วิธีดำเนินการวิจัย

1. การรวบรวมและเตรียมตัวอย่างเชื้อรา

1.1 การรวบรวมตัวอย่างเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.

รวบรวมเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จากการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้โดย พรพรรณ (2543) สุวิตา (2549) วรรณดี บัญญัติรัชตะ, มาลัยพร เชื้อบัณฑิต และสาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้รวบรวมและตรวจสอบแล้วว่าเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช

2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวัสดุที่ใช้ในการขยายเชื้อรา *Trichoderma* spp.

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลต มาทดสอบขยายเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณโดยใช้วัสดุ 3 ชนิด คือ เมล็ดข้าวฟ่าง, ข้าวหัก และแกลบร่วมกับรำข้าว เตรียมหัวเชื้อข้าวฟ่างโดยนำข้าวฟ่างแช่ในน้ำทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน ข้าวหักแช่น้ำ 2 ชั่วโมง นำแกลบผสมร่วมกับรำข้าวในอัตราส่วน 1:2 คลุกเคล้าให้เข้ากันเติมน้ำเพื่อให้มีความชื้นที่พอเหมาะบรรจุใส่ขวด นำวัสดุทั้ง 3 บรรจุใส่ขวดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น ใช้ cork borer เจาะปลายเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วันวางในขวดวัสดุขยายเชื้อทั้ง 3 ชนิด ปิดปากขวดแล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ±2 °ซ) เมื่อครบ 2 วันทำการกลับเชื้อโดยเขย่าขวดไปมาให้เส้นใยแตกหัก บ่มต่ออีกจนครบ 7 วัน จากนั้นนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. นำค่า colony forming unit (cfu)/ กรัม ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in completely randomized design ซึ่งมี 3 กรรมวิธี (วัสดุขยายเชื้อ 3 ชนิด) กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ เพื่อคัดเลือกวัสดุขยายเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เหมาะสมที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการชักนำให้แตงเทศสร้างความต้านทานต่อโรคต้นแตกยางไหลที่เกิดจากเชื้อรา *Didymella bryoniae*

3.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อราสาเหตุโรคต้นแตกยางไหล

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาเลี้ยงบน PDA 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง 28 ±2 องศาเซลเซียส จากนั้นเจาะด้วย cork borer บริเวณปลายเส้นใย นำไปวางบนอาหาร PDA โดยวางชิดขอบด้านใดด้านหนึ่ง อีกด้านหนึ่งวางเชื้อ *D. bryoniae* (เลี้ยงบน PDA 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง 28 ±2 องศาเซลเซียส) สาเหตุโรคต้นแตกยางไหลของแตงเทศ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 28 ±2 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดการเจริญของเชื้อทุกวัน จนครบ 7 วันจึงนำค่าไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ ใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2 การทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

เพาะต้นกล้าแตงเทศพันธุ์อ่อนแอ จากบริษัท ซีนเมล็ดพันธุ์ จำกัด ในพีทมอส และย้ายลงปลูกในกระถางเมื่อกล้าอายุ 10 วัน โดยใช้ดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วซึ่งเป็นดินสำเร็จรูป (ตราหลักสิบ) ผสมกับทรายและพีทมอสในอัตราส่วน 2:1:1 โดยปริมาตร ผสมหัวเชื้อ *Trichoderma* ที่ได้จากข้อ 2 ลงในดินที่จะใช้ปลูกต้นแตงเทศ กระถางละ 20 กรัม/ดิน 1,000 กรัม หลังจากย้ายปลูกแตงเทศ 7 วัน ใช้ cork

borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซ.ม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะอาหารที่มีเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* ซึ่งเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 7 วัน แล้วใช้เข็มเขี่ยปลอดเชื้อย้ายชิ้นวุ้นเชื้อรามาวางบนใบแตงเทศที่ทำแผลแล้ว (โดยปลูกเชื้อต้นยัง 2 ใบ) ปิดทับชิ้นวุ้นด้วยสก๊อตเทปใส จากนั้น 5 วัน เก็บผลการทดลองโดยวัดความยาวและความกว้างของแผลที่เกิดขึ้น สำหรับการปลูกเชื้อรา *D. bryoniae* ที่ลำต้น (หลังจากย้ายปลูกแตงเทศ 14 วัน) ทำเช่นเดียวกับปลูกเชื้อที่ใบแตงเทศ ประเมินการเป็นโรคโดยวัดความยาวของแผลที่เกิดขึ้นที่ลำต้นหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 10 วัน วัดความยาวแผลตามแนวยาวของลำต้น โดยวัดทั้งหมด 3 ต้น นำข้อมูลความยาวแผลไปวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ Mstat เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีโดยใช้ Duncan's Multiple Rang Test (DMRT)

3.3 การทดสอบในสภาพแปลงปลูกขนาดเล็ก

เตรียมดินให้ร่วนและฆ่าเชื้อในดินแปลงปลูกขนาดเล็กโดยราดฟอร์มาลีน:น้ำ (1:24 โดยปริมาตร) ในแปลงปลูกให้ชุ่ม คลุมแปลงด้วยพลาสติกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นเปิดพลาสติดคลุมแปลงออกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายปลูกต้นกล้าแตงเทศหลังมีใบจริง 4 ใบ โดยรองก้นหลุมด้วยหัวเชื้อ *Trichoderma* ที่ได้จากข้อ 2 ลงในแปลงที่จะใช้ปลูกต้นแตงเทศ หลุมละ 20 กรัม หลังจากนั้นทำการปลูกเชื้อและบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบในเรือนทดลอง

4. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของแตงเทศโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ซึ่งมี 16 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำ ทำการทดลองโดยย้ายปลูกต้นกล้าแตงเทศโดยกรรมวิธีทดลองที่ 1 ปลูกแตงเทศในดินนึ่งฆ่าเชื้อและกรรมวิธีทดลองที่ 2-16 ปลูกแตงเทศในดินที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. 15 ไอโซเลตเพาะแตงเทศพันธุ์อ่อนแอของบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ ย้ายปลูกเมื่ออายุ 2 สัปดาห์ลงในกระถางขนาดความจุปริมาตร 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยผสมหัวเชื้อ *Trichoderma* ที่ได้จากข้อ 2 ลงในดินที่จะใช้ปลูกต้นแตงเทศ กระถางละ 20 กรัม/ดิน 1,000 กรัม หลังปลูกเชื้อครบ 15 วัน วัดการเจริญเติบโตของต้นแตงเทศ โดยประเมินจากน้ำหนักสดน้ำหนักแห้งของต้นและราก โดยตัดบริเวณโคนต้นที่เป็นจุดเชื่อมต่อของสวนรากที่มีสีขาวและส่วนลำต้นที่มีสีเขียวเพื่อแบ่งส่วนลำต้นและส่วนราก นำไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80°ซ เป็นเวลา 3 วัน นำออกมาชั่งน้ำหนัก นำข้อมูลน้ำหนักสดและแห้งที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ Mstat เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกรรมวิธี โดยใช้ Duncan's Multiple Rang Test

5. ตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในการครอบครองรากพืช

วางแผนการทดลองแบบ CRD ซึ่งมี 16 กรรมวิธีๆ ละ 3 ซ้ำ ทำการทดลองโดยย้ายปลูกต้นกล้าแตงเทศโดยกรรมวิธีทดลองที่ 1 ปลูกแตงเทศในดินนึ่งฆ่าเชื้อและกรรมวิธีทดลองที่ 2-16 ปลูกแตงเทศในดินที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. 15 ไอโซเลต เพาะต้นกล้าแตงเทศพันธุ์อ่อนแอต่อโรคของบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ ย้ายปลูกเมื่ออายุ 2 สัปดาห์ลงในกระถางขนาดความจุปริมาตร 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยผสมหัวเชื้อ *Trichoderma* ที่ได้จากข้อ 2 ลงในดินที่จะใช้ปลูกต้นแตงเทศ กระถางละ 20 กรัม/ดิน 1,000 กรัม หลังปลูกเชื้อครบ 14 วัน ตรวจหาเปอร์เซนต์การครอบครองราก โดยใช้ส่วนของปลายราก โดยวิธีล้างรากให้สะอาดด้วยน้ำเปล่าโดยการผ่านน้ำไหล จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง จากนั้นตัดแยกส่วนของปลายขึ้นมา 3 ซม. (ตัดปลายรากทีละครึ่งเซนติเมตร) ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออีก 1 ครั้ง จากนั้นซับชิ้นรากด้วยกระดาษทิชชู่นึ่งฆ่าเชื้อ ซับให้แห้ง จึงย้ายลง

วางในจานอาหาร WA โดยวางจำนวน 10 ชิ้นต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ 3 วัน ตรวจเปอร์เซนต์การครอบครองรากของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

6. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายในใบแตงเทศจากการชักนำให้สร้างความต้านทานโรคโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลต(เหมือนในข้อ 3) จากนั้นเก็บใบแตงเทศในวันที่ 0, 5, 10 และ 15 หลังจากปลูกเชื้อ จากนั้นนำใบแตงเทศมาบดเพื่อสกัดโปรตีน โดยชั่งตัวอย่างใบแตงเทศน้ำหนัก 0.5 กรัม มาบดตัวอย่างในโกร่งที่เย็นจัด เติม 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.0 (sodium acetate trihydrate 13.6 g/ H_2O 1 ลิตร ปรับ pH ด้วย 1 N acetic acid) ปริมาณ 1,200 ไมโครลิตร เทตัวอย่างใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใส (supernatant) นำไปเก็บที่ –20°ซ จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

วัดปริมาณความเข้มข้นโปรตีน โดยนำ crude proteins ที่สกัดได้มาวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

6.1 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase นำ crude protein ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มร่วมกับสารละลาย colloidal chitin 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M acetate buffer pH5.0 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Saksirirat and Hoppe, 1991) หยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปต้มในน้ำเดือด 100°ซ นาน 20 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีการของ Somogyi (1952) กิจกรรมของเอนไซม์ประเมินจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (N-acetylglucosamine equivalent) คิดเป็น µmol ที่ถูกย่อยออกจาก colloidal chitin ใน 1 ชั่วโมงต่อ mg protein ใน reaction mixture

6.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase นำ crude protein ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มร่วมกับสารละลายลามินาริน (laminarin) 0.09 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M acetate buffer, pH 5.0 จำนวน 0.9 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Saksirirat and Hoppe, 1991) ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) ที่ถูกย่อยออกจากลามินาริน ตามวิธีของ Somogyi (1952) กิจกรรมของเอนไซม์ประเมินจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) คิดเป็นµmol ที่ถูกย่อยออกจากลามินารินใน 1 ชั่วโมงต่อ mg protein ใน reaction mixture

6.3 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ protease นำ crude protein บ่มร่วมกับสารละลายเคซีน (casein) 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 จำนวนอย่างละ 1.0 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย trichloroacetic acid 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3.0 มิลลิลิตร นำส่วนน้ำใส (supernatant) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร มาทดสอบโดยเติม 0.4 M sodium carbonate (Na_2CO_3) จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม Folin-ciocalteuphenol's reagent จำนวน 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (nm) ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ถูกย่อยออกจากเคซีน เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ tyrosine เป็นกรดอะมิโนมาตรฐาน ดัดแปลงตามวิธีของ Yang และ Wang (1999) กิจกรรมของเอนไซม์ประเมินจากปริมาณกรดอะมิโน [amino acid (tyrosine equivalent)] คิดปริมาณเป็น µmol ที่ถูกย่อยออกจากเคซีนใน 1 ชั่วโมงต่อ mg protein ใน reaction mixture