บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 1 เพื่อให้ได้เชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค

เพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 1 ได้ดำเนินการดังนี้

1. รวบรวมเชื้อไรโซเบียม และเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB เพื่อทำการทดสอบ

1.1 การรวบรวมและเก็บตัวอย่าง

เชื้อไรโซเบียม และเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB ได้ถูกรวบรวมเพื่อทำการทดสอบจากสองแนวทาง โดยแนวทางที่หนึ่งได้รวบรวมจากเชื้อไรโซเบียมที่ได้ถูกคัดแยกไว้แล้วจากปมของพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) ซึ่งรวบรวมโดยกรมวิชาการเกษตร ในขณะที่กลุ่ม PGPB นั้นได้จากเชื้อที่รวบรวมไว้โดยสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ม.เทคโนโลยีสุรนารี และแนวทางที่สอง คือ การสุ่มเก็บตัวอย่างปม และรากพืชตระกูลถั่วจากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศ จากนั้นทำการคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากปม หรือคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืช

1.2 การคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมรากพืชตระกูลถั่ว

แยกเชื้อไรโซเบียม ตามวิธีของ Somasegaran และ Hoben (1994) โดยทำการฆ่าเชื้อบนผิวปมก่อน จากนั้นนำปมที่ได้มาผ่าแล้วใช้ loop เขี่ยเชื้อเผาไฟ แตะภายในปมรากพืช นำมา streak บนอาหาร yeast extract mannito agar (YMA) บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส จำนวน 3-7 วัน เลือกเก็บโคโลนีของไรโซเบียมเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

1.3 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB จากบริเวณรอบรากพืช

เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPB นี้หากเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืช จะสามารถเรียกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้ว่าเป็น Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) ซึ่งสามารถคัดแยกได้โดยนำรากพืชที่ต้องการแยกเชื้อมาล้างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 3 ครั้ง เพื่อล้างดินและเชื้อจุลินทรีย์ที่จับอยู่กับรากพืชแบบหลวม ๆ ออกไปก่อน จากนั้นทำการ vortex รากพืชในน้ำกลั่นปลอดเชื้อนาน 10 นาที เพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ยึดจับกับผิวรากได้ดีออกมา แล้วนำไป spread บนอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน Burk's **N**-free agar medium (100 ไมโครลิตร ต่อ 1 plate) บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส จำนวน 2-4 วัน เลือกเก็บโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อให้เชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการตรึงไนโตรเจนให้แก่พืช

2. คัดเลือกเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า โดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*)

ทดสอบความสามารถของเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่รวบรวมได้ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าที่สำคัญ คือ *Fusarium* spp., *Didymella* spp., *Aspergillus niger* และ *Rhizoctonia* sp. ทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิดบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วนำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราฝังอยู่มาทดสอบบนอาหาร nutrient agar (NA) โดยวางชิ้นวุ้นเชื้อราบริเวณกลาง plate จากนั้นเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่ต้องการทดสอบใน plate เดียวกันกับเชื้อรานั้น ๆ โดยเว้นระยะห่างจากเชื้อราเท่า ๆ กัน จำนวน 4 ซ้ำ แล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการเจริญของเชื้อราว่าถูกยับยั้งโดยเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่นำมาทดสอบหรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับชิ้นวุ้นเชื้อราที่ปล่อยให้เจริญเป็นอิสระ (control) จากนั้นประเมินศักยภาพเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Percent Inhibition of Diameter Growth = PIDG) ตามวิธีของ Verma and Kharwar (2006) ทั้งนี้เชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีจะถูกนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

วัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 2 เพื่อให้ทราบปริมาณของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการเกาะติดกับรากถั่วลิสง

เพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 2 ได้ดำเนินการดังนี้

3. การหาปริมาณของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการเกาะติดกับรากถั่วลิสง

เนื่องจากโรครากเน่าที่พบในถั่วลิสงซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Aspergillus niger* เป็นโรคที่พบได้ทั่วไป และสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรเป็นอย่างมากเนื่องจากเชื้อรานี้สามารถแพร่กระจายได้ง่ายในดิน และยังสามารถฝังตัวติดอยู่ในเมล็ดถั่วลิสงได้ ทำให้การนำเมล็ดถั่วลิสงไปปลูกในครั้งต่อไปยังคงพบปัญหาโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้โรครากเน่าที่พบในถั่วลิสงซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *A. niger* เป็นต้นแบบในการศึกษา ทั้งนี้ได้ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการเกาะติดกับรากถั่วลิสง โดยนำเมล็ดถั่วลิสงมาทำการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวเมล็ด ด้วยแอลกอฮอล์ 95 % เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง แล้วแช่ใน 6% แคลเซียมไฮโปคลอไลด์ เป็นเวลา 3 นาที เสร็จแล้วล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่ง

ฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพาะในภาชนะปิดปลอดเชื้อเป็นเวลา 2-3 วัน ที่ความชื้นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ จนสังเกตเห็นรากของต้นถั่วงอกออกมา จากนั้นนำเมล็ดที่งอกรากแล้วเล็กน้อยไปเพาะต่อใน หลอดทดลอง ขนาด 2 × 15 นิ้ว โดยภายในหลอดบรรจุ N- Free Nutrient Solution ที่มีการเติม 0.5% KNO_3 ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชตามวิธีของ Somasegaran และ Hoben (1994) และตาข่ายเจาะรู้กว้างพอที่จะให้รากถั่วเจริญแต่เมล็ดไม่สามารถรอดตาข่ายได้โดยวางสูงห่างจากระดับผิวน้ำภายในหลอด 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำเมล็ดที่งอกแล้ว วางบนตาข่ายโดยให้รากผ่านรูที่เจาะไว้ และทำการหยอดเชื้อ PGPR ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญมีจำนวน เชื้อที่ 10^8 เซลล์ ลงไปบนเมล็ดในแต่ละหลอด ปิดฝาหลอดทดลองด้วยอะลูมิเนียมฟอย เลี้ยงในห้องทึบแสง เป็นเวลา 7 วัน ทำการตัดรากแก้ว ขนาด 1 เซนติเมตร มาทำการล้างด้วย 0.05% Tween 20 และล้างด้วยน้ำเปล่า 1 ครั้ง นำรากถั่วที่ได้ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บรรจุน้ำฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำรากไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง และหาน้ำหนักแห้ง นำน้ำที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ไปทำการเจือจางเพื่อนับจับจำนวนโคโลนีด้วยวิธี Plate count (10 folds dilution) แล้วนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจนับจำนวนเชื้อในแต่ละการเจือจาง คำนวณหาค่า Colony Forming Unit (CFU) จากนั้นคำนวณเป็นค่า log CFU ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของรากถั่ว

วัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 3 เพื่อให้ทราบชนิดของเชื้อ PGPR ที่คัดเลือก

เพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 3 ได้ดำเนินการดังนี้

4. ระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม PGPR ที่คัดเลือกได้ โดยวิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

4.1 การสกัด genomic DNA จากเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว Nutrient broth medium (NB) จนกระทั่งเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ late log phase จากนั้นสกัด genomic DNA ตามวิธีการของ Somasegaran และ Hoben (1994) จากนั้นละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่สกัดได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1 % agarose gel จากนั้นเก็บ DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ – 20°C เพื่อทำการศึกษาต่อไป

4.2 การเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำ genomic DNA ที่สกัดได้จากเชื้อจุลินทรีย์มาเพิ่มปริมาณในส่วนของลำดับเบสของ ribosomal DNA ในบริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ FD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') และ RP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3') นำไปเข้าเครื่อง Thermal cycle ที่สภาวะ 94 องศาเซลเซียส 3นาที จำนวน 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 63 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 2 วินาที จำวนวน 30 รอบ, และ 72 องศาเซลเซียส จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1 % agarose gel และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบกับฐานข้อมูลในเว็บไซด์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast เพื่อระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบได้ในระดับ genus และ specie

วัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 4 เพื่อให้ทราบถึงการอยู่ร่วมกันได้ของเชื้อ PGPR กับ เชื้อไรโซเบียม (*Bradyrhizobium* sp. TAL173)

เพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 4 ได้ดำเนินการดังนี้

5. การทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อ PGPR กับ เชื้อไรโซเบียม

เชื้อไรโซเบียม (*Bradyrhizobium* sp. TAL173) เป็นเชื้อที่ทางกรมวิชาการเกษตรแนะนำแก่เกษตรกรในการใช้คลุกกับเมล็ดถั่วลิสงก่อนการเพาะปลูก จึงได้นำมาใช้เป็นหัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนให้แก่ต้นถั่วลิสง และเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในถั่วลิสง *(Aspergillus niger)* มาใช้ในรูปแบบหัวเชื้อผสม ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบการเจริญร่วมกันของเชื้อทั้งสองชนิด โดยเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมในจานเลี้ยงเชื้อ ที่บรรจุอาหาร NA โดย spread เชื้อให้ทั่วบนผิวหน้าอาหาร หลังจากนั้นประมาณ 3 -4 วัน ทำการปลูกเชื้อ PGPR ลงภายหลัง บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วตรวจการยับยั้งการเจริญของเชื้อไรโซเบียมโดยเชื้อ PGPR ซึ่งสังเกตได้จากบริเวณใสรอบโคโลนีของ PGPR (Inhibition Zone)

วัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 5 เพื่อให้ทราบปริมาณของเชื้อราที่สามารถก่อให้เกิดอาการโรครากเน่าในพืช และปริมาณของเชื้อ PGPR ที่สามารถป้องกันอาการโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา ได้

เพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 5 ได้ดำเนินการดังนี้

6. การทดสอบหาปริมาณเชื้อราที่สามารถก่อให้เกิดอาการของโรครากเน่าในพืช

เชื้อราก่อโรครากเน่าขาดที่มีสาเหตุมาจาก *A. niger* ได้นำไปทดสอบกับถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 เพื่อทดสอบหาปริมาณเชื้อราที่สามารถก่อให้เกิดอาการโรครากเน่าในพืช โดยนำเมล็ดถั่วลิสงที่ต้องการทดสอบมาทำการฆ่าเชื้อที่อยู่บนผิวเมล็ด ทำการใส่เชื้อราที่ต้องการทดสอบให้กับพืช โดยเชื้อราจะถูกเตรียมให้อยู่ในรูป cell suspension ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จนเชื้อราเจริญเต็ม plate จากนั้นนำเซลล์ของเชื้อราที่ได้ทั้งหมดใน plate ผสมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (5 ml ต่อ plate) แล้วขูดเบา ๆ เพื่อคัดแยกเฉพาะส่วนของสปอร์ จากนั้นนำไปคลุกกับเมล็ดถั่วลิสงในจำนวนสปอร์ปริมาณต่าง ๆ ตั้งแต่ 10^1 ถึง 10^7 conidia ต่อ มิลลิลิตร แล้วเพาะเมล็ดถั่วลิสงที่คลุกกับสปอร์ของเชื้อราแล้วในดินปลอดเชื้อที่บรรจุในกระถางทดสอบ เพื่อทำการบันทึกการเจริญของพืช อาการโรคของพืช และบันทึกปริมาณสปอร์ของเชื้อราที่ก่อให้เกิดอาการโรคพืช เพื่อใช้เป็นปริมาณของเชื้อราที่จะทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ทั้งนี้อาการติดเชื้อได้แบ่งเป็นเปอร์เซ็นต์การติดโรคจากการสังเกตสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* ที่มีลักษณะเป็นสีดำ (Black mold) เทียบกับจำนวนต้นที่ปลูก และให้คะแนนการเกิดโรคตามวิธีการของ Ziedan (2006) ดังนี้

0 = ไม่แสดงการเป็นโรคใด ๆ (No symptoms (healthy plant)),

1 = ใบพืชมีสีเหลือง ¼ ของใบ

2 = ใบพืชมีสีเหลือง ½ ของใบ

3 = ใบพืชมีสีเหลือง ¾ ของใบ และมีจุดสีน้ำตาลไหม้บนใบ

4 = พืชเหี่ยวแห้งและตาย

7. การทดสอบหาปริมาณของเชื้อ PGPR ที่สามารถป้องกันอาการโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราได้

ทำการเลี้ยงเชื้อ PGPR ในอาหาร NB จนกระทั่งเชื้อเจริญเข้าสู่ late log phase ทำการนับจำนวนเซลล์ของเชื้อ PGPR โดยวิธี Total plate count จากนั้นเตรียมเชื้อ PGPR ทั้งหมด 5 ระดับความ

เข้มข้น คือ เชื้อ PGPR ปริมาณความเข้มข้นจาก 10^4 ถึง 10^8 cells/ml จากนั้นเตรียมเมล็ดถั่วลิสงโดยทำการฆ่าเชื้อที่อยู่บนผิวเมล็ด แล้วคลุกเมล็ดด้วยปริมาณเชื้อราที่ได้จากข้อ 6 แล้วทำการหยอดเชื้อ PGPR ในปริมาณต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ (1 มิลลิลิตรต่อเมล็ด) โดยปลูกถั่วลิสง 2-3 เมล็ดต่อกระถางทดสอบ สังเกตการเจริญของถั่วลิสงที่ใส่เชื้อ PGPR ในการควบคุมโรค จากนั้นบันทึกระดับอาการของโรคพืช และปริมาณเชื้อ PGPR ที่สามารถป้องกันอาการโรคได้

วัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 6 เพื่อให้ทราบประสิทธิภาพของหัวเชื้อไรโซเบียมที่ผสมกับเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมการเกิดโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดถั่วลิสง และประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

เพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ย่อยข้อที่ 6 จะดำเนินการดังนี้

8. การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อไรโซเบียมที่ผสมกับเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมการเกิดโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดถั่วลิสง และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วลิสง

จากการตรวจสอบในข้อ 7 ตรวจสอบการส่งเสริมการเจริญของพืชได้จากการนับจำนวนปม การหาน้ำหนักปมแห้ง น้ำหนักต้นแห้ง และน้ำหนักรากแห้ง และคำนวณทางสถิติโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SPSS