

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

3.1 การตรวจสอบโรคสำคัญจากกิ่งพันธุ์ส้ม

เป็นการตรวจสอบโรคสำคัญจากกิ่งพันธุ์ส้ม 3 ชนิดที่ได้จากแหล่งพันธุ์ส้มของมูลนิธิโครงการหลวง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยคัดเลือกตัวอย่างพืชจากต้นส้มที่มีสุขภาพดี แข็งแรง และไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรค มาทำการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรครินนิ่ง (Greening disease) และ ไวรัส *Citrus Tristeza Virus* (CTV)

3.1.1 การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรครินนิ่ง (Greening disease) ในตัวอย่างพืช

ทำการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรครินนิ่ง (Greening disease) ในตัวอย่างพืชโดยสกัดดีเอ็นเอจากใบส้มด้วยชุดสกัด GF-1-Plant DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia)

1) นำตัวอย่างพืชมา 100 มิลลิกรัม มาสกัดดีเอ็นเอรวม (DNA) ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณ 16 rRNA gene ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* โดยเทคนิค PCR (Jagoueix *et al.*, 1994) โดยใช้

Forward primer (5'GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA 3') และ

Reverse primer (5'GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT3')

ในการเพิ่มจำนวนขึ้นยีนขนาด 1,107 คู่เบส ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ 0.2 มิลลิโมลาร์ของแต่ละ dNTP และ primers Forward และ Reverse ที่มีความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์

2) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังนี้ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

3) ตรวจสอบผลผลิต PCR (PCR product) ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น standard marker และได้ทำ PCR ของยีนควบคุม 18S rRNA โดยใช้ primer 18S-F (5' GAACAAGTGGCGAAAGCATTTCG 3') และ 18S-R (5'CCTGGTAAGTTTCCCCGT GTTG 3') เพื่อใช้ตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอ

4) นำตัวอย่างส้มที่ปลอดเชื้อสาเหตุโรครินนิ่ง ไปตรวจสอบเชื้อ CTV ซึ่งเชื้อสาเหตุของโรคทริสเทซ่าต่อไป

3.1.2 การตรวจสอบไวรัส *Citrus Tristeza Virus* (CTV) ในตัวอย่างพืช

ทำการตรวจสอบไวรัส *Citrus Tristeza Virus* (CTV) ในตัวอย่างใบส้ม ด้วยวิธี RT-PCR (Mehta, et al., 1997)

- 1) นำตัวอย่างพืชมา 100 มิลลิกรัม สกัดอาร์เอ็นเอรวม (Total RNA) ด้วยสาร TRIzol® reagent (Invitrogen, USA) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ Total RNA โดยการทำ gel electrophoresis และการวัดค่าการดูดกลืนแสง
- 2) นำ Total RNA ของพืชตัวอย่างมา 2 ไมโครกรัม เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ cDNA โดย M-MuLV Reverse Transcriptase (Vivantis, Malaysia) cDNA ที่ได้จะนำมาเป็น DNA template ในการทำ PCR ด้วย primers ที่ออกแบบจาก Coat protein (CP gene) ขนาด 670 คู่เบส ได้แก่

primer C1 (5' GGCGGAATTCGACGACGAAACAAAGAAA 3') และ

primer C2 (5' GAAGATCTTCAACGTGTGTGAATTTCC 3')

- ในการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาปฏิกิริยาประมาณ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA 10 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase 5 ยูนิต 10X PCR buffer 5 ไมโครลิตร MgCl₂ 2.5 มิลลิโมลาร์ 0.2 มิลลิโมลาร์ของแต่ละ dNTP และ primer C1,C2 ที่มีความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์
- 3) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังนี้ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที และ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ
 - 4) ตรวจสอบผลผลิต PCR (PCR product) ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น standard marker ทั้งนี้ ได้ทำ PCR ของยีนควบคุม 18S rRNA โดยใช้ primer 18S-F (5' GAACAACTGCGAAAGCATTTCG 3') และ 18S-R (5'CCTGGTAAGTTTCCCCGTGTTG 3') เพื่อใช้ตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้
 - 5) หลังจากตัวอย่างพืชที่ผ่านการตรวจสอบไวรัส CTV สาเหตุโรคทริสเทซ่า และการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งแล้ว จะนำไปทำการฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มที่เหมาะสม (ผลจากการศึกษาในข้อ 3.2) เพื่อนำไปใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นของต้นส้มในการขยายพันธุ์ต้นส้มแม่พันธุ์ปลอดโรค ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

3.2 การศึกษาวิธีการผลิตต้นส้มแม่พันธุ์ปลอดโรคของพืชตระกูลส้ม

ในการศึกษาวิธีการผลิตต้นส้มแม่พันธุ์ปลอดโรคของพืชตระกูลส้ม 3 ชนิด ได้แก่ คัมควัท เลมอน และเกรพฟรุ๊ต โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะคัดเลือกตัวอย่างพืชจากต้นส้มที่มีสุขภาพดี แข็งแรง และไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรคของพืชตระกูลส้ม 3 ชนิดมาทำการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดส้ม และชนิดของสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้ม

3.2.1 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดลำ

- 1) ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดลำ จำนวน 3 วิธีการ วิธีการละ 20 ซ้ำ โดยตัวอย่างพืชจากต้นลำที่มีสุขภาพดี แข็งแรง และไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรค
- วิธีการที่ 1 แช่ชิ้นส่วนยอดในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส
- วิธีการที่ 2 แช่ชิ้นส่วนยอดในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส
- วิธีการที่ 3 แช่ชิ้นส่วนยอดในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร บนเครื่องเขย่าสารความถี่สูง เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อของแต่ละวิธีการ มีรายละเอียด ดังนี้

วิธีการที่ 1 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ (สารละลายคลอโรกซ์ มีโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium Hypochlorite, NaOCl) เป็นส่วนประกอบร้อยละ 8.25) มีรายละเอียดขั้นตอน ดังนี้

- (1) นำชิ้นส่วนพืช มาล้างน้ำเพื่อขจัดฝุ่นละอองและสิ่งสกปรกที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช โดยใช้ น้ำสะอาด
- (2) แช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการเขย่าเป็นระยะๆ หรือวางบนเครื่องเขย่า ในระหว่างการฟอก ทำการควบคุมอุณหภูมิของสภาวะแวดล้อมให้มีอุณหภูมิคงที่ ในช่วง 25 ± 2 องศาเซลเซียส
- (3) ตั้งแต่ขั้นตอนนี้เป็นต้นไป ดำเนินการในตู้ปลอดเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ นำชิ้นส่วนพืชมาล้างสารฟอกฆ่าเชื้อออกด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ ประมาณ 5 นาที
- (4) ย้ายตัวอย่างไปวางผึ่งบนจานแก้วให้แห้งพอสมควร แล้วทำการตัดแต่งพืชตัวอย่าง
- (5) นำชิ้นส่วนพืชที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (MS basal medium) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อทดสอบความปลอดเชื้อ ในการเพาะเลี้ยงใช้ชิ้นส่วนพืช 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง นำชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมให้มีอุณหภูมิระหว่าง 25 ± 2 องศาเซลเซียส และมีอัตราการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์
- (6) เมื่อครบกำหนด 2 สัปดาห์ ทำการตรวจนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่ปราศจากการปนเปื้อน และมีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ บันทึกลักษณะของเนื้อเยื่อที่สังเกตได้
- (7) ทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6-10 สัปดาห์ ทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะของเนื้อเยื่อและความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่

สังเกตได้ ในกรณีที่ได้น้ำอ่อนที่สมบูรณ์จะทำการอนุบาลพืชเพื่อดูแลให้เจริญเติบโตในโรงเรือนต่อไป

วิธีการที่ 2 การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิว เพื่อช่วยให้สารฟอกฆ่าเชื้อจับกับผิวของตัวอย่างพืชได้ดีขึ้น ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิว เช่น Tween 20 โดยขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อทำเช่นเดียวกับวิธีการที่ 1 แต่ในขั้นตอนของการแช่ชิ้นส่วนพืชในสารฟอกฆ่าเชื้อ จะทำการเติมสารลดแรงตึงผิวร่วมด้วย

วิธีการที่ 3 การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิว และเขย่าบนเครื่องเขย่าสารความถี่สูง (Ultrasonic Sonicator) รายละเอียดขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ มีดังนี้

- (1) นำชิ้นส่วนพืชมาล้างน้ำเพื่อขจัดฝุ่นละอองและสิ่งสกปรกที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช โดยใช้น้ำสะอาด
- (2) แช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิว เพื่อช่วยให้สารฟอกฆ่าเชื้อจับกับผิวของตัวอย่างพืชได้ดีขึ้น แช่เป็นเวลา 10 นาที ทำการเขย่าบนเครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง ในระหว่างทำการเขย่าทำการควบคุมอุณหภูมิของน้ำในเครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูงให้มีอุณหภูมิคงที่ ในช่วง 45 ± 2 องศาเซลเซียส
- (3) ล้างสารละลายออกด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละประมาณ 5 นาที
- (4) ย้ายตัวอย่างไปวางผึ่งบนจานแก้วให้แห้งพอสมควร แล้วทำการตัดแต่งพืชตัวอย่าง
- (5) นำชิ้นส่วนพืชตัวอย่างที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS basal medium ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อทดสอบความปลอดภัยเชื้อ ในการเพาะเลี้ยงใช้ชิ้นส่วนพืช 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง นำชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมให้มีอุณหภูมิระหว่าง 25 ± 2 องศาเซลเซียสและมีอัตราการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์
- (6) เมื่อครบกำหนด 2 สัปดาห์ ทำการตรวจนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่ปราศจากการปนเปื้อน และมีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ บันทึกลักษณะของเนื้อเยื่อที่สังเกตได้
- (7) ทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6–10 สัปดาห์ โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะของเนื้อเยื่อและความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สังเกตได้ ในกรณีที่ได้น้ำอ่อนที่สมบูรณ์จะทำการอนุบาลพืชเพื่อดูแลให้เจริญเติบโตในโรงเรือนต่อไป

- 2) วิเคราะห์ผลเพื่อใช้ระบุเลือกวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเนื้อเยื่อสัมผัสโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเปรียบเทียบค่าร้อยละของชิ้นส่วนพืชที่ปราศจากการ

ปนเปื้อน อัตราการรอด และการมีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ของเนื้อเยื่อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อในแต่ละวิธี

- (1) การหาค่าร้อยละของชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อน ทำได้โดยการนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียและ/หรือรา ของแต่ละวิธีการฟอก ทำการตรวจนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อน ในช่วง 2 สัปดาห์ โดย

$$\text{ค่าร้อยละของชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อน} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อน}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่ทำการฟอกด้วยวิธีการนั้นๆ}} \times 100$$

- (2) การหาค่าร้อยละของชิ้นส่วนพืชที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อน ทำได้โดยการนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่ปลอดการปนเปื้อนของแบคทีเรียและ/หรือรา และสามารถเจริญเป็นยอดอ่อนของแต่ละวิธีการฟอก โดยชิ้นส่วนพืชที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนนั้นจะต้องมีการเกิดใบอย่างน้อย 1 คู่ และมีความสูงของยอดมากกว่า 1 เซนติเมตร โดยทำการตรวจนับเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดย

$$\text{ค่าร้อยละของชิ้นส่วนพืชที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อน} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อน}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่ทำการฟอกด้วยวิธีการนั้นๆ}} \times 100$$

3.2.2 การศึกษาและเปรียบเทียบชนิดของสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้ม

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตายอดของส้มบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS หรือ WPM ที่มีการเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และสารที่ทำให้อาหารแข็งตัว KELCOGEL® 3.0 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ ทำการทดลองวิธีการละ 10 ซ้ำ

- 1) ตรวจวัดผลโดยทำการบันทึกจำนวนยอด ความยาวของยอด และจำนวนยอดที่มีการเกิดราก หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์
- 2) ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple's Rang Test (DMRT)

3.3 สถานที่ดำเนินการวิจัย

- 1) หน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย สถานีเกษตรหลวงปางดะ อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่
- 2) ห้องวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาขาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม