บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกและการจัดจำแนกเชื้อ *Rhizoctonia* spp. สาเหตุโรครากเน่าในสตรอเบอรี่

1.1 การแยกเชื้อ

นำต้นสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการเหี่ยวจากแหล่งปลูกต่าง ๆ คือ

1. แปลงปลูกสตรอเบอรี่สถานีวิจัยโครงการหลวงอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่
2. แปลงปลูกสตรอเบอรี่สถานีวิจัยโครงการหลวงอ่างขาง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่
3. แปลงปลูกสตรอเบอรี่ของเกษตรกรบ้านบ่อแก้ว อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่
4. แปลงปลูกสตรอเบอรี่ของเกษตรกร อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่
5. แปลงปลูกสตรอเบอรี่ของเกษตรกรบ้านห้วยน้ำริน อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย

นำรากสตรอเบอรี่มาล้างทำความสะอาดแล้วซับให้แห้ง เลือกรากที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลปนดำถึงสีดำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 10% Clorox (sodium hypochlorite) นาน 3 นาที ล้างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อนาน 1 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองแล้วนำไปวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin sulfate ในอัตรา 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เมื่อพบเส้นใยเจริญออกมาจากตัวอย่างพืชจึงตัดปลายเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน จึงเขี่ยเส้นใยมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีลักษณะเส้นใยของราในสกุล *Rhizoctonia* นำมาเก็บใน potato carrot agar (PCA) slant เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

1.2 การตรวจนับจำนวนนิวเคลียส

นำเชื้อ *Rhizoctonia* spp. จาก PCA slant มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เมื่ออายุได้ 4 วันจึงตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีมาวางบนสไลด์แก้วที่เคลือบด้วย 2% water agar (WA) บาง ๆ แล้วนำสไลด์แก้วไปวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองชื้นรองอยู่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน จึงนำมาย้อมด้วยสี Geimsa ตามวิธีการของ นิพนธ์ (2544) ดังนี้ หยด Geimsa ลงบนเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วย 3% KOH 1 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง ซับให้แห้ง หยด Geimsa อีกครั้ง

ทิ้งไว้ 2 นาที ล้างด้วย 3% KOH 1 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง ปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ โดยใช้น้ำกลั่นเป็น mounting medium แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจนับจำนวนนิวเคลียสที่พบในแต่ละเซลล์

1.3 การจำแนกออกเป็น anastomosis group (AG)

นำเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. ที่แยกได้และ tester strain (ตารางที่ 3) ลงเลี้ยงบนอาหาร PDA หลังจากนั้น 4 วัน จึงตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อทั้ง 2 มาวางบนสไลด์แก้วที่เคลือบด้วย 2% WA บาง ๆ วางห่างกันประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วนำไปวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองชื้นรองอยู่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 36 ชั่วโมงจึงเริ่มตรวจการรวมเส้นใย โดยนำสไลด์ที่เชื้อเจริญชนกันแล้วมาย้อมด้วย cotton blue ใน lactophenol ปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ แล้วนำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผล โดยถือว่าเชื้อราคู่ใดที่เส้นใยมีการเจริญเข้าหากันและเกิดการรวมเส้นใย ไม่ว่าจะพบการตายของเซลล์ที่อยู่โดยรอบจุดรวมเส้นใยหรือไม่ก็ตาม จัดว่าเชื้อราทั้งสองอยู่ใน anastomosis group (AG) เดียวกัน

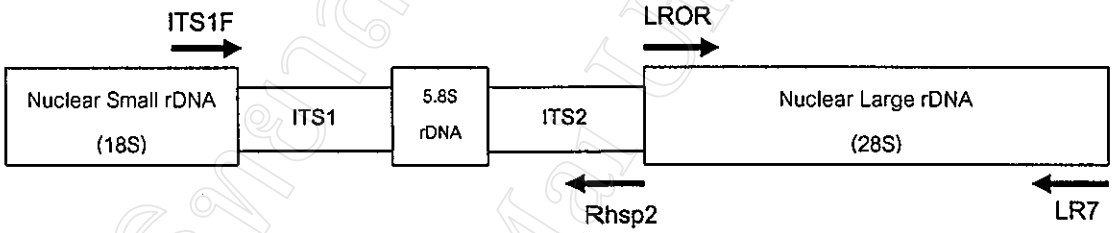
ตารางที่ 3 Tester strain ของรา *Rhizoctonia* spp. ที่ใช้ในการศึกษา[1]

Binucleate *Rhizoctonia*	isolate	Binucleate *Rhizoctonia*	isolate
AG-A	C-517	AG-J	STC-23
AG-Ba	C-484	AG-K	FAS2909W
	SIR-2	AG-L	FKO-2-26
AG-Bb	C-455	AG-O	FKO-6-2
AG-C	OR706	AG-P	C-578
AG-D	W-12	AG-Q	C-620
AG-E	F-18	AG-R	Bn-39
AG-F	AH-6	Multinucleate *Rhizoctonia*	isolate
AG-G	AH-9		
AG-H	STC-9		
AG-I	AV-2	*R. solani* AG-5	ST2-1

[1] Tester strain ทั้งหมดได้รับจาก Prof. Dr. Ogoshi Akira และ Prof. Dr. Shigeo Naito, Faculty of Agriculture, Hokkaido University

2. การแยกกลุ่มเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนด้วยกัน ส่วนแรก เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA ด้วย primer LROR/LR7 (Cubeta และคณะ, 1991) (ภาพที่ 2) แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Hha*I, *Mbo*I, *Msp*I และ *Taq*I ส่วนที่สอง เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วย primer ITS1F/Rhsp2 (Salazar และคณะ, 2000) (ภาพที่ 2) ซึ่งเป็น primer ที่เฉพาะเจาะจงต่อราในสกุล *Rhizoctonia* แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 8 ชนิดคือ *Cla*I, *Hha*I, *Mbo*I, *Mse*I, *Msp*I, *Rsa*I, *Taq*I และ *Xmn*I



ภาพที่ 2 ไดอะแกรมแสดงตำแหน่งของ primer LROR/LR7 และ ITS1F/Rhsp2 ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ 28S rDNA และ ITS1-5.8S-ITS2 ตามลำดับ

การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อรา

การเตรียมเส้นใยเชื้อรา

นำเชื้อ *Rhizoctonia* spp. ลงเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน จึงย้ายชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราลงเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน นำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1โดยใช้ชุดกรองที่ต่อกับ vacuum pump เพื่อช่วยให้ของเหลวไหลเร็วขึ้น ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อหลาย ๆ ครั้ง รอจนเส้นใยแห้งดีแล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้วิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Rogers และ Bendich (1988) ดังนี้ ชั่งเส้นใยมา 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในโกร่งแช่เย็นจัด (-80 องศาเซลเซียส) บดเส้นใยจนละเอียดเป็นผง เติม 2X CTAB buffer (ดูรายละเอียดในภาคผนวก) 500 ไมโครลิตร คนให้เข้ากัน เทของเหลวที่ได้ใส่ในหลอดทดลอง (micro-centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 1 เท่าของปริมาตรเดิม เขย่าให้เข้ากันจนเป็นเมือกขาว นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แยกของเหลวใสที่อยู่ด้านบนใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติม 10% CTAB ลงไป 0.1 เท่าของปริมาตรของเหลวใส เขย่าให้เข้ากัน เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 1 เท่าตัว เขย่าให้เข้ากันจนเป็นเมือกขาว นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แยกส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ เติม CTAB precipitation buffer เท่าปริมาตรของเหลวใส เขย่าเบา ๆ ให้สารผสมกัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 – 60 วินาที หรือจนสารเริ่มตกตะกอน ซึ่งการหมุนเหวี่ยงนานเกินไปจะทำให้ตะกอนอัดตัวกันแน่นละลายยาก จากนั้นค่อย ๆ เทส่วนใสทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วย high salt TE buffer 100 – 200 ไมโครลิตร นำไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียสจนตะกอนละลายหมด เติม absolute ethanol ที่แช่เย็นปริมาตร 2 เท่าของของเหลวในหลอด ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 70% ethanol ที่แช่เย็นจนปริมาตรเท่าเดิม นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วทำซ้ำอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้จน ethanol ระเหยหมด ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 0.1X TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 28S rDNA และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

2.1.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจาง 200 เท่า เพื่อใช้เป็น template ในการทำปฏิกิริยาโดยใช้ primer LROR (5′-ACCCGCTGAACTTAAGC-3′) และ LR7 (5′-TACTACCACCA AGATCT- 3′) ในปริมาตรรวม 40 ไมโครลิตรซึ่งประกอบด้วย 1X QIAGEN PCR buffer (Tris – Cl, KCl, $(NH_4)_2 SO_4$, 1.5 mM $MgCl_2$) 1X Q-solution, dNTP mix เข้มข้นอย่างละ 0.2 mM, primer LROR/LR7 เข้มข้นอย่างละ 0.2 μM เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (QIAGEN, Germany) 1 unit น้ำกลั่น และดีเอ็นเอที่เจือจางแล้ว 2 ไมโครลิตร ผสมส่วนประกอบทั้งหมด

ให้เข้ากันในหลอดสำหรับทำปฏิกิริยา PCR แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycler PTC-100™ (MJ Research, USA) โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้นเข้าสู่วงรอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที annealing ที่ 52 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที จำนวน 30 รอบ แล้วตามด้วย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบผลที่ได้โดยการทำเจลอิเล็กโตรโฟเรสิสบน 1.5% agarose

2.1.2 การตรวจผลโดยเจลอิเล็กโตรโฟเรสิส

นำถาดและหวีสำหรับเตรียมเจลประกอบเข้าด้วยกัน ละลาย agarose LE (Promega, USA) 0.45 กรัม ใน 0.5X TBE buffer 30 มิลลิลิตร หลอมเจลด้วยไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวจนเจลละลายดี ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส นำมาเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง จึงเท 0.5X TBE buffer บนผิวหน้าเจลเล็กน้อย ค่อย ๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่อง GelMate™ - GEP102 (TOYOBO, Japan) เติม 0.5X TBE buffer จนท่วมผิวหน้าเจลประมาณ 2 – 3 มิลลิเมตร นำ 100 bp ladder (Amersham Pharmacia,USA) เพื่อใช้เป็น molecular weight marker แล้วจึงนำ PCR – product 2 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องถัดมาจนครบทุกตัวอย่าง ปิดฝาครอบ เปิดสวิตช์ให้กระแสไฟฟ้าเข้าเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ที่ 100 โวลท์ จนกระทั่งสีของ loading dye ห่างจากขอบล่างของเจลประมาณ 1 นิ้วจึงปิดสวิตช์ นำเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide ล้างด้วยน้ำเปล่าแล้วนำไปส่องดูด้วยแสง UV และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gene Genius Bioimage System (SYNGENE,UK)

2.1.3 การตัด PCR – product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำ PCR – product แต่ละไอโซเลทมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I, *Mbo*I, *Msp*I และ *Taq*I (NEB, UK) ทีละ 1 เอนไซม์แยกกัน ในปฏิกิริยาประกอบไปด้วย PCR – product 3 ไมโครลิตร เอนไซมม์ตัดจำเพาะ 2 – 3 unit บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมของแต่ละเอนไซม์และน้ำ ในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร นำไป incubate ที่อุณหภูมิเหมาะสม (รายละเอียดในภาคผนวก) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการทำเจลอิเล็กโตรโฟเรสิส บน 1.5% agarose ย้อมเจลด้วย ethidium bromide นำไปส่องดูด้วยแสง UV และบันทึกภาพเก็บไว้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1.2

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8S-ITS2 และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

2.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจาง 200 เท่า เพื่อใช้เป็น template ในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ primer ITS1F (5′-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3′) และ Rhsp2 (5′-TTGATA AAGGTGTTGTCCAAG-3′) ในปริมาตรรวม 40 ไมโครลิตรซึ่งประกอบด้วย 1X QIAGEN PCR buffer ที่เพิ่ม $MgCl_2$ เป็น 2.5 mM, dNTP mix เข้มข้นอย่างละ 0.2 mM, primer ITS1F/Rhsp2 เข้มข้นอย่างละ 0.2 μM เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (QIAGEN, Germany) 1 unit น้ำกลั่น และดีเอ็นเอที่เจือจางแล้ว 2 ไมโครลิตร ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันในหลอดสำหรับทำปฏิกิริยา PCR แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycler PTC-100™ (MJ Research, USA) โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้นเข้าสู่วงรอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ แล้วตามด้วย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2.2.2 การตัด PCR – product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำ PCR – product ของแต่ละไอโซเลทมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I, *Hha*I, *Mbo*I, *Mse*I, *Msp*I, *Rsa*I, *Taq*I และ *Xmn*I (NEB, UK) โดยใช้เอนไซม์ครั้งละ 1 ชนิดเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1.3 แล้วตรวจสอบผลที่ได้โดยการทำเจลอิเล็กโตรโฟเรสิสบน 1.5% agarose เช่นกัน

3. การบันทึกผลและการวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลโดยแต่ละแถบจะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ (character) ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยใช้ Unweighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA) เป็นเกณฑ์ในการรวมกลุ่ม และใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของ Dice ด้วยโปรแกรม SPSS for Windows release 9.0

4. สถานที่ดำเนินงานวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ห้องวิจัยด้านเชื้อรา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษา และวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (ADB project) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University