บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1. ศึกษาลักษณะอาการของโรครากเน่าของส้ม

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างส้มที่แสดงอาการของโรครากเน่า จากสวนส้มที่ปลูกในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ เก็บตัวอย่างโดยนำตัวอย่างดินและส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรคมาทำการศึกษาเพื่อหาเชื้อสาเหตุของโรคต่อไป

3.2. แยกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

นำตัวอย่างของโรคมาทำการแยกเชื้อโดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

3.2.1 แยกเชื้อโดยวิธีการล่อเชื้อจากดิน (baiting technique)

ล่อเชื้อจากดินจากต้นที่แสดงอาการของโรคโดยใช้แตงกวาและแครอท

นำแตงกวาและแครอท มาทำการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 เปอร์เซ็นต์ หรือ แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง เพื่อล้างโซเดียมไฮโปคลอไรต์ หรือแอลกอฮอล์ออก หั่นแตงกวาและแครอทด้วยมีดฆ่าเชื้อ ให้ชิ้นพืชมีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส (ลูกเต๋า) มีขนาดประมาณ 1x1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำชิ้นพืชวางลงบนดินที่เก็บมาจากแปลงของส้มที่เป็นโรค โดยวางให้ชิ้นพืชจมลงไป 0.5 เซนติเมตร ใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไปให้ชื้น ปิดฝากล่องให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้นาน 5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อที่ขึ้นบนชิ้นพืช จากนั้นตรวจดูเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แล้วจึงเขี่ยเส้นใยที่ขึ้นบนเหยื่อล่อด้วยเข็มเขี่ยไปเลี้ยงบนอาหาร half PDA จานอาหารละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 วันแล้วจึงใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร half PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

ล่อเชื้อจากดินจากต้นที่แสดงอาการของโรคโดยใช้ใบสับปะรด

นำใบสับปะรดมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 เปอร์เซ็นต์ หรือแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง ใช้ใบมีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว หั่นตรงส่วนโคนใบเพื่อให้มีพื้นที่ผิวมากที่สุด จากนั้นนำชิ้นส่วนดังกล่าวไปจุ่มลงในบีกเกอร์ที่บรรจุสารละลายของตัวอย่างดิน (ผสมด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ซึ่งเป็นวัสดุปลูกจากต้นที่แสดงอาการของโรค โดยจุ่มตรง

โคนใบลงไป จากนั้นนำบีกเกอร์ที่มีใบสับปะรดจุ่มในสารละลายของวัสดุปลูกใส่ลงในถุงพลาสติก และมัดปากถุงให้แน่น ตรวจผลทุกวันเพื่อดูแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Phytophthora* spp. หลังจากนั้น 8 วัน นำใบสับปะรดไปบ่มไว้ในกล่องความชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 4-5 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญออกมาจากแผล จากนั้นตรวจดูเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แล้วจึงเขี่ยเส้นใยด้วยเข็มเขี่ยไปเลี้ยงบนอาหาร half PDA จานอาหารละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 วันแล้วจึงใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร half PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

ล่อเชื้อจากดินจากต้นที่แสดงอาการของโรคโดยใช้ใบส้ม

นำใบส้มมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 เปอร์เซ็นต์ หรือแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง เพื่อล้างโซเดียมไฮโปคลอไรต์ หรือแอลกอฮอล์ออก ใช้ใบมีดที่ฆ่าเชื้อแล้วหั่นให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร นำน้ำกลั่นฆ่าเชื้อใส่ให้ท่วมดินที่เก็บมาจากต้นของส้มที่แสดงอาการของโรค จากนั้นจึงนำใบส้มที่เตรียมไว้ลอยบนผิวน้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนำใบส้มมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เมื่อพบ sporangium ของเชื้อ *Phytophthora* spp. จึงตัดใบส้มเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปวางบนอาหาร WA จานอาหารละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง จึงใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และพร้อมที่จะนำไปทดสอบการเกิดโรคกับต้นส้มเพื่อหาสาเหตุของโรคที่แท้จริงต่อไป

3.2.2 แยกเชื้อโดยวิธี moist chamber

เริ่มจากนำชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรคมาฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 เปอร์เซ็นต์ หรือ แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปวางลงในกล่องความชื้น ซึ่งภายในปูด้วยกระดาษทิชชู่ เทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปให้พอชุ่ม ปิดฝากล่องให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน จากนั้นสำรวจดูการเจริญของเส้นใยและเขี่ยเส้นใยไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แล้วจึงเขี่ยเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหาร half PDA จานอาหารละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 วันแล้วจึงใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร half PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

3.3. ทดสอบความสามารถของเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค

เก็บรวบรวมเมล็ดส้มจากสถานที่ขายส้มต่างๆที่จังหวัดเชียงใหม่ เช่น ตลาดต้นพะยอม หรือตามร้านค้าทั่วไป จากนั้นนำไปเพาะในกระบะเพาะ รอจนต้นส้มเจริญจนมีใบจริง จากนั้นย้ายต้นกล้าส้มลงปลูกในกระถางเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.1 ปลูกเชื้อด้วย mycelia disc บนต้นกล้าส้ม บนจานอาหาร WA

นำต้นกล้าส้มอายุ 5 เดือน วางบนอาหาร WA ในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราที่แยกได้ ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วนำ mycelia disc ไปปลูกเชื้อบนต้นกล้าส้ม โดยวางบนใบและรากส้ม ที่ทำแผล จำนวน mycelia disc 2 ชิ้นต่อแผล ใส่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปเล็กน้อย ปิดฝาเพื่อให้ความชื้น ติดฉลาก (label) ระบุรายละเอียดของเชื้อราที่ใช้ปลูกเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการปลูกเชื้อ 2 ซ้ำต่อ 1 ไอโซเลท สังเกตการเปลี่ยนแปลงทุกวัน

3.3.2 ปลูกเชื้อด้วย mycelia disc ที่โคนต้นกล้าส้ม ที่ปลูกลงในกระถาง

เตรียมเชื้อราที่แยกได้แต่ละไอโซเลทบนอาหาร PDA จากนั้นใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราที่แยกได้ นำ mycelia disc ไปปลูกเชื้อที่โคนต้นกล้าส้มอายุ 5 เดือน ที่ทำแผลบริเวณโคนต้น โดยปลูกส้มลงในกระถาง และใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 500 กรัม โดยทำการปลูกเชื้อ 2 ซ้ำ ต่อ 1 ไอโซเลท ติดฉลาก (label) ระบุรายละเอียดของเชื้อที่ใช้ปลูกเชื้อ นำกระถางไปวางไว้ในกระบะพลาสติก ใส่น้ำลงไปเล็กน้อย เก็บไว้ในถุงพลาสติกเพื่อทำให้เกิดความชื้นสูง โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลทุกวัน และบันทึกผล

3.4. แยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินรอบ ๆ ราก

ทำการเก็บตัวอย่างรากส้ม และดินบริเวณรอบ ๆ ต้นส้มจากสวนส้มในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ จากดินบริเวณรอบ ๆ รากพริกกะเหรี่ยง ที่ตำบลสบเมย จังหวัดแม่ฮ่องสอน และจากดินบริเวณรอบ ๆ รากมะเขือเทศ ที่ตำบลสบโขง อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่ ที่สมบรูณ์ ปกติ ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลงหรือแสดงอาการของโรค โดยทำการตัดรากของส้มที่ปกติแล้วเขย่าเบา ๆ เพื่อกำจัดดินส่วนใหญ่ออกไป ให้เหลือดินที่ติดอยู่เฉพาะกับผิวราก จากนั้นจึงนำรากส้มและดินบริเวณรอบ ๆ ต้นส้ม ปริมาณ 1 กรัม มาทำการ serial dilution วิธีนี้ทำได้โดยการนำรากส้มและดินที่ต้องการแยกเชื้อมาจำนวน 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ดูดสารละลายมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง ทำไปเรื่อยๆ จนมีความเข้มข้น 10^{-4}-10^{-5} จากนั้นนำ suspension ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ด้วยวิธีการ spread plate เมื่อพบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จึงแยกเชื้อไปเลี้ยงเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวต่อไป

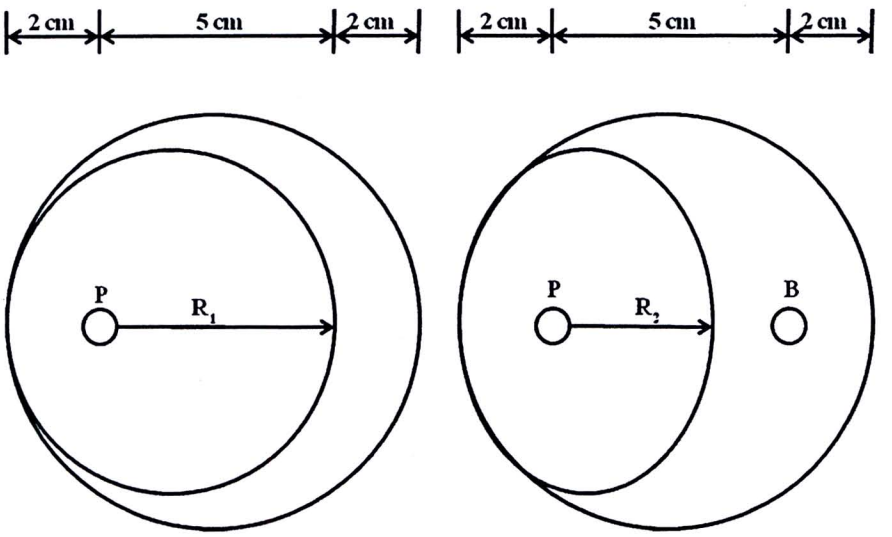
3.5. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม โดยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์

3.5.1 การทดสอบขั้นต้น

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพ โดยเริ่มจากนำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ชุบโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดที่ไม่ซ้ำกัน วางลงบนอาหาร PDA ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 2 เซนติเมตร จำนวน 4 ไอโซเลท ต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้านละ 1 ไอโซเลท จากนั้นจึงใช้ cork borer เจาะปลายเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* spp. แต่ละไอโซเลท มาวางตรงกลางจานอาหารให้ห่างจากแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท 2 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เมื่อเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุมเจริญจนเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคไปทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อไป

3.5.2 การเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ โดยทดสอบในจานอาหารขนาด 9 เซนติเมตร นำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ชุบโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบ วางลงบนอาหาร โดยให้ห่างจากตำแหน่งที่จะวางเชื้อสาเหตุ 5 เซนติเมตร จากนั้นจึงใช้ cork borer เจาะปลายเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* spp. แต่ละไอโซเลท มาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้านตรงข้ามกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ สำหรับชุดควบคุมจะวางเชื้อสาเหตุอย่างเดียวในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพ 3) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Complete Randomized Design โดยทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ เมื่อเชื้อ *Phytophthora* spp. ในชุดควบคุมเจริญจนมีรัศมีขนาด 5 เซนติเมตร จึงทำการวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุ และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth : PIRG) (ภาพ 4)



ภาพ 4 ลักษณะการวัดผลในการเป็นปฏิปักษ์ ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Phytophthora* spp สาเหตุโรครากเน่าของส้มโดยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ (P: Pathogen, B: Antagonistic bacteria, R: Radial growth of Pathogenic fungi)

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ (เกษม, 2532)

ใช้สูตรดังนี้ percent inhibition = $\frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$

โดย R_1 = ความยาวรัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

3.6. ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. มาทดสอบหาคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีการต่างๆ เช่น การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร NA และการศึกษาการติดสีแกรม ขนาด รูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ โดยการย้อมสีแบบแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ การทดสอบเซลลูเลส การทดสอบฟอสฟาเตส, และการทดสอบไคติเนส เป็นต้น

3.7. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครากเน่าของส้มโดยใช้เทคนิค PCR

3.7.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Phytophthora* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อและภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ PDA, CMA, WA และ CA ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ได้แก่ 16 25 และ 31 องศาเซลเซียส โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในลักษณะแกน X และ Y แล้วจึงหาค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต รูปร่างลักษณะของ sporangium วัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามวิธีการของ Pongpisutta and Sangchote (2004)

3.7.2 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Phytophthora* spp.

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Phytophthora* spp. ในอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บรวบรวมเส้นใยของเชื้อมาซับให้แห้งบนกระดาษทิชชู่ (tissue) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อได้เส้นใยมากพอ จึงนำไปทำการสกัดดีเอ็นเอทันที หรืออาจเก็บเส้นใยที่ได้ไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิประมาณ 1-4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยชั่งเส้นใยของเชื้อราประมาณ 0.2 กรัม และนำไปบดในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที บดเส้นใยให้ละเอียด เติม extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0.5 % SDS) ปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร ผสมกับ polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) 0.02 กรัม ให้เข้ากัน ถ่ายใส่หลอด cenfrifuge นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ใส่ลงในหลอดใหม่ที่ปลอดเชื้อ เติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol อัตราส่วน 25: 24: 1 ปริมาตร 1: 1 ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ได้สารละลายแยกชั้นเป็น 2 ชั้น ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม isopropanol เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้ง แล้วทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งคว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูให้แห้ง และทำการละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°C จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ทำการเตรียม agarose gel 1% โดยชั่ง agarose 0.3 กรัม ละลายให้เข้ากันกับ 1X TBE buffer (Tris Borate Buffer) 30 มิลลิลิตรลงในขวดที่เตรียมไว้ จากนั้นหลอมให้เข้ากันแล้วรอให้เจล (gel) อุ่นพอมือจับได้ แล้วเติม Ethidium bormide 3 µl ลงในเจล จากนั้นจึงเทเจลลง

ในถาดเจล (gel tray) ที่เตรียมไว้ เสียบหวีลงไปในเจล (comb) ที่มีจำนวนช่องตามต้องการ เพื่อให้เกิดเป็นหลุมเล็ก (well) รอจนเจลแข็งตัวแล้วดึงหวีออก จากนั้นนำเจลที่ได้วางลงใน electrophoresis gel tank และเท 1X TBE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล ผสม loading buffer 2 ไมโครลิตร กับสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ให้เข้ากันแล้วหยอดตัวอย่างลงในหลุม (well) ปิดฝาและเปิดสวิตช์ electrophoresis gel tank ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก ด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 30 นาที แล้วจึงปิดสวิตช์ จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation (SYNGRNE; Gene Genius Bio Imaging System)

3.7.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ โดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ด้วย specific primer Par1s (forward primer) (5'-ACGTTTGGGCTTCGGCCTGATT-3') และ Par2a (reverse primer) (5'-GATGCATACCGAAGTACACATTA-3') , specific primer Pal1s (forward primer) (5'-CACGTGAACCGTATCAAAACT-3') และPal2a (reverse primer) (5'-CAATCATACCACCACAGCTGA-3') ที่พัฒนาโดย Tsai *et al.* (2006) และ specific primer CAPFW (forward primer) (5'-TTTAGTTGGGGGTCTTGTACC-3') และ CAPRV2 (reverse primer) (5'-TACGGTTCACCAGCCCATCA-3') ที่พัฒนาโดย Silvar *et al.* (2005)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 105 ไมโครลิตร ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (H_2O)	78.8
5 mM dNTPs	4.2
10X PCR buffer	10.5
Primer (20 µM)	2.6
Primer (20 µM)	2.6
50 mM $MgCl_2$	5.3
Tag DNA polymerase (5 Unit/µl)	1
ดีเอ็นเอต้นแบบ	1

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ผสมส่วนประกอบดังกล่าวให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่อง programmable thermal controller, PTC-100™ (MJ Research) โดยมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยาสำหรับ specific primer Par1s และ Par2a, specific primer Pal1s และPal2a ดังนี้

initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน	3 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน	30 วินาที	จำนวน 35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	นาน	30 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน	1 นาที	
final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน	10 นาที	

และเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยาสำหรับ specific primer CAPFW และ CAPRV2 ดังนี้

initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน	3 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	นาน	30 วินาที	จำนวน 35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส	นาน	30 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน	45 วินาที	
final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน	10 นาที	

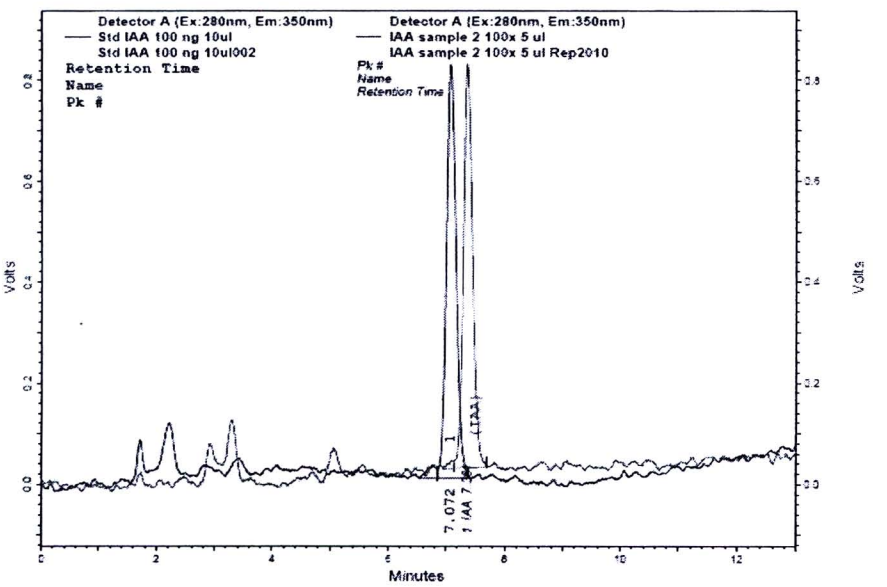
จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ผลด้วย gel electrophoresis บน 1% agarose gel โดยนำผลผลิตจากการทำ PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอบน 1% agarose gel ใน 1X TBE buffer ที่เติม Ethidium bormide แล้ว ด้วยเครื่อง electrophoresis gel tank โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation (SYNGRNE; Gene Genius Bio Imaging System)

3.8. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าของส้มในสภาพเรือนทดลอง

3.8.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อพืช

เพื่อให้ทราบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ จะไม่ทำให้เกิดโรคหรือยับยั้งการเจริญกับต้นส้ม จึงทำการทดสอบความเป็นพิษต่อพืชโดยการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท และแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในห้องปฏิบัติการคือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท T13 ที่สามารถสังเคราะห์ IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB โดยวิเคราะห์การสร้างฮอร์โมนพืชด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งมีการสังเคราะห์ IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB

โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 1,270.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ปนัดดา และอังสนา, 2552) (ภาพ 5) มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ โดย streak แบคทีเรียลงบนอาหาร NA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร เทลงบนอาหาร แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัว แอล (L) ที่ปลอดเชื้อ ขูดผิวหน้าอาหารเบาๆ เท cell suspensions ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้ รวมไว้ในบีกเกอร์ นำมาทำการนับโคโลนีโดยวิธี dilution plating ปรับให้มีระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml จากนั้นนำเมล็ดส้มที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว ปลูกลงในดินฆ่าเชื้อซึ่งบรรจุในกระบะเพาะ ดูแลรดน้ำสม่ำเสมอ จนต้นกล้าส้มมีอายุ 8 เดือน จึงทำการทดสอบความเป็นพิษ โดยการใส่สารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์บริเวณโคนต้นส้ม ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อต้น ทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน วัดการเจริญของต้นส้มเปรียบเทียบกับชุดควบคุมหลังจากใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์นาน 28 วัน



ภาพ 5 โครมาโตรแกรมของ IAA วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) (ปนัดดา และอังสนา , 2552)

ก. IAA มาตรฐาน ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (กราฟสีน้ำเงิน)

ข. ปริมาณ IAA จากการสังเคราะห์ของแบคทีเรียไอโซเลท T13 (กราฟสีชมพู)

3.8.2 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าของส้มในสภาพเรือนทดลอง

ทำการเตรียม inoculums ของเชื้อสาเหตุ ตามวิธีการของ Bowman *et al.* (2007) โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างไปแช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อข้ามคืน แล้วนำข้าวฟ่างไปนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 2 ครั้ง เวลาห่างกัน 24 ชั่วโมง จากนั้นปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้มลงในข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ mycelia disc ของเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR03 จำนวน 2 disc ต่อข้าวฟ่าง 100 กรัม บ่มที่อุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 วัน ในที่มืด เมื่อเชื้อเจริญจนเต็มถุง จึงนำไปใช้ต่อไป จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าของส้มในสภาพเรือนทดลอง โดยใส่สารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์บริเวณโคนต้นส้ม ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อต้น ทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน จึงทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม โดยการใส่ inoculums ของเชื้อสาเหตุ ลงในกระบะเพาะ ปริมาตร 20 กรัมต่อวัสดุปลูก 1,000 มิลลิลิตร แต่ละการทดลองใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) 6 กรรมวิธี 12 ซ้ำ โดยมีรายละเอียดของแต่ละกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 1 บริเวณโคนต้นส้ม แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

กรรมวิธีที่ 2 ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 2 บริเวณโคนต้นส้ม แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

กรรมวิธีที่ 3 ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 3 บริเวณโคนต้นส้ม แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

กรรมวิธีที่ 4 ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 4 บริเวณโคนต้นส้ม แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

กรรมวิธีที่ 5 ชุดควบคุม 1 ใส่น้ำกลั่นบริเวณโคนต้นส้ม แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

กรรมวิธีที่ 6 ชุดควบคุม 2 ใส่น้ำกลั่นที่ได้จากการเทลงบนผิวหน้าอาหาร NA บริเวณโคนต้นส้ม แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

ทำการประเมินต้นเป็นโรคภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุนาน 75 วัน โดยกำหนดระดับความรุนแรงของโรคประยุกต์จากวิธีการของ Bekker *et al.* (2007) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1 = ไม่แสดงอาการเหี่ยว

2 = แสดงอาการเหี่ยวเล็กน้อยหรือเหี่ยวบางส่วน

3 = แสดงอาการเหี่ยว 25-50%

4 = แสดงอาการเหี่ยว 50-80% และ/หรือใบร่วง

5 = แสดงอาการเหี่ยว 80-100% หรือต้นส้มตาย

ทำการประเมินต้นเป็นโรคภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุนาน 75 วัน โดยกำหนดระดับความรุนแรงของโรคตามวิธีการของ Orbovic (2008) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1 = ไม่แสดงอาการรากเน่า

2 = แสดงอาการรากเน่า 1-10% หรือส่วนมากมีรากที่สมบรูณ์

3 = แสดงอาการรากเน่า 11-50% หรือมีรากที่สมบรูณ์เป็นบางส่วน

4 = แสดงอาการรากเน่า 50-80% หรือมีรากที่สมบรูณ์เพียงเล็กน้อย

5 = แสดงอาการรากเน่า 80-100% หรือไม่มีรากที่สมบรูณ์เลย

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. แปลงปลูกส้มในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

2. ห้องปฏิบัติการกลางโรคพืช สาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. ห้องปฏิบัติการ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

พฤศจิกายน 2551- ตุลาคม 2553