บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บรวบรวมเชื้อและการแยกเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ จากส่วนต่าง ๆ ของต้นพริกและมะเขือเทศ ที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่

1.1 การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างต้นพริกและมะเขือเทศจากพื้นที่สูงและพื้นที่ราบในจังหวัดเชียงใหม่จากพื้นที่ 3 อำเภอ คือ อำเภอแม่แจ่ม 1 พื้นที่ อำเภอสันทราย 2 พื้นที่ และอำเภอแม่วาง 6 พื้นที่ โดยเลือกต้นพืชที่สมบูรณ์ ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลง

1.2 การแยกเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์จากส่วนต่าง ๆ ของพืช (Tan *et al.*, 2006 ; Shimizu *et al.*, 2000)

1. นำตัวอย่างพืช ใบ ก้าน ลำต้นและรากมาล้างน้ำให้สะอาด โดยล้างผ่านน้ำไหล (running water) เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นผึ่งลมให้แห้ง
2. ตัดใบ ก้าน ลำต้น และราก เป็นชิ้นเล็ก ๆ สี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 1×1 เซนติเมตร
3. ฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นพืช โดยนำชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 นาที แช่ในสารละลาย sodium hyporchlorite ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 20 นาที นำชิ้นพืชล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นแช่ในสารละลาย sodium hyporchlorite ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 10 นาที
4. ซับชิ้นพืชให้แห้งด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อโดย นำมาวางบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งลมให้แห้ง
5. วางชิ้นพืชจากต้นพริกบนอาหาร inhibitory mold agar (IMA-2) ส่วนชิ้นพืชจากต้นมะเขือเทศวางบนอาหาร S medium โดยอาหารทั้งสองชนิดผสมสารปฏิชีวนะ คือ nalidixic acid 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
6. บ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 – 3 สัปดาห์

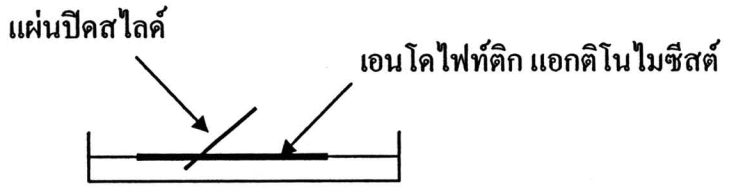
1.3 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และการเก็บเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์

(Shimizu *et al.*, 2000)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ มีลักษณะโคโลนีเป็นเส้นใย พบผงสปอร์คล้ายผงแป้งเจริญบนผิวหน้าของชิ้นพืช เขี่ยเชื้อมา streak plate ลงบนอาหาร IMA-2 เลี้ยงเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ บนอาหาร จากนั้นนำเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ที่แยกได้เก็บไว้เป็น stock culture ในหลอดอาหาร IMA-2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4 การจำแนกชนิดของเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ (Williams *et al.*, 1989)

นำเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ที่แยกได้แต่ละไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 โดยวิธี streak plate แล้วปักแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในจานอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่มีโคโลนีของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ เจริญอยู่หนาแน่น โดยให้ทำมุมประมาณ 45 องศากับผิวหน้าอาหาร (ภาพ 1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำแผ่นปิดสไลด์ที่มีเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ที่เจริญขึ้นติดอยู่บนแผ่นสไลด์มาย้อมสีแบบ simple stain โดยหยดด้วยสารละลาย crystal violet 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจดูลักษณะของ mycelium และการเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ตามเอกสารของ Miyadoh *et al.* (1997) และ Stanley *et al.* (1989) เพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อเบื้องต้น



ภาพ 1 การทำ slide culture เพื่อตรวจดูลักษณะเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์

1.5 การตั้งชื่อไอโซเลทของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ที่แยกได้

นำเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของต้นพริกและมะเขือเทศ ซึ่งเก็บพืชมาจากพื้นที่ต่าง ๆ มาตั้งชื่อไอโซเลท โดยตั้งชื่อตามชนิดพืช ส่วนของพืชและพื้นที่ที่เก็บเป็นภาษาอังกฤษ ดังนี้

ต้นพริกที่เก็บจากอำเภอแม่แจ่ม	ตั้งชื่อไอโซเลทโดยใช้อักษร	MJC
ต้นพริกที่เก็บจากอำเภอสันทราย	ตั้งชื่อไอโซเลทโดยใช้อักษร	SSC
ต้นพริกที่เก็บจากอำเภอแม่วาง	ตั้งชื่อไอโซเลทโดยใช้อักษร	MWC
ต้นมะเขือเทศที่เก็บจากอำเภอแม่วาง	ตั้งชื่อไอโซเลทโดยใช้อักษร	MWT

โดยต้นพืชที่เก็บมาจากอำเภอเดียวกันแต่ต่างพื้นที่ จะตั้งชื่อเรียงลำดับตามพื้นที่ที่เก็บต้นพืชก่อน เช่น เก็บต้นพริกจากอำเภอสันทราย พื้นที่ที่ 1 ตั้งชื่อไอโซเลทโดยใช้อักษร SSC1 หรือ เก็บต้นมะเขือเทศจากอำเภอแม่วาง พื้นที่ที่ 3 ตั้งชื่อไอโซเลทโดยใช้อักษร MWT3 เป็นต้น และเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ที่แยกได้จากส่วนของพืชต่าง ๆ กันจะตั้งชื่อตามส่วนของชิ้นพืชที่แยกเชื้อได้ คือ แยกเชื้อได้จากส่วนของใบ ใช้อักษร L แยกเชื้อได้จากส่วนของก้าน ใช้อักษร B และแยกเชื้อได้จากส่วนของราก ใช้อักษร R เช่น แยกเชื้อได้จากใบพริกที่เก็บจากอำเภอสันทราย พื้นที่ที่ 1 ตั้งชื่อไอโซเลทโดยใช้อักษร SSC1-L หรือ แยกเชื้อได้จากรากมะเขือเทศที่เก็บจากอำเภอแม่วาง พื้นที่ที่ 3 ตั้งชื่อไอโซเลทโดยใช้อักษร MWT3-R เป็นต้น

2. การเตรียมเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

เลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* โดยใช้เชื้อราในรูปแบบผงสำเร็จรูปใช้สำหรับผลิตเป็นเชื้อสด ผลิตโดย บริษัท ยูนิเซฟจำกัด นำผงเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ปริมาณผงเชื้อ 1 กรัม/1 จานอาหาร PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน

3. การเก็บเชื้อและการแยกเชื้อราสาเหตุของโรคใบจุดและโรคเหี่ยวของพริกและมะเขือเทศ (เกวลิน, 2547)

เก็บรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและโรคเหี่ยว คือเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *F. oxysporum* จากต้นพริกและมะเขือเทศที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่

3.1 การแยกเชื้อรา *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ

ตัดชิ้นส่วนที่เป็นโรคติดกับเนื้อเยื่อส่วนที่ดีให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 3×3 มิลลิเมตร ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวพืชโดยการแช่ชิ้นพืชในสารละลาย sodium hypochorite ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 2-3 นาที จากนั้นล้างชิ้นพืชด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ซับด้วยกระดาษกรองให้แห้ง แล้วนำชิ้นพืชไปวางบนอาหาร PDA

3.2 การแยกเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

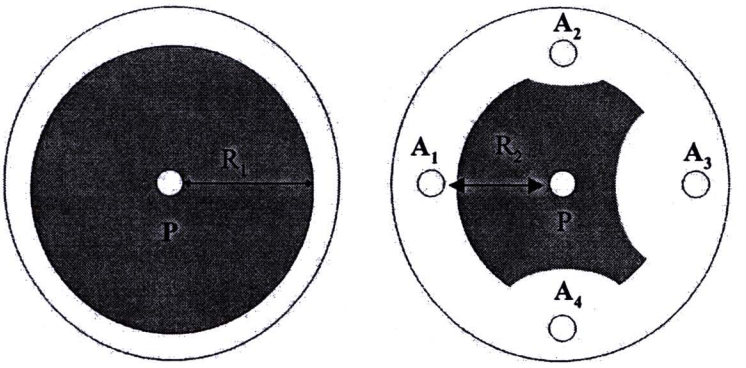
จากตัวอย่างต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคเหี่ยว บริเวณโคนต้นพบเส้นใยสีขาวเจริญคลุมอยู่ ใช้เข็มเขี่ยเส้นใยสีขาวนำมาวางบนอาหาร PDA

ทำการบ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นประมาณ 2 – 3 วัน ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์จากอาหาร PDA โดยวิธีการ hyphal tip isolation ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นบริเวณส่วนปลายของเส้นใยเชื้อรา จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่ได้มาวางบนอาหาร PDA ที่เตรียมไว้และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนเชื้อราสร้างโคโลนีขึ้นเต็มจานเลี้ยงเชื้อ โดยตรวจดูลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยเปรียบเทียบลักษณะเส้นใยและสปอร์ ตามเอกสารของ Barnett and Hunter (1998) จากนั้นจึงนำเชื้อราที่ได้ทั้ง 2 ชนิดทำการเก็บเป็น stock เพื่อทำการทดลองต่อไป

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ และเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Fusarium oxysporum* สาเหตุของโรคใบจุดและโรคเหี่ยวของพริกและมะเขือเทศ

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ และเชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *F. oxysporum* โดยวิธี dual culture ตามวิธีการของ Crawford *et. al.* (1993) และ El-Tarabily *et al.* (1997)

เลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ที่ไม่ซ้ำกันบนอาหาร IMA-2 จำนวน 4 ไอโซเลทต่อจานอาหาร เป็นระยะเวลา 3 วัน เพื่อให้เชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ เจริญเป็นโคโลนีที่สมบูรณ์และสร้างสารปฏิชีวนะ จากนั้นจึงนำเชื้อสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดมาวางตรงกลางจานอาหารให้ห่างจากเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ แต่ละไอโซเลท 2 เซนติเมตร (ภาพ 2) เชื้อรา *T. harzianum* จะวางเชื้อพร้อมกันกับเชื้อราสาเหตุของโรคพืชบนอาหาร PDA โดยวางเชื้อรา *T. harzianum* ห่างจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช 4 เซนติเมตร (ภาพ 3)



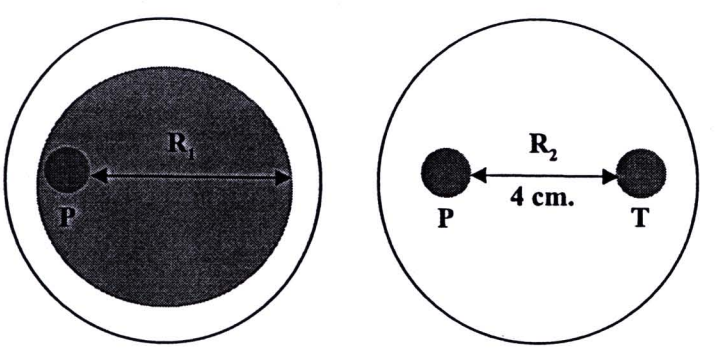
ชุดควบคุม ชุดทดสอบ

ภาพ 2 ลักษณะการวัดผลในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ต่อเชื้อสาเหตุโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) โดยวิธี dual culture

A: เชื้อแอกติโนไมซีสต์ P: เชื้อราสาเหตุโรคพืช

R_1: ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2: ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ



ชุดควบคุม ชุดทดสอบ

ภาพ 3 การทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ต่อเชื้อสาเหตุโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) โดยวิธี dual culture

T: เชื้อรา *Trichoderma harzianum* P: เชื้อราสาเหตุโรคพืช

R_1: ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2: ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ (Percent Inhibition of Radial Growth; PIRG) (เกษม, 2532)

$$PIRG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

การวัดค่าความเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อ สามารถประมาณค่าการยับยั้งดังนี้

> 75	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก
61 – 75	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
51 – 60	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
< 50	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทดลอง 4 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางเชื้อราสาเหตุโรคพืชเพียงอย่างเดียวในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม เจริญจนเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงบันทึกผลโดยวัดขนาดบริเวณการยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้นระหว่างโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ที่เป็นปฏิปักษ์ รวมทั้งวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมและชุดทดสอบ จากนั้นจึงนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent Inhibition of Radial Growth; PIRG)

คัดเลือกเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในกลุ่มที่มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ โดยคัดเลือกมา 1 ไอโซเลทที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด เพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

5. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Eletron Microscopy, SEM)

เลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 บนอาหาร IMA-2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อมีการเจริญของเส้นใยและสร้างสปอร์ที่สมบูรณ์ นำเชื้อส่งไปที่ศูนย์วิจัยและบริการจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอน สวท-มช. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้อง SEM โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่างมี ดังนี้

1. ตัดชิ้นวุ้นตัวอย่าง (cutting) ที่มีเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ เจริญอยู่ขนาดประมาณ 5 x 5 มิลลิเมตร จำนวน 3 - 4 ชิ้น ต่อเชื้อตัวอย่าง
2. คงสภาพเนื้อเยื่อ (fixing) โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ของตัวอย่าง โดยแช่ใน glutaraldyhyde ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M phosphate buffer
3. ล้างออกด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7.2
4. รักษาสภาพ (fixing) อีกครั้ง โดยการแช่ในสารละลาย osmium tetroxide ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M phosphate buffer
5. ล้างออกด้วย 0.2 M phosphate buffer ความเป็นกรดด่าง (pH) 7.2
6. ไล่น้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยการแทนที่น้ำด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามลำดับจาก 30 50 70 80 90 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ 2-3 ครั้งตามลำดับโดยใช้เวลาแช่ในแต่ละความเข้มข้น 5 - 10 นาที
7. ทำให้แห้ง (drying) ด้วยการรมตัวอย่างด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
8. การฉาบทอง (coating) โดยนำไปเคลือบด้วยอนุภาคทองหนา 30 นาโนเมตร
9. นำตัวอย่างที่ได้มาตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL รุ่น JSM-5910LV) พร้อมทั้งบันทึกภาพลักษณะของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ คือ ลักษณะสปอร์และรูปแบบของการสร้างสปอร์

6. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

6.1 การเตรียมเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์

เลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ทุกไอโซเลทที่แยกได้ ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project Medium 1 (ISP1) (Shirling and Gottlieb, 1966) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker ที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอ

6.2 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์โดยใช้ชุดตรวจสอบ NucleoSpin Tissue

ดูดเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ที่เลี้ยงในอาหารเหลวลงในหลอด microtube 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8000 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วน supernatant ออกเติม

180 ไมโครลิตร buffer T1 ลงในส่วน pellet จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วเติม protinase K ลงไป 25 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1-3 ชั่วโมงหรือทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ 11000 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วน supernatant ออก เติม buffer B3 ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ลงไป นำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เติม ethanol ปริมาตร 210 ไมโครลิตร กรองด้วย Tissue Column นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11000 g เป็นเวลา 1 นาที ทำการล้างส่วน pellet โดยเติม buffer BW ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11000 g เป็นเวลา 1 นาที และล้างส่วน pellet ครั้งที่ 2 โดยเติม buffer B5 ปริมาณ 600 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11000 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11000 g เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง แล้วเติม buffer BE ปริมาณ 40 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11000 g เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการย้ายเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ในหลอด microtube 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6.3 การใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์

ส่วนประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร โดยประกอบด้วย distilled water ปริมาณ 22 ไมโครลิตร, 2x PCR mastermix solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ F1 (5'-AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3'; I = inosine) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ ไพรเมอร์ R5 (5'-ACGGITACCTTGTTACGACTT-3') ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 35 รอบ โดยขั้นตอน denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 นาที ขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 วินาที และ ขั้นตอน extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที

6.4 การตัดผลผลิตดีเอ็นเอของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์จากปฏิกิริยา PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดคือ *Sph*I, *Kpn*I, *Pst*I, *Sca*I และ *Kzo* 91 ประกอบด้วยผลผลิต PCR 5 ไมโครลิตร, buffer 2 ไมโครลิตร โดยใช้เอนไซม์ *Sph*I, *Kpn*I, *Pst*I, *Sca*I และ *Kzo* 91 (ตารางที่ 1) ที่ความเข้มข้น 5 ยูนิต/มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง แล้วตรวจผลด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

ตารางที่ 1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดคือ *Sph*I, *Kpn*I, *Pst*I, *Sca*I และ *Kzo* 91ตัดดีเอ็นเอของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่ลำดับเบสตำแหน่งต่าง ๆ ดังนี้

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ลำดับเบสที่เอนไซม์ตัดจำเพาะมาตัด	ลักษณะลำดับเบสภายหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
*Sph*I	...GCATGC... ...CGTACG...	...GCATG C... ...C GTACG...
*Kpn*I	...GGTACC... ...CCATGG...	...GGTAC C... ...C CATGG...
*Pst*I	...CTGCAG... ...GACGTC...	...CTGCA G... ...G ACGTC...
*Sca*I	...AGTACT... ...TCATGA...	...AGT ACT... ...TCA TGA...
Kzo 91	...NGATCN... ...NCTAGN...	...N GATCN... ...NCTAG N...

6.5 การตรวจผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอบน agarose gel

นำถาดและหวี (comb) สำหรับเตรียมเจลประกอบเข้าด้วยกัน เตรียม 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel โดยละลาย agarose 1 กรัม ใน 1X TBE buffer 100 มิลลิลิตร หลอมเจลด้วยไมโครเวฟจนเจลละลาย ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส จึงนำมาเทในถาดที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณครึ่งชั่วโมง นำเจลใส่ลงในเครื่อง electrophoresis เติม 1X TBE buffer จนท่วมผิวหน้าเจลประมาณ 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบผสมกับ loading buffer นำดีเอ็นเอที่ผสมแล้วค่อย ๆ หยอดลงไปในหลุม จากนั้นหยอดดีเอ็นเอ Marker ลงไปเพื่อใช้เป็น molecular marker แล้วปิดฝากล่องอิเลคโตรโฟรีซีส เปิดสวิทซ์ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งในทิศทางจากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักดิ์ไฟฟ้า 100 โวลท์ ระยะเวลา 45 นาที สังเกตจากสีทั้งสองที่ผสมใน loading buffer เคลื่อนที่ห่างกันเป็นระยะทาง 2.5 เซนติเมตร จึงทำการปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide เป็นระยะเวลา 15 นาที ล้างเจลด้วยน้ำเปล่า 5 นาที แล้วนำเจลที่ได้ไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel Documentation (SYNGRNE รุ่น GENE Genius Bio Imaging System)

6.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏบน RFLP gel บนตาราง matrix โดยแต่ละแถบดีเอ็นเอ (band) จะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ (character) ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ๆ นั้น จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ Numerical Taxonomy System (NTSYS version 2.0) (Rohlf, 1993) โดยเปลี่ยนเป็น similarity matrix ด้วยโปรแกรม SIMQUAL (similarity for qualitative data) โดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient จากนั้นนำมาจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี unweighted pair group by arithmetic mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม SAHN (sequential, agglomerative, hierachical and nested clustering method) (Yap and Nelson, 1996)

7. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ และเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ต่อการควบคุมโรคใบจุดโรค และโรคเหี่ยวของพริกและมะเขือเทศในสภาพโรงเรือน

7.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติมัยซีส ไอโซเลท SSC2-R1 และเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

การเพิ่มปริมาณเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 ในข้าวเจ้า
(ดัดแปลงจากวิธีการของ Cristina *et al.*, 2006)

โดยนำข้าวเจ้าแช่น้ำทิ้งไว้ข้ามคืน กรองน้ำทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำสะอาดประมาณ 2-3 ครั้ง ผึ่งให้พอแห้งหมาด ๆ บรรจุลงถุงพลาสติกทนร้อน 100 กรัม/ถุง ปิดปากถุงให้สนิท นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 มาทำการขยายปริมาณของสปอร์ ซึ่งได้ทำการเลี้ยงเชื้อไว้บนอาหาร IMA-2 เป็นระยะเวลา 7 วัน เทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร ใช้ loop ที่ลนไฟฆ่าเชื้อขูดสปอร์ของเชื้อที่เจริญบนหน้าอาหาร ใช้ syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร ดูด spore suspension ของเชื้อ ใส่ลงในถุงพลาสติกที่บรรจุข้าวเจ้า ปริมาณ 3 มิลลิลิตร/ถุง โดยทำในสภาพปลอดเชื้อ แล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ เขย่าถุงข้าวเบา ๆ ทุกวัน เพื่อให้สปอร์ของเชื้อกระจายตัว

การเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในเมล็ดข้าวฟ่าง
(จิระเดช และวรรณวิไล, 2542)

โดยนำข้าวฟ่างแช่น้ำทิ้งไว้ข้ามคืน กรองน้ำทิ้งล้างด้วยน้ำสะอาดประมาณ 2-3 ครั้ง ต้มเมล็ดข้าวฟ่างให้สุกโดยสังเกตจากเมล็ดข้าวฟ่างจะเริ่มปริแตกออกประมาณ 4-5 เมล็ด กรองน้ำทิ้ง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งพอแห้งหมาด ๆ จากนั้นบรรจุลงถุงพลาสติกทนร้อน 50 กรัม/ถุง ปิดปากถุงให้สนิทนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำเชื้อรา *T. harzianum* ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ใช้ cork borerขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะบริเวณขอบของโคโลนีแล้วใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตักชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยและสปอร์ของเชื้อเจริญอยู่ใส่ลงในถุงพลาสติกที่บรรจุข้าวฟ่างอยู่จำนวน 3 ชิ้น/ถุง โดยทำในสภาพปลอดเชื้อ เขย่าถุงเบา ๆ เพื่อให้สปอร์ของเชื้อกระจายตัวลงสู่ข้าวฟ่าง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ในที่ร่มและเย็น อากาศถ่ายเทสะดวก หลังบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 2 วัน เขย่าถุงอีกครั้งเพื่อให้เส้นใยกระจายตัว เมื่อเชื้อราเจริญเต็มถุงใช้ระยะเวลาประมาณ 7 วัน จึงนำไปใช้ทดสอบต่อไป

7.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ และเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ต่อการควบคุมโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ

ทำการการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 และเชื้อรา *T. harzianum* ต่อการควบคุมโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ โดยทำการทดลองกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ โดยการทดลองแบ่งเป็น 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่นเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 บริเวณต้นพืชและปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. ภายหลังจากการฉีดพ่นเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 เป็นระยะเวลา 7 วัน

กรรมวิธีที่ 2 คลุกเชื้อรา *T. harzianum* ลงในดินปลูก และปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. ภายหลังจากการคลุกเชื้อรา *T. harzianum* ลงในดินปลูก เป็นระยะเวลา 7 วัน

กรรมวิธีที่ 3 คลุกเชื้อรา *T. harzianum* ลงในดินปลูก และฉีดพ่นเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 บริเวณต้นและปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. ภายหลังจากการคลุกเชื้อรา *T. harzianum* ลงในดินปลูกและฉีดพ่นเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 เป็นระยะเวลา 7 วัน

กรรมวิธีที่ 4 ชุดควบคุม ปลูกด้วยเชื้อรา *Alternaria* sp.

วิธีการนำเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 ไปใช้ในการทดลอง

โดยในกรรมวิธีที่มีการใช้เชื้อรา *T. harzianum* โดยทำการผสมเชื้อรา *T. harzianum* ที่เลี้ยงในข้าวฟ่าง ปริมาณ 50 กรัม/ถุง เทลงในกระถางที่มีดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 800 กรัม/กระถาง ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นจึงปลูกต้นกล้าพริกและมะเขือเทศอายุ 10 วันลงไป และในกรรมวิธีที่มีการใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 นำข้าวเจ้าที่เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 จำนวน 1 ถุงผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 200 มิลลิลิตร การกรองจนได้ spore suspension ของเชื้อ จากนั้นนำ spore suspension ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 ฉีดพ่นบริเวณต้นพืชให้ทั่ว

การปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. (ดัดแปลงจากวิธีการของ เกวลิน, 2547)

การปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. ปลูกเชื้อโดยใช้ spore suspension ของเชื้อรา ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร โดยการพ่น spore suspension โดยใช้ที่ฉีดพ่นละอองฝอยด้วยมือ (Foggy) โดยฉีดห่างต้นประมาณ 1 ฟุต ให้ทั่วต้น ใช้ถุงพลาสติกคลุมเพื่อรักษาความชื้น เก็บต้นพืชไว้ในที่ร่มและเย็น เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงเปิดถุงออก บันทึกผลการทดลอง โดยสังเกตอาการของโรคและประเมินความรุนแรงของโรคภายหลังจากการปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. เป็นระยะเวลา 10 วัน

การประเมินความรุนแรงของโรค

ใช้เกณฑ์การประเมินโรคโดยอ้างจาก สืบศักดิ์ (2540) โดยแบ่งความรุนแรงของโรคออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0	ต้นพืชไม่มีอาการใบจุดเลย
ระดับ 1	ต้นพืชมีอาการใบจุด 1-25 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบสุ่ม
ระดับ 2	ต้นพืชมีอาการใบจุด 26-50 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบสุ่ม
ระดับ 3	ต้นพืชมีอาการใบจุด 51-75 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบสุ่ม
ระดับ 4	ต้นพืชมีอาการใบจุด 76-100 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบสุ่ม

นำผลที่ได้จากการประเมินมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ใบเป็นโรคและเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายมีสูตรดังนี้

เปอร์เซ็นต์ใบเป็นโรค = $\frac{\text{จำนวนใบที่เป็นโรค}}{\text{จำนวนใบทั้งหมด}} \times 100$

เปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลาย = $\frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}^{1}}{\text{จำนวนใบพืชที่สุ่ม}^{2}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของการเป็นโรค}}$

[1] ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ คือ จำนวนใบเฉลี่ยที่เกิดโรค โดยนับจากใบยอดลงมาจำนวน 5 ใบ คูณด้วยระดับการเกิดโรค

[2] จำนวนใบพืชที่สุ่ม คือ ใบพืชที่นับจากใบยอดลงมา 5 ใบ

7.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ และเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกและมะเขือเทศ

ทำการการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 และเชื้อรา *T. harzianum* ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกและมะเขือเทศ โดยทำการทดลองกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ โดยการทดลองแบ่งเป็น 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ราดเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 บริเวณโคนต้นพืชและปลูกเชื้อรา *F.oxysporum* ภายหลังจากการราดเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 เป็นระยะเวลา 7 วัน

กรรมวิธีที่ 2 คลุกเชื้อรา *T. harzianum* ลงในดินปลูก และปลูกเชื้อรา *F. oxysporium* ภายหลังจากการคลุกเชื้อรา *T. harzianum* ลงในดินปลูกเป็นระยะเวลา 7 วัน

กรรมวิธีที่ 3 คลุกเชื้อรา *T. harzianum* ลงในดินปลูก และราดเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 บริเวณต้นและปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* ภายหลังจากการคลุกเชื้อรา *T.harzianum* ลงในดินปลูกและราดเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 เป็นระยะเวลา 7 วัน

กรรมวิธีที่ 4 ชุดควบคุม ปลูกด้วยเชื้อรา *F. oxysporum*

วิธีการนำเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 ไปใช้ในการทดลอง

โดยในกรรมวิธีที่มีการใช้เชื้อรา *T. harzianum* จะทำการผสมเชื้อรา *T. harzianum* ที่เลี้ยงในข้าวฟ่าง ปริมาณ 50 กรัม/ถุง เทลงในกระถางที่มีดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 800 กรัม/กระถาง ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นจึงปลูกต้นกล้าพริกและมะเขือเทศอายุ 10 วันลงไป และในกรรมวิธีที่มีการใช้เชื้อ แอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 นำข้าวเจ้าที่เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 1 ถุงผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 200 มิลลิลิตร ทำการกรองจนได้ spore suspension ของเชื้อ จากนั้นนำ spore suspension ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 ราดบริเวณต้นโคนพืชให้ทั่ว ปริมาณต้นละ 100 มิลลิลิตร

การปลูกเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (ดัดแปลงจากวิธีการของ เกวลิน, 2547)

การปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* ปลูกเชื้อโดยใช้ spore suspension ของเชื้อรา ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร โดยการนำต้นพืชกล้าอายุ 10 วัน ทำการตัดปลายรากแล้วนำต้นกล้ามาจุ่มใน spore suspension เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำต้นกล้าไปปลูกในดิน บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตอาการของโรคและประเมินความรุนแรงของโรคภายหลังจากการปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

การประเมินความรุนแรงของโรค

ใช้เกณฑ์การประเมินโรคโดยอ้างจาก Liu *et al.* (1995) โดยแบ่งความรุนแรงของโรคออกเป็น 6 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0	ต้นพืชไม่แสดงอาการเหี่ยว
ระดับ 1	ต้นพืชแสดงอาการเหี่ยวน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์
ระดับ 2	ต้นพืชแสดงอาการเหี่ยว 26-50 เปอร์เซ็นต์
ระดับ 3	ต้นพืชแสดงอาการเหี่ยว 51-75 เปอร์เซ็นต์
ระดับ 4	ต้นพืชแสดงอาการเหี่ยว 76-100 เปอร์เซ็นต์
ระดับ 5	ต้นพืชตาย

และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์จำนวนของต้นพืชที่เกิดโรคเหี่ยวที่ระดับความรุนแรงต่างๆ