บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการ

3.1 ผลกระทบร่วมของโรคทริสเตซ่ากับโรคกรีนนิ่งต่อการเจริญเติบโตของส้มโชกุน

ทำการปลูกเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซ่า และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งโดยนำตาส้มนัมเบอร์วันที่เป็นโรคทริสเตซ่าสายพันธุ์รุนแรงที่ทำให้เกิดอาการลำต้นเป็นร่องบุ๋ม จากอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ และตาส้มโชกุนที่เป็นโรคกรีนนิ่งจากอำเภอวังชิ้น จังหวัดแพร่ มาติดบนกิ่งชำส้มโชกุนอายุ 1 ปี ที่ปลูกในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว ด้วยวิธีการติดตาแบบชิบ (chip budding) สูงจากโคนต้น 20 เซนติเมตร

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด completely randomized design (CRD) ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี ทำกรรมวิธีละ 10 ต้นหรือ 10 ซ้ำดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ติดตาด้วยตาส้มที่เป็นโรคทริสเตซ่า จำนวน 8 ตาต่อต้น

กรรมวิธีที่ 2 ติดตาด้วยตาส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่ง จำนวน 8 ตาต่อต้น

กรรมวิธีที่ 3 ติดตาด้วยตาส้มที่เป็นโรคทริสเตซ่า จำนวน 4 ตา และตาส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่ง จำนวน 4 ตา ต่อต้น

กรรมวิธีที่ 4 ไม่ติดตา (control)

หลังติดตาปล่อยให้ต้นส้มเจริญเติบโตในโรงเรือนทดลอง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2547 ถึงเดือนมิถุนายน 2548 ทำการบันทึกอาการผิดปกติที่ปรากฏ การเจริญเติบโตของต้นส้มได้แก่ความสูง ขนาดของทรงพุ่ม จำนวนกิ่ง ขนาดใบ และสีใบ และตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซ่า และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) และเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ทุก 2 เดือน สำหรับการวัดขนาดของใบทำการสุ่มวัดจากใบที่ 5 ของยอด จำนวน 5 ยอด ๆ ละ 1 ใบ ส่วนสีใบวัดโดยใช้เครื่องวัดสีใบ (Chromameter) วัดจากใบที่ 5 ของยอดเช่นเดียวกับการวัดสีใบ และหลังสิ้นสุดการทดลองทำการวัดน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน และราก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 ชนิดของต้นตอส้มที่มีความต้านทานต่อโรคในจังหวัดแพร่

ปลูกส้มโชกุน และส้มเขียวหวานที่ติดตาบนต้นตอส้ม 4 ชนิดคือส้มโวลคาเมอเรียน่า (Volkameriana), ส้มทรอยเยอร์ (Troyer), ส้มคลีโอพัตรา (Cleopatra) และส้มหงจี๋ ที่อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่ วางแผนการทดลองแบบ split plot โดยใส่ปุ๋ย 3 อัตราเป็น main-plot ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน
กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ยเพิ่มขึ้นอีก 50 % จากค่าวิเคราะห์ดิน
กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยเพิ่มขึ้นอีก 100 % จากค่าวิเคราะห์ดิน

และชนิดของต้นตอ 7 ชนิด เป็น sub- plot ทำ 5 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ส้มโชกุน/ โวลคาเมอเรียน่า
กรรมวิธีที่ 2 ส้มโชกุน/ ทรอยเยอร์
กรรมวิธีที่ 3 ส้มเขียวหวาน/ทรอยเยอร์
กรรมวิธีที่ 4 ส้มโชกุน/คลีโอพัตรา
กรรมวิธีที่ 5 ส้มเขียวหวาน/คลีโอพัตรา
กรรมวิธีที่ 6 ส้มโชกุน/ หงจี๋
กรรมวิธีที่ 7 ส้มเขียวหวาน/หงจี๋

บันทึกอาการผิดปกติที่ปรากฏ การเจริญเติบโตของต้นส้มได้แก่ความสูง ขนาดของทรงพุ่ม สัดส่วนระหว่างกิ่งพันธุ์ และต้นตอเหนือ และใต้รอยต่อ 5 เซนติเมตร และขนาดใบ โดยสุ่มวัดจากใบที่ 5 ของยอดจำนวน 5 ยอด ๆ ละ 1 ใบ จากนั้นนำความกว้าง และความยาวของใบมารวมกันแล้วหาค่าเฉลี่ย หรือในการทดลองนี้เรียกว่าค่า leaf index เก็บข้อมูลหลังปลูกส้มทุก 3 เดือน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SXW (Statistix for Windows) และทำการตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซ่า และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่ง ด้วยเทคนิค ELISA และเทคนิค PCR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซ่าด้วยเทคนิค ELISA

3.3.1 การสกัดน้ำคั้นจากตัวอย่างใบส้ม

ล้างตัวอย่างใบส้มให้สะอาด ใช้มีดตัดเอาเฉพาะเส้นกลางใบหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งให้ได้ 0.5 กรัม นำไปใส่ในโกร่งที่อบฆ่าเชื้อแล้วเติม extraction buffer (ภาคผนวก ข) 2 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดจนเป็นน้ำใส เทน้ำใสที่ได้ใส่ใน eppendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยก (centrifuge) ด้วยความเร็ว 7,000 g นาน 5 นาที ดูดน้ำใสด้านบนใส่ในหลอด eppendrof อันใหม่ เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

3.3.2 การเคลือบ antibody บนเพลท

เจือจางแอนติบอดี (Anti CTV IgG; บริษัท BIOREBA, Switzerland) 1 : 1000 ด้วย coating buffer (ภาคผนวก ข) (20 มิลลิลิตรต่อเพลท) เมื่อผสมเสร็จแล้วเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex) จากนั้นใช้ micropipette ดูดสารละสายที่ได้ใส่ในหลุมเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร เก็บเพลทไว้ในกล่องที่มีความชื้นเพื่อไม่ให้สารละลายระเหย และ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทของเหลวทิ้งแล้วทำการล้างเพลทหลังจากนั้นเติมน้ำคั้นจากตัวอย่างใบส้ม

3.3.3 การล้างเพลท

ใช้ micropipette ดูด washing buffer (ภาคผนวก ข) เติมลงไปในหลุมๆ ละ 240 ไมโครลิตร เขย่าเพลทเบา ๆ นาน 2-3 นาที ระวังอย่าให้ของเหลวกระเด็นออกจากหลุม จากนั้นเทของเหลวในเพลททิ้งแล้วล้างซ้ำด้วยวิธีเดิมจนครบ 3 ครั้ง

3.3.4 การเติมน้ำคั้นจากตัวอย่างใบส้ม

เติมน้ำคั้นจากตัวอย่างใบส้มที่ต้องการตรวจลงไปในหลุมตามผังที่วางไว้ หลุมละ 200 ไมโครลิตรตัวอย่างละ 2 หลุม จากนั้นเติม extraction buffer ในหลุมเปรียบเทียบ (blank) ตามด้วยน้ำคั้นจากใบส้มที่เป็นโรคทริสเตซ่า และน้ำคั้นจากใบส้มที่ไม่เป็นโรคในหลุม positive check และ negative check ตามลำดับ เสร็จแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น 1 คืน เมื่อครบเวลาเทของเหลวทิ้งแล้วล้างเพลท จากนั้นเติมแอนติบอดีที่ติดเอ็นไซม์ (enzyme–labeled antibody)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.5 การเติม enzyme–labeled antibody

เจือจางแอนติบอดีที่ติดเอ็นไซม์ (Anti CTV conjugate; บริษัท BIOREBA, Switzerland) 1:1000 ด้วย conjugate buffer (ภาคผนวก ข) (20 มิลลิลิตรต่อเพลท) ดูดสารละลายที่ได้ใส่ในหลุมหลุมละ 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ในกล่องที่มีความชื้นที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทของเหลวทิ้งแล้วทำการล้างเพลท จากนั้นเติม substrate

3.3.6 การเติม substrate

ละลาย p-nitrophenyl phosphate (PNPP) ใน substrate buffer (ภาคผนวก ข) อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร (1 mg/ml.) เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ใส่ในหลุม ๆ ละ 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ในกล่องที่มีความชื้นในที่มืดอุณหภูมิห้อง (18–25 องศาเซลเซียส) นาน 60 นาที เมื่อครบเวลานำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

3.4. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบส้ม (ดัดแปลงจาก Dellaporta, 1983)

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้มีดผ่าตัดที่สะอาด ตัดเอาเฉพาะเส้นกลางใบส้มชั่งให้ได้ 0.5 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในโกร่งที่ฆ่าเชื้อ และแช่เย็น เติม grinding buffer (ภาคผนวก ค) ลงไป 5 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ในตู้เย็นนาน 10 นาทีแล้วบดให้ละเอียดจนเป็นน้ำใส เทน้ำใสที่ได้ใส่ใน eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป เหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสด้านบนใส่ใน eppendorf อันใหม่แล้วนำไปเหวี่ยงที่ 14,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที จะสังเกตเห็นตะกอนสีเขียวติดอยู่ก้นหลอด เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แล้วเติม CTAB buffer (ภาคผนวก ค) ที่ผสม 0.2 % mercaptoethanol ลงไป 0.7 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อให้ตะกอนที่ได้ละลาย จากนั้นนำไป incubate ใน heat block อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยเขย่าทุก 10 นาที จากนั้นเติม chloroform / isoamyl alcohol 0.7 มิลลิลิตรแล้วนำไปเหวี่ยงที่ 7,000 g ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ของเหลวจะแยกออกเป็น 2 ชั้น ดูดของเหลวใสด้านบนใส่ใน eppendorf อันใหม่จากนั้นเติม isopropanol ลงไปเท่ากับปริมาตรของเหลวที่ดูดได้ นำไปเหวี่ยงที่ 14,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที จะสังเกตุเห็นตะกอนสีขาวของดีเอ็นเออยู่ที่ก้นหลอด ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 % ethanol 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 g ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นเท 70 % ethanol ทิ้ง ทำให้ตะกอนแห้งโดยนำหลอดไปไว้ใน vacuum ประมาณ 15-30 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อตะกอนแห้งแล้วเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ 20 ไมโครลิตรเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR

3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียกรีนนิ่งด้วยเทคนิค PCR (ดัดแปลงจาก Sdoodee, 1999)

ทำเครื่องหมายบนหลอด PCR tube แต่ละหลอดเสร็จแล้วใช้ micropipette ดูด mastermix (ภาคผนวก ค) ลงไปในหลอดที่เตรียมไว้หลอดละ 24 ไมโครลิตร จากนั้นเติมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบส้มลงไป 1 ไมโครลิตร หลอดที่เหลือเติมดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งลงในหลอด positive check และเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในหลอด negative check จากนั้นนำหลอดทั้งหมดใส่ใน เครื่อง Programable Thermal Controller PTC-100 ™ (MJ Research) ตั้งโปรแกรมการทำงานแต่ละรอบของเครื่องในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามตารางที่ 1 สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคกรีนนิ่งใช้ specific primer ที่จำเพาะกับบริเวณ 16S ribosomal gene ด้วย forward primer OI1 (5'-GCGCGTATGCAAGAGCGGCA-3') และ reverse primer OI2c (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT- 3')

ตารางที่ 1 โปรแกรมการทำงานของเครื่อง Programable Thermal Controller PTC-100 ™ (MJ Research) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่ง

Cycle	Step	Time	Temp(°C)
1	Initial denaturation	3 min.	94
2-35	Denaturation	1 min.	94
	Annealing	30 sec.	55
	Extention	1.5 min.	72
36	Denaturation	1 min.	94
	Annealing	30 sec.	55
	Extention	10 min.	72
	Incubate	Hold	4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่ง

หลังจากได้ PCR product แล้วนำไปตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค gel electrophoresis

3.4.3.1 การเตรียม agarose gel

ชั่ง agarose gel 0.3 กรัมใส่ในขวดที่มี 0.5 xTBE buffer 30 มิลลิลิตรนำไปหลอมให้เจลละลายจนเป็นน้ำใส ทิ้งให้พออุ่น จากนั้นเทลงบน gel tray แล้วเสียบ comb ลงไปบนเจล เมื่อเจลแข็งจึงค่อยๆ ดึง comb ออก นำเจลที่ได้ไปไว้ใน electrophoresis gel tank เติม 0.5 xTBE buffer ให้ท่วมเจลเล็กน้อย จากนั้นทำขั้นตอน gel loading

3.4.3.2 Gel loading

ใช้ micropipette ดูด loading buffer 2 ไมโครลิตร หยดบนแผ่นพาราฟิล์ม และดูด PCR product 8 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยดูดขึ้นลง 2-3 ครั้ง จากนั้นค่อย ๆ เติมลงไปในช่องเจล โดยในช่องแรกของเจลเติม DNA marker ตามด้วย PCR product ของ GO-DNA (positive control) PCR product ของพืชปกติ (negative control) และ PCR product ของตัวอย่างใบส้มที่ต้องการตรวจตามลำดับ หลังจากนั้นทำขั้นตอน gel running ต่อไป

3.4.3.3 Gel running

ปิดฝา gel tank แล้วตั้งกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 60 นาที

3.4.3.4 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบน gel

เมื่อผ่านขั้นตอน gel running แล้ว นำเจลไปล้างในน้ำสะอาดก่อนนำไปย้อมด้วย ethidium bromide (ethidium bromide ความเข้มข้น 1 mg/ml) นาน 5 นาที จากนั้นล้าง ethidium bromide ออกโดยแช่ในน้ำสะอาดนาน 10 นาที เสร็จแล้วนำเจลไปใส่ในเครื่อง gel document (SYNGRNE; Gene Genius Bio Imaging System) เพื่อดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (UV) ผ่านจอคอมพิวเตอร์ ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏตรงตำแหน่งเดียวกันกับแถบดีเอ็นเอของ GO-DNA แสดงว่าพบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การวัดสี ด้วยเครื่องวัดสีใบ (Chromameter) Minolta CR 300 เป็นการวัดสีแบบ 3 มิติ (ภาพภาคผนวก ง) ซึ่งในการวัดแต่ละครั้งจะอ่านค่า 3 ค่าได้แก่

ค่า L* เป็นค่าความสว่าง มีช่วงตั้งแต่ 0 คือมืดดำ ถึง 100 คือขาวสว่าง
ค่า a* เป็นค่าสีตามแกนนอน มีช่วงตั้งแต่ +60 คือสีม่วงแดง ถึง -60 คือสีเขียวอมน้ำเงิน
ค่า b* เป็นค่าสีตามแกนตั้ง มีช่วงตั้งแต่ +60 คือสีเหลือง ถึง -60 คือสีน้ำเงิน

หลังจากอ่านค่าแล้วนำมาคำนวณหาค่าองศาของสี (hue) ดังนี้

ในกรณีที่

ค่า a* เป็นค่าบวก และ b* เป็นค่าบวก	ค่า hue = arctangent b*/a*
ค่า a* เป็นค่าบวก และ b* เป็นค่าลบ	ค่า hue = 360 - arctangent b*/a*
ค่า a* เป็นค่าลบ และ b* เป็นค่าบวก	ค่า hue = 180 - arctangent b*/a*
ค่า a* เป็นค่าลบ และ b* เป็นค่าลบ	ค่า hue = 270 - arctangent b*/a*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved