บทที่ 3
วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การเกิดโรคกรีนนิ่งในส้มพันธุ์ฟรีมองท์ คลีโอพัตรา ทรอยเยอร์ และส้มเขียวหวาน

ปลูกต้นกล้าส้มปลอดโรคพันธุ์ฟรีมองท์ คลีโอพัตรา ทรอยเยอร์ จากการเพาะเมล็ด และส้มเขียวหวานที่ทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการตอนกิ่ง ซึ่งมีอายุประมาณ 1 ปี จำนวนพันธุ์ละ 40 ต้น ในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว ภายในโรงเรือนปลูกต้นไม้ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หลังการย้ายปลูก 6 เดือน ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งด้วยการติดตาที่ได้จากต้นส้มที่เป็นโรค โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) แต่ละพันธุ์ทำการทดลอง 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ต้น (10 ซ้ำ) ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ทำการติดตาจำนวน 1 ตาต่อต้น
กรรมวิธีที่ 2 ทำการติดตาจำนวน 2 ตาต่อต้น
กรรมวิธีที่ 3 ทำการติดตาจำนวน 3 ตาต่อต้น
กรรมวิธีที่ 4 ไม่ทำการติดตา (ชุดควบคุม)

1.1 บันทึกขนาดของใบและการเปลี่ยนแปลงของใบที่ 6-7 จากปลายยอด จำนวนต้นละ 5 ใบ ภายหลังการติดตาทุกๆ 45 วัน โดยขนาดพื้นที่ใบด้วยเครื่องวัดขนาดพื้นที่ใบ ส่วนการเปลี่ยนแปลงของสีใบ ทำการวัดค่าองศาสี (hue) ของใบด้วยเครื่องวัดสีใบ ซึ่งเป็นระบบการวัดสีแบบ 3 มิติ มีการแสดงค่า 3 ค่าได้แก่ ค่า L* เป็นค่าความสว่าง มีช่วงตั้งแต่ 0 คือมืดดำ ถึง 100 คือขาวสว่าง, ค่า a* เป็นค่าสีตามแกนนอน มีช่วงตั้งแต่ +60 คือสีม่วงแดง ถึง -60 คือสีเขียวอมน้ำเงิน และค่า b* เป็นค่าสีตามแกนตั้ง มีช่วงตั้งแต่ +60 คือสีเหลือง ถึง -60 คือสีน้ำเงินจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าองศาสีโดยแทนในสูตร hue = 180 - arctangent b*/a* จากนั้นนำค่าองศาสีของใบที่ได้มาเปรียบเทียบกับลักษณะสีในแผนที่สี(ภาคผนวก ข)

1.2 ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งในต้นส้มที่ทำการติดตาที่เป็นโรคด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.1 การสกัด DNA จากใบพืชตัวอย่าง (ดัดแปลงจาก Dellaporta, 1983)

ทำการล้างใบส้มที่ต้องการสกัด DNA ให้สะอาดด้วยน้ำสะอาดและซับให้แห้ง จากนั้นใช้มีดที่สะอาดตัดเอาเฉพาะส่วนเส้นกลางใบ (mid vein) ของพืช ชั่งตัวอย่างละ 0.5 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ เติม grinding buffer (ภาคผนวก ก) ตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่ 4°C นาน 10-20 นาทีในโกร่งที่แช่เย็นจัด บดให้ละเอียด แล้วเทเฉพาะของเหลวที่ได้ลงในหลอด eppendolf ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที

ของเหลวข้างต้นจะตกตะกอนที่บริเวณก้นหลอด จึงใช้ pipet ดูดเอาเฉพาะของเหลวใสด้านบน ใส่ใน eppendolf อันใหม่ แล้วจึงนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 g อุณหภูมิ 4°C นาน 25 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง เก็บเฉพาะส่วนของตะกอนสีเขียวที่ติดอยู่บริเวณก้นหลอด

เติม CTAB buffer (ภาคผนวก ก) 0.7 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนละลาย นำไป incubate ที่ 60°C นาน 30 นาที โดยทำการเขย่าหลอดทุกๆ 10 นาที จากนั้นเติม chloroform/isoamyl alcohol 0.7 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 g ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จะได้ของเหลวในหลอดทดลองที่แยกเป็น 2 ชั้น แล้วจึงใช้ pipet ดูดเอาของเหลวด้านบนเก็บไว้ในeppendolf อันใหม่ นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที

เทสารละลายทิ้งอย่างระมัดระวัง เก็บเฉพาะตะกอนของ DNA ที่ติดอยู่บริเวณก้นหลอด ทำการล้างตะกอนโดยเติม 70% ethanol 50µl แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g นาน 5 นาที เทแอลกอฮอล์ทิ้ง จากนั้นทิ้งให้ตะกอนแห้ง แล้วจึงทำการเก็บตะกอน DNA โดยละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไป 20 µl แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

1.2.2 การตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่ได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

ทำการเตรียม agarose gel โดยเติม agarose 0.3 กรัม ลงใน 0.5XTBE buffer 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มให้ละลายในไมโครเวฟ ทิ้งให้ gel ที่ได้อุณหภูมิลดลง แล้วเทลงใน gel tray ที่เตรียมไว้โดยเสียบ comb ที่มีจำนวนช่องตามที่ต้องการ รอจน gel แข็งตัวแล้วจึงดึง comb ออกอย่างระมัดระวัง นำ gel ที่ได้ใส่ลงใน electrophoresis gel tank แล้วเติม 0.5XTBE buffer ให้ท่วมแผ่น gel

การเตรียม gel loading โดยใช้ micropipet ดูด loading buffer 2 µl หยดลงบนแผ่นพาราฟิล์ม จากนั้นดูด DNA ที่สกัดได้ 8 µl ลงไปผสมกับ loading buffer ที่เตรียมไว้ให้เข้ากัน แล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ดูดส่วนผสมทั้งหมดที่ได้ไปหยอดลงในแต่ละช่องของ gel ที่เตรียมไว้ เมื่อหยอด DNA จนครบตามที่ต้องการแล้วจึงทำการ run gel โดยใช้กระแสไฟ 50V นาน 90 นาที

เมื่อเครื่องทำการ run gel เสร็จ ทำการล้าง gel ที่ได้ในน้ำสะอาด แล้วจึงทำการย้อม gel โดยการแช่แผ่น gel ลงในสารละลาย ethidium bromide (ethidium bromide 1 mg/ml ผสมกับน้ำกลั่นอัตราส่วน 20 µl/dH_2O 1 ลิตร) นาน 5 นาที จากนั้นล้าง ethidium bromide ออกด้วยน้ำให้สะอาด แล้วนำไปตรวจสอบแถบ gel ที่ได้ภายใต้ UV ด้วยเครื่อง gel document (SYNGRNE; Gene Genius Bio Imaging System)

1.2.3 การเพิ่มปริมาณ GO-DNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) (ดัดแปลงจาก Sadoodee, 1999)

1.2.3.1 การทำปฏิกิริยา PCR

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย specific primer ที่จำเพาะกับบริเวณ 16S DNA gene ด้วย forword primer OI1(5'-GCGCGTATGCAAGAGCGGCA-3') และ reverse primer OI2c (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3') การเพิ่มปริมาณ DNA ประกอบด้วยสารละลายปริมาณรวม 25 µl ดังนี้

เตรียม mastermix (ภาคผนวก) หลอดละ 24 µl แล้วเติม DNA ที่เตรียมไว้ลงไปหลอดละ 1.0 µl โดยหลอดที่เป็น positive control จะใช้ GO-DNA และ negative control ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนในส่วนของ DNA

Thermocycling

ใส่หลอดทดลองทั้งหมดลงในเครื่อง Programable Thermal Controller PTC-100™(MJ Research) โดยตั้งโปรแกรมการทำงานในแต่ละรอบดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รอบการทำงานของเครื่อง thermocycler เพื่อเพิ่มปริมาณของ GO-DNA โดยเทคนิค PCR

Cycle	Step	Time	Temp ($^{\circ}$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	1.5 min.	72
	Incubation	Hold	4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.3.2 การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณ GO-DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ gel electrophoresis

ทำการเตรียม gel, gel loading, gel running, การย้อม gel และตรวจสอบแถบ DNA วิธีเช่นเดียวกับวิธีการตรวจสอบคุณภาพ DNA

การทดลองที่ 2 การเจริญเติบโตของส้มโชกุนที่ติดตาบนต้นตอ 3 พันธุ์ในสภาพสวน

ได้เลือกพื้นที่ทดลองซึ่งเป็นแปลงส้มของเกษตรกรสวนเวียงคำ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งได้ปลูกส้มโชกุนที่ติดตาบนต้นตอส้มพันธุ์หงจี๋จำนวน 76 ต้น, ฟรีมองท์ 60 ต้น และคลีโอพัตรา 150 ต้น โดยมีอายุหลังการย้ายปลูก 10 เดือน ทำการบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของต้นส้มโชกุนบนต้นตอพันธุ์ละ 20 ต้น ทุก 3 เดือน โดยวัดความสูงบริเวณโคนต้นเหนือระดับพื้นดินจนถึงปลายยอด วัดขนาดทรงพุ่ม สัดส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นของกิ่งพันธุ์โชกุนซึ่งอยู่เหนือรอยต่อ 5 เซนติเมตรกับต้นตอซึ่งอยู่ต่ำกว่ารอยต่อ 5 เซนติเมตร และจำนวนการติดผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved