่มเส้นใยเชื้อราที่ต้องการทดสอบโดยการกลุ่มเชื้อตัวแทนกลุ่มๆ ละ 3-4 ไอโซเลท รวมทั้งสิ้น 64 ไอโซเลท ใช้หลอดดูดขนาดเล็กที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วเจาะเชื้อราเป็น culture disc วางตรงกลางขวดที่มีต้นพืช ให้เชื้อราเจริญอยู่ร่วมกับกล้วยไม้ นาน 2 สัปดาห์ เลือกกล้วยไม้ที่แข็งแรง และมีชีวิตมาปลูกในกระถางที่มีวัสดุปลูกคือ ถ่าน และออสมันดาที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำมาที่สภาพแวดล้อมเดียวกันเป็นเวลา 3 เดือน โดยบันทึกการเจริญทุก 1 เดือน คือ จำนวนใบ จำนวนราก จำนวนลำกล้วย และบันทึกความสูงของต้นเมื่อครบ 3 เดือน วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS for window 9.0 และ ตรวจสอบการเข้าอาศัยในรากพืชของเชื้อราไมคอร์ไรซา โดยแยกเชื้อราเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

ลูกผสมเอื้องแซะ

การทดลองนี้ใช้กล้วยไม้เอื้องแซะลูกผสม 3 สายพันธุ์ ดังนี้

CEP เอื้องแซะ X หวายเอกพลแพนด้า

CWR01 เอื้องแซะแม่สะเรียง X ขาวปากแดง

CYBB เอื้องแซะหอม X ชมพูบานูญ

ใช้ต้นกล้วยไม้เอื้องแซะลูกผสมที่มีอายุ 2 เดือนที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 4 ต้นในขวดอาหาร เลี้ยงเชื้อ *Rhizoctonia* ไอโซเลท DO5/1 และ 3MT3/2 เชื้อ *Xylaria* ไอโซเลท YA4 และ YA12 ในอาหาร PDA (potato dextrose agar) แล้วใช้หลอดดูดขนาด

เล็กที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจะเป็น culture disc วางตรงกลางขวดที่มีที่มีดินพืช ให้เชื้อราเจริญอยู่ร่วมกับกล้วยไม้ 2 สัปดาห์ เลือกกกล้วยไม้ที่แข็งแรง และมีชีวิตมาปลูกในตระกร้าที่มีวัสดุปลูกคือ ถ่าน และออสมันดาที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำมาที่สภาพแวดล้อมเดียวกันเป็นเวลา 1 เดือน โดยบันทึกการเจริญคือ จำนวนใบ จำนวนราก จำนวนลำลูกกล้วย และบันทึกความสูงของต้น วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS for window 9.0 แล้วนำรากกล้วยไม้ดังกล่าวไปแยกเชื้อรากลับมาศึกษาอีกครั้งเช่นเดียวกับของเอื้องแซะ

3. การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราไมคอร์ไรซาโดยเทคนิค RAPD

การเตรียมดีเอ็นเอของเชื้อราโดยวิธีของ Lee and Taylor (1990)

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-7 วัน จากนั้นเจาะชิ้นวันด้วยหลอดดูดขนาดเล็กที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 15-20 ชิ้นไปเลี้ยงใน potato dextrose broth ปริมาณ 50 ml ที่บรรจุใน flask ขนาด 125 ml นาน 10 วัน บดเส้นใยที่ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วกับ liquid nitrogen ในโถรงบขนาดเล็ก ตักเส้นใยที่บดแล้วจำนวน 30 mg ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ผสม lysis buffer 400 μ l ให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา จากนั้นนำ eppendorf tube แช่ใน water bath อุณหภูมิ 65°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมส่วนผสมของ phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) โดยปริมาตร 400 μ l ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ 14,000 rpm ต่อเวลาที่ นาน 15 นาที ดูเฉพาะส่วนใสข้างบนใส่ eppendorf tube หลอดใหม่เติม 0.03 เท่าโดยปริมาตร 3M sodium acetate และ 0.5 เท่าโดยปริมาตรของ isopropanol กลับหลอดเบาๆ เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นานอย่างน้อย 30 นาที (หรือข้ามคืน) นำไปปั่นที่ 14,000 rpm ต่อเวลาที่ นาน 15 นาที ทั้งส่วนใสและล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ตากดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนด้วย 1X TE เก็บที่ 4°C หรือ -20°C และนำไปตรวจความเข้มข้นโดย gel eletrophoresis กับตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐาน

การเตรียม agarose gel และทำ อิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบพร้อมกับเสียบหัวให้เรียบร้อย จากนั้นชั่งผง agarose 0.8 กรัม เติม running buffer (1X TBE buffer) 100 มิลลิลิตร หลอมเจลให้ละลายแล้วค่อยๆ เทลงบนถาดที่เตรียมไว้ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัว แล้วจึงดึงหัวออก จากนั้นจึงถาดที่ใส่เจลขึ้นมาเศษเจลที่ติดอยู่ทิ้งให้หมด นำเจลใส่ในเครื่อง Mupid แล้วเติม 1X TBE buffer ให้ท่วมหน้าเจล ใช้ปีเปตดูดสีย้อม

ผสมกับดีเอ็นเอตัวอย่าง อัตรา 1:1 ปิดฝาครอบแล้วเปิดสวิทช์ของเครื่อง Mupid โดยใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีที่ผสมใน loading buffer ห่างจากขอบล่างประมาณ 1 เซนติเมตรปิดสวิทช์แล้วนำเจลมาแช่ไว้ในสารละลาย ethidium bromide เขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Foto/Analysis Visionary (Gel Scanner) พร้อมกับบันทึกภาพด้วย UPP-110S High Quality Printing Paper Type I (Normal)

การวัดค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ

ผสมดีเอ็นเอ 2 μl กับ TE buffer 48 μl ให้เข้ากัน จากนั้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงในช่วงคลื่น 260 280 และ 320 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer Model UV-250 IPC, Shimadzu ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยอัตราส่วนของ $\text{abs}_{260} : \text{abs}_{280}$ โดยดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่าประมาณ 1.8

การแยกกลุ่มเชื้อราไมคอร์ไรซาโดยวิธี RAPD

ปรับความเข้มข้นของ DNA ตัวอย่างโดยใช้ TE buffer แล้วให้ได้ 30 ng/ μl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปทำ RAPD ด้วย primer 50 ชนิด (ตารางผนวกที่ 5) แล้วคัดเลือก primer ที่ให้ผลดีที่สุด ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังตารางที่ 1

การทำ RAPD

เตรียมหลอดทำปฏิกิริยา ขนาด 0.2 ml ใส่ primer 1 μl และ DNA ตัวอย่าง 1 μl ลงที่ก้นหลอด ปิดฝาให้แน่น นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นผสมส่วนประกอบ (master mix) ใน eppendorf tube 0.5 ml ดังนี้

10 $\times$ PCR buffer	(2.5 $\times$ จำนวนตัวอย่าง) μl
10 mM dNTP	(0.8 $\times$ จำนวนตัวอย่าง) μl
1.5 Mm MgCl_2	(1.5 $\times$ จำนวนตัวอย่าง) μl
steriled double distilled water	(18 $\times$ จำนวนตัวอย่าง) μl
Taq DNA Polymerase(5unit/ μl)	(0.2 $\times$ จำนวนตัวอย่าง) μl

ผสมให้เข้ากัน โดยใช้วิธีคิดเบาๆ แล้วจึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมส่วนประกอบดังกล่าวปริมาณ 23 μl ลงในหลอดทำปฏิกิริยาที่เตรียมไว้ปิดฝาหลอดให้แน่น ใช้วิธีคิดเบาๆ นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบเท่าเดิม เป็นเวลา 1 นาที นำมาทำ PCR ด้วยเครื่อง GeneAmp PCR Systems 9600 (Perkin Elmer) โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง ดังนี้

PCR Profile

- I. 94°C, 5 min; 1×
- II. 94°C, 1 min, 36°C, 2 min, 72°C 2 min; 40×
- III. 72°C, 7 min; 1×
- IV. 4°C, ∞

ตารางที่ 1 ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ปรากฏแถบ DNA จากการวิเคราะห์โดยวิธี RAPD

เชื้อไมคอร์ไรซา	ชนิด primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์
<i>Rhizoctonia</i> : DO5/1 3MT3/2 YA1 2MT12/2	OPA01	5' CAGGCCCTTC 3'
	OPA09	5' GGGTAACGCC 3'
	OPA11	5' CAATCGCCGT 3'
	OPB10	5' AGGGGTCTTG 3'
	OPB12	5' CCTTGACGCA 3'
	OPB18	5' CCACAGCAGT 3'
	OPC16	5' CACACTCCAG 3'
	OPD12	5' CACCGTATCC 3'
<i>Xylaria</i> : MA5/2 2MA26/2 YA4 2MA31/3	OPA01	5' CAGGCCCTTC 3'
	OPA17	5' GACCGCTTGT 3'
	OPD13	5' GGGGTGACGA 3'
<i>Fusarium</i> : 3NC7 2CD14/2	OPA05	5' AGGGGTCTTG 3'
	OPA13	5' CAGCACCCAC 3'
	OPA15	5' TTCCGAACCC 3'
	OPA18	5' AGGTGACCGT 3'
	OPB04	5' GGACTGGAGT 3'
	OPB11	5' GTAGACCCGT 3'

การตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

ประกอบถาดสำหรับเทเจลและหวีเข้าด้วยกัน เตรียม agarose gel เข้มข้น 1.5% โดยละลาย Ultra – pure DNA Grade Agarose 2.25 กรัม ใน 1× TBE buffer 150 ml หลอมเจลโดยใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราว ให้เจลละลายจนหมด หลังจากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องพร้อมเขย่าเบาๆ จนกระทั่งเย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50–55 °C แล้วค่อยๆ เทลงในถาดที่เตรียมไว้ ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร เมื่อเจลแข็งตัวค่อยๆ คึงหวีออก นำเจลใส่ลงใน Sub - Cell® Gt Agarose Gel Electrophoresis systems เติม 1× TBE buffer ให้สูงกว่าผิวเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร นำ EZ Load 100 bp PCR Molecular Ruler (Bio-Rad) 5 µl ใส่ในช่องแรกของเจล แล้วผสม PCR-product 9 µl กับ Nucleic Acid Sample Loading gel 5× (Bio-Rad) 1 µl ให้เข้ากัน นำไปหยอดลงในช่องถัดไปของแผ่นเจล หลังจากนั้นปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดสวิทช์ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีที่ผสมอยู่ใน loading buffer ห่างจากขอบล่างประมาณ 1 นิ้ว แล้วจึงปิดเครื่อง นำเจลออกจากถาดมาข้อมใน 1× TBE buffer 500 ml ที่ผสม 50 µl ของ ethidium bromide เข้มข้น 10 mg/ml เขย่าด้วย shaker ประมาณ 3 ชั่วโมง นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพเก็บไว้ด้วย UPP-110S High Quality Printing Paper Type I

การบันทึกข้อมูล

บันทึกจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด และบันทึกภาพลงในแผ่นดิสก์เพื่อนำไปวิเคราะห์กลุ่มเชื้อราด้วย Bio-Profile® Image Analysis Software โดยกำหนดค่า % confidence = 95% และใช้ค่า Nei and Li coefficient similarity ในการจัดกลุ่มเชื้อราไมคอร์ไรซา

4. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยของไมคอร์ไรซา และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำผลชนิดของพืชอาศัยที่ได้จาก 1 และ 2 มาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากข้อ 3