บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การแยกเชื้อราเอนโดไฟต์และแซพโพรบจากกิ่งมณฑาป่า

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างกิ่งมณฑาป่าจากอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก สุ่มเก็บกิ่งสดที่จะใช้ในการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ โดยเลือกจากกิ่งที่แข็งแรงและไม่เป็นโรค ไม่มีร่องรอยการเข้าทำลายของแมลง อายุไม่แก่หรืออ่อนมากเกินไป และสุ่มเก็บกิ่งมณฑาป่าที่ร่วงหล่นอยู่บนพื้นใต้ต้น โดยเลือกกิ่งที่มีลักษณะแห้งและผุพัง และสามารถสังเกตพบด้วยตาเปล่าว่ามีเชื้อราเจริญอยู่เพื่อใช้ในการแยกเชื้อราแซพโพรบ เก็บตัวอย่างจำนวน 50 และ 30 ตัวอย่าง สำหรับกิ่งสดและกิ่งแห้ง ตามลำดับ นำตัวอย่างที่ได้กลับไปแยกเชื้อที่ห้องปฏิบัติการโดยแยกถุงเก็บระหว่างตัวอย่างกิ่งสดและกิ่งแห้งออกจากกัน (และตัวอย่างกิ่งที่เก็บจากคนละต้น ให้เก็บตัวอย่างแยกถุงกัน)

3.1.2 การแยกเชื้อราแซพโพรบและการจัดจำแนกชนิด

3.1.2.1 นำตัวอย่างกิ่งมณฑาป่ามาตรวจสอบหาเชื้อราแซพโพรบที่เจริญบนกิ่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แล้วจึงทำสไลด์ของเชื้อราที่ตรวจพบ

3.1.2.2 นำสไลด์ที่ได้มาตรวจสอบดูลักษณะฟรุตบอดี้ สปอร์และลักษณะด้านสัณฐานวิทยาอื่น ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง ถ่ายภาพลักษณะสปอร์ของเชื้อรา วัดขนาดและทำการบันทึกผลลักษณะต่าง ๆ ที่ปรากฏ ทดสอบเพิ่มเติมด้วย reagent ชนิดต่าง ๆ เพื่อศึกษาลักษณะเฉพาะของเชื้อราแต่ละชนิด หลังจากนั้นทำสไลด์กึ่งถาวรเพื่อเก็บสไลด์ไว้ศึกษาในครั้งต่อไป

3.1.2.3 ทำการแยกเชื้อโดยวิธีแยกสปอร์เดี่ยว single spores isolation ลงบนอาหาร WA (Water Agar) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้วิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีการของ Choi *et al.* (1999) จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) ตรวจดูการงอกของสปอร์เชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอเมื่อเวลาผ่านไป 24-48 ชั่วโมง (ขึ้นกับชนิดของเชื้อ)

3.1.2.4 หากพบว่ามีการงอกของสปอร์เชื้อราเกิดขึ้น ทำการย้ายสปอร์ที่งอกวางลงบนอาหาร PDA (Potato Dextose Agar) แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้การเจริญของเส้นใยเกิดเร็วขึ้น สังเกตลักษณะของโคโลนีเชื้อราที่ได้ว่าเป็นเชื้อราที่ต้องการแยกเชื้อจริงหรือไม่จากลักษณะที่สังเกตพบ ซึ่งควรจะมีความคล้ายคลึงกันในแต่ละโคโลนีที่แยกมาจากสปอร์เดี่ยวของเชื้อแต่ละชนิด

3.1.2.5 เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ลงในหลอดเก็บเชื้อที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ ½ PDA (slant) ร่วมกับการเก็บเชื้อในหลอดบรรจุ mineral oil เพื่อเก็บรักษาเชื้อไว้ที่ห้องปฏิบัติการ ส่วนการเก็บตัวอย่างแห้งเชื้อรา (Dry Herbarium) ทำได้โดยการตัดชิ้นตัวอย่างกิ่งที่มีเชื้อราเจริญอยู่ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างแห้งที่ได้แต่ละชนิดใส่ลงในกล่องหรือถุงกระดาษ/ถุงซิป label รายละเอียดต่าง ๆ ให้ครบถ้วน แล้วเก็บไว้ในตู้ที่แห้ง มิดชิด ปลอดภัยจากการเข้าทำลายของไร หนูและแมลงต่าง ๆ

3.1.3 การแยกเชื้อราเอนโดไฟต์และการจัดจำแนกชนิด

3.1.3.1 นำตัวอย่างกิ่งทั้งหมดมาทำความสะอาดพื้นผิวภายนอกโดยการล้างผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตัดกิ่งออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ยาวประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร โดยแยกระหว่างเปลือกและเนื้อไม้ (หนึ่งตัวอย่างกิ่งแยกเป็นเนื้อเยื่อส่วนเปลือกและเนื้อไม้อย่างละ 4 ชิ้น) ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวของตัวอย่างด้วยวิธี triple-surface sterilization โดยนำตัวอย่างพืชจุ่มลงในสารละลาย 70% ethanol (นาน 1 นาที), 5% Sodium hypochlorite (3 นาที), 95% ethanol (30 วินาที) ตามลำดับ แล้วล้างครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อนาน 30 วินาที

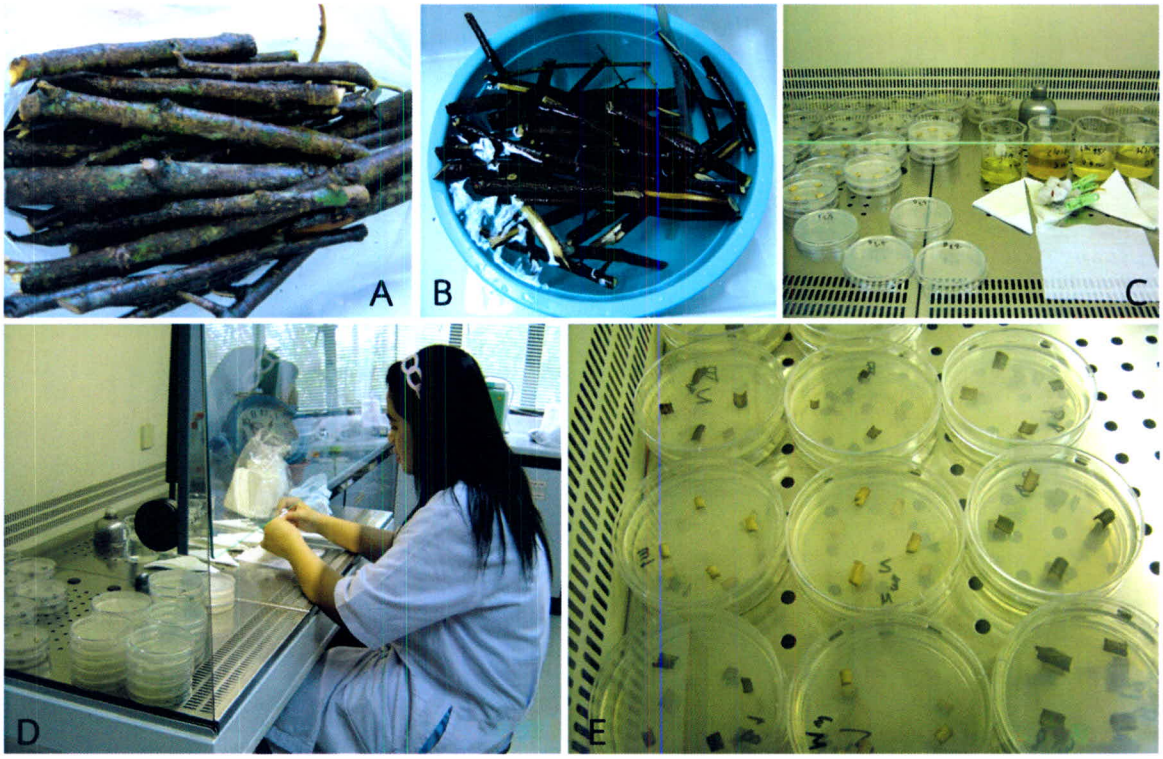
3.1.3.2 ซับน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยกระดาษที่ฆ่าเชื้อแล้ว วางเนื้อเยื่อชิ้นไม้ส่วนเปลือกและเนื้อไม้อย่างละ 4 ชิ้น ลงบนจานอาหาร ½ PDA (½ Potato Dextrose Agar) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส)

3.1.3.3 ตรวจดูการเจริญของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่เจริญออกมาจากชิ้นไม้ทุก ๆ วัน เป็นระยะเวลา 1-2 สัปดาห์ ทำการถ่ายเชื้อโดยการตัดปลายเส้นใยของเชื้อราแต่ละชนิดไปเลี้ยงบนอาหาร PDA และบ่มไว้เพื่อดูการสร้างสปอร์

3.1.3.4 ในกรณีที่ตรวจไม่พบว่าเชื้อว่ามีการสร้างสปอร์ ทำการกระตุ้นการสร้างสปอร์ด้วยการเลี้ยงเชื้อลงบนอาหาร ½ PDA ที่ใส่เนื้อเยื่อพืชอาศัย (เนื้อเยื่อของกิ่งมณฑาป่า) ผสมลงไป ร่วมกับการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Corn Meal Agar เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์จากนั้นจึงทำการตรวจสอบการสร้างสปอร์ด้วยวิธีการทำ slide culture และตรวจสอบดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่หากพบว่ายังคงไม่มีการสร้างสปอร์เกิดขึ้นหลังการกระตุ้น ให้จัดเชื้อราไอโซเลตนั้น ๆ อยู่ในกลุ่ม mycelia sterilia

3.1.3.5 ทำการบ่งบอกชนิดเชื้อราโดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา, สปอร์, ลักษณะโคโลนี และลักษณะอื่นๆ โดยการเปรียบเทียบกับเอกสารและหนังสือต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง (เช่น Ellis, 1971; 1976; Carmichael *et al.*, 1980; Sutton, 1980; Sivanesan, 1984; Fröhlich and Hyde, 2000; Hyde *et al.*, 2000; Lu and Hyde, 2000; Taylor and Hyde, 2003; Tsui and Hyde, 2003; Wu and Zhuang, 2005; Cai *et al.*, 2006)

3.1.3.6 หลังจากได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้ว ทำการเก็บเชื้อ (long term preservation) โดยเลี้ยงเชื้อในขวดเก็บเชื้อที่บรรจุอาหารวุ้นเอียง (½ PDA slant) และในขวดบรรจุ mineral oil ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ทำการเก็บรักษาเชื้อที่ได้ทั้งหมดไว้ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนและวิธีการในการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากกิ่งมณฑาป่า. A. ตัวอย่างกิ่งสดที่เก็บมาจากอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า B. การล้างตัวอย่างกิ่งผ่านน้ำไหล C. อุปกรณ์ในการทำการฆ่าเชื้อที่ผิว (triple-surface sterilization) D. วิธีการฆ่าเชื้อที่ผิว E. ตัวอย่างเปลือกและเนื้อไม้ของมณฑาป่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิว วางในอาหารเลี้ยงเชื้อ ½ PDA.

3.2 การคัดเลือกหาเชื้อราที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในกล้วย (*C. musae*)

3.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. musae* ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ

นำเชื้อรา *C. musae* ที่ได้จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อเช็คความบริสุทธิ์และรอให้เส้นใยเชื้อราเจริญเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกลักษณะการเจริญของโคโลนีเชื้อ สีของโคโลนี และลักษณะของโคนิเดียหรือสปอร์ (ถ้าพบ) จากนั้นทำการตรวจเช็คกับคู่มือในการจัดจำแนก (Key) ว่ามีลักษณะตรงตาม key character ของเชื้อ *C. musae* หรือไม่

3.2.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *C. musae* ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ

เพื่อเป็นการตรวจสอบซ้ำให้แน่ใจว่าเชื้อก่อโรคที่จะใช้ในการทดสอบเป็นเชื้อ *C. musae* จริง รวมทั้งเป็นการตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) ของเชื้อไปในขณะเดียวกัน นำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. musae* อายุ 3 วัน เจริญอยู่ (mycelial plug) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ปลูกเชื้อลงบนผลกล้วยที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยแบ่งวิธีการในการทดสอบเป็น 4 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่ 1 ใช้ mycelial plug ร่วมกับการทำแผล กรรมวิธีที่ 2

ใช้ mycelial plug เพียงอย่างเดียว (ไม่ทำแผล) กรรมวิธีที่ 3 ใช้ PDA plug ร่วมกับการทำแผล และกรรมวิธีที่ 4 ใช้ PDA plug เพียงอย่างเดียว วางผลกล้วยที่ปลูกเชื้อแล้วลงในกล่องให้ความชื้น (moist chamber) ที่สะอาด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูอาการของโรคทุกวันหลังผ่านการปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 วันขึ้นไป บันทึกผลที่สังเกตพบ

3.2.3 การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อราเอนโดไฟต์และแซพโพรบในการต่อต้านการเจริญของ *C. musae*

คัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์และแซพโพรบ จำนวน 93 และ 3 ไอโซเลต ตามลำดับ มาเลี้ยงร่วมกัน (dual culture technique) กับเชื้อรา *C. musae* บนอาหาร PDA โดยทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี โดยเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์และแซพโพรบในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน นำวุ้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตรที่มีเส้นใย (mycelial plug) ของเชื้อราเอนโดไฟต์/แซพโพรบ และเชื้อรา *C. musae* มาเลี้ยงคู่กันบนจานอาหาร PDA โดยวาง mycelial plug ของเชื้อราทั้งสองห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อข้างละ 2.5 cm (ภาพที่ 3.2) นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจผลการเจริญของเชื้อราทั้งสองในวันที่ 7 ของการทดสอบ โดยวัดรัศมีของเชื้อ *C. musae* ในจานควบคุมและจานทดสอบ (ภาพที่ 3.3) จากนั้นนำมาคำนวณค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. musae* ออกเป็นร้อยละตามสูตรที่ระบุไว้ด้านล่าง

ค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. musae*

Percentage inhibition of radial growth: PIRG = $\left[\frac{R_1 - R_2}{R_1}\right] \times 100$

โดยกำหนดให้ R_1 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. musae* ในจานชุดควบคุม

R_2 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. musae* ในจานชุดทดลอง

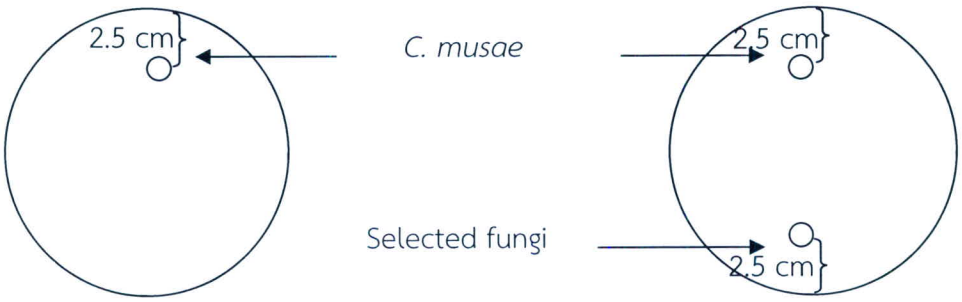
และสรุปผลการยับยั้งได้ดังนี้ (เกษม สร้อยทอง, 2532)

มากกว่า 75% = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (very high antagonistic activity)

60-75% = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง (high antagonistic activity)

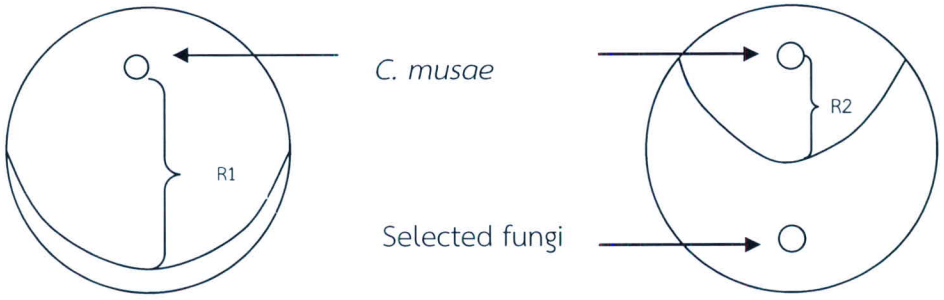
51-60% = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (moderate antagonistic activity)

น้อยกว่า 50% = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ (low antagonistic activity)



Control Plate Experiment Plate

ภาพที่ 3.2 วิธีการทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อราเอนโดไฟต์/แซพโพรบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. musae*



Control Plate Experiment Plate

ภาพที่ 3.3 วิธีวัดการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเอนโดไฟต์/แซพโพรบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. musae*