เทคนิคการตรวจสอบสภาพปลอดดีเอ็นเอของยีสต์บนผิวใบพืช

มณี ตันติรุ่งกิจ

หน่วยจุลชีววิทยาประยุกต์

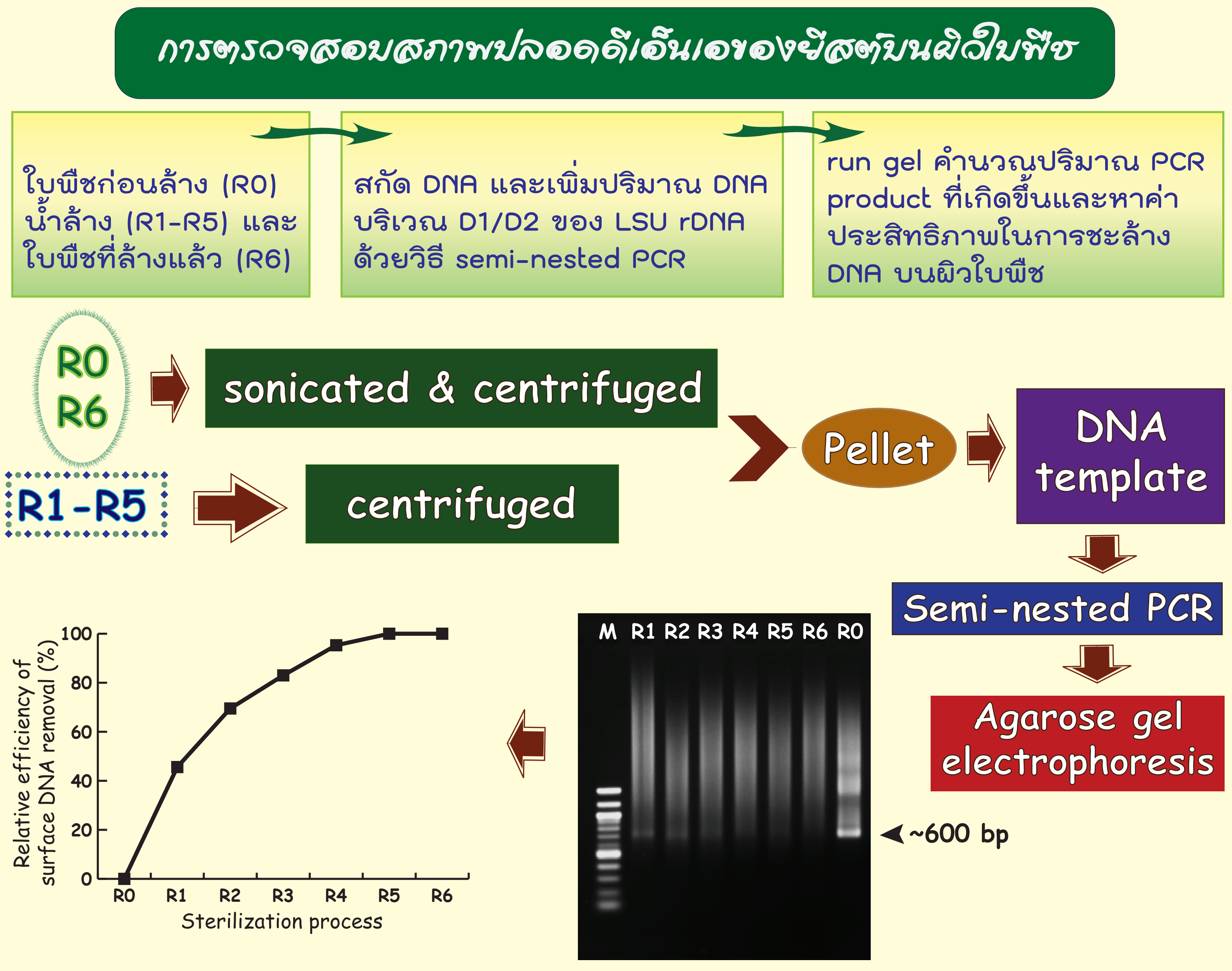
ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง

36th Anniversary Central Laboratory and Greenhouse Complex

เทคนิคการตรวจสอบสภาพปลอดดีเอ็นเอของยีสต์บนผิวใบพืช เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายของยีสต์เอนโดไฟต์ (endophytic yeast) ซึ่งเป็นยีสต์ที่อาศัยอยู่ภายในส่วนต่างๆ ของพืชที่มีความสมบูรณ์โดยไม่ก่อให้เกิดโรค โดยวิธีการไม่เพาะเลี้ยงเชื้อ (culture-independent method) เทคนิคนี้จะบ่งชี้ว่าวิธีการที่ใช้ในการทำความสะอาดผิวใบพืช สามารถชะล้างและทำลายดีเอ็นเอบนผิวชิ้นส่วนพืชออกไปจนไม่มีผลกระทบต่อการศึกษาความหลากหลายของยีสต์เอนโดไฟต์ โดยวิธีการไม่เพาะเลี้ยงเชื้อ

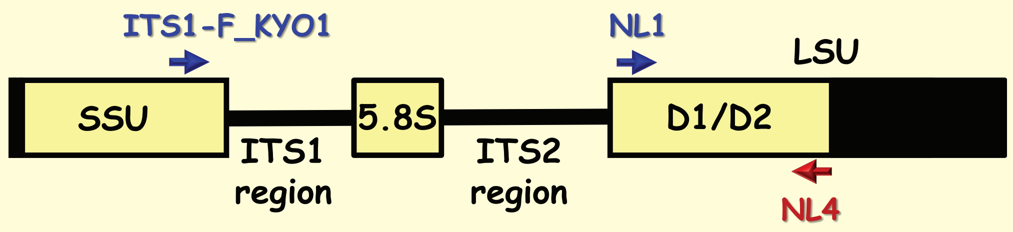
โดยทั่วไปการทำความสะอาดผิวใบพืชเพื่อชะล้างจุลินทรีย์อีพิไฟต์ที่อยู่บนผิวใบพืช นิยมใช้เอทานอลล้างชิ้นส่วนของพืช เพื่อฆ่าทำลายจุลินทรีย์และ sodium hypochlorite เพื่อทำลายดีเอ็นเอ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อหลายๆ ครั้ง และตรวจสอบสภาพปลอดเชื้อบนชิ้นส่วนพืชด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งวิธีการนี้ได้รับการยอมรับในระยะแรกของการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ โดยวิธีการไม่เพาะเลี้ยงเชื้อ แต่ในระยะ 2-3 ปีที่ผ่านมานี้ นักวิจัยส่วนใหญ่เล็งเห็นว่าวิธีนี้ไม่สามารถบอกได้ว่าชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการล้างนั้นปราศจากดีเอ็นเอ จึงได้พัฒนาเทคนิคเพื่อใช้ตรวจสอบความสามารถในการชะล้างและทำลายดีเอ็นเอ บนผิวชิ้นส่วนพืชด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR; Polymerase Chain Reaction) โดยทำความสะอาดผิวใบและตรวจสอบความสามารถในการชะล้างดีเอ็นเอของยีสต์อิพิไฟต์ในแต่ละขั้นตอนของการล้างด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

การตรวจสอบสภาพปลอดดีเอ็นเอของยีสต์บนผิวใบพืช



ขั้นตอนมีดังนี้

1. ทำความสะอาดใบพืชโดยแช่ใบพืชในเอทานอลเข้มข้น 70% นาน 2.5 นาที และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 5% นาน 2.5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 ครั้งๆ ละ 2 นาที
2. นำใบพืชก่อนล้าง (R0) และใบพืชที่ล้างแล้ว (R6) มาชะล้างจุลินทรีย์และดีเอ็นเอบนผิวใบพืชด้วยคลื่นความถี่สูงวิธีของ Yang et al. (2001) โดยนำใบพืชที่แช่อยู่ใน washing buffer (1X phosphate buffered saline, Tween 20) ไปผ่านคลื่นความถี่สูง นาน 7 นาที
3. นำบัฟเฟอร์ที่ได้จากข้อ 1 (R0 และ R6) และน้ำล้างใบพืช (R1-R5) ไปปั่นเหวี่ยงและเก็บตะกอนที่ได้ไว้เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ
4. เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ large subunit ribosomal DNA (LSU rDNA) ซึ่งเป็นยีนเครื่องหมาย (gene marker) ที่นิยมใช้ในการระบุชนิดและการศึกษาเกี่ยวกับวิวัฒนาการของยีสต์ ด้วยวิธี semi-nested PCR เพื่อป้องกันการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของใบพืช โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ITS1-F_KYO1 (Toju et al., 2012) และ NL4 (outer set) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS - D1/D2 (~1300 bp) และ NL1/NL4 (inner set) D1/D2 (~ 600 bp) (Kurtzman & Robnett, 1998) และใช้ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Tantirungkij et al., 2015)



5. ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของยีสต์ ในแต่ละตัวอย่างด้วยวิธี agarose gel electrophoresis วัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น และคำนวณหาประสิทธิภาพสัมพัทธ์ (relative efficiency) ของการชะล้างดีเอ็นเอในแต่ละขั้นตอน

$$\text{ประสิทธิภาพสัมพัทธ์ของการชะล้าง (\%)} = 100 - \frac{\text{ความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของแต่ละตัวอย่าง} \times 100}{\text{ความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของใบพืชก่อนล้าง (R0)}}$$

สำหรับเทคนิคการตรวจสอบสภาพปลอดดีเอ็นเอของยีสต์บนผิวใบพืชที่พัฒนาขึ้นนี้ เป็น**เทคนิคใหม่**ที่ทำได้ง่ายและสามารถใช้กับการศึกษาความหลากหลายของยีสต์เอนโดไฟต์ในพืชโดยเฉพาะพืชที่ยังไม่เคยมีการศึกษาถึงความหลากหลายของยีสต์เอนโดไฟต์มาก่อน นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ชนิดอื่นๆ ได้เช่นกัน ซึ่งเทคนิคนี้ต่างจากวิธีของ Burdorf และคณะ (2014) ที่ได้เสนอแนะให้เพาะเชื้อควบคุมลงบนชิ้นส่วนพืชก่อนทำความสะอาดผิวชิ้นส่วนพืช และตรวจหา PCR product ของเชื้อควบคุมในดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการทำความสะอาด แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ เชื้อควบคุมต้องเป็นเชื้อที่ไม่มีรายงานว่าเป็นเอนโดไฟต์ของพืชชนิดนั้น และ PCR product ของเชื้อควบคุมต้องมีขนาดต่างจาก PCR product

เอกสารอ้างอิง

Burdorf et al. (2014) Braz J Microbiol 45:977-983

Kurtzman, C. P. and C. J. Robnett. (1998). Antonie van Leeuwenhoek 73: 331-371

Toju et al. (2012) PLoS ONE 7:e40863

Tantirungkij et al. (2015) Antonie van Leeuwenhoek 108: 633–647

Yang et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:3889-3894

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการ: ความหลากหลายและนิเวศน์วิทยาของยีสต์เอนโดไฟต์และยีสต์อีพิไฟต์จากใบของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย และการผลิตสารส่งเสริมการเจริญพืชออกซินโดยสายพันธุ์ที่คัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพสูงพร้อมกับการศึกษาชีววิถีการสังเคราะห์

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยนี้