สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

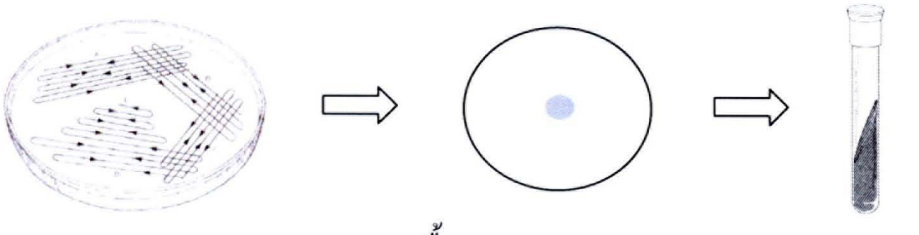
บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการ

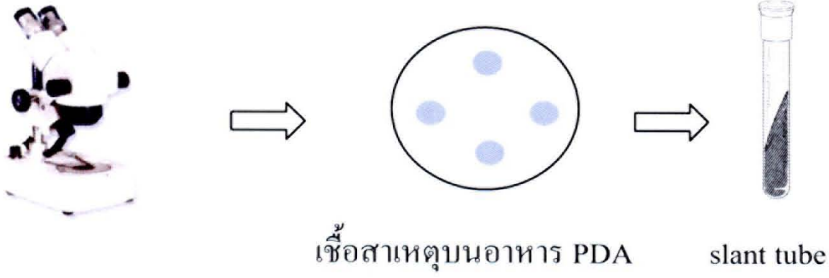
<u>การทดลองที่ 1</u> : การทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

1.1 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์ และเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

เก็บตัวอย่างโรคแอนแทรคโนส จากแปลงปลูกพริกของเกษตรกรที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในเขต อ.สันทราย อ.แม่ริม และสุ่มเก็บตัวอย่างผลพริกจากตลาดในจังหวัดเชียงใหม่นำมาแยกเชื้อสาเหตุตามลักษณะอาการที่ปรากฏ โดยแบ่งวิธีการแยกเชื้อออกเป็น 2 วิธีการดังนี้ การแยกเชื้อจากตัวอย่างที่ไม่ปรากฏสปอร์บนบาดแผลตามวิธีการของ Photita *et al.* (2005) โดยนำส่วนของพืชอาศัยมาล้างด้วยน้ำไหลเป็นเวลาประมาณ10 นาที เพื่อล้างสิ่งปนเปื้อนต่างๆออก ตัดชิ้นพืชบริเวณแผลกับเนื้อเยื่อปกติให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยจุ่มชิ้นพืชใน 10% Clorox (1% sodium hypochlorite) เป็นเวลา 1-3 นาที (ขึ้นอยู่กับความหนาบางของชิ้นพืช) ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อประมาณ 3-5 นาที ซับชิ้นพืชให้แห้งด้วยกระดาษชำระที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำชิ้นพืชวางลงบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 $\pm$ 2°C) ประมาณ 3-4 วัน จึงเขี่ยบริเวณปลายเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ใหม่ จากนั้นเลี้ยงเชื้อลงในหลอดอาหาร PDA ที่ผิวหน้าเอียง เก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้เป็น stock culture การแยกเชื้อจากตัวอย่างที่ปรากฏสปอร์บนผลพริกที่มีลักษณะแผลช่ำน้ำ กลุ่มสปอร์มีสีชมพู-ส้ม (single-spore) ตามวิธีการของ Choi *et al.* (1999) โดยใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะลงบนสปอร์ (spore masse) นำมา streak บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อเจริญใช้เข็มเขี่ยเขี่ยเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นเลี้ยงเชื้อลงในหลอดอาหาร PDA ที่ผิวหน้าเอียง เก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้เป็น stock culture (ภาพ 2) ส่วนการแยกเชื้อจากสปอร์บนผลพริกที่มีลักษณะแผลแห้ง กลุ่มสปอร์มีสีดำเรียงซ้อนกันเป็นวง แยกโดยนำตัวอย่างที่ได้มาส่องภายใต้กล้องสเตอริโอที่กำลังขยาย 40X โดยใช้ปากคีม (forcep) ปลายแหลมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำโครงสร้างสปอร์ วางบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องจนกว่าเชื้อราเจริญ ใช้เข็มเขี่ย เขี่ยเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นเลี้ยงเชื้อลงในหลอดอาหาร PDA เก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้เป็น stock culture (ภาพ 3) ต่อไป



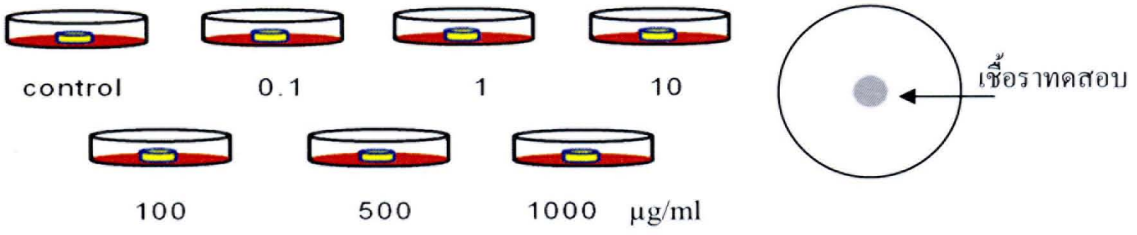
ภาพ 2 การแยกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ด้วยวิธี streak plate



ภาพ 3 การแยกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ภายใต้กล้องสเตอริโอ

1.2 การประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 0, 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1000 µg/ml (ภาคผนวก ก) โดยเทอาหารใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละประมาณ 10 มิลลิลิตร (ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง) ทดสอบความต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมด้วยวิธี culture disc technique โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราแต่ละไอโซเลท ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำต่อไอโซเลท (ภาพ 4) บันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อรา และการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราเมื่อเชื้อราชุดควบคุมเจริญเต็มที่ โดยบันทึกทั้งในแกน x และ แกน y แล้วหาค่าเฉลี่ยการเจริญเส้นใยของเชื้อรา จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาประเมินตามหลักเกณฑ์ในข้อ 1.2.1 และ 1.2.3



ภาพ 4 ลักษณะการวางเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

หลักเกณฑ์ในการประเมินระดับความต้านทานของเชื้อราต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พิจารณาจาก (ดัดแปลงจาก Farungsang and Farungsang (1992), Koenraadt *et al.* (1992) และ Peres *et al.* (2004))

1.2.1 ความสามารถเจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกว่าเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อนำเชื้อราจากทุกไอโซเลทมาจัดระดับความต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม 4 ระดับ ดังนี้คือ

- เชื้อราที่อ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (sensitive: S) คือเชื้อราที่ไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญได้เพียงเล็กน้อยบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับความเข้มข้น < 1 µg/ml
- เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับต่ำ (weakly resistant: WR) คือ เชื้อราที่เจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับความเข้มข้น ≤ 10 µg/ml
- เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับปานกลาง (moderately resistant : MR) คือเชื้อราที่เจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับความเข้มข้น ≤ 100 µg/ml
- เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (highly resistant : HR) คือเชื้อราที่สามารถเจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับความเข้มข้น ≥ 500 µg/ml

ตาราง 2 ระดับความต้านทานสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม 4 ระดับ

ระดับความต้านทาน[1]	ความเข้มข้นของสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (µg/ml)					
	0.1	1	10	100	500[3]	1,000
Sensitive (S)	✓[2]	X	X	X	X	X
	✓	✓	X	X	X	X
Weakly resistant (WR)	✓	✓	✓	X	X	X
Moderately resistant (MR)	✓	✓	✓	✓	X	X
Highly resistant (HR)	✓	✓	✓	✓	✓	X
	✓	✓	✓	✓	✓	✓

[1] S; ≤ 1 µg/ml, WR; ≤ 10 µg/ml, MR; ≤ 100 µg/ml, HR; ≥ 500 µg/ml

[2] ✓ = เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 10% ขึ้นไป เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

X = เชื้อราที่เจริญไม่ได้ หรือเจริญได้น้อยกว่า 10 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

[3] อัตราแนะนำ

1.2.3 เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

นำค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อราที่ได้จากการทดสอบมาประเมินหาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในแต่ละความเข้มข้น โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คำนวณจากสมการ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อรา (เทียบกับชุดควบคุม)} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ชุดควบคุม}} \times 100$$

จากนั้นนำเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อราที่ได้มาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราในแต่ละความเข้มข้น 5 ระดับการเจริญ ดังนี้คือ

- = เชื้อราที่เจริญได้ ≤ 10 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- \+ = เชื้อราที่เจริญได้ 35% ≤ 10% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- ++ = เชื้อราที่เจริญได้ 65% ≤ 35% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- +++ = เชื้อราที่เจริญได้ 90% ≤ 65% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- ++++ = เชื้อราที่เจริญได้ ≥ 90% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

<u>การทดลองที่ 2</u> : การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

2.1 เพิ่มปริมาณยีน beta-tubulin ด้วยเทคนิค Nested PCR

2.1.1 เตรียมเส้นใยเชื้อรา และสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (ตาราง 3) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน หรือจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ spatula ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขูดเส้นใยเชื้อราลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 0.1-0.2 กรัม จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด Nuclospin Plant Kit® โดยนำเส้นใยเชื้อราที่เตรียมไว้ใส่ในโกร่งที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เติมไนโตรเจนเหลวลงไป เพื่อให้เส้นใยแข็งตัว จากนั้นบดเส้นใยให้เป็นผง ตักใส่หลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม PL1 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex เติม RNaseA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ PL1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 65^{o}C เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นประกอบชุดทดลองสำเร็จรูป (ชุด kit) และดูดของเหลวใสที่ได้ใส่ใน column สีม่วง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอด Eppendorf ใหม่ จากนั้นเติม PC buffer ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ใช้ pipette ดูดขึ้นลง 5 ครั้ง จากนั้นประกอบชุด kit และดูดของเหลวใสที่ได้ใส่ใน column สีเขียว นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวในหลอดทิ้ง จากนั้นล้างซิลิกา เมมเบรน (silica membrane)ใน column สีเขียวด้วย PW buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน column สีเขียว นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วเติม PW2 buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใน column สีเขียว นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วเติม PW2 buffer อีก 200 ไมโครลิตร ลงใน column สีเขียว นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม PE elution buffer (อุ่นที่ 70^{o}C มาก่อน) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงใน column สีเขียว บ่มที่อุณหภูมิ 70^{o}C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อละลายเอาส่วนของดีเอ็นเอจากซิลิกาเมมเบรนของ column สีเขียว นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม PE elution buffer อีก 25 ไมโครลิตร ลงใน column สีเขียวอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 70^{o}C เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 20^{o}C จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตาราง 3 เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ

ลำดับที่	ไอโซเลท[2]	ชนิดของเชื้อรา	ระดับความต้านทาน[1]
1	Cc8	*C. capsici*	S
2	Cg24	*C. gloeosporioides*	
3	Cg30	*C. gloeosporioides*	
4	Cc1	*C. capsici*	WR
5	Cc9	*C. capsici*	
6	Cg46	*C. gloeosporioides*	MR
7	Cg5	*C. gloeosporioides*	HR
8	Cg22	*C. gloeosporioides*	
9	Cg14	*C. gloeosporioides*	
10	Cg23	*C. gloeosporioides*	
11	Cg27	*C. gloeosporioides*	
12	Cg28	*C. gloeosporioides*	
13	Cg40	*C. gloeosporioides*	
14	Cg44	*C. gloeosporioides*	
15	Cc43	*C. capsici*	
16	Cc53	*C. capsici*	
17	Cg60	*C. gloeosporioides*	
18	Cg73	*C. gloeosporioides*	
19	Cg75	*C. gloeosporioides*	
20	Cg78	*C. capsici*	
21	Cg86	*C. capsici*	

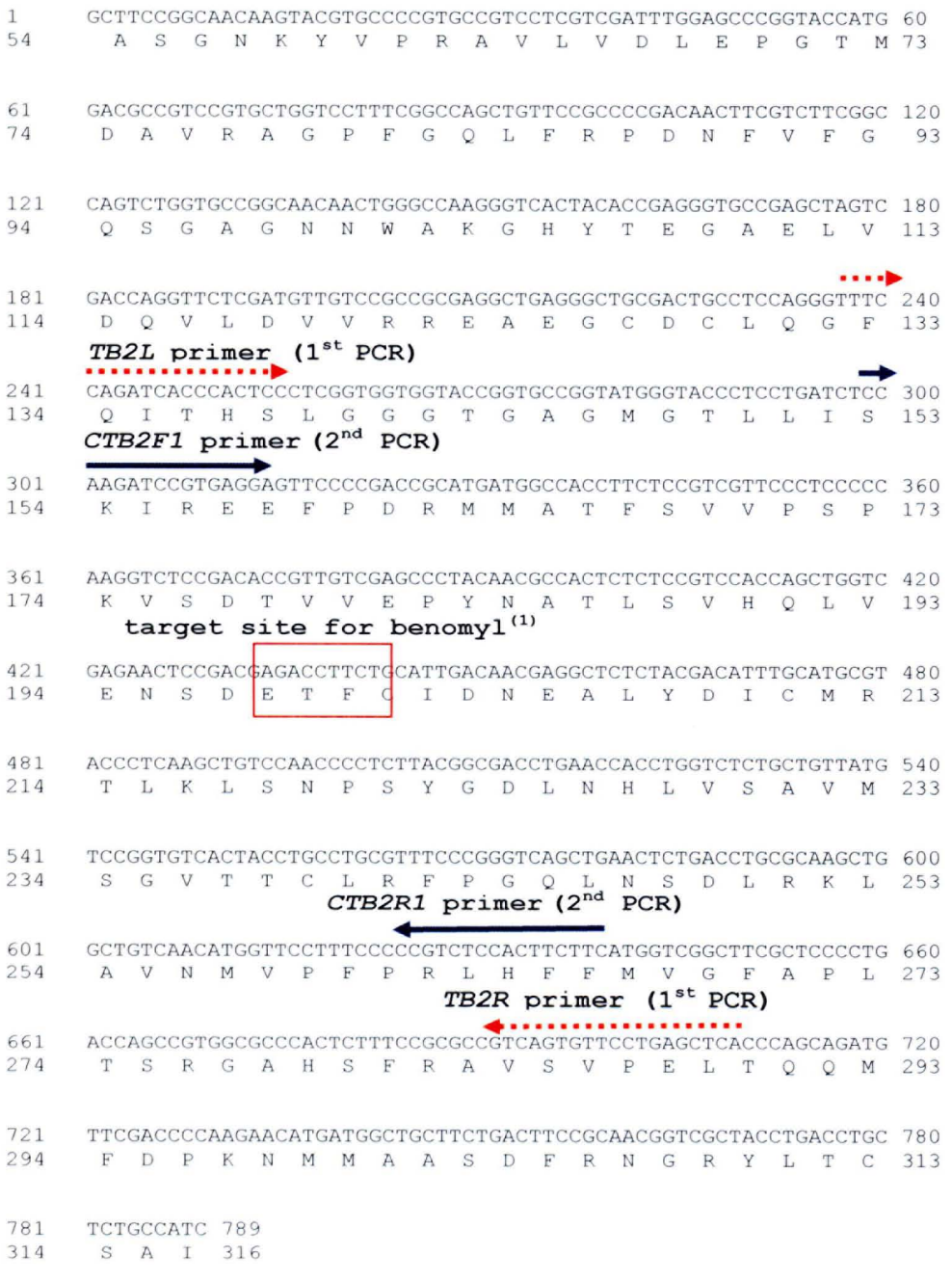
[1] S = Sensitive ($\leq$ 1 µg/ml) WR = Weakly resistant ($\leq$ 10 µg/ml), MR = Moderately resistant ($\leq$ 100 µg/ml), HR = Highly resistant ($\geq$ 500 µg/ml)

[2]Cc = *Colletotrichum capsici*, Cg = *Colletotrichum gloeosporioides*

2.2.2 ตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟริซีสใน 1% agarose gel โดยชั่ง agarose 1 กรัม เติม running buffer (50x TAE buffer) 100 มิลลิลิตร หลอมเจลให้ละลายด้วยไมโครเวฟ เมื่อเจลมีอุณหภูมิประมาณ 60^{O}C เติม 1x ethidium bromide (EtBr) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทลงในถาดเจลให้มีความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เสียบหวีที่ปลายข้างหนึ่งของถาดเจล เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ (well) สำหรับใส่ตัวอย่าง ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็ง ค่อยๆ ดึงหวีออก นำถาดเจลใส่ลงไปในเครื่องอิเล็กโทรโฟริซีสโดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ทางขั้วลบ เติม 50x TAE buffer ลงไปพอท่วมแผ่นเจล จากนั้นดูดดีเอ็นเอผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 2:1 ไมโครลิตร หยอดลงใน well และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker) ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำไปตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพ

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน beta-tubulin ด้วยเทคนิค Nested Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งอาศัยการทำ PCR 2 ขั้นตอนด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ โดยไพรเมอร์คู่แรกจะใช้สำหรับทำ PCR ขั้นตอนแรก (1st PCR) คือ ไพรเมอร์ TB2L forward (5′-GTT TCC AGA TCA CCC ACT CC-3′) และ TB2R reverse (5′-TGA GCT CAG GAA CAC TGA CG-3′) ที่ผลิตโดยบริษัท iNtRON BIOTECHNOLOGY, INC. ซึ่งไพรเมอร์คู่แรกจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณรอบนอกรวมถึงตำแหน่งยีน beta-tubulin ซึ่งมักจะพบในเชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบโนมิล (Peres *et al.*, 2004) ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 3 software ซึ่งอาศัยต้นแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน beta-tubulin ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (GenBank accession no. U14138) (ภาพ 5) เตรียมส่วนผสมการทำ PCR ขั้นแรก (1st PCR) ในหลอด PCR ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ตามตาราง 4



ภาพ 5 ลำดับนิวคลิโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน beta-tubulin (*TBU2*)[2] ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* สายพันธุ์ปกติ (sensitive)

[1]Peres *et al.* (2004) [2]Buhr and Dickman (1994)

ตาราง 4 ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ขั้นตอน 1st PCR ในการเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน beta-tubulin

สารประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x PCR buffer	5.0
dNTP mix	5.0
Primer TB2L	1.0
Primer TB2R	1.0
DNA template	1.0
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	36
Blend *Taq* DNA Polymerase (TOYOBO)	1
ปริมาตรรวม	**50**

เมื่อเติมส่วนผสมทุกอย่างครบแล้ว นำหลอด PCR tube ที่เตรียมพร้อมแล้วไปเข้าเครื่อง thermal cycler Programmable Thermal Controller PTC-200™ thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA) โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เวลา 5 นาที
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เวลา 1 นาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 35°C เวลา 1 นาที
   extension ที่อุณหภูมิ 72°C เวลา 1 นาที
   } 30 รอบ
3. primer extension ที่อุณหภูมิ 72°C เวลา 5 นาที

จากนั้นตรวจสอบผล PCR (1st PCR) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซีสโดยผสมผลผลิต PCR ครั้งที่ 1 (1stPCR) กับ 6X loading dye ในอัตราส่วน 5:1 ไมโครลิตร เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งใช้ λ DNA digested by *Hind III* ต่อ 6X loading dye ในอัตราส่วน 8:2 ไมโครลิตร จากนั้นต่อเครื่องอิเลคโทรโฟริซีสเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ใช้กระแสไฟ 80 โวลต์ 400 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำเจลไปตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพ

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในขั้นตอนที่ 1 (1st PCR) มาเพิ่มปริมาณบริเวณบางส่วนของยีน beta-tubulin ในขั้นตอน PCR ที่ 2 (2nd PCR) ด้วยไพรเมอร์คู่ที่ 2 คือ CTB2F1 forward (5′-TCC AAG ATC CGT GAGG -3′) และ CTB2R1 reverse (5′-AAG AAG TGG AGA CG -3′) ที่ออกแบบให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง beta-tubulin ที่อยู่ถัดเข้าไปจากไพรเมอร์คู่แรก (ภาพ 5) โดยเตรียมส่วนผสมการทำ PCR ขั้นตอนที่ 2 (2ndPCR) ในหลอด PCR ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ตามตาราง 5

ตาราง 5 ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ขั้นตอนที่ 2 (2nd PCR) ในการเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน beta-tubulin

สารประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x PCR buffer	5.0
dNTP mix	5.0
Primer CTB2F1	1.0
Primer CTB2R1	1.0
DNA template	1.0
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	36
Blend *Taq* DNA Polymerase (TOYOBO)	1
ปริมาตรรวม	**50**

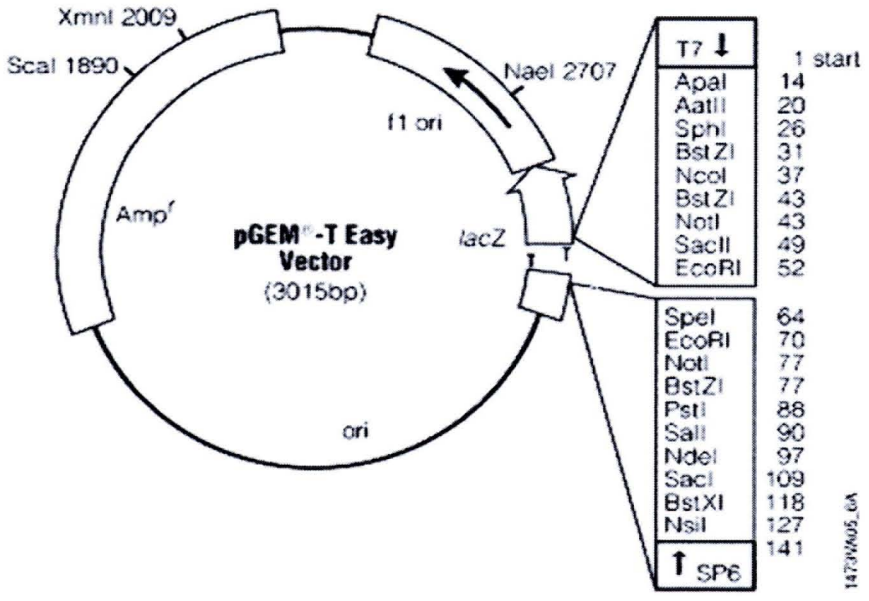
เมื่อเติมส่วนผสมทุกอย่างครบแล้ว นำหลอด PCR tube ที่เตรียมพร้อมแล้วไปเข้าเครื่อง thermal cycler Programmable Thermal Controller PTC-200™ thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA) โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

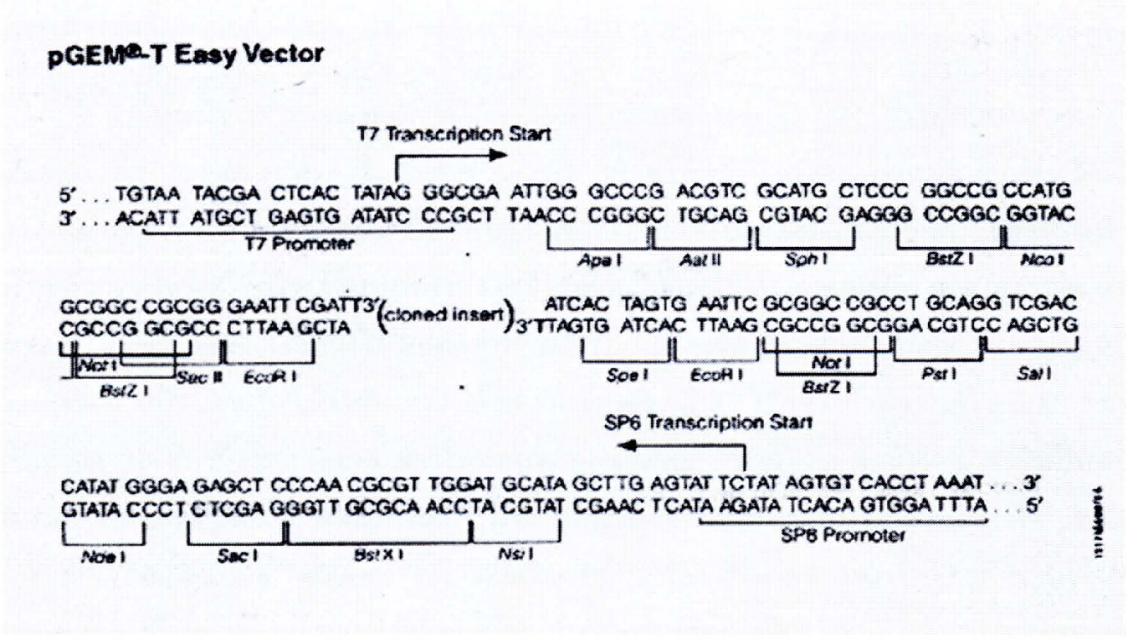
1. initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เวลา 5 นาที
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เวลา 1 นาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 50°C เวลา 1 นาที
   extension ที่อุณหภูมิ 72°C เวลา 1 นาที
   } 30 รอบ
3. primer extension ที่อุณหภูมิ 72°C เวลา 5 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR ครั้งที่ 2 (2^{nd} PCR) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซีสโดยผสมผลผลิต PCR ครั้งที่ 2 กับ 6X loading dye ในอัตราส่วน 5:1 ไมโครลิตร เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งใช้ λ DNA digested by *Hind III* ต่อ 6X loading dye ในอัตราส่วน 8:2 ไมโครลิตร จากนั้นต่อเครื่องอิเลคโตรโฟริซิสเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ใช้กระแสไฟ 80 โวลต์ 400 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำเจลตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพ

2.2 การทำ Transformation และ colony direct PCR

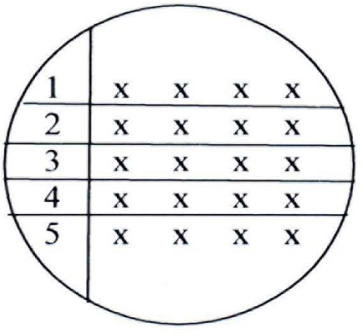
นำผลผลิตจาก 2^{nd} PCR ที่ได้มาโหลดบน 1% low melting point gel (Invitrogen®) โดยโหลด 2^{nd} PCR product กับ 6X loading dye ในอัตราส่วน 20:3 ไมโครลิตร เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานต่อ 6X loading dye ในอัตราส่วน 8:2 ไมโครลิตร จากนั้นต่อเครื่องอิเล็กโทรโฟริซีสเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า เติม 50X TAE ให้ท่วมเจล ใช้กระแสไฟ 80 โวลต์ 400 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำเจลตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ใช้ใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเจลบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ (ขนาด 341 bp) ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเจลมาหลอมให้ละลาย ที่อุณหภูมิ $65^{o}C$ เป็นเวลา 5 นาที หรือจนกว่าเจลจะหลอมหมด จากนั้นดูดเจลที่หลอมมาปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ลงใน T-vector pGEM®Easy 0.5 ไมโครลิตร (ภาพ 6) ที่เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 2x ligation buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (โดยทำบนน้ำแข็ง) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $15^{o}C$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เตรียม competent cell (*Escherichia coli*) ที่แช่แข็งที่ $-80^{o}C$ มาทำให้ละลายโดยแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นหลอมเจลที่บ่มไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมงอีกครั้ง ที่อุณหภูมิ $65^{o}C$ เป็นเวลา 1-2 นาที ดูดลงใน competent cell แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ $42^{o}C$ เป็นเวลา 40 วินาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เตรียม SOC medium (Super Optimal broth with Catabolite repression) (Invitrogen®) 800 ไมโครลิตร ในหลอดอาหาร (tube) จากนั้นดูด competent cell ใส่ลงใน SOC medium บ่มที่อุณหภูมิ $37^{o}C$ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทอาหารแข็ง LB (Luria-Bertani) ที่ผสม 130 mM ampicillin ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหยด X-gal และ IPTG อย่างละ 30 ไมโครลิตร ใช้แท่งแก้วรูปตัวเอลเกลี่ยให้แห้ง ดูด SOC medium ที่มีส่วนผสมของ competent cell มา 200 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร LB ที่เตรียมไว้ ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลเกลี่ยให้ผิวหน้าอาหารแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $37^{o}C$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง





ภาพ 6 แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ (T-vector pGEM®Easy)

เลือกโคโลนีสีขาวที่ขึ้นบนอาหาร LB ที่ได้โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีสีขาว แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสาร 130 mM ampicillin ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ภาพ 7) หลังจากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่แตะโคโลนีจุ่มลงในหลอด PCR ที่ผสมสารดังตาราง 6 (colony direct PCR) นำไปเข้าเครื่อง PCR (สุ่มเลือก 4 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่าง) เพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นว่าโคโลนีที่เลือกมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB มีส่วนของ insert gene beta-tubulin หรือไม่



ภาพ 7 การเลี้ยง *Escherichia coli* บนอาหารแข็ง LB (Luria-Bertani) ที่ผสมสาร 130 mM ampicillin

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาโหลดบน 1% agarose gel โดยมีส่วนผสมของ PCR product ต่อ 6xloding dye ในอัตราส่วน 5:2 ไมโครลิตร หากปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง 341 bp แสดงว่าโคโลนีที่เลือกมามีส่วนของ insert gene beta-tubulin อยู่ จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีที่เลี้ยงไว้บนอาหาร LB โดยเลือกโคโลนีที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในขั้นตอนการทำ colony direct PCR มาเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว LB ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่ผสม 130 mM ampicillin แล้ว โดยใส่ไม้จิ้มฟันลงไปด้วย บ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง จากนั้นดูดใส่หลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนไว้ จากนั้นสกัด plasmid *E. coli* ด้วย NucleoSpin® plasmid Kit โดยเติม P1 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในหลอด Eppendorf ที่มีตะกอนอยู่ ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex เพื่อให้เซลล์ membrane แตก เติม P2 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาประมาณ 5 ครั้ง เติม N3 buffer ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสลงใน column สีขาว ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส เติม PE buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส นำ column ไปปั่นเหวี่ยงให้แห้ง ด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที นำ column ที่ได้ใส่ในหลอด Eppendorf เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง column สีขาว เก็บหลอด Eppendorf ที่มีส่วน plasmid ของแบคทีเรียไว้เพื่อนำไปทำ PCR ในขั้นตอนต่อไป เตรียม master mix (ตาราง 7, 8) โดยแยกหลอดออกเป็น 2 หลอด คือหลอดที่ผสมไพรเมอร์ T7 และไพรเมอร์ Sp6 ดูดตัวอย่างที่ได้ 1 ไมโครลิตร ลงในหลอด PCR ที่ผสม master mix ไว้แต่ละหลอดแล้ว นำไปเข้าเครื่อง PCR

ตาราง 6 ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ในขั้นตอนการทำ colony direct PCR

สารประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	3.72
10X PCR buffer	0.5
dNTP	0.5
ไพรเมอร์ T7	0.1
primerSp6	0.1
Taq (Blend *Taq* (TOYOBO))	0.08
ปริมาตรรวม	**5**

1. initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เวลา 5 นาที
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เวลา 30 วินาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 50°C เวลา 15 วินาที
   extension ที่อุณหภูมิ 72°C เวลา 1 นาที
   } 40 รอบ
3. primer extension ที่อุณหภูมิ 72°C เวลา 5 นาที

ตาราง 7 ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ T7

สารประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	13
buffer	3
ไพรเมอร์ T7	1
Big Dye	2
template	1
ปริมาตรรวม	**20**

ตาราง 8 ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ Sp6

สารประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	13
buffer	3
ไพรเมอร์ Sp6	1
Big Dye	2
template	1
ปริมาตรรวม	**20**

1. initial denaturation ที่อุณหภูมิ 96^{o}C เวลา 2 นาที
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 96^{o}C เวลา 30 วินาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 50^{o}C เวลา 15 วินาที } 30 รอบ
   extension ที่อุณหภูมิ 60^{o}C เวลา 4 นาที

ดูด PCR product ที่ได้ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม sodium 2 ไมโครลิตร และ 100% เอทานอล ที่อุณหภูมิ 4^{o}C ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex เก็บที่อุณหภูมิ -30^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายใสทิ้ง เติม 70% เอทานอล ที่อุณหภูมิ 4^{o}C ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรม

เติม buffer Hi-Di ™ formamide ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในตะกอนดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว จากนั้นเปลี่ยนหลอด Eppendorf เป็นหลอดสำหรับใช้ทำ sequence นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 96^{o}C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer โดยตั้งค่าต่างๆ ตามคู่มือการใช้ที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ โดยเครื่องจะทำงานประมาณ 3 ชั่วโมงต่อการอ่านค่า 1 ตัวอย่าง การทำงานของเครื่องจะเป็นไปแบบอัตโนมัติ และบันทึกผลโดยเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ต่อกับเครื่องหา

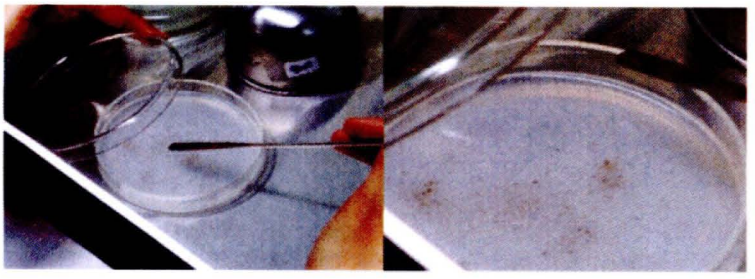
ลำดับเบส ซึ่งเมื่อเสร็จสิ้นการทำงานของเครื่องแล้วสามารถนำข้อมูลออกจากเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลต่อไป โดยเปรียบเทียบข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดกับข้อมูลจาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) ที่เวปไซต์ http://www.ncbi.nlm.gov/Genbank เข้าไปในส่วนของ BLAST นำข้อมูลนิวคลีโอไทด์วางลงในโปรแกรม เลือก nucleotide blast เลือก nucleotide collection (nr/nt) จากนั้นทำการ sequence alignment โดยเลือกที่ BLAST จะได้ข้อมูลสำหรับการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ออกมา จากนั้นเลือกให้แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนเทียบกับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเลือก Reformat these results เลือก CDS feature เลือก view report จะได้ข้อมูลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน beta-tubulin ของทุกตัวอย่าง โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม BioEdit และเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่างกรดอะมิโนของทุกตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W

การทดลองที่ 3: การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อรา *Colletotrichum* sp และการจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีส

3.1 การเก็บตัวอย่าง และการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดิน

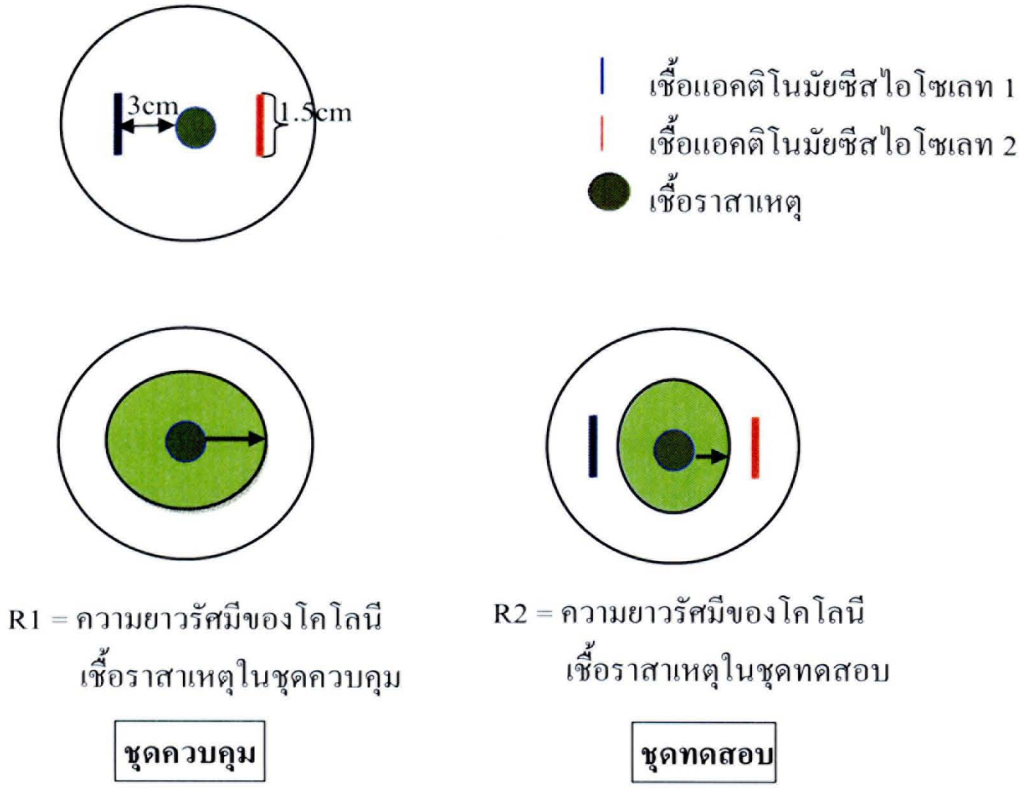
เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติดอยปุย พื้นที่สูงกาแล และจากแปลงปลูกพริกใน อ. สันทรายจำนวน 7 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกใสตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม ผึ่งตัวอย่างดินให้แห้งเป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นบดให้ละเอียด กรองด้วยตะแกรงขนาด 3 มิลลิเมตร นำไปอบฆ่าเชื้อโดยใช้ดินตัวอย่างละ 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 2 ระดับคือ 60^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 120^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Li-Hua and Cheng-Lin (1996) นำตัวอย่างดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วมาเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ CSA (caseine starch agar), CA (chitin agar), OMA (oatmeal agar) และ SEA (soil extract agar) (ภาพ 8) โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อเจริญสุ่มเก็บโคโลนีที่เจริญบนอาหารชนิดต่างๆ โดยนำโคโลนีที่ได้มา streak ลงบนอาหาร CSAจากนั้น restreak เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บในหลอดอาหาร Emerson's agar (Rothrock and Gottlieb, 1981) เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



ภาพ 8 การเกลี่ยตัวอย่างดินลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิดต่างๆ

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* sp.

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้บนอาหาร glucose yeast malt agar (GYM) เนื่องจากอาหาร GYM เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีส และเชื้อรา *Colletotrichum* sp. โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แตะผงสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส streak ลงบนผิวหน้าอาหาร โดยให้ห่างจากจุดศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร (ภาพ 9) ทำการทดลองไอโซเลทละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อแอคติโนมัยซีสสามารถเจริญเติบโตและสร้างสารทุติยภูมิ เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีสเจริญเติบโตช้ากว่าเชื้อราสาเหตุ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะบริเวณขอบเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เพื่อใช้เป็นชุดทดสอบ ส่วนชุดควบคุมให้วางเชื้อราลงบนอาหาร GYM ที่ไม่มีเชื้อแอคติโนมัยซีส บ่มที่อุณหภูมิห้องจนกว่าเชื้อราในชุดควบคุมเจริญถึงตำแหน่งที่วางเชื้อแอคติโนมัยซีส บันทึกผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา จากนั้นคำนวณหาประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง



ภาพ 9 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีส ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี dual culture

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent inhibition of radial growth: PIRG)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(R1-R2) \times 100}{R1}$$

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

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

3.3 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส

เตรียม colloidal chitin (Hsu and Lockwood, 1975) โดยละลายผงไคตินที่ได้จากเปลือกปู (Fluka) 10 กรัม ด้วยกรดเข้มข้น H_3PO_4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน กรองด้วยผ้าขาวบางและล้างด้วยน้ำสะอาดจนกว่าจะได้ pH 6.2-7.2 นำ colloidal chitin ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{o}C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เก็บรักษา colloidal chitin ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เพื่อใช้ในการเตรียม colloidal chitin agar ต่อไป (ภาคผนวก ก)

เตรียม 15% colloidal chitin agar (CCA) (Hsu and Lockwood, 1975) (ภาคผนวก ก) โดยเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่อบฆ่าเชื้อแล้วแตะผงสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 120^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้มากกว่า 75% แตะลงบนอาหาร 4 จุดต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ทำการทดลองไอโซเลทละ 3 ซ้ำ) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และสังเกตวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นบนอาหาร CCA บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34 SEA120-4, SEA120-28 และ SEA120-38 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ 100% ในห้องปฏิบัติการ และสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง 15% colloidal chitin agar โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลท ในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอนในขวดชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ cork borer เจาะเชื้อแอคติโนมัยซีสที่เลี้ยงบนอาหาร glucose yeast malt agar (GYM) (ภาคผนวก ก) มาจำนวน 10 ชิ้น ลงในอาหารเหลว EPM นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35^{o}C เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นนำอาหาร EPM ที่เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสเป็นเวลา 15 วัน มาปั่นแยกเอาส่วนตะกอนของเชื้อแอคติโนมัยซีสออก ด้วยความเร็ว 6,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4^{o}C และอีกส่วนหนึ่งนำมากรองด้วยชุดกรองแบคทีเรีย (Minisart®) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกระดาษกรอง 0.2 ไมครอน (ดัดแปลงจากศิริลักษณ์, 2542)

เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร โดยเทชั้นแรกให้มีความหนาประมาณ 0.1 เซนติเมตร และชั้นที่สองหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร (double layer) รอจนผิวหน้าอาหารแห้งใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อห่างจากเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร โดยเจาะ 4 ตำแหน่งเพื่อใช้สำหรับหยอดอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดขอบโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ Cg24 (S), Cg49 (WR), Cc11 (MR), Cc53 (HR) และ Cg60 (HR) วางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมไว้ ใช้ไมโครไปเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) อย่างละ 20 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุม ส่วนชุดควบคุมหยอดเชื้อ *Bacillus subtilis* ผลิตภัณฑ์ทางการค้า ตามอัตราแนะนำเท่ากับ 1×10^{9} CFU/g ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และอาหาร EPM ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ภาพ 10) ทำการทดสอบไอโซเลทละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง และวัดการเจริญของเชื้อราสาเหตุ จากนั้นนำมาคำนวนหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดังนี้

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent inhibition of radial growth: PIRG)

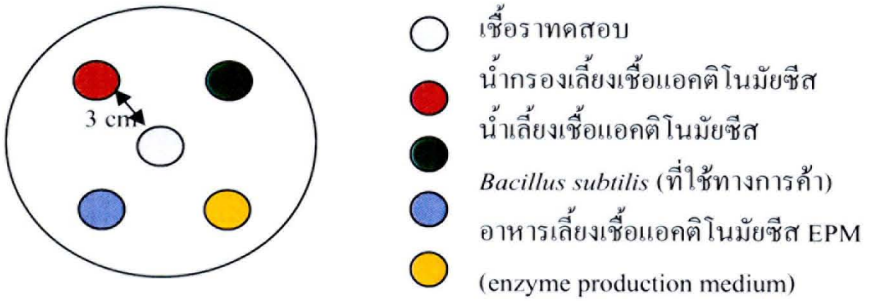
$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(R1-R2)\times 100}{R1}$$

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดทดสอบ

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

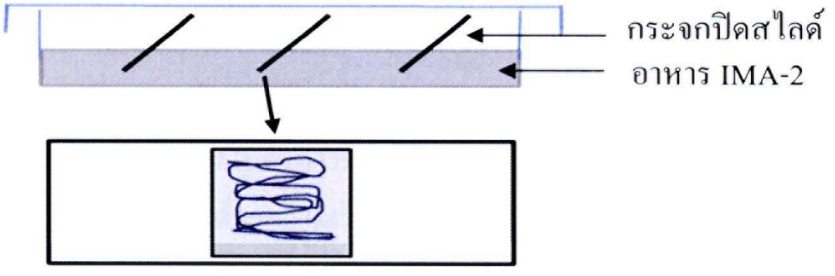
> 75	เปอร์เซ็นต์	=	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก
61-75	เปอร์เซ็นต์	=	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
51-60	เปอร์เซ็นต์	=	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
< 50	เปอร์เซ็นต์	=	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ



ภาพ 10 การทดสอบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช

3.5 การจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีส

ศึกษาและจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีส จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-4 และ SEA120-28 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และผลิตเอนไซม์ไคติเนสด้วยเทคนิค inclined coverslip โดยใช้ forcep จุ่มแอลกอฮอล์ผ่านไฟฆ่าเชื้อคีบกระจกปิดสไลด์ (cover slip) ปลอดเชื้อปักลงในอาหารเป็นมุม 45 องศา ให้ลึกลงไปในเนื้อวุ้นประมาณครึ่งแผ่น ในแต่ละส่วนของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ inhibitory mold agar (2IMA-2) (ภาพ 11) จากนั้นใช้ loop เขี่ยเชื้อที่ต้องการศึกษาขีดบนผิวหน้าอาหารบริเวณที่สัมผัสกับกระจกปิดสไลด์ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าเชื้อเจริญบนอาหาร จากนั้นนำกระจกปิดสไลด์ ที่ได้มาย้อมสีแบบ simple stain โดยหยดด้วยสารละลาย 0.1% crystal violet ทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที ใช้กระดาษทิชชูซับน้ำออกให้แห้ง นำไปตรวจดูลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 100X งามนิจ (2539) โดยเปรียบเทียบลักษณะต่างๆตามเอกสารของ Miyadoh (1997) และ Stanley *et al.* (1989) เพื่อจำแนกสกุลของเชื้อแอคติโนมัยซีส



ภาพ 11 การเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสด้วยเทคนิค inclined coverslip เพื่อศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส

3.5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบผนังเซลล์ diaminopimelic acid (DAP) ของเชื้อแอคติโนมัยซีส

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-4, SEA120-28 และ SEA120-38 มาวิเคราะห์หา diaminopimelic acid (DAP) ซึ่งเป็นองค์ประกอบภายในผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Lechevalier และ Lechevalier, 1970) โดยใช้วิธีการแยกสีของสารละลายมาตรฐานจากเทคนิคโครมาโทกราฟี thin layer chromatography (TLC) เทียบกับสารละลายมาตรฐาน 0.01 M *LL* and *meso* – A_2pm เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสในอาหารเลี้ยงเชื้อ non-sporulating medium (ภาคผนวก ก) เชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ใช้ระยะเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ ใช้ปลาย loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อขูดโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร non-sporulating medium ประมาณ 100 มิลลิกรัม ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุ 6 N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex เป็นเวลา 6 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 120°C ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลาประมาณ 20 นาที แล้วแยกส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้สารละลายที่ได้ใช้เป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์ DAP จากนั้นหยดสารละลายตัวอย่าง 3 ไมโครลิตร และสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนฐานของแผ่น TLC (TLC plate) จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ได้แช่ใน TLC tank ที่บรรจุ solvent system (methanol-distilled:water:HCl 6 N:pyridine อัตราส่วน 80:26:4:10 v/v) โดยใช้เวลาประมาณ 3-6 ชั่วโมง นำแผ่น TLC ออกมาทำให้แห้งใน fume hood ประมาณ 3-5 นาที แล้วฉีดพ่นด้วยสารละลาย 0.20% ninhydrin ให้ทั่วแผ่น นำไปบ่มที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที

3.5.2 การจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีสด้วย 16S rDNA

3.5.2.1 การเตรียมเชื้อแอคติโนมัยซีส และ การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-4, SEA120-28 และ SEA120-38 ใน flask ที่บรรจุอาหารเหลว yeast malt extract broth (YM broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ใช้ไมโครไปเปตดูดเชื้อแอคติโนมัยซีสที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติม 10.3% sucrose in water ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติม TSE-sucrose ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex เติม 500 mM EDTA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติม lysozyme

(10 mg/ml in TSE-sucrose) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มในเครื่องเขย่า (shaker) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 40 นาที เติม proteniase K (5 mg/ml in TSE) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที เติม 10% SDS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที แช่ไนโตรเจนเหลว 3 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที แช่ไนโตรเจนเหลว 3 นาที (ทำซ้ำกันประมาณ 5 ครั้งจนสังเกตเห็นว่าสารละลายที่ได้มีความหนืด) จากนั้นบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที นำมาบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที (ถ้ามีตะกอนให้ดูดส่วนใสใส่ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร อีกครั้ง) เติมเอทานอล 800 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาให้สารเข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 10-20 ไมโครลิตร

3.5.2.2 เพิ่มปริมาณยีนตำแหน่ง 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction)

นำดีเอ็นเอของเชื้อแอคติโนมัยซีส จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-4, SEA120-28 และ SEA120-38 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 27f forward (5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTCAG -3′) และ 1492r reverse (5′-GGC TAC CTT GTT ACG ACTT-3′) โดยผสมสารดังตาราง 9

ตาราง 9 ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ในการเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน 16S rDNA

สารประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x PCR buffer	5.0
dNTP mix	5.0
27f	1.0
1492r	1.0
DNA template	1.0
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	36
Taq DNA Polymerase	1
ปริมาตรรวม	**50**

เมื่อเติมส่วนผสมทุกอย่างครบแล้ว นำหลอด PCR tube ที่เตรียมพร้อมแล้วไปเข้าเครื่อง thermal cycler Programmable Thermal Controller PTC-200™ thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA) โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. initial denaturation ที่อุณหภูมิ 96°C เวลา 5 นาที
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เวลา 1 นาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 55°C เวลา 1 นาที
   extension ที่อุณหภูมิ 72°C เวลา 2 นาที
   } 35 รอบ
3. primer extension ที่อุณหภูมิ 72°C เวลา 3 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซีส โดยผสมผลผลิต PCR ที่ได้กับ 6X loading dye ในอัตราส่วน 5:1 ไมโครลิตร เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งใช้ λ DNA digested by *Hind III* ต่อ 6X loading dye ในอัตราส่วน 8:2 ไมโครลิตร จากนั้นต่อเครื่องอิเล็กโทรโฟริซิสเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำเจลตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพ จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มา purification ด้วยชุด NucleoSpin®Extract II จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค 16S rDNA

3.5.2.3 วิเคราะห์หาระดับความสัมพันธ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส (phylogenetic)

เมื่อได้ข้อมูลที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีส โดยอาศัยฐานข้อมูลจากอินเทอร์เน็ตของ National Center for Biotechnology Information ไปที่เว็ปไซต์ http://www.GenBank.ncbi.nlm.nih.gov) และ Ribosomal Database Project (www.rdp.cme.msu.edu) โดยเลือก BLAST ในการค้นหาและวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ คัดเลือกเชื้อที่ได้จากการวิเคราะห์ เพื่อนำมาเป็นข้อมูลอ้างอิงในการทำ phylogenetic tree จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเข้าโปรแกรม Phydit เพื่อจัดเรียงข้อมูล (alignment) จากนั้นนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์หาระดับความสัมพันธ์ของเชื้อ ด้วยโปรแกรม Treecon โดยกำหนดค่า Bootstrap เท่ากับ 1000

<u>การทดลองที่ 4:</u> การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส กับเมล็ดพันธุ์พริกและต้นกล้าพริก

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสกับเมล็ดพันธุ์พริก บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-4, SEA120-28 และ SEA120-38 ในอาหารเหลว EPM (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอนในขวดชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ cork borer เจาะเชื้อแอคติโนมัยซีสที่เลี้ยงบนอาหาร glucose yeast malt agar (GYM) (ภาคผนวก ก) มาจำนวน 10 ชิ้น ลงในอาหารเหลว EPM นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35^{o}C เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นนำอาหาร EPM ที่เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสเป็นเวลา 15 วัน มาปั่นแยกเอาส่วนตะกอนของเชื้อแอคติโนมัยซีสออก ด้วยความเร็ว 6,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4^{o}C (อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF)) และอีกส่วนหนึ่งนำมากรองด้วยชุดกรองแบคทีเรีย Minisart® ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกระดาษกรอง 0.2 ไมครอน (อาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F)) ดัดแปลงจาก ศิริลักษณ์, 2542

นำเมล็ดพริกหนุ่มพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์การค้า ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดตามวิธีการของ Errakhi *et al.* (2007) โดยแช่ในสารละลาย 2% sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมาแช่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F ไอโซเลท OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 โดยแช่เมล็ดจำนวน 100 เมล็ด ในแต่ละกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1: ชุดควบคุม แช่เมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 2: ชุดควบคุม แช่เมล็ดพริกพันธุ์การค้า ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 3: ชุดควบคุม แช่เมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EPM เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 4: ชุดควบคุม แช่เมล็ดพริกพันธุ์การค้า ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EPM เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 5: ชุดควบคุม แช่เมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง ใน *B. subtilis** ผลิตภัณฑ์ทางการค้า ตามอัตราแนะนำ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 6: ชุดควบคุม แช่เมล็ดพริกพันธุ์การค้า ใน *B. subtilis* ผลิตภัณฑ์ทางการค้า ตามอัตราแนะนำ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 7: แช่เมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง ใน NF ไอโซเลท OMA60-7 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 8: แช่เมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง ใน F ไอโซเลท OMA60-7 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 9: แช่เมล็ดพริกพันธุ์การค้า ใน NF ไอโซเลท OMA60-7เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 10: แช่เมล็ดพริกพันธุ์การค้า ใน F ไอโซเลท OMA60-7เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 11: แช่เมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง ใน NF ไอโซเลท SEA60-34 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 12: แช่เมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง ใน F ไอโซเลท SEA60-34 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 13: แช่เมล็ดพริกพันธุ์การค้า ใน NF ไอโซเลท SEA60-34 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 14: แช่เมล็ดพริกพันธุ์การค้า ใน F ไอโซเลท SEA60-34 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 15: แช่เมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง ใน NFไอโซเลท SEA120-28 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 16: แช่เมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง ในF ไอโซเลท SEA120-28 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 17: แช่เมล็ดพริกพันธุ์การค้า ใน NF ไอโซเลท SEA120-28 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 18: แช่เมล็ดพริกพันธุ์การค้า ใน F ไอโซเลท SEA120-28 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

* *Basillus subtilis* = อัตราแนะนำเท่ากับ 1×10^{9} CFU/g

จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์พริกที่ผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F ไอโซเลทต่างๆ มาผึ่งให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อ ก่อนนำไปเพาะบนกระดาษชื้น (blotter method) โดยนำเมล็ดพริกวางบนกระดาษเพาะในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ซึ่งภายในบรรจุกระดาษกรอง Whatman No.1 จำนวน 1 แผ่น ไว้ด้านบนกระดาษฟาง 3 แผ่น ที่ชุบน้ำจนชุ่มไว้ด้านล่าง วางเมล็ดพริกจำนวน 25 เมล็ดต่อจาน โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ ตรวจสอบการงอกของเมล็ดพริก และวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การงอกเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. กับต้นกล้าพริก ในสภาพโรงเรือน

4.2.1 การทดสอบกับต้นกล้าพริกที่เมล็ดผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส

นำเมล็ดพริกหนุ่มพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์การค้า มาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดตามวิธีการของ Errakhi *et al.* (2007) โดยแช่ในสารละลาย 2% sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมาแช่ด้วยอาหารลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารแลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) ไอโซเลท จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 จากนั้นนำเมล็ดพริกมาเพาะในดินที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

ทดสอบการเกิดโรคกับต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดพริกที่แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติมัยซีส โดยเตรียม spore suspension เพื่อใช้เป็น inoculum ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท Cg60 (HR) โดยเลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท Cg60 (HR) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกว่าเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อราสาเหตุเจริญอยู่ ใช้แผ่นสไลด์ขูดโคโลนีของเชื้อรา เพื่อให้สปอร์ของเชื้อราหลุดออก จากนั้นกรองเอาเส้นใยของเชื้อราสาเหตุออกด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตรวจนับความเข้มข้นของสปอร์เชื้อราด้วย haemacytometer ปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ผสมสารจับใบ Tween-20 จำนวน 3 หยด/10 มิลลิลิตร เพื่อช่วยในการกระจายตัวของสปอร์เชื้อรา และการเกาะติดผิวใบพืช จากนั้นพ่น inoculum บนต้นกล้าพริกที่ทำแผลจำนวน 20 แผล/ใบ โดยทำ 4 ใบ/ต้น กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ จากนั้นใช้ถุงพลาสติกคลุมต้นกล้าพริกเพื่อรักษาความชื้น บันทึกผลการเกิดโรคภายหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 10 วัน และคำนวนเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD สังเกตการเกิดโรค บันทึกอาการและประเมินความรุนแรงของโรค จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

การประเมินการเกิดโรคโดยให้ระดับต่างๆ ดังนี้ (สืบศักดิ์, 2540)

ระดับ 0 = ไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 1 = จำนวนแผลที่เกิดบนใบ 1-25%

ระดับ 2 = จำนวนแผลที่เกิดบนใบ 26-50%

ระดับ 3 = จำนวนแผลที่เกิดบนใบ 51-75%

ระดับ 4 = จำนวนแผลที่เกิดบนใบ 76-100%

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (สืบศักดิ์, 2540)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (\%)} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่ม}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของการเป็นโรค}}$$

4.2.2 การฉีดพ่นอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสกับต้นกล้าพริก

นำต้นกล้าพริกหนุ่ม พันธุ์การค้าอายุ 45 วัน มาทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) โดยฉีดพ่นอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสก่อน หรือหลังการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท Cg60 (HR) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยเตรียม spore suspension ตามวิธีการในข้อ 4.2.1 จากนั้นใช้ถุงพลาสติกคลุมต้นกล้าพริกเพื่อรักษาความชื้น กรรมวิธีในการทดลองมีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1: ชุดควบคุม ไม่ทำการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp.

กรรมวิธีที่ 2: ชุดควบคุม ทำแผล แล้วปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

กรรมวิธีที่ 3: ชุดควบคุม ทำแผล แล้วฉีดพ่นอาหารเหลว EPM

กรรมวิธีที่ 4: ชุดควบคุม ฉีดพ่น *B. subtilis* ผลิตภัณฑ์ทางการค้า ตามอัตราแนะนำ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วปลูกเชื้อราสาเหตุ

กรรมวิธีที่ 5: ชุดควบคุม ปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วฉีดพ่น *B. subtilis* ผลิตภัณฑ์ทางการค้า ตามอัตราแนะนำ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 6: ฉีดพ่น NF ไอโซเลท OMA60-7 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำแผล และปลูกเชื้อสาเหตุ

กรรมวิธีที่ 7: ฉีดพ่น NF ไอโซเลท SEA60-34 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำแผล และปลูกเชื้อสาเหตุ

กรรมวิธีที่ 8: ฉีดพ่น NF ไอโซเลท SEA120-28 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำแผล และปลูกเชื้อสาเหตุ

กรรมวิธีที่ 9: ฉีดพ่น F ไอโซเลท OMA60-7 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำแผล และปลูกเชื้อสาเหตุ

กรรมวิธีที่ 10: ฉีดพ่น F ไอโซเลท SEA60-34 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำแผล และปลูกเชื้อสาเหตุ

กรรมวิธีที่ 11: ฉีดพ่น F ไอโซเลท SEA120-28 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำแผล และปลูกเชื้อสาเหตุ

กรรมวิธีที่ 12: ทำแผล และปลูกเชื้อราสาเหตุ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ฉีดพ่น NF ไอโซเลท OMA60-7
กรรมวิธีที่ 13: ทำแผล และปลูกเชื้อราสาเหตุ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ฉีดพ่น NF ไอโซเลท SEA60-34
กรรมวิธีที่ 14: ทำแผล และปลูกเชื้อราสาเหตุ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ฉีดพ่น NF ไอโซเลท SEA120-28
กรรมวิธีที่ 15: ทำแผล และปลูกเชื้อราสาเหตุ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ฉีดพ่น F ไอโซเลท OMA60-7
กรรมวิธีที่ 16: ทำแผล และปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ฉีดพ่น F ไอโซเลท SEA60-34
กรรมวิธีที่ 17: ทำแผล และปลูกเชื้อราสาเหตุ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ฉีดพ่น F ไอโซเลท SEA120-28

* *Basillus subtilis* = อัตราแนะนำเท่ากับ 1×10^{9} CFU/g

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD โดยทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ต้น โดยทำแผล 4 ใบ/ต้น จำนวน 20 แผล/ใบ สังเกตการเกิดโรค บันทึกอาการและประเมินความรุนแรงของโรค จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

4.3 ทดสอบการก่อให้เกิดโรคของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสกับต้นกล้าพริก ในสภาพโรงเรือน

การทดสอบการเกิดโรคของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) จำนวน 6 ไอโซเลท โดยทำแผลต้นกล้าพริกที่มีอายุ 45 วัน จำนวน 20 แผล/ใบ โดยทำแผล 4 ใบ/ต้น กรรมวิธีละ 3 ต้น หลังจากฉีดพ่นด้วย NF และ F ใช้ถุงพลาสติกคลุมต้นกล้าพริกเพื่อรักษาความชื้น

กรรมวิธีที่ 1: ชุดควบคุม ไม่ทำการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp.
กรรมวิธีที่ 2: ชุดควบคุม ฉีดพ่นด้วยอาหารเหลว EPM
กรรมวิธีที่ 3: ฉีดพ่นด้วย NF ไอโซเลท OMA60-7
กรรมวิธีที่ 4: ฉีดพ่นด้วย F ไอโซเลท OMA60-7
กรรมวิธีที่ 5: ฉีดพ่นด้วย NF ไอโซเลท SEA60-34
กรรมวิธีที่ 6: ฉีดพ่นด้วย F ไอโซเลท SEA60-34
กรรมวิธีที่ 7: ฉีดพ่นด้วย NF ไอโซเลท SEA120-28
กรรมวิธีที่ 8: ฉีดพ่นด้วย F ไอโซเลท SEA120-28