บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 วิธีการวิจัย

3.1.1) การเตรียมตัวอย่างพืชและการตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง (Greening disease) และโรคทริสเตซ่า (Tristeza disease) ในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรค ตัวอย่างของยอดส้มที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นจะผ่านการตรวจสอบแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLA) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง โดยใช้เทคนิค PCR และตรวจสอบไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยใช้เทคนิค RT-PCR

1) การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง

ทำการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง ในตัวอย่างส้มโดยสกัดดีเอ็นเอจากใบส้มด้วยชุดสกัด GF-1-Plant DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) โดย

(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')

ในการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนขนาด 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 ใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 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' GAACAACTGCGAAAGCATTTGC 3') และ

primer 18S-R (5' CCTGGTAAGTTTCCCCGT GTTG 3') เพื่อใช้ตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิก ดีเอ็นเอ

2) การตรวจสอบโรคทริสเตซ่า

ทำการตรวจสอบไวรัส *Citrus Tristeza Virus* (CTV) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค ทริสเตซ่า ในตัวอย่างส้ม ด้วยวิธี RT-PCR (Mehta, *et al*., 1997) โดย

(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' GAAGATCTTCAACGTGTGTTGAATTTCC 3')

ในการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาปริมาตรรวม 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 ใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ 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 และตามด้วย 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 ทั้งนี้ได้ทำ PCR ของยีนควบคุม 18S rRNA โดยใช้

primer 18S-F (5' GAACAACTGCGAAAGCATTTGC 3') และ

primer 18S-R (5'CCTGGTAAGTTTCCCCGTGTTG 3') เพื่อใช้ตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้

3.1.2 การศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท

ในการศึกษาจะใช้ชิ้นส่วนยอดและชิ้นส่วนข้อของพืชตระกูลส้ม ได้แก่ เลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท ที่ได้จากต้นส้มที่มีสุขภาพดี แข็งแรง และไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรค เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD)

1) ผลของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของต้นอ่อนพืชตระกูลส้ม

ในการทดลองจะเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสูตรอาหารพื้นฐานที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของต้นอ่อน ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงทุกสูตรจะเตรียมให้อยู่ในรูปอาหารกึ่งแข็งโดยการเติมสารที่ทำให้อาหารแข็งตัว KELCOGEL® 3.0 กรัมต่อลิตร

ชุดทดลองที่	สูตรอาหาร	รหัสเรียก
1	อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog medium) ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบครึ่งเท่าของสูตรพื้นฐาน MS (Murashige and Skoog, 1962) และเติมซูโครส 15 กรัมต่อลิตร	½ MS + Su15
2	อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบครึ่งเท่าของสูตรพื้นฐาน MS และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร	½ MS + Su30
3	อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบเท่ากับสูตรพื้นฐาน MS และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร	MS + Su30
4	อาหารสูตร WPM (woody plant medium) ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบครึ่งเท่าของสูตรพื้นฐาน WPM (Lloyd & McCown, 1981) และเติมซูโครส 15 กรัมต่อลิตร	½ WPM + Su15
5	อาหารสูตร WPM ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบครึ่งเท่าของสูตรพื้นฐาน WPM และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร	½ WPM + Su30
6	อาหารสูตร WPM ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบเท่าของสูตรพื้นฐาน WPM และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร	WPM + Su30
7	อาหารสูตร LS (Linsmaier and Skoog medium) ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบครึ่งเท่าของสูตรพื้นฐาน LS (Linsmaier and Skoog, 1965) และเติมซูโครส 15 กรัมต่อลิตร	½ LS + Su15
8	อาหารสูตร LS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบครึ่งเท่าของสูตรพื้นฐาน LS และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร	½ LS + Su30
9	อาหารสูตร LS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบเท่าของสูตรพื้นฐาน LS และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร	LS + Su30

วิธีการเพาะเลี้ยง มีรายละเอียด ดังนี้

(1) นำชิ้นส่วนยอดและชิ้นส่วนข้อของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่แตกต่างกันตามชุดทดลองที่ 1 ถึง 9 โดยในการเพาะเลี้ยงใช้ชิ้นส่วนยอดหรือชิ้นส่วนข้อ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง และในแต่ละชุดทดลองทำซ้ำ 20 ซ้ำ

(2) นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และควบคุมการให้แสงที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยมีอัตราการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์

(3) ตรวจวัดผลโดยทำการบันทึกจำนวนยอด ความยาวของยอด และจำนวนยอดที่มีการเกิดราก จากนั้นวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple's Rang Test (DMRT)

2) ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอด และการเจริญของต้นอ่อน

ในการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินชนิด BAP ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอด และการส่งเสริมการเจริญของต้นอ่อนเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยในการทดลองจะใช้อาหารสูตรที่เหมาะสม (ผลจากการศึกษาในข้อ 3.2.1) และเติมไซโตไคนินชนิด BAP ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ตามชุดทดลองที่ 1 ถึง 5

ชุดทดลองที่	ความเข้มข้นของ BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	รหัสเรียก
1	0	BAP 0
2	1	BAP 1
3	2	BAP 2
4	3	BAP 3
5	5	BAP 5

วิธีการเพาะเลี้ยง มีรายละเอียด ดังนี้

(1) นำชิ้นส่วนยอดและชิ้นส่วนข้อของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมไซโตไคนินชนิด BAP ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างตามชุดทดลองที่ 1 ถึง 5 โดยในการเพาะเลี้ยงใช้ชิ้นส่วนยอดหรือชิ้นส่วนข้อ 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง และในแต่ชุดทดลองทำซ้ำ 10 ซ้ำ

(2) นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และควบคุมการให้แสงที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยมีอัตราการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์

(3) การตรวจวัดผลโดยทำการบันทึกจำนวนยอด ความยาวของยอด และจำนวนยอดที่มีการเกิดราก จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple's Rang Test (DMRT)

3.1.3 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (shoot tip culture)

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด จะศึกษาในคัมควัทที่มีผลการตรวจสอบว่ามีการตรวจพบไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยศึกษาผลของขนาดของเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดที่ทำการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญของเนื้อเยื่อส้ม และการปลอดไวรัส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยทำการศึกษา 4 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่	รายละเอียดการตัดเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดที่ทำการเพาะเลี้ยง
1	ตัดเนื้อเยื่อส่วนยอดให้มีขนาดปลายยอดยาว 0.3 มิลลิเมตร
2	ตัดเนื้อเยื่อส่วนยอดให้มีขนาดปลายยอดยาว 0.5 มิลลิเมตร
3	ตัดเนื้อเยื่อส่วนยอดให้มีขนาดปลายยอดยาว 1.0 มิลลิเมตร
4	ตัดเนื้อเยื่อส่วนยอดให้มีขนาดปลายยอดยาว 3.0 มิลลิเมตร

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด มีรายละเอียด ดังนี้

(1) นำเนื้อเยื่อส่วนยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาทำการตัดภายใต้กล้องในสภาวะปลอดเชื้อ ตามกรรมวิธีที่ 1 ถึง 4 โดย ยอดของคัมควัท 1 ยอด จะนำมาทำการตัดตามกรรมวิธีเพียง 1 กรรมวิธี โดยในแต่ละกรรมวิธีทำซ้ำ 5 ซ้ำ

(2) นำเนื้อเยื่อที่ตัดได้มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่เหมาะสม (ผลจากการศึกษาในข้อ 3.2.1) โดยในการเพาะเลี้ยงใช้ชิ้นส่วนยอด 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง

(3) ทำการเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และควบคุมการให้แสงที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยมีอัตราการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์

(4) ตรวจวัดผลโดยทำการบันทึกการเจริญหรือการมีชีวิตรอดของเนื้อเยื่อ ความยาวของยอดและจำนวนใบ โดยทำการสังเกตในทุกๆ สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple's Rang Test (DMRT)

(5) นำตัวอย่างของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงได้มาทำการตรวจสอบไวรัส *Citrus Tristeza Virus* (CTV) ในตัวอย่างส้ม ด้วยวิธี RT-PCR เพื่อเปรียบเทียบผลสัมฤทธิ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด เพื่อให้ได้เนื้อเยื่อที่ปลอดไวรัส

3.2 สถานที่ดำเนินการวิจัย

3.2.1 สถานีเกษตรหลวงปางดะ อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่

3.2.2 ห้องวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาขาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)