บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมี

เคมีภัณฑ์	บริษัทผู้ผลิต
Agar	-
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	Merck, Germany
Ammonium phosphate ($(NH_4)_2HPO_4$)	May and Baker, England
Boric acid (H_3BO_3)	Merck, Germany
Calcium chloride ($CaCl_2$)	May and Baker, England
Chloramin T	Fluka, Switzerland
Copper (II) sulphate ($CuSO_4.5H_2O$)	May and Baker, England
Ethanol	Merck, Germany
Ferric chloride ($FeCl_3$)	Merck, Germany
Glucose	-
Glutaldehyde	
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Merck, Germany
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	May and Baker, England
Malt extract	Difco, U.S.A.
Manganese chloride ($MnCl_2.4H_2O$)	May and Baker, England
Potassium chloride (KCl)	Merck, Germany
Potassium phosphate (KH_2PO_4)	May and Baker, England
Potassium hydroxide (KOH)	Merck, Germany
Sodium chloride (NaCl)	Fluka, Switzerland
Sucrose	-
Thiamine-HCl	May and Baker, England
Zinc sulphate ($ZnSO_4.7H_2O$)	May and Baker, England

2. อุปกรณ์และครุภัณฑ์

ชนิด	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
กล้องจุลทรรศน์	CH30	Olympus, Japan
กล้องจุลทรรศน์แบบ sterio microscope	MZ6	Leica, Germany
ขวดทดลอง (Eelenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร	Pyrex	Bibby, England
ขวดทดลอง (Eelenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร	Pyrex	Bibby, England
จานเลี้ยงเชื้อแก้ว (Petridish)	pyrex	Bibby, England
จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (Plastic petridish)	-	Bioster, Italy
หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)	Laba	Sanyo, Japan
ตู้ถ่ายเชื้อ (Larminar flow)	H1	หจก.แลปเซอร์วิส
เครื่องชั่ง		
เครื่องชั่งละเอียด	AG204	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องชั่งหยาบ	PB3002	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	2000	Cyberscan
ตะแกรงร่อนดิน	O.S.K.119	Ogawa Seiki, Japan
ตู้อบ	Modell 700	Memmert, Germany
พาราฟิล์ม	-	Whatman, England
หลอดทดลองฝาเกลียว	-	Kimax, U.S.A.

3. วัสดุอื่นๆ ได้แก่ กระดาษอลูมิเนียม กล้องถ่ายรูป เข็มเขี่ยเชื้อ เครื่องเจาะจุกคอร์ก ผ้าขางบาง สำลี
4. วัสดุปลูก กระถางต้นไม้พลาสติก กล่องพลาสติกใส ดินพรุ ทราย เวอร์มิคิวไลท์
5. เมล็ดพันธุ์ไม้ยูคาลิปตัส (*E. camaldulensis*) จากแหล่งเก็บ อ.ท่าตูม จ.สุรินทร์ Seed No. 96-0147 วันที่เก็บ 5-27 มีนาคม 2539

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สำรวจและเก็บตัวอย่าง

1.1 <u>ราเอคโตไมคอร์ไรซา</u> สำรวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ด *Pisolithus* spp. จากสวนป่ายูคาลิปตัส (*E. camaldulensis*) สวนป่าสนเขา (*Pinus kesiya*) สวนป่าเต็งรัง (*Dipterocapus alatus*) และสวนป่ายางนา (*Shorea roxburghii*) ในพื้นที่ 19 จังหวัด ทุกภาคของประเทศไทย คือ กาญจนบุรี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชัยนาท ชัยภูมิ ชุมพร เชียงใหม่ ตาก นครสวรรค์ นครราชสีมา ปราจีนบุรี พิจิตร เพชรบูรณ์ ยโสธร ระยอง ลำพูน สระแก้ว สุพรรณบุรีและอุทัยธานี ระหว่างช่วงฤดูฝนของแต่ละปี ตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงตุลาคม พ.ศ. 2544 และ 2545

1.2 <u>ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา</u> สำรวจและเก็บตัวอย่างราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาจากสวนป่ายูคาลิปตัส (*E. camaldulensis*) เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ 10 จังหวัดของประเทศไทย คือ กาญจนบุรี จันทบุรี ชัยนาท ชัยภูมิ ตาก นครสวรรค์ นครราชสีมา พิจิตร สระแก้วและอุทัยธานี โดยสุ่มหลายๆจุดที่ความลึก 0-30 เซนติเมตร ในช่วงฤดูฝนตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงตุลาคม พ.ศ. 2544

2. แยกเชื้อให้บริสุทธิ์

2.1 <u>ราเอคโตไมคอร์ไรซา</u> แยกเส้นใยจากเนื้อเยื่อดอกเห็ด *Pisolithus* spp. ที่เก็บได้ในข้อ 1.1 ให้ได้เส้นใยที่บริสุทธิ์ โดยวิธีปลอดเชื้อ เลือกดอกเห็ดอ่อนที่มีสภาพสมบูรณ์ ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเนื้อเยื่อที่อยู่ภายใน นำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Modified Melin-Norkrans (MMN) (Molina และ Palmer, 1982) (ภาคผนวก ข) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 สัปดาห์ ทำการ subculture จนได้เส้นใยราที่บริสุทธิ์ ตรวจยืนยันความบริสุทธิ์ของเส้นใยที่แยกได้ โดยเขี่ยเส้นใยราวางบนแผ่นสไลด์ ย้อมด้วย Lactophenol cotton blue ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2 <u>ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา</u> แยกสปอร์ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาจากดินตัวอย่างจากข้อ 1.2 นำดินตัวอย่าง 200 กรัม มาแยกสปอร์โดยวิธี wet sieving and decanting technique (Gerdemann และ Nicolson, 1963) (ภาคผนวก ค) นำตะกอนดินที่ตะแกรงชั้นต่างๆ ไปคัดแยกสปอร์ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาด้วยวิธี sucrose centrifugation (Smith และ Skipper, 1979) (ภาคผนวก ง) แล้วนำไปคัดแยกสปอร์ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereoscopic microscope แยกสปอร์ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาเป็นชนิดต่างๆ เพื่อนำไปเพิ่มจำนวนแบบเฉพาะเจาะจง ฆ่าเชื้อสปอร์ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา โดยแช่ใน 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) Chloramin T ผสมกับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ Tween 20 นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ในสารละลายสเตรปโตมัยซิน ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเจนตามัยซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 20 นาที แล้วใส่สปอร์ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา 1 สปอร์ลงใน

กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว ที่บรรจุทรายประมาณ 3 ใน 4 ของกระถาง ทรายที่ใช้ปลูกผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง วางสปอร์ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาไว้ตรงกลางกระถาง ปิดทับด้วยทรายเล็กน้อย แล้วโรยเมล็ดข้าวฟ่างลาย (*Sorghum bicolor*) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยแช่ใน 5 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ใน 70 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง (ขวัญใจ, 2535) ลงไป ประมาณ 50 เมล็ด ปิดทับด้วยทรายบางๆ ปลูกในเรือนเพาะชำนาน 3 เดือน รดน้ำทุกวัน

3. คัดเลือกหัวเชื้อราไมคอร์ไรซาที่เหมาะสม

3.1 <u>ราเอคโตไมคอร์ไรซา</u> เลือกรา *Pisolithus* spp. ที่มีสมบัติดีเหมาะต่อการทำหัวเชื้อเพื่อสร้างราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยเลือกสายพันธุ์ที่สร้างเส้นใยมากและเจริญเร็วที่สุด โดยเปรียบเทียบจากความกว้างของโคโลนีอายุ 4 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN

3.2 <u>ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา</u> เมื่อข้าวฟ่างลายอายุ 3 เดือนสุ่มตัวอย่างรากและตรวจการติดเชื้อในรากตามวิธีของ Phillips และ Hayman (1970) และตรวจนับจำนวนสปอร์ในดิน ถ้าไม่พบสปอร์ในดิน ให้ตัดรากออกมาย้อมสีดูการติดเชื้อในราก ถ้าพบการติดเชื้อ ให้ตัดต้นส่วนเหนือดินออกไป และใส่เมล็ดของข้างฟ่างลายลงไปปลูกใหม่ ปลูกไว้ในเรือนเพาะชำนาน 3-4 เดือน เพื่อกระตุ้นให้สร้างสปอร์ (รากใหม่ของพืชอาศัยจะทำให้ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาเพิ่มจำนวนขึ้น เมื่อถึงระดับหนึ่งจะมีการสร้างสปอร์) คัดเลือกราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์มากที่สุดมาใช้เป็นหัวเชื้อ เมื่อพบว่ามีการสร้างสปอร์ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาจำนวนมากเพียงพอ ทำให้ดินในกระถางแห้ง โดยไม่ต้องรดน้ำนาน 7-14 วัน ตัดต้นส่วนเหนือดินออกและนำดินในกระถางใส่ในถุงพลาสติก เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

4. การผลิตหัวเชื้อ

4.1 <u>ราเอคโตไมคอร์ไรซา</u> เลี้ยงเส้นใยรา *Pisolithus* spp. ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบด้านนอกของโคโลนีด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์ก เพื่อให้ได้หัวเชื้อมาตรฐานสำหรับนำมาเพิ่มปริมาณเส้นใยในวัสดุที่ใช้ทำหัวเชื้อเวอร์มิคิวไลท์ (vermiculite) ผสม peat moss โดยใช้เวอร์มิคิวไลท์ 6 ส่วน และ peat moss 1 ส่วน บรรจุลงในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN ในอัตราส่วนวัสดุที่ใช้ทำหัวเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2:1 โดยปริมาตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง โดยที่ครั้งที่ 2 ห่าง

จากครั้งแรก 24 ชั่วโมง ใส่ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยราลงในขวดทดลอง ขวดละ 1 ชิ้น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง จนเส้นใยราเจริญเต็มขวดใช้เวลาประมาณ 1 เดือน เมื่อจะนำมาใช้ ให้ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากหัวเชื้อด้วยน้ำประปาหลายๆครั้ง กรองด้วยผ้าขาวบางซ้อนกัน 3 ชั้น บีบเอาน้ำออกให้หมด แล้วนำมาผึ่งในถาดให้เหลือความชื้นเล็กน้อย แล้วนำไปผสมกับวัสดุปลูกต่อไป

4.2 <u>ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา</u> นำราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มาเพิ่มจำนวน โดยผสมดินที่มีสปอร์ เส้นใยและรากที่มีการติดเชื้อราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาจำนวน 100 กรัม กับทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง ใส่ในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว ใส่เมล็ดข้าวฟ่างลาย ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด โดยแช่ใน 5 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ใน 70 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง (ขวัญใจ, 2535) ประมาณ 50 เมล็ด ลงไป ปิดทับด้วยทรายบางๆ ปลูกในเรือนเพาะชำนาน 3 เดือน แยกดินออกมาเล็กน้อยประมาณ 30 กรัม เพื่อหาปริมาณสปอร์ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา (sporulation yield) ด้วยวิธี wet sieving and decanting technique (Gerdemann และ Nicolson, 1963) (ภาคผนวก ค) และนำตะกอนดินที่ตะแกรงชั้นต่างๆ ไปคัดแยกสปอร์ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาด้วยวิธี sucrose centrifugation (Smith และ Skipper, 1979) (ภาคผนวก ง)

5. ทดสอบการกระตุ้นการเจริญกับกล้าไม้ยูคาลิปตัส เปรียบเทียบการเจริญของกล้าไม้ยูคาลิปตัสที่มีการใส่ หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเพียงชนิดเดียว หัวเชื้อราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาเพียงชนิดเดียว หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาร่วมกับหัวเชื้อราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาและชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อ

5.1 <u>เตรียมกล้าไม้ยูคาลิปตัส</u> ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดยูคาลิปตัส โดยแช่ใน 70 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นแช่ใน 30 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำไปเพาะในกระบะพลาสติกขนาด 10x15x5 เซนติเมตร โดยปลูกในทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รดน้ำทุกวันจนต้นกล้าอายุ 1 เดือน

5.2 <u>เตรียมวัสดุสำหรับปลูก</u> นำทรายที่ล้างสะอาดแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง และกล่องพลาสติกสี่เหลี่ยมใสสำหรับปลูกขนาด 12.5x31.5x3.5 เซนติเมตร เจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ตรงกลางของด้านบนและล่าง เช็ดด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์

5.3 ใส่หัวเชื้อราไมคอร์ไรซา ทดสอบในกล้าไม้ยูคาลิปตัสอายุ 1 เดือน ใส่หัวเชื้อผสมกับทราย แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด ดังนี้ ชุดที่ 1 ผสมดินที่มีสปอร์ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาที่เตรียมได้จากข้อ 1 จำนวน 200 สปอร์กับทรายปลอดเชื้อ 8 ส่วนและเวอร์มิคิวไลท์และดินพรุปลอดเชื้อ 1 ส่วน ชุดที่ 2 ผสมหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เตรียมได้จากข้อ 2 กับทรายปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1:8 ชุดที่ 3 ผสมดินที่มีสปอร์ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาเท่ากับชุดที่ 1 และหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเท่ากับชุดการที่ 2 กับทรายปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1:8 ชุดที่ 4 ผสมเวอร์มิคิวไลท์และดินพรุปลอดเชื้อกับทรายปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1:8 นำวัสดุปลูกที่เตรียมได้ไปบรรจุในกล่องพลาสติกสี่เหลี่ยมใสขนาด 12.5x31.5x3.5 เซนติเมตร ให้เต็ม แล้วปลูกกล้ายูคาลิปตัสจากข้อ 5.1 จำนวน 1 ต้น นำไปดูแลในเรือนเพาะชำ ดูแลรักษากล้าไม้ รดน้ำกล้าไม้ในกล่องพลาสติกให้ชุ่มวันเว้นวัน จนกล้าไม้อายุ 6 เดือน ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม ในระดับปานกลางทุกๆ 2 สัปดาห์ (ภาคผนวก ข) ใช้การทดลองแบบ Randomized complete block design (RCB) มี 3 ซ้ำ 9 วิธีการ (ภาคผนวก ญ)

5.4 เก็บข้อมูล เปรียบเทียบอัตราการเจริญของกล้าไม้ยูคาลิปตัสในชุดการทดลองต่างๆ เมื่ออายุครบ 6 เดือน โดยวัด

5.4.1 ความสูงของลำต้นและเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นที่ระดับคอราก

5.4.2 หามวลชีวภาพของส่วนลำต้นและราก โดยนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้ง

5.4.3 หาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (percent infection) ของราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาและราเอคโตไมคอร์ไรซาในรากของกล้าไม้ยูคาลิปตัส โดยตัดรากออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีความยาวชิ้นละ 1 เซนติเมตร ย้อมสีราก (Kormaik และ McGraw, 1982 ดัดแปลงจาก Phillips และ Hayman,1970) สุ่มชิ้นส่วนของรากที่ย้อมสีแล้วมา 50 ชิ้น วางบนแผ่นสไลด์ครั้งละ 5 ชิ้น นับจำนวนรากที่พบว่ามีการติดเชื้อของราไมคอร์ไรซาของแต่ละชุดการทดลองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราไมคอร์ไรซา (Giovannetti และ Mosse, 1980)

6. **พิสูจน์เอกลักษณ์** (Identification)

6.1 ราเอคโตไมคอร์ไรซา เนื่องจากไม่สามารถจำแนกราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. ได้ถึงระดับชนิด โดยใช้แค่ลักษณะภายนอกของดอกเห็ด *Pisolithus* sp. ได้ จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางทางพันธุศาสตร์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR) ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ (ตัวอย่างทั้งหมดส่งไปวิเคราะห์ที่ Asian Natural Environmental Science Center, the University of Tokyo ประเทศญี่ปุ่น ขั้นตอนการทำดังนี้

6.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ เลือกดอกเห็ดอ่อน *Pisolithus* sp. ที่สมบูรณ์ ตัดเนื้อเยื่อด้านในบริเวณก้านดอก (ไม่ควรตัดเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการสร้างสปอร์) ทำให้แห้งด้วยซิลิกาเจล เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ บดตัวอย่างแห้งในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วย FastPrep FP120 homogenizer (Savant instruments, INC., NY) และสกัดดีเอ็นเอด้วย cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Zhou และคณะ, 1999) ใส่ตัวอย่างที่บดแล้วใน CTAB buffer (2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl (pH8.0), 20 mM EDTA (pH8.0), 1.4M NaCl และ 0.5% 2-mercaptoethanol) ที่ 65 องศาเซลเซียส บ่มนาน 1 ชั่วโมง สกัดด้วยตัวสกัด phenolchloroform-isoamyl alcohol (25:24:1,v/v) 1 ครั้ง จากนั้นสกัดด้วย phenolchloroform-isoamyl alcohol mixture (24:1, v/v) 2 ครั้ง ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ละลายดีเอ็นเอใน TE buffer (10mM Tris-HCl (pH8.0) และ 1mM EDTA) 10 µl เก็บที่ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

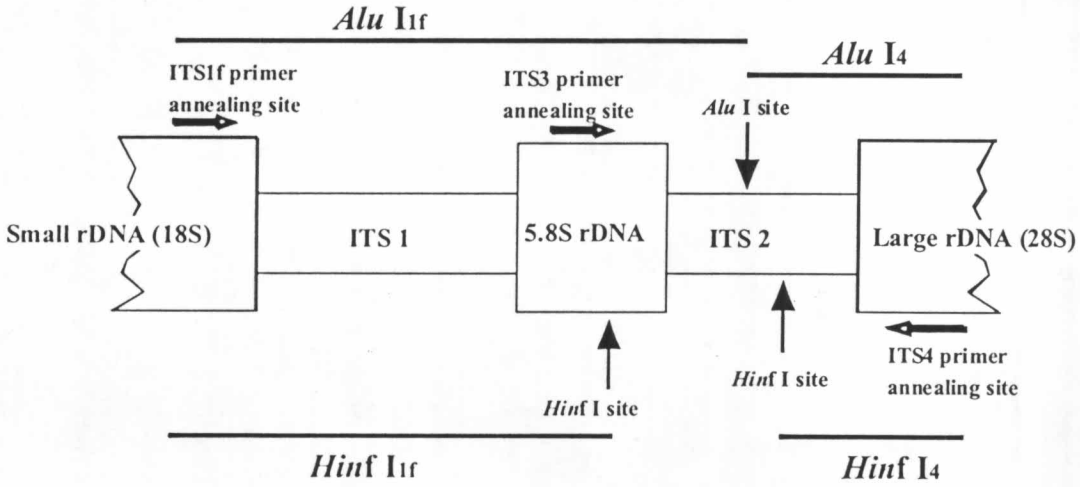
6.1.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (internal transcribed spacer (ITS) amplification และ terminal- restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis) ใช้ primer 2 ตัว ITS1f (Gardes และ Bruns 1993) และ ITS4 (White และคณะ. 1990) primer 1 ตัวถูกติด (labeled) ด้วย Texas Red fluorescent dye (Genset KK, Kyoto, Japan) ที่ปลาย 5' สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง sequencer คู่ของ primer ประกอบด้วย labeled ITS1f และ ITS4 หรือ ITS1f และ labeled ITS4 ชิ้นส่วนที่ได้จากการ amplified โดย ITS1f และ ITS4 ถูกตั้งชื่อเป็น $ITS_{1f\text{-}4}$ 20 µl ของส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 5 ng ของ template DNA, 0.2 mM ของ dNTP, 1XPCR buffer, 1.5 mM Mg^{2+}, 0.5 U ของ Ampli Taq Gold (Ampli Taq Gold kit, Perkin Elmer, Branchburg, NJ) และ 0.5 µM ของคู่ primer ใช้เครื่อง thermal cycler TP 3000 (Takara Shuzo Co., Tokyo) โดยเริ่มต้นที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 9 นาที ตามด้วยขั้นตอน denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่ 51 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และขั้นตอน extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 38 รอบและรอบสุดท้ายตามด้วย 5 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส ใช้ labeled $ITS_{1f\text{-}4}$ 2 ชนิด ในการวิเคราะห์ terminal-RFLP analysis (Zhou et al. 2002) 3 µl ของ $ITS_{1f\text{-}4}$ ถูกย่อยโดย 5U restriction endonuclease (Alu I หรือ Hinf I) ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง หลังจากเจือจาง 10 เท่า ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ของ ITS และชิ้นส่วนที่ถูกตัดนำมา denatured ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และนำไปทำ electrophoresis บนแผ่น 6 เปอร์เซ็นต์ Long Ranger acrylamide gel (FMC Bioproducts Co., ME) ด้วย 6.1 M urea และ 1.2XTBE (0.1 M tris [hydroxymethyl] aminomethane, 3.0 mM EDTA และ 0.1M boric acid) ในเครื่อง sequencer (SQ-5500E, Hitachi Electronics Engineering Co., Tokyo) $ITS_{1f\text{-}4}$ sequence ที่ได้นำไปเทียบ

กับ sequence *ของ* *Pisolithus* spp. *ใน* GenBank DNA database (http://www.ddbj.nig.ac.jp)

คู่ primer ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ITS1f CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA

ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC



ภาพที่ 7 แผนที่ internal transcribed spacer (ITS) (Bruns, 1998)

6.2 ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา ไม่สามารถจำแนกราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาได้ถึงระดับชนิด โดยใช้แค่ลักษณะภายนอกของสปอร์ราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากดินและลักษณะเส้นใยในรากได้ จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในการพิสูจน์เอกลักษณ์

6.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากรากยูคาลิปตัส ล้างรากยูคาลิปตัสให้สะอาดปราศจากดินแล้วตัดให้มีความความยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร ล้างรากอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทำให้แห้งด้วยซิลิกาเจลเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ บดตัวอย่างแห้งในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วย FastPrep FP120 homogenizer (Savant instruments, INC., NY) และสกัดดีเอนเอด้วย cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Zhou และคณะ, 1999) ใส่ตัวอย่างที่บดแล้วใน CTAB buffer (2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl (pH8.0), 20 mM EDTA (pH8.0), 1.4M NaCl และ 0.5% 2-mercaptoethanol) ที่ 65 องศาเซลเซียส บ่มนาน 1 ชั่วโมง สกัดด้วยตัวสกัด phenolchloroform-isoamyl alcohol (25:24:1,v/v) 1 ครั้ง จากนั้นสกัดด้วย

phenolchloroform-isoamyl alcohol mixture (24:1, v/v) 2 ครั้ง ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ละลายดีเอ็นเอใน TE buffer (10mM Tris-HCl (pH8.0) และ 1mM EDTA) 10 µl เก็บที่ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

6.2.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (18 S rRNA) ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย 10 ng ของ template DNA, 0.2mM ของ dNTP, 1.5 mM ของ $MgCl_2$, 0.5 U ของ Ampli Taq Gold (Ampli Taq Gold kit, Perkin Elmer, Branchburg, NJ) และ 0.5 µM primer (VANS1 และ NS21) (Simon et al. 1992) นำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้เครื่อง thermal cycler TP 3000 (Takara Shuzo Co., Tokyo) ขั้นตอนต่อไปเหมือนกับข้อ 6.1.2

คู่ primer ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

VANS1 5' GTCTAGTATAATCGTTATACAGG 3'

NS21 5'AATATACGCTATTGGAGCTGG 3'