วิธีดำเนินการวิจัย

1. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการชักนำให้ต้นมะเขือเทศสร้างความต้านทานโรคใบจุดเป้ากระสุนที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola*

1.1 การเตรียมต้นมะเขือเทศ นำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดา (บริษัทศรแดง) มาแช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะลงในถาดหลุมบรรจุด้วยวัสดุเพาะ (ดินร่วนและพีทมอส อัตราส่วน 20:1) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$C นาน 1 ชั่วโมง นำไปไว้ในเรือนทดลอง อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 $^{\circ}$C รดน้ำทุกเช้า เมื่อมะเขือเทศงอกประมาณ 7-10 วัน ถอนแยกให้เหลือหลุมละ 1 ต้น และรดน้ำตามปกติ จนกระทั่งมะเขือเทศมีอายุ 14 วัน จึงนำมาใช้ในการทดลอง

1.2 การเตรียมหัวเชื้อข้าวฟ่างของเชื้อรา *Trichoderma* spp. นำเชื้อรา *Trichoderma* spp.จำนวน 35 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต T1, T4, T9, T10, T13, T14, T17, T18, T19, T20, T21, T24, T25, T30, T31, T32, T35, 38, 57, 67, 74, 77, 78, 85, 88, 89, 90, 103, 106, 111, 115, 119, 122, 133, 139, 162 และ 177 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นอาหาร PDA และย้ายชิ้นวุ้นจำนวน 3 ชิ้น ลงในหัวเชื้อข้าวฟ่าง ซึ่งเตรียมได้จากการนำเมล็ดข้าวฟ่างมานึ่งให้พอสุก บรรจุใส่ถุงพลาสติก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปผสมกับวัสดุปลูกนึ่งฆ่าเชื้อในกระถางขนาด 6 นิ้ว ในอัตราส่วน 20 กรัมต่อ 1 กระถาง ก่อนทำการย้ายปลูกมะเขือเทศและปลูกเชื้อสาเหตุโรค เป็นเวลา 7 วัน

1.3 การเตรียมเชื้อรา *Corynespora cassiicola* นำเชื้อรา *C. cassiicola* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มาเลี้ยงในอาหารมาเลี้ยงเชื้อ PDA นาน 7 วัน จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อล้างเส้นใยบนผิวหน้าอาหาร นับสปอร์ให้มีความเข้มข้น 1×10^{7} สปอร์/มิลลิลิตร เติม Tween 80 ให้ได้ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ เพื่อลดความหนืดทำให้สารแขวนลอยสปอร์จับใบพืชได้ดีขึ้น

1.4 การปลูกเชื้อราสาเหตุโรคพืช ย้ายปลูกต้นมะเขือเทศที่มีอายุ 14 วันจากข้อ 1.1 ลงในกระถางขนาด 6 นิ้ว บรรจุด้วยวัสดุปลูกผสมด้วยหัวเชื้อข้าวฟ่างของเชื้อรา *Trichoderma* แต่ละไอโซเลต ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2 เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อที่เตรียมในข้อ 1.3 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อต้นต่อกระถาง ใช้ถุงพลาสติกคลุมกระถาง เพื่อรักษาความชื้นไว้ 1 คืน วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 37 กรรมวิธีๆละ 3 ซ้ำ

1.5 การบันทึกผลการทดลอง บันทึกผลการทดลองหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน โดยนับจำนวนจุดแผลที่เกิดขึ้นบนใบของมะเขือเทศทุกใบ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS

2. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายในใบมะเขือเทศจากการชักนำให้สร้างความต้านทานโรคโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

2.1 การเก็บใบมะเขือเทศ ทำการเก็บใบมะเขือเทศหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บจำนวน 5 ใบต่อต้น ทั้งหมด 3 ต้น (3 ซ้ำ) จากนั้นนำใบมะเขือเทศมาสกัดโปรตีนที่สร้างขึ้นเนื่องจากการถูกชักนำโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. และนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase, β-1,3-glucanase และ protease

2.2 การสกัดโปรตีนจากใบพืช ชั่งตัวอย่างใบมะเขือเทศน้ำหนัก 0.5 กรัม มาบดตัวอย่างในโกร่งที่เย็นจัด เติม 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.0 (sodium acetate trihydrate 13.6 g/ H_2O 1 ลิตร ปรับ pH ด้วย 1 N acetic acid) ปริมาณ 1,200 ไมโครลิตร เทตัวอย่างใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใส (supernatant) นำไปเก็บที่ –20°C จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2.3 การวัดปริมาณความเข้มข้นโปรตีน นำ crude proteins ที่สกัดได้จากข้อ 2.1 มาวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.4 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase นำ crude protein ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มร่วมกับสารละลาย colloidal chitin 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M acetate buffer pH5.0 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Saksirirat and Hoppe, 1991) หยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปต้มในน้ำเดือด 100°C นาน 20 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีการของ Somogyi (1952) กิจกรรมของเอนไซม์ประเมินจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (N-acetylglucosamine equivalent) คิดเป็น µmol ที่ถูกย่อยออกจาก colloidal chitin ใน 1 ชั่วโมงต่อ mg protein ใน reaction mixture

2.5 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase นำ crude protein ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มร่วมกับสารละลายลามินาริน (laminarin) 0.09 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M acetate buffer, pH 5.0 จำนวน 0.9 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Saksirirat and Hoppe, 1991) ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) ที่ถูกย่อยออกจากลามินาริน ตามวิธีของ Somogyi (1952) กิจกรรมของเอนไซม์ประเมินจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) คิดเป็นµmol ที่ถูกย่อยออกจากลามินารินใน 1 ชั่วโมงต่อ mg protein ใน reaction mixture

2.6 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ protease นำ crude protein บ่มร่วมกับสารละลายเคซีน (casein) 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 จำนวนอย่างละ 1.0 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย trichloroacetic acid 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3.0 มิลลิลิตร นำส่วนน้ำใส (supernatant) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร มาทดสอบโดยเติม 0.4 M sodium carbonate (Na_2CO_3) จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม Folin-ciocalteuphenol's reagent จำนวน 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (nm) ตรวจสอบกิจกรรม

ของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ถูกย่อยออกจากเคซีน เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ tyrosine เป็นกรดอะมิโนมาตรฐาน ดัดแปลงตามวิธีของ Yang และ Wang (1999) กิจกรรมของเอนไซม์ประเมินจากปริมาณกรดอะมิโน [amino acid (tyrosine equivalent)] คิดปริมาณเป็น μmol ที่ถูกย่อยออกจากเคซีนใน 1 ชั่วโมงต่อ mg protein ใน reaction mixture นำข้อมูลจากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายทั้ง 3 เอนไซม์ไปวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS

3. การผลิตมวลชีวภาพและทดสอบความมีชีวิตรอดของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

3.1 การเตรียมเชื้อรา *Trichoderma* spp. (T24, T17 และ 88)

นำเมล็ดข้าวฟ่างมาแช่น้ำ 1 คืน แล้วนำไปนึ่งให้สุกพอดี จากนั้นบรรจุใส่ขวดแบนอุดด้วยสำลีปิดทับด้วยกระดาษ ใช้ยางรัดปากขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที หลังจากที่เมล็ดข้าวฟ่างเย็นแล้ว ทำการปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. 3 ไอโซเลต (T24, T17 และ 88) ที่เตรียมไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทั้ง 3 ไอโซเลต ใส่ในข้าวฟ่างในขวดแบน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใช้เชื้อเจริญเต็มขวดประมาณ 4-5 วัน แล้วเคลือบเชื้อ *Trichoderma* โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และตั้งไฟอ่อนๆ กวนจนแป้งเหนียวใส รอให้แป้งเปียกเย็นจึงคลุกเชื้อรา *T. harzianum* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างกับกาวแป้งเปียก แล้วเกลี่ยให้บางๆบนถาดอลูมิเนียมแบนแล้วนำไปผึ่งลมในที่ร่มให้แห้ง แล้วขยี้ให้แตกเป็นเม็ดเล็กๆบรรจุใส่ในขวดส่วนหนึ่งเก็บไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส) อีกส่วนหนึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ (30±2 องศาเซลเซียส)

3.2 การทดสอบความมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อ *Trichoderma* spp.

ทำการทดสอบความงอกของเชื้อ *Trichoderma* ทั้ง 3 ไอโซเลต (T24, T17 และ 88) โดยใช้ปากคีบย้ายเมล็ดของเชื้อดังกล่าว ที่อยู่ในขวดไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางจำนวน 25 เม็ดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลองไอโซเลตละ 50 เม็ด นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้น 3 วัน ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเชื้อ *Trichoderma* ที่เจริญจากเมล็ดข้าวฟ่าง และบันทึกผล โดยทำการทดสอบความงอกของเชื้อทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 6 เดือน

4. การทดสอบประสิทธิภาพมวลชีวภาพเชื้อรา *Trichoderma* sp. T24 ต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ในสภาพเรือนทดลอง

4.1 การเตรียมมวลชีวภาพเชื้อรา *Trichoderma* spp.

นำเมล็ดข้าวฟ่างมาแช่น้ำ 1 คืน แล้วนำไปนึ่งให้สุกพอดี จากนั้นบรรจุใส่ถุงพลาสติกทนร้อนใช้คอขวดรัดปากถุง อุดด้วยสำลี ปิดทับด้วยกระดาษ ใช้ยางรัดปากถุง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที หลังจากที่เมล็ดข้าวฟ่างเย็นแล้ว ทำการปลูกเชื้อ *Trichoderma* (T24) ที่เตรียมไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใช้เข็มเขี่ยตัดชิ้นวุ้นขนาดประมาณ

1×1 เซนติเมตร ย้ายลงใส่ในถุงข้าวฟ่างจำนวน 4-5 ชิ้นต่อถุง นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 วัน เชื้อจะเจริญจนเต็มถุง แบ่งเชื้อออกเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งนำไปเคลือบด้วยแป้งมันสำปะหลังเปียก 20 เปอร์เซ็นต์ อีกส่วนหนึ่งไม่ต้องเคลือบ

4.2 การเตรียมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

นำเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) race ที่ 2 ไปเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง (30°ซ ±4 °ซ) เป็นเวลา 7 วัน เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ให้มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อต้องปลูกเชื้อตามกรรมวิธีทดลองที่ต้องการปลูกเชื้อ Fol นำไปปลูกเชื้อกับต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา อายุ 20 วัน โดยวิธีการตัดรากต้นมะเขือเทศออกประมาณ 1-2 เซนติเมตร จากปลายราก แล้วจุ่มลงในสารแขวนลอยสปอร์ (root dip) เป็นเวลา 20 นาที โดยประยุกต์ตามวิธีการของ Marlatt et al., (1996) และ Bunyatratchata et al., (2005) จากนั้นนำต้นมะเขือเทศไปปลูกในดินปลูกผสมวัสดุปลูก (พีทมอส) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ในกระถางปลูกมะเขือเทศ ตรวจสอบอาการเหี่ยวเหลืองของต้นมะเขือเทศทุกวัน เป็นเวลา 20 วันหลังจากปลูกด้วยเชื้อ Fol

4.3 การเตรียมต้นกล้ามะเขือเทศและการปลูกเชื้อ (Inoculation)

เพาะเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดาในกระบะเพาะ เมื่อเมล็ดมะเขือเทศงอกเป็นต้นกล้าอายุประมาณ 20-25 วัน ทำการย้ายต้นกล้าปลูกในกระถางพลาสติกสีดำ จำนวน 4 ต้นต่อกระถาง หลังจากนั้นประมาณ 7 วัน ต้นกล้ามะเขือเทศจะตั้งตัวได้แล้ว ทำการปลูกเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต T24 และเชื้อรา Fol ลงในกระถางที่ปลูกมะเขือเทศโดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 4 กรรมวิธี (treatment) จำนวน 4 ซ้ำๆละ 4 ต้น แต่ละกรรมวิธีมีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปลูกเชื้อ Fol อย่างเดียว

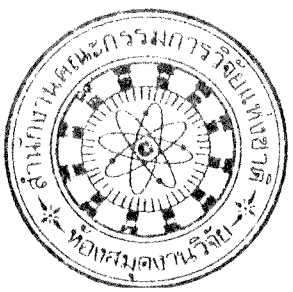
กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อ Fol + *Trichoderma* T24 (เคลือบแป้งเปียก)

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อ Fol + *Trichoderma* T24 (ไม่เคลือบแป้งเปียก)

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อ Fol + สารเคมีแมนโคเซป ความเข้มข้น 1,800 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.4 การดูแลรักษาต้นพืชและการตรวจสอบผล

หลังจากที่ปลูกเชื้อแล้ว รดน้ำต้นมะเขือเทศวันละครั้งในช่วงตอนเย็น และสังเกตการเกิดโรคเหี่ยวเหลืองของต้นมะเขือเทศ ต้นที่เป็นโรคจะมีอาการต้นเหี่ยว ใบเหลือง และอาจทำให้ต้นหักล้มได้ ต้นมะเขือเทศปกติสามารถที่จะเจริญเติบโตได้ ใบมีสีเขียว โคนต้นไม่เกิดบาดแผล นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ได้ไปวิเคราะห์ ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) ทางสถิติ



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 03 มี.ค. 2555
248161