บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์

3.1.1 การเก็บตัวอย่างพืช (sample collection)

สุ่มเก็บตัวอย่างส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งในพื้นที่ ที่กำลังปรับเปลี่ยนเป็นระบบเกษตรอินทรีย์ โดยเลือกเก็บใบ กิ่ง และราก ที่สมบูรณ์ ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลงหรือแสดงอาการของโรค จำนวน 3 พื้นที่ ได้แก่พื้นที่ศูนย์เกษตรยั่งยืน, สวนส้มของคุณสุเทพ, สวนส้มของคุณไมตรี ทีรอม ตำบล แม่สูน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

3.1.2 การกำจัดเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนของส้ม (surface sterilization) และการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท (isolation) (ดัดแปลงจากวิธีของ Shimizu *et al*., 2000)

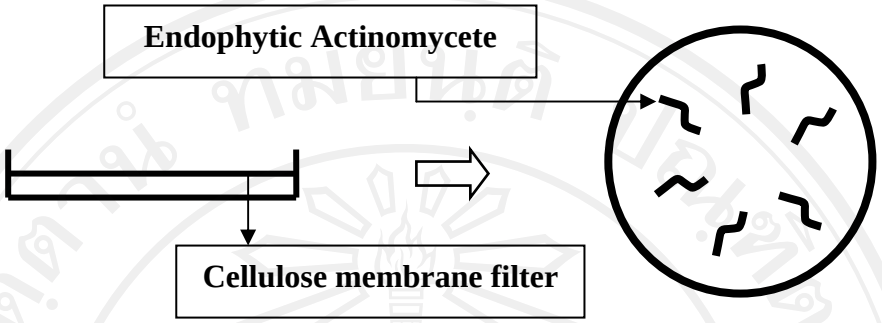
นำตัวอย่างส้มที่ได้ล้างน้ำให้สะอาดโดยการเปิดน้ำไหลผ่านชิ้นส่วนส้ม เป็นเวลา 30 นาที ผึ่งลมให้แห้ง ตัดใบส้มขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร ตัดกิ่งและรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ alcohol ที่มีความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อประมาณ 4 - 5 ครั้ง นำชิ้นส่วนของส้มวางบนอาหาร IMA-2 (Inhibitory Mold Agar-2) (ภาคผนวก ก) และ Humic acid vitamin agar (ภาคผนวก ก) ที่ผสมสารปฏิชีวนะคือ heritage (Active in gradient : Azoxystrobin) เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และ naldixic acid ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย แล้วทำการบ่มตัวอย่างชิ้นพืชไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน

3.1.3 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และการเก็บเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ (Shimizu *et al*., 2000)

ใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อเอนโดไฟท์ที่คาดว่าจะเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่เจริญขึ้นบนชิ้นพืช มาขีดบนแผ่นกรองเซลลูโลส (Cellulose membrane filter) ที่มีขนาดรูเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร ที่วางบนอาหาร IMA-2 นำเชื้อไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 วัน จากนั้นนำแผ่นกรองเซลลูโลสออก หากเชื้อนั้นเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีท พบว่าเชื้อนั้นสามารถเจริญรอดผ่านแผ่นกรองเซลลูโลส (ภาพที่ 9) และเก็บรวบรวมเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้ไว้เป็น stock culture โดยเก็บเชื้อไว้ในหลอดอาหาร IMA-2 และเก็บใน glycerin 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสม DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 9 การขีดเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ลงบนอาหาร IMA-2 ที่ผิวหน้าของอาหารวางด้วยแผ่นเซลลูโลส

3.2 ศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype)

3.2.1 การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร International Streptomyces Project (ISP) (Williams *et al*, 1989; Holt *et al*., 1994)

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast-malt extract agar (ISP-2), oatmeal agar (ISP-3) และ starch agar with mineral salts (ISP-4) (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะสีและการเจริญของ aerial mycelium, ลักษณะโคโลนี, การแพร่ของรงควัตถุ โดยอ้างอิงหมายเลขสี จาก Manual of color name (1987) และ ลักษณะของเส้นสายสปอร์ ที่ปรากฏอยู่บนอาหารในแต่ละชนิด

3.2.2 การผลิตเมลานิน (melanin production)

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร peptone-yeast extract iron agar (ISP-6) (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลล์เซียส เป็นเวลา 7 – 14 วัน บันทึกผลการผลิตเมลานินซึ่งสามารถสังเกตการแพร่ของรงควัตถุ จะมีสีน้ำตาลดำขึ้นบนอาหาร

3.2.2 การศึกษาหา Diaminopimelic acid (DAP) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Lechevalier and Lechevalier, 1970)

การศึกษาหา Diaminopimelic acid (DAP) ภายในผนังเซลล์ โดยใช้วิธีการแยกสีของสารละลายมาตรฐานจากเทคนิคโครโมโตกราฟฟี Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้สารละลายมาตรฐาน LL and *meso* – A_2pm 0.01 M เป็นตัวทำละลาย เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Non-sporulating medium (ภาคผนวก ก) เชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ใช้ระยะเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ เก็บเกี่ยวเอาเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ประมาณ 100 มิลลิกรัม ลงในหลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุ 6 N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixture เป็นเวลา 6 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลาประมาณ 20 นาที แล้วแยกส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที 5 นาที จะได้สารละลายที่ได้ใช้เป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์ DAP หยดสารละลายตัวอย่าง 3 ไมโครลิตร และสารละลายมาตรฐาน (LL and *meso* – A_2pm 0.01 M) 1 ไมโครลิตร ลงบนฐานของ TLC plate นำ TLC plate ที่ได้ไปแช่ใน TLC tank ที่บรรจุ solvent system (methanol-distilled : water : HCl 6 N : pyridine ; 80 : 26 : 4 : 10, v/v) โดยใช้เวลาประมาณ 3 - 6 ชั่วโมง และนำ TLC plate ออกมาทำให้แห้งใน fume hood ประมาณ 3-5 นาที แล้วฉีดพ่นสารละลาย ninhydrin 0.20 เปอร์เซ็นต์ ให้ทั่วแผ่น นำไปบ่มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.2.3 การศึกษาหาสารประกอบน้ำตาลในผนังเซลล์ (whole-cell sugars) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Lechevalier และ Lechevalier, 1970)

การศึกษาหาสารประกอบของน้ำตาลในผนังเซลล์ (Whole cell hydrolysate) โดยวิธีการแยกสีของสารละลายมาตรฐานจากเทคนิคโครโมโตกราฟฟี Thin Layer Chromatography (TLC) และใช้สารละลายมาตรฐาน 2 ชุด ดังนี้คือ ชุดที่ 1 ประกอบไปด้วยน้ำตาล xylose, arabinose และ galactose ชุดที่ 2 ประกอบไปด้วยน้ำตาล mannose, glucose และ ribose ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนไฟท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GY agar (ภาคผนวก ก) ใช้ระยะเวลาประมาณ 1 - 2 สัปดาห์ เก็บเกี่ยวเอาเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอน-โดไฟท์ประมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวที่บรรจุ 1 N H_2SO_4 จำนวน 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixture นำหลอดดังกล่าวไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลาประมาณ 20 นาที ทิ้งให้เย็น ปรับ pH ของส่วนผสมที่ได้ให้เป็น pH 5.2-5.5 ด้วย $Ba(OH)_2$ ที่อิ่มตัว แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ประมาณ 10 นาที เทเอาเฉพาะสารละลายส่วนใสและนำไประเหยจนแห้ง ละลายตัวอย่างแห้งในน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร หยดสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร และสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ชุด 1 ไมโครลิตร ลงบนฐานของ TLC plate นำ TLC plate ที่ได้ไปแช่ใน TLC tank ที่บรรจุ solvent system (n-butanol-distilled : water : pyridine: toluene; 10 : 6 : 6 : 1, v/v)โดยใช้เวลาประมาณ 3 - 6 ชั่วโมง และนำ TLC plate ออกมาทำให้แห้งใน fume-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

hood ประมาณ 3 - 5 นาที แล้วฉีดพ่นสารละลาย Aniline phthalate ให้ทั่วแผ่น นำไปบ่มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.2.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM : Scanning Electron Microscope)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์บนอาหาร IMA-2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ เพื่อให้เชื้อเจริญเต็มที่และสร้างสปอร์ที่สมบูรณ์ นำเชื้อส่งไปที่ศูนย์วิจัยและบริการจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอน สวท.–มช. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด มีวิธีการเตรียมตัวอย่างดังนี้ คือ ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์เจริญอยู่ มีขนาดประมาณ 5 x 5 มิลลิเมตร จำนวน 3 - 4 ชิ้น ต่อเชื้อตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ได้แช่ในสารละลาย glutaraldyhyde 2.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M phosphate buffer เพื่อรักษาสภาพ (fixing) โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ แล้วล้างออกด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7.2 และแช่ในสารละลาย osmium tetroxide 1 ปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M phosphate buffer เพื่อรักษาสภาพเซลล์ แล้วล้างออกด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7.2 ขั้นตอนต่อมาคือ การไล่น้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยการแทนที่น้ำด้วย alcohol ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามลำดับ จาก 30, 50, 70, 80, 90, และ 100 เปอร์เซ็นต์ 2 - 3 ครั้งตามลำดับ โดยใช้เวลาแช่ในแต่ละความเข้มข้น 5 - 10 นาที ทำให้แห้ง (drying) ด้วยการรมตัวอย่างด้วย CO_2 และทำการเคลือบตัวอย่างด้วยอนุภาคทองหนา 30 นาโนเมตร นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาส่องดูลักษณะสปอร์และรูปแบบของการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL รุ่น JSM-5910LV) พร้อมทั้งบันทึกภาพลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์

3.3. การจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ด้วยยีน 16S rDNA โดยใช้เทคนิค PCR

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแอคติโนมียซีท (DNA Extraction) (ดัดแปลงจาก Murray and Thompson, 1980)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ในอาหาร GY broth (ภาคผนวก ก) นำเชื้อที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 3 - 5 วัน ไปเปตเชื้อแอคติโนมัย-ซีทเอนโดไฟท์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด micro centrifuge มาแยกส่วนสารละลายใสและเซลล์โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แข็งตัว แล้วเติม TE buffer 200 ไมโครลิตร และ Glass bead บดให้ละเอียด เติม lysozyme (50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

mg/ml) 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เติม Proteinase k (20 mg/ml) 50 ไมโครลิตร และ 10 % SDS 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติม 5 M NaCl 50 ไมโครลิตร และ 10 % CTAB 300 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 55 องศาเซลเซียส 30 นาที เติม Chloroform : Isoamyl Alcohol (24:1) 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที กลับหลอด micro centrifuge ทุก 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ไปเปตสารละลายส่วนบนลงในหลอด micro centrifuge ประมาณ 500 ไมโครลิตร เติม Isopropanol ที่เย็นจัด 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที (ล้างตะกอนดีเอ็นเอ 2 ครั้ง) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 50 ไมโครลิตร เติม Rnase 0.002 เปอร์เซ็นต์ 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 30-60 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ

3.3.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแอคติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็น DNA template โดยใช้ universal primers ดังต่อไปนี้ทำปฏิกิริยา

Primer	Nucleotide sequence
Forward 27f	5´AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3´
Reverse 1525r	5´AAG GAG GTG WTC CAR CC 3´

หมายเหตุ Standard MixBase Definitions

M = A, C
W = A, T
R = A, G

องค์ประกอบปฏิกิริยา PCR (PCR Condition)

ใช้ชุด PCR test kit (2X PCR Master mix Solution (i-Taq))

	ไมโครลิตร (µl)
Master Mixture (kit)	10
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
DNA template	1
H_2O	7

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดลงในหลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนในการทำ PCR

		Temperature (°C)	time	cycles
step 1	pre-denaturation	94	5 min.	1
step 2	template denaturation	94	30 sec.	
step 3	primer annealing	55	30 sec.	30
step 4	extension	72	30 sec.	
step 5	Final extension	72	7 min	1

3.3.4 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis

การเตรียม agarose gel

เตรียม agarose gel 1 เปอร์เซ็นต์ ชั่ง agarose 1 กรัม ละลายใน 1X TAE buffer 100 มิลลิลิตร ลงในขวด (duran) นำไปหลอมให้เข้ากันในไมโครเวฟ รอให้เจลอุ่นพอจับได้ ประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ผสม ethidium bromide ที่ความเข้มข้น100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 7 ไมโครลิตร แล้วเทลงในถาดเจล (gel tray) ที่เสียบหวี (comb) มีจำนวนช่อง (well) ตามต้องการ โดยปกติแล้วเจลควรมีความหนาประมาณ 5-7 มิลลิเมตร รอจนให้เจลแข็งตัวและดึงหวีออกอย่างระมัดระวัง

การ run agarose gel electrophoresis

นำเจลที่ได้วางลงใน electrophoresis gel tank จากนั้นเท 1X TAE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล ผสม PCR products 3-5 ไมโครลิตร และ loading buffer 1 ไมโครลิตร ให้เข้ากันบนแผ่น Parafilm สำหรับตัวอย่างมาตรฐาน (Molecular weight marker) ใช้ 1 Kb Plus DNA Ladder (invitrogen) ผสมเช่นเดียวกับตัวอย่าง PCR ทำการโหลดตัวอย่างและตัวอย่างมาตรฐานลงใน well โดยให้ตัวอย่างมาตรฐานอยู่ในช่องทางซ้ายสุด หรือ ขวาสุด ปิดฝาและเปิดสวิตซ์ electrophoresis gel tank ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจสอบดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGREN; Gene Genius Bio Imaging System)

3.3.5 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (purification)

การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จาก PCR products โดยใช้ Purification test kit (GP-1 PCR clean-up kit)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Gel Electrophoresis

ตรวจวิเคราะห์ผลดีเอ็นเอด้วยวิธี Electrophoresis เพื่อยืนยันพบแถบดีเอ็นเอจริง

Homogenization

เติม buffer PCR Mix thoroughly 5 เท่า ของ PCR products และเติม 3 M CH_3COONa pH 5.2 5 ไมโครลิตร

Loading to column

ย้ายสารละลายตัวอย่างลงใน column centrifuge และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000 g/1 นาที แล้วเทสารละลายส่วนล่างทิ้ง

Column washing

เติม 750 ไมโครลิตร ของ wash buffer และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000 g/1 นาที แล้วเทสารละลายส่วนล่างทิ้ง แล้วตาก column ให้แห้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ระยะเวลา 2-5 นาที

Elution

ย้าย Column centrifuge ลงในหลอด microcentrifuge tube เติม Elution buffer 30-200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000 g/1 นาที แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ดูความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Electrophoresis อีกครั้ง

3.3.6 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล

นำตัวอย่าง PCR product ที่ทำการ Purification เรียบร้อยแล้วส่งไปทำการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล โดยเทคนิค 16s rDNA ที่บริษัท MARCROGEN Advancing through Genomics ประเทศเกาหลีใต้

เมื่อได้ข้อมูลที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิดของแอคติโนมัยซีทโดยอาศัยฐานข้อมูลจากอินเตอร์เน็ทของ National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม BLAST ในการค้นหาและวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.7 การทำแผนภูมิวิเคราะห์แสดงความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของเชื้อแอคติโนมัยซีท (Phylogenetic tree)

Phylogenetic tree เป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสที่วิเคราะห์จากเทคนิค 16S rDNA sequence โดยนำลำดับเบสที่ได้จากการตรวจสอบ เทียบกับตัวอ้างอิง ที่หาได้จาก Gene Bank วิเคราะห์ความสำพันธ์โดยใช้โปรแกรม Phydit ร่วมกับ Trecon (Bootstrep = 1000)

3.4. ศึกษาศักยภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ต่อการผลิตสารที่ช่วยในการเจริญเติบโตของส้ม

3.4.1 การวิเคราะห์หาความสามารถในการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Gordon and Weber (1951))

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ในอาหาร IMA 2 ประมาณ 7 วัน ทำการ cock เชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่ต้องการ (ต้องเลือกบริเวณที่มีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน) ลงในอาหาร NB ที่เติม tryptophan 2 กรัมต่อลิตร นำเชื้อที่ได้ไปบ่มโดยเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 7 วัน นำเชื้อที่ได้มาแยกส่วนสารละลายใสโดยการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 นำส่วนละลายใสไปวิเคราะห์หา IAA และนำตะกอนเซลล์ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของเชื้อโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และนำมาชั่งด้วยเครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง ไปเปตสารละลายของ standard series และสารละลายเชื้อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติม salkovskii reagent 2 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 530 นาโนเมตร

วิธีการเตรียม Standard series

ชั่งสาร Indole-3-acetic acid (MW = 175.19) ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ก่อนโดยใช้เป็น stock solution (ละลายใน 50% methanol) แล้วเจือจาง สารละลาย IAA 10 มิลลิโมล ให้เป็น 1 มิลลิโมล ด้วย 50% methanol แล้วใช้สารละลาย IAA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมล นี้ ทำการเตรียมชุด standard series ที่มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 50, 100, 150 ไมโครโมล

ความเข้มข้น μM	IAA 1 μM	Medium (ml)
0	0	1000
10	10	990
20	20	980
50	50	950
100	100	900
150	150	850

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการย่อยละลายฟอสฟอรัส

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยกได้ในอาหารแข็ง Czapek's agar (ภาคผนวก) บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและบริเวณใสรอบโคโลนี clear zone หาค่า clear zone ratio จากอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนี (clear zone diameter) ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (colony diameter)

3.4.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส (ดัดแปลงจากวิธีการของ นันพนา (2549))

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยกได้ในอาหารแข็ง Carboxymenthyl cellulose (CMC) บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน แล้วย้อมด้วยการเทสารละลาย congo red 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้ท่วมอาหารวุ้นทิ้งไว้ 3 นาที และล้างด้วยสารละลาย NaCI 1 โมลลาร์ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและบริเวณใสรอบโคโลนี (clear zone) หาค่า clear zone ratio จากอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนี (clear zone diameter) ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (colony diameter)

3.5 ศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของส้ม

คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโต (จากข้อ 3.4) เพื่อทดสอบศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการเข้าสู่ราก ด้วยวิธีการปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ลงในกล้าส้ม และเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นส้มกับต้นส้มที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

3.5.1 วิธีการตรวจสอบการเข้าราก

ทำการเพาะต้นกล้าส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง นำเมล็ดส้มที่ได้ล้างน้ำให้สะอาดและผึ่งลมให้แห้ง ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยแช่ alcohol ที่มีความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ-กลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อประมาณ 4-5 ครั้ง นำเมล็ดส้มวางบนจานเพาะเชื้อที่บรรจุทรายที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 7 วัน ย้ายกล้าส้มลงในกระถางที่บรรจุทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ใช้ระยะเวลาในการปลูกประมาณ 1 เดือน จากนั้นทำการปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ลงในดินบริเวณรอบๆ ของรากต้นกล้าส้ม ที่ระดับความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร ต่อ กระถาง ต้นกล้าส้มควบคุมไม่มีการปลูกเชื้อ ใช้ระยะเวลาปลูกประมาณ 2 เดือน จากนั้นนำรากออกมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วแช่ในสารละลาย KOH 10 เปอร์เซ็นต์ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำรากมาล้างด้วยน้ำสะอาด และแช่ในสารละลาย HCl 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้งแล้วนำมาแช่ในสารละลาย water blue 0.06 เปอร์เซ็นต์ เพื่อย้อมสีราก จากนั้นนำรากที่ย้อมมาตัด (section) วางบนแผ่นไลส์ แล้วปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดไสล์ แล้วนำไปตรวจสอบการเข้ารากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

3.5.2 เปรียบเทียบศักยภาพของเชื้อต่อการเจริญเติบโตของกล้าส้ม

3.5.2.1 การเพาะกล้าส้มและวางแผนการทดลอง

ทำการเพาะกล้าส้มเหมือนกับวิธีในข้อ 3.5.1 ย้ายกล้าส้มลงในกระถางที่บรรจุดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ใช้ระยะเวลาในการปลูกประมาณ 1 เดือน จากนั้นทำการปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอน-โดไฟท์ที่คัดเลือก คือ เชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารเจริญเติบโตที่หลากหลาย และเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05 เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิต IAA สูงที่สุดเช่นกัน วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ทรีตเมนต์ 4 ซ้ำ คือ ทรีตเมนต์ 1 ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21, ทรีตเมนต์ 2 ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05, ทรีตเมนต์ 3 ปลูกเชื้อไอโซเลท TGsR-02-21 และ TGsL-02-05 และทรีตเมนต์ 4 เป็นชุดควบคุม (ไม่ได้ใส่เชื้อ) ที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร ต่อ กระถาง ใช้ระยะเวลาปลูกประมาณ 2 เดือน

3.5.2.2 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกล้าส้ม

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้น ดูการแตกแขนงของรากฝอย และปริมาณน้ำหนักสดและแห้งเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved