

บทที่ 3

วิธีการศึกษา

1. การสำรวจและประเมินความรุนแรงของโรครากปม

1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

สำรวจแปลงปลูกพืชที่เป็นโรครากปมพร้อมเก็บตัวอย่างดินและรากจากพืชชนิดต่าง ๆ จำนวน 16 ชนิดจาก 31 แปลงปลูกในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง 6 จังหวัดได้แก่ อุบลราชธานี ขุขันธ์ ศรีสะเกษ สุรินทร์ บุรีรัมย์ และนครราชสีมา โดยเก็บตัวอย่างใน 3 ลักษณะ คือ ต้นพืชแสดงอาการเหลืองหรือแคระแกร็น รากเป็นปม (S-RK) ต้นพืชไม่แสดงอาการของโรค แต่รากเป็นปม (NS-RK) และต้นพืชไม่มีอาการของโรคและรากปกติ (NS-NRK) เก็บรากฝอยของพืชที่แสดงอาการเป็นปมอย่างน้อย 1 กรัม และเก็บตัวอย่างดินที่ลึกลงจากผิวน้ำดินลงไปประมาณ 5 เซนติเมตร และบริเวณรอบ ๆ รากพืช อย่างน้อย 500 กรัม ใส่ถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิท บันทึกวันที่และสถานที่เก็บโดยละเอียด นำไปตรวจสอบและแยกเชื้อราในห้องปฏิบัติการ โรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

1.2 การประเมินความรุนแรงของโรคและตรวจสอบปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมในดิน

นำตัวอย่างรากในข้อ 1.1 มาประเมินความรุนแรงของการเกิดโรครากปมใน 2 ลักษณะ คือ ประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดปมในระบบรากของพืชแต่ละต้น และตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยในราก 1 กรัมที่ผ่านการย้อมสีตามวิธีการของ Daykin and Hussey (1985) (ภาคผนวก ก) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

ส่วนตัวอย่างดินทำการแยกไส้เดือนฝอยรากปมจากตัวอย่างดิน 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยวิธี combination of sieving and Baerman funnel technique (Barker, 1985) (ภาคผนวก ก) และตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

2. การคัดเลือกเชื้อราในดินที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่และไข่ไส้เดือนฝอยรากปมในห้องปฏิบัติการ

2.1 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม

แยกเชื้อราบริสุทธิ์จากกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม โดยนำตัวอย่างรากพืชจากข้อ 1.1 ล้างน้ำเบา ๆ ให้สะอาด เลือกเก็บกลุ่มไข่ที่แก่ที่มีสีน้ำตาลจากบริเวณราก ทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิว (surface sterilization) โดยแช่กลุ่มไข่ในสารละลาย sodium hypochlorite (NaOCl) เข้มข้น 0.5 % โดย

ปริมาณ นาน 2 นาที แล้วรีบล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที จากนั้นนำกลุ่มไข่ไปวางบนอาหาร water agar (WA) 1.2 % ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร บ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่อสังเกตเห็นกลุ่มเส้นใยเชื้อราเจริญออกมาจากกลุ่มไข่ ให้เข็มเขี่ยปลายแหลมตัดชิ้นวัฏบริเวณปลายเส้นใยมาเลี้ยงในหลอดที่บรรจุอาหาร potato dextrose agar (PDA) และทำการแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation) ตามวิธีการของ Hywel-Jones (2002) (ภาคผนวก ก) เพาะเลี้ยงเชื้อราบริสุทธิ์จนเจริญเต็มผิวหน้าวัฏแล้วไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป โดยให้รหัสเชื้อราเป็นตัวอักษร 3 ตัว และตัวเลข 4 ตัว เพื่อบอกให้ทราบถึง แหล่งที่เก็บ สถานที่เก็บ และลำดับของไอโซเลตเชื้อรา

2.2 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากดิน

แยกเชื้อราบริสุทธิ์ จากตัวอย่างดินที่ได้จากการสำรวจในข้อ 1.1 โดยนำดินที่ผึ่งลมให้แห้ง และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 35 mesh จำนวน 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำสารแขวนลอยดินที่ได้เจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (tenfold serial dilution) และเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 10^{-3} มาแยกเชื้อราโดยวิธี spread plate technique โดยจุดสารแขวนลอยดินจำนวน 0.1 มิลลิตร หยอดลงบนผิวหน้าอาหาร Martin's medium ที่ผสม streptomycin sulfate ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้แท่งแก้วเกลี่ยสารแขวนลอยดินให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 28°C เมื่อปรากฏเส้นใยเชื้อราบนอาหาร เลือกเก็บโคโลนีเชื้อราที่มีลักษณะแตกต่างกัน โดยใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมตัดชิ้นวัฏบริเวณปลายเส้นใย ย้ายมาเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เพื่อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ และทำการแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation) ตามวิธีการของ Hywel-Jones (2002) (ภาคผนวก ก) แล้วเพาะเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ลงในหลอดอาหาร PDA เมื่อเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหารนำไปเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อการทดลองขั้นตอนต่อไป โดยให้รหัสเชื้อราที่เก็บได้เช่นเดียวกับเชื้อราที่แยกได้จากกลุ่มไข่

2.3 การเตรียมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* บริสุทธิ์

2.3.1 การเตรียมดิน

ใช้ดินที่เป็นส่วนผสมของดินร่วนปนทราย : ดินทราย : ปุ๋ยคอก อัตรา 1:1:1 ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันดี บรรจุในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 20x30 เซนติเมตร ขนาดบรรจุน้ำหนัก 1.5 กิโลกรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปใช้เพาะปลูกต่อไป

2.3.2 การเตรียมไส้เดือนฝอยรากปมบริสุทธิ์

เตรียมกล้าถั่วเขียว อายุ 7 วัน โดยเพาะเมล็ดในดินผสมที่หนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งบรรจุในแก้วน้ำพลาสติกขนาดบรรจุ 350 มิลลิลิตร แก้วละ 1 ต้น และรองก้นแก้วด้วยจานพลาสติก จากนั้นนำกลุ่มไข่บริเวณรากพริกที่แสดงอาการโรครากปมจากแปลงปลูกพริกที่ ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานีซึ่งเป็นแหล่งปลูกพริกที่สำคัญของจังหวัด ใส่ลงในขวดแก้ว (vial) ที่บรรจุน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลอดละ 1 กลุ่มไข่ จำนวน 60 หลอด นำไปปลูกให้กับกล้าถั่วเขียวโดยการเทน้ำในขวดแก้วที่มีกลุ่มไข่ลงไปในกลุ่มที่เจาะลึกประมาณ 3 เซนติเมตรใกล้ๆ บริเวณรากถั่วเขียว โดยใส่ 1 กลุ่มไข่ต่อต้น กลบดิน รดน้ำวันละ 1 ครั้ง หลังปลูกเชื้อ 60 วัน นำรากมาล้างดินออก และใช้มีดปลายแหลมเขี่ยแยกเอาตัวเต็มวัยเพศเมียออกมาจากรากเพื่อตรวจสอบย่นส่วนกัน (perineal pattern) ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์ตามวิธีการของ Hartman และ Sasser (1985) และคัดเลือกเฉพาะต้นที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* เข้าทำลาย

2.3.3 การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม

นำรากถั่วเขียวและดินในถ้วยแก้วที่เป็นปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จากข้อ 2.3.2 ผสมกับดินผสมที่หนึ่งฆ่าเชื้อ บรรจุลงในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 22 เซนติเมตร และสูง 18 เซนติเมตร และรองก้นกระถางด้วยถาดดินเผาเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของไส้เดือนฝอย ขยายต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน ลงกระถาง ๆ ละ 1 ต้น รดน้ำวันละ 1 ครั้งในตอนเช้า ให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เมื่อมะเขือเทศอายุ 60 วัน นำรากและดินจากกระถางนั้นมาเพิ่มปริมาณอีก โดยผสมดินจากกระถางเดิมกับดินผสมหนึ่งฆ่าเชื้ออัตรา 1:1 แล้วปลูกกล้ามะเขือเทศอายุ 1 เดือนจำนวน 1 ต้นต่อกระถาง เมื่อมะเขือเทศมีอายุ 60 วันก็จะทำการขยายและเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมเช่นนี้ไปเรื่อยๆ ให้มีปริมาณเพียงพอที่จะใช้ตลอดการทดลอง

2.3.4 การเตรียมกลุ่มไข่ (egg mass) ไส้เดือนฝอยรากปม

ใช้ปากคีบเก็บกลุ่มไข่ที่แก่จากรากมะเขือเทศในข้อ 2.3.3 มาทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวโดยวางกลุ่มไข่ลงในท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร ที่ปิดส่วนท้ายท่อด้วยผ้าไนลอน นำไปล้างในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อก่อนแล้วจึงนำไปแช่ในสารละลาย $HgCl_2$ ที่ละลายใน ethanol ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm นาน 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 4 ครั้งๆ ละ 2 นาที จะได้กลุ่มไข่ที่พร้อมสำหรับการทดสอบต่อไป

2.3.5 การเตรียมไข่ไส้เดือนฝอยรากปม

นำกลุ่มไข่ที่แก่จากรากมะเขือเทศในข้อ 2.3.3 แช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ($NaOCl$) เข้มข้น 1 % นาน 3 นาที พร้อมเขย่าเบาๆ เพื่อช่วยละลายสารเหนียวและ

ให้ไข่กระจายออกจากกัน เทผ่านตะแกรงขนาด 500 mesh (ขนาด 25 ไมครอน) แล้วรีบล้างไข่ที่ติดค้างบนตะแกรงด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 4 ครั้งๆ ละ 2 นาที ใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อล้างและรวบรวมไข่และถ่ายลงในบิกเกอร์ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว นำสารแขวนลอยไข่ไปปรับให้มีความหนาแน่นในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 100 ไข่ต่อมิลลิลิตร โดยวิธีการสุ่มไข่จากบิกเกอร์มาครั้งละ 5 มิลลิลิตร เทใส่ถาดพลาสติกขนาด 6x6 เซนติเมตร ซึ่งที่ถาดจัดแบ่งเป็นช่องสี่เหลี่ยมเล็กขนาดเท่ากันทุกช่อง ตรวจนับไข่ใส่เค้นฝอยที่อยู่ในแต่ละช่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ สุ่มนับ 3 ครั้ง แล้วคำนวณหาปริมาณไข่ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงคำนวณปรับความหนาแน่นของไข่ในบิกเกอร์ให้ได้ความหนาแน่น 100 ไข่ต่อมิลลิลิตร สำหรับนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

2.4 การทดสอบการเจริญของเส้นใยบนกลุ่มไข่

การทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อราบนกลุ่มไข่ใส่เค้นฝอยรากปมเป็นการคัดเลือกเบื้องต้นเพื่อหาเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตบนกลุ่มไข่ได้ดีโดยนำเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากดินในข้อ 2.1 และจากกลุ่มไข่ในข้อ 2.2 เลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 15 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา แล้วย้ายมาวางบนกลางอาหาร water agar (WA) 1.2 % ที่บรรจุในงานขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร นำกลุ่มไข่ใส่เค้นฝอย จำนวน 4 กลุ่มไข่ วางรอบเชื้อราโดยห่างจากเชื้อราประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปบ่มในที่มืดที่ อุณหภูมิ 28 °C นาน 10 วัน ตรวจผลการเข้าทำลายกลุ่มไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยการตรวจกลุ่มเส้นใยที่เจริญบนกลุ่มไข่และประเมินผลการเจริญเติบโตของเส้นใยเป็น 3 ระดับ คือ

- ระดับ 1 ไม่พบเส้นใยของเชื้อราปกคลุมกลุ่มไข่ (not colonized) ของเชื้อรา
- ระดับ 2 พบเส้นใยเชื้อราเจริญบนกลุ่มไข่ (colonized) แต่ไม่ปกคลุมกลุ่มไข่ทั้งหมด
- ระดับ 3 พบเส้นใยเชื้อราปกคลุมกลุ่มไข่หนาแน่น (fully colonized)

เนื่องจากการพบเชื้อราเจริญปกคลุมกลุ่มไข่อาจยังไม่สามารถบอกได้ว่าการทำลายไข่ที่อยู่ข้างใน ดังนั้นจึงได้นำกลุ่มไข่ที่มีเส้นใยเชื้อราเจริญปกคลุมอยู่ไปตรวจสอบความสามารถในการเกิดปม (bioassay) กับถั่วเขียวเนื่องจากถั่วเขียวเป็นพืชที่อ่อนแอต่อไส้เดือนฝอยรากปม และตรวจสอบการเกิดปมที่รากได้เร็วและเห็นอาการชัดเจน โดยนำกลุ่มไข่ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายในระดับเฉลี่ยตั้งแต่ระดับ 2.5 ขึ้นไป นำไปทดสอบ ความสามารถทำให้เกิดปม ที่รากถั่วเขียวอายุ 7 วัน ที่ปลูกในดินผสมที่หนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งบรรจุในแก้วน้ำพลาสติกขนาดบรรจุ 350 มิลลิลิตร แก้วละ 1 ต้นและรองก้นแก้วด้วยงานพลาสติก ใส่กลุ่มไข่ลงไปในหลุมที่เจาะลึกประมาณ 3 เซนติเมตรใกล้ ๆ บริเวณรากถั่วเขียว โดยใส่ 1 กลุ่มไข่ต่อต้น กลบดิน รดน้ำวันละครั้ง โดยเชื้อราแต่ละไอโซเลตทำการทดสอบ

4 กลุ่มไข่ (1 กลุ่มไข่ต่อถ้วยเขียว 1 ถ้วย) หลังจากนั้น 30 วันตรวจสอบการเกิดปมหรือไม่เกิดปมที่บริเวณรากถ้วยเขียวจากกลุ่มไข่ที่ทดสอบจำนวน 4 กลุ่มไข่

2.5 การทดสอบการเข้าทำลายไข่

คัดเลือกไอโซเลตเชื้อราที่มีระดับในการเข้าทำลายกลุ่มไข่เฉลี่ยตั้งแต่ระดับ 2.5 ขึ้นไปรวม 60 ไอโซเลต มาทดสอบการเป็นปรสิตต่อไข่ไส้เดือนฝอยรากปม โดยคัดสารแขวนลอยไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่มีความหนาแน่น 100 ไข่ต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ในจานอาหารขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ที่บรรจุอาหาร water agar 1.2 % จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราที่ตรวจนับด้วย haemocytometer ตามวิธีการของ Tuite (1969) (ภาคผนวก ก) อัตรา 1.5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตรผสมลงไปบนอาหาร หมุนจานอาหารไปมาเบาๆ เพื่อให้สปอร์เชื้อราและไข่ไส้เดือนฝอยกระจายสม่ำเสมอทั่วทั้งจานอาหาร ทดสอบ 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 10 วัน ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ โดยการนับจำนวนไข่ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย ไข่ที่ไม่ถูกทำลาย และจำนวนตัวอ่อนที่ฟักออกมาเพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การทำลายไข่ของเชื้อราแต่ละไอโซเลตและเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวอ่อน

3. การศึกษาประสิทธิภาพเชื้อราในการควบคุมการเกิดโรครากปมในถ้วยเขียวในเรือนทดลอง

3.1 การเตรียมเมล็ดข้าวฟ่างสำหรับเลี้ยงเชื้อรา

ล้างเมล็ดข้าวฟ่างให้สะอาด คัดเมล็ดลอยน้ำทิ้ง ล้างน้ำหลาย ๆ ครั้ง นำไปต้มให้เมล็ดข้าวฟ่างสุกค่านอกแต่ค่านในยังดิบ เทน้ำต้มทิ้ง ผึ่งเมล็ดให้แห้งแล้วบรรจุลงในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 12×20 เซนติเมตร ปริมาตร 250 กรัม ต่อดูง สวมคอขวดที่ใช้ในการทำก้อนเห็ด คึงปากถุงแล้วพับเรียบลงตามคอขวดให้รอบ รัดให้แน่นด้วยยางรัด อุดคอขวดด้วยสำลีแล้วปิดทับด้วยกระดาษ รัดหนังยางให้แน่นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

3.2 การเตรียม inoculum ของเชื้อรา

นำเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ตั้งแต่ระดับ 2.5 ขึ้นไป มาเลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 20 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะปลายเส้นใยแล้วย้ายไปเลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 5 ชิ้นต่อดูง บ่มไว้ในความมืดที่อุณหภูมิ 28°C เมื่อเชื้อราเจริญคลุมเมล็ดข้าวฟ่างนาน 20 วัน จึงนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3 การทดสอบเชื้อรากับไส้เดือนฝอย

นำดินผสมนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 1.5 กิโลกรัมผสมเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่าง 75 กรัม บรรจุลงในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22×18 เซนติเมตร พร้อมกับหยอดเมล็ดถ้วยเขียว

ลงไปในกระถาง ๆ ละ 1 เมล็ด ร่องกันกระถางด้วยจานกระเบื้องเพื่อป้องกันการปนเปื้อน รดน้ำวันละ 1 ครั้ง เมื่อต้นกล้าถั่วเขียวอายุ 7 วัน นำกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่เลี้ยงบนต้นมะเขือเทศพันธุ์ลีดา ใส่บรรจุในขวดแก้วที่มีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 กลุ่มไข่ต่อต้น โดยหยอดลงในหลุมที่เจาะลึกประมาณ 4 เซนติเมตรใกล้กับรากพืชแล้วกลบดิน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ประกอบด้วย 60 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ ๆ ละกระถาง ๆ ละ 1 ต้น โดยมีชุดควบคุม (control) 2 ลักษณะคือ ถั่วเขียวที่ใส่กลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 5 กลุ่มไข่ต่อกระถาง (control 1) และถั่วเขียวที่ไม่ใส่ทั้งเชื้อราและกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอย (control 2) รดน้ำวันละ 1 ครั้ง และใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ทุก ๆ 2 สัปดาห์

ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราต่อการควบคุมโรครากปมถั่วเขียวหลังจากปลูกกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยเป็นระยะเวลา 40 วัน โดยแยกรากถั่วเขียวออกจากดินปลูกอย่างระมัดระวังและคว่ำกระถางต้นถั่วเขียวลงในกะละมัง ใช้มือประคองต้นถั่วเขียวไว้ หมุนต้นเบาๆ เพื่อดึงต้นและรากออกจากกระถาง ถ้างรากให้สะอาดแล้วนำมาประเมินความรุนแรงในการเกิดปมโดยคิดเปอร์เซ็นต์พื้นที่รากที่เกิดปมต่อระบบรากพืช

4. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราในการควบคุมโรครากปมของพริกในเรือนทดลอง

4.1 การเตรียม inoculum ของเชื้อรา

นำเชื้อราที่มีเปอร์เซ็นต์การทำลายไข่สูง มีเปอร์เซ็นต์ลดการฟักไข่เป็นตัวอ่อนได้สูง และสามารถควบคุมการเกิดปมที่รากถั่วเขียวที่ปลูกในกระถางได้ดี จำนวน 11 ไอโซเลต และเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รวมเชื้อราที่ทดสอบทั้งสิ้น 12 ไอโซเลต มาทำการทดสอบ โดยการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 15 วัน ให้มีความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 1×10^7 , 3×10^7 , 5×10^7 และ 7×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอุปกรณ์นับสปอร์ (haemocytometer)

4.2 การเตรียมไข่ไส้เดือนฝอยรากปม

ทำการเตรียมไข่ไส้เดือนฝอยรากปมบริสุทธิ์เช่นเดียวกับข้อ 2.3.5 และปรับให้สารแขวนลอยไข่มีความหนาแน่น 1,000 ไข่ต่อมิลลิลิตร

4.3 การทดสอบเชื้อรากับไข่ไส้เดือนฝอยรากปม

นำต้นกล้าพริกพันธุ์หัวเรือ อายุ 1 เดือน ขยายลงปลูกในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 22 x 18 เซนติเมตร ที่บรรจุดินผสมหนึ่งฆ่าเชื้อน้ำหนัก 1.5 กิโลกรัม จำนวน 1 ต้นต่อกระถาง พร้อมกับดูดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลตที่มีปริมาณสปอร์เข้มข้น 1×10^7 สปอร์/มิลลิลิตร อัตรา 1, 3, 5 และ 7 มิลลิลิตรต่อกระถางตามแผนการทดลอง โดยใส่ที่

บริเวณรากต้นกล้า แล้วกลบดิน จากนั้น 7 วันใส่สารแขวนลอยไข่ไส้เดือนฝอยรากปมเข้มข้น 1,000 ไข่ต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 มิลลิลิตร ลงในรูลึกประมาณ 1 เซนติเมตร ห่างโคนต้นประมาณ 4 เซนติเมตร จำนวน 3 รูๆละ 1 มิลลิลิตร รอบโคนต้นพริก

จัดกรรมวิธีในการทดลองแบบ factorial in completely randomized design มี 2 ปัจจัย คือปัจจัย A ได้แก่ จำนวนเชื้อรา 12 ไอโซเลต ปัจจัย B ได้แก่ อัตราความเข้มข้นของสปอร์เชื้อรา 4 ระดับ ได้แก่ 1×10^7 , 3×10^7 , 5×10^7 , และ 7×10^7 สปอร์ต่อกระถาง รวม 48 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ ๆ ละกระถาง ๆ ละ 1 ต้น โดยมีชุดควบคุม (control) 2 ลักษณะคือ พริกที่ใส่ไข่ไส้เดือนฝอยรากปม จำนวน 3,000 ไข่ต่อกระถาง (control 1) และ พริกที่ไม่ใส่เชื้อใดๆ (control 2) ดูแลรักษาดินพริก โดยรดน้ำวันละ 1 ครั้งและให้น้ำปุ๋ยสูตร 15-15-15 ทุก 2 สัปดาห์

วัดประสิทธิภาพของเชื้อราต่อการควบคุมโรครากปมของพริกหลังจากปลูกไข่ไส้เดือนฝอย 60 วัน โดยวัดความสูงของมะเขือเทศ (เซนติเมตร) น้ำหนักต้นสด (กรัม) ความรุนแรงของการเกิด ปมที่รากโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์พื้นที่รากที่เกิดปมต่อระบบราก ตรวจนับจำนวนไข่ไส้เดือนฝอยรากปม (J2) ต่อคืนในกระถางจำนวน 300 ลูกบาศก์เซนติเมตรโดยวิธี centrifugal flotation technique โดยดัดแปลงจากวิธีการของ (Jenkins, 1964) (ภาคผนวก ก) และจำนวนไข่ (eggs) ต่อรากพริกทั้ง ต้น (ภาคผนวก ก)

5. การศึกษาความสามารถในการควบคุมโรครากปมของพริกในระดับแปลงปลูกขนาดเล็ก

5.1 การเตรียมแปลงปลูกพืช

ก. ขนาดแปลง

แปลงปลูกซึ่งก่อด้วยอิฐ กว้าง 1 เมตร ยาว 12 เมตร สูง 50 เซนติเมตร จำนวน 4 แปลง แบ่งแต่ละแปลงให้มีความกว้าง 1 เมตร ยาว 1 เมตร มีจำนวนแปลงตามแผนการทดลอง

ข. การเตรียมดิน

ดินที่ใช้ปลูกเป็นดินร่วนผสมปุ๋ยคอกและทรายแม่น้ำ อัตราส่วน 1:1:1 พรวนดินที่บรรจุ อยู่ในแปลงและทำการฆ่าไส้เดือนฝอยที่ปนเปื้อนอยู่ในดินที่บรรจุในแปลงปลูกด้วย formalin โดย นำสารละลาย formalin 2 ส่วนผสมกับน้ำ 48 ส่วน จากนั้นนำไปราดลงในดินที่อยู่ในแปลงปลูก อัตรา 20 ลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตรแล้วคลุมแปลงให้มีมิดชิดด้วยผ้าพลาสติกนาน 1 สัปดาห์ จึงนำผ้า พลาสติกออก แล้วปล่อยทิ้งไว้นาน 2 สัปดาห์ ก่อนใช้ในการทดลอง

5.2 การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) ของเชื้อรา

5.2.1 การเตรียมเมล็ดข้าวฟ่างสำหรับเลี้ยงเชื้อรา

เตรียมเมล็ดข้าวฟ่างสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อราที่จะทดสอบประสิทธิภาพเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.1

5.2.2 การเตรียม inoculum ของเชื้อรา

นำเชื้อราที่มีประสิทธิภาพควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในสภาพเรือนทดลองได้ดีที่สุดจำนวน 3 ไอโซเลต และเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* จากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 1 ไอโซเลต เพื่อใช้เปรียบเทียบ รวม 4 ไอโซเลต เพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA นาน 20 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใย แล้วย้ายไปเลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่างหนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 5 ชิ้นต่อถุง บ่มไว้ในความมืดที่อุณหภูมิ 28 °ซ เมื่อเชื้อราเจริญคลุมเมล็ดข้าวฟ่างนาน 20 วัน จึงนำไปเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ เชื้อราให้มีความเข้มข้น 7×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรโดยอุปกรณ์นับสปอร์ (haemocytometer)

5.3 การเตรียมไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

เตรียมไข่ไส้เดือนฝอยรากปมเช่นเดียวกับข้อ 4.2 และปรับให้ไข่มีความหนาแน่น 100 ฟองต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร

5.4 การทดสอบเชื้อรากับไข่ไส้เดือนฝอยรากปม

โดยใช้บัวรดน้ำราดสารแขวนลอยไข่ไส้เดือนฝอยที่มีความหนาแน่น 100 ฟองต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร ลงไปในดินให้มีความหนาแน่นของไข่ไส้เดือนฝอย จำนวน 200,000 ไข่ต่อแปลง ใช้คราดสับและเกลี่ยดินไปมาเพื่อให้ไข่ไส้เดือนฝอยรากปมกระจายสม่ำเสมอตลอดทั่วทั้งแปลง จากนั้นย้ายต้นกล้าพริกพันธุ์หัวเรืออายุ 1 เดือนลงปลูก ให้มีระยะห่างระหว่างต้น 30 เซนติเมตร และระยะห่างระหว่างแถว 30 เซนติเมตร ปลูกได้ 3 แถว ๆ ละ 3 ต้น ในแปลงที่ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา ปฏิบัติ นำสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราอัตรา 7×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ราดลงบนโคนต้นกล้าของพริกแต่ละต้นก่อนทำการกลบดิน

ส่วนแปลงที่ทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี carbofuran ใช้หยอดรองกันหลุมในอัตรา 3 กรัมต่อหลุม พรวนดินให้สารเคมีกระจายพร้อมทำการย้ายต้นกล้าพริกลงในหลุมปลูกแล้วกลบดิน ทำการดูแลรักษาต้นพริกโดยรดน้ำวันละ 1 ครั้ง และให้ใช้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ทุก ๆ 2 สัปดาห์ และใช้สารเคมีกำจัดไรและแมลงเมื่อพบการระบาด

5.5 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) ประกอบด้วย ด้วย 7 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 พริก+*M. incognita* + *Pochonia chlamydosporia* (EUB26-08)

กรรมวิธีที่ 2 พริก+*M. incognita* + *Pochonia chlamydosporia* (EYT35-09)

กรรมวิธีที่ 3 พริก+*M. incognita* + *Lecanicillium tenuipes* (SNM01-06)

กรรมวิธีที่ 4 พริก+*M. incognita* + *Paecilomyces lilacinus* (ศูนย์พันธุวิศวกรรม)

กรรมวิธีที่ 5 พริก+*M. incognita* + carbofuran

กรรมวิธีที่ 6 พริก+ nematode

กรรมวิธีที่ 7 พริกอย่างเดียว

แต่ละกรรมวิธีทำการทดลอง 4 ซ้ำๆละ 9 ต้น โดยมีชุดควบคุม (control) 2 ลักษณะ คือ แปลงพริกที่ปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยจำนวน 200,000 ไข่ต่อแปลง และแปลงพริกที่ไม่ปลูกเชื้อใด ๆ ดังนั้นมีจำนวนแปลงปลูกทั้งสิ้น 28 แปลง

วัดประสิทธิภาพของเชื้อราต่อการควบคุมโรครากปมในพริก หลังจากปลูกเชื้อ 60 วัน โดยวัดความสูง (เซนติเมตร) น้ำหนักต้นสด (กรัมต่อต้น) ความรุนแรงของการเกิดปมที่ระบบรากโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์พื้นที่รากที่เกิดปมต่อระบบรากทั้งหมด จำนวน J2 ต่อดินจำนวน 300 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่แยกโดยวิธี centrifugal flotation technique (ภาคผนวก ก) จำนวนไข่ต่อรากพริก 1 กรัม (ภาคผนวก ก) และจำนวนไส้เดือนฝอยเพศเมียต่อราก 1 กรัมที่ผ่านการย้อมรากโดยแปลงจากวิธีการของ วิธีการของ Daykin and Hussey (1985) (ภาคผนวก ก)

6. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในเชิงปริมาณของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

6.1 การเตรียม crude extracellular protein

เตรียมอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร หนึ่งขวดเชื้อที่ภายใต้ความดันไอน้ำ เมื่ออาหารเย็นนำเชื้อราจำนวน 11 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมโรครากปมพริกในระดับเรือนทดลองที่เลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 20 วัน มาเจาะบริเวณปลายเส้นใยด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร และย้ายชิ้นวุ้นจำนวน 5 ชิ้นลงในอาหารเหลว นำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 10 วัน กรองแยกเส้นใยออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำน้ำใสของเชื้อรามาตกตะกอนโปรตีนซึ่งดัดแปลงวิธีของ Giri และคณะ (1998) โดยใช้ NH_4SO_4 กวนให้สารละลายเข้มข้นสุดท้าย 60 % ที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน เก็บตะกอนโปรตีนโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer, pH 6.9 ที่ผสม 0.05 M NaCl_2 (ภาคผนวก ข) 2 ครั้ง

นำตะกอนที่ได้ละลายด้วย 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ สำหรับทดสอบในขั้นตอนต่อไป

6.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำตะกอน (crude extracellular protein) ของเชื้อราแต่ละไอโซเลตในข้อ 6.1 มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐานตามวิธีการของ Bradford (1976) (ภาคผนวก ก)

6.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ protease

ทำการวิเคราะห์ protease โดยนำ crude extracellular protein ใส่หลอดทดสอบ หลอด control ใช้ crude extracellular protein ที่ผ่านความร้อน 121 °ซ นาน 20 นาที และหลอด blank ใช้ น้ำกลั่น ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร ทุกหลอดเติมสารละลายเคซีน (casein) เข้มข้น 1% ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 (ภาคผนวก ข) (ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 30 นาที) จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา นาน 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย Trichloroacetic acid (TCA) เข้มข้น 10 % จำนวน 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 20 นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำน้ำใสที่ได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเติม 0.4 M Na_2CO_3 (ภาคผนวก ข) จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 1 N folin-ciocalteu reagent (ภาคผนวก ข) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ค่าดูดกลืนแสงที่ได้นำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ถูกย่อยออกจากเคซีนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ tyrosin คัดแปลงตามวิธีการของ Yang และ Wang (1999) (ภาคผนวก ก) กิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ (specific activity) ประเมินจากปริมาณกรดอะมิโน (tyrosine equivalent) คิดปริมาณเป็นไมโครโมล (μmol) ที่ถูกย่อยจากเคซีนใน 1 ชั่วโมงต่อมิลลิกรัมโปรตีนใน crude extracellular protein

6.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase

วิเคราะห์กิจกรรม chitinase โดยนำ crude extracellular protein ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย colloidal chitin เข้มข้น 1% (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็น substrate สำหรับหลอด blank ใส่ น้ำกลั่น 0.3 มิลลิลิตร ผสม substrate 0.3 มิลลิลิตร ส่วนหลอด control ใช้ crude extracellular protein ของเชื้อรา (ที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 121 °ซ นาน 20 นาที) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมกับ substrate ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีด้วย Vortex mixer แล้วนำหลอดทั้งหมดบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อ

หลอดเย็นนำหลอดทั้งหมดมาเติม dinitro salicylic acid reagent (DNS reagent) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer หยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดไปต้มในน้ำเดือด นาน 15 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนที่เป็นน้ำใส ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ตามวิธีการของ Somogyi (1952) (ภาคผนวก ก) โดยกิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ (specific activity) ประเมินจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (N-acetylglucosamine equivalent) คิดเป็นไมโครโมลที่ถูกย่อยออกจาก colloidal chitin ใน 1 ชั่วโมงต่อมิลลิกรัมโปรตีนของ crude extracellular protein โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ N-acetylglucosamine

6.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ glucoamylase

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Fisher และ Stein (1961) โดยนำ crude extracellular protein ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบ ส่วนหลอด control ใส่ crude extracellular protein (ที่ผ่านความร้อน 121 °ซ นาน 20 นาที) จำนวน 1 มิลลิลิตร และหลอด blank ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำหลอดทั้งหมดเติม 0.1 M citrate buffer, pH 4.5 (ภาคผนวก ข) จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วรีบนำหลอดทั้งหมดไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 10 นาที นำหลอดทั้งหมดมาเติมสารละลายแป้ง (soluble starch) เข้มข้น 1% จำนวน 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 °ซ นาน 10 นาที แล้วเติม DNS reagent จำนวน 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา เขย่าให้เข้ากันแล้วรีบนำหลอดทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที และทำให้หลอดเย็นทันทีโดยนำไปแช่ในน้ำที่เย็นจัดนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เก็บส่วนที่เป็นน้ำใสนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) ที่ถูกย่อยออกจากสารละลายแป้ง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ glucose ตามวิธีการของ Somogyi (1952) กิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ (specific activity) ประเมินจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) คิดเป็นไมโครโมล ที่ถูกย่อยออกจากสารละลายแป้งใน 1 ชั่วโมงต่อมิลลิกรัมโปรตีนใน crude extracellular protein

7. การบ่งชี้ชนิดของเชื้อราปฏิบัติกับต่อไส้เดือนฝอยรากปม

7.1 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

7.1.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราด้วย compound microscope นำเชื้อราทุกไอโซเลตที่มีระดับการเข้าทำลายกลุ่มไข่ตั้งแต่ 2.5 ขึ้นไปมาเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA บ่มในความมืดที่อุณหภูมิ 28 °ซ นาน 15 วัน แล้วนำมาทำการเพาะเลี้ยงบนแผ่นสไลด์ (slide culture) เพื่อนำมาศึกษาลักษณะของเส้นใย ก้านสปอร์ ลักษณะรูปร่างของ สปอร์ สีและขนาดของสปอร์ รวมทั้งโครงสร้างขยายพันธุ์อื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับการตรวจสอบจากหนังสือของ Domsch และ Gams (1980) และ Zare และ Gams (2004) เพื่อนำมาเป็นข้อมูลสำหรับจำแนกชนิดของเชื้อรา

7.1.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราด้วย scanning electron microscope (SEM) โดยการนำเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรครากปมของพริกในระดับเรือนทดลอง มาทำการศึกษาลักษณะเส้นใย รูปร่างสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหารวุ้น PDA บ่มในความมืดที่อุณหภูมิ 28 °ซ นาน 15 วัน ตัดบริเวณวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราเจริญเป็นชิ้นกว้างและยาวขนาด 0.5 เซนติเมตรด้วยใบมีด นำชิ้นวุ้นแช่ในสารละลาย glutaraldehyde เข้มข้น 2.5 % ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อ fix ตัวอย่าง แล้วนำชิ้นส่วนของวุ้นมาผ่านกระบวนการคั่งน้ำออก (dehydration) โดยนำไปแช่ใน ethanol ที่ลำดับความเข้มข้น 30, 50, 70, 90, 100 และ 100 % รวม 6 ครั้ง นานครั้งละ 15 นาที ตามลำดับ โดยระวังไม่ให้ชิ้นวุ้นแห้ง จากนั้นนำชิ้นวุ้นไปทำให้แห้งภายใต้เครื่อง critical point dryer (CPD) รุ่น samdri-PVT-3B โดยการปล่อย liquid CO₂ เข้าไปแทนที่แอลกอฮอล์ในเซลล์ตัวอย่าง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึงจุดวิกฤต อุณหภูมิ 31 °ซ ความดัน 1070 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว liquid CO₂ จะเปลี่ยนสถานะเป็น CO₂ gas ทำให้ผิวหน้าตัวอย่างไม่เปลี่ยนรูปร่าง นำชิ้นวุ้นที่แห้งมาติดบนวัสดุรองรับตัวอย่าง (stub) ด้วยกาวสองหน้าชนิด carbon paint เพื่อให้เกิดการนำไฟฟ้าที่ดีนำตัวอย่างมาฉาบทองคำด้วยเครื่อง ion sputter นำตัวอย่างที่ได้มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด บันทึกภาพรูปร่างลักษณะต่างๆของเส้นใยเชื้อรารูปร่างสปอร์ และลักษณะสำคัญอื่น ๆ

ถ่ายภาพการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปมของเส้นใยเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต โดยนำตัวอย่างไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่บ่มร่วมกับสปอร์เชื้อราบนอาหาร WA เป็นเวลา 10 วัน มาทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อถ่ายรูปเช่นเดียวกันกับการเตรียมตัวอย่างการถ่ายภาพรูปร่างลักษณะเส้นใยรูปร่างสปอร์ของเชื้อรา

7.2 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อราปฏิภักษ์โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA

7.2.1 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อราที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง จำนวน 10 ไอโซเลต มาเลี้ยงบนหลอดอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C นาน 20 วัน คุดูอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในโคโลนีของเชื้อที่อยู่ในหลอด ใช้เข็มเย็บที่ทนไฟฆ่าเชื้อแล้วชุดเบาๆ เพื่อให้ได้สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา คุดูสารแขวนลอยสปอร์จำนวน 300 ไมโครลิตร (μ l) ไป spread ลงบนจานอาหาร PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C นาน 3 วัน ใช้แผ่นสไลด์แก้วที่ทนไฟฆ่าเชื้อแล้วชุดเอาเฉพาะเส้นใยของเชื้อที่เจริญขึ้นมาบนอาหารเก็บใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (micro centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้สำหรับนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

7.2.2 การเตรียมดีเอ็นเอ

โดยการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อราปฏิภักษ์สดโดยดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) นำเส้นใยเชื้อราจากข้อ 7.1 น้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในโกร่งที่แช่เย็นจัดซึ่งเติม extraction buffer (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และ 2-mercaptoethanol 1 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด คุดูใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 1 ชั่วโมง เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ นาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 °C นาน 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำใส ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตร 0.7 เท่าของส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ นาน 5 นาที จะพบดีเอ็นเอเป็นสายสีขาวขุ่นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 20 นาที เก็บตะกอนดีเอ็นเอโดยการนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol เข้มข้น 76 % ที่ผสมด้วย 10 mM ammonium acetate ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับหลอดไปมาเบาๆ เพื่อให้การล้างตะกอนดีเอ็นเอดีขึ้น นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำการล้างตะกอนด้วยวิธีเดียวกันนี้จำนวน 3 ครั้ง แล้วเปิดฝาหลอดไว้ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จึงนำไปละลายด้วย TE buffer (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RnaseA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1/10 ของปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที จากนั้นหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ โดยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (ภาคผนวก ก) แล้วจึงวิเคราะห์คุณภาพและความ

เข้มข้นของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) (ภาคผนวก ก) เก็บดีเอ็นเอ (genomic DNA) ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

7.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA ด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอจากข้อ 7.2 เป็นต้นแบบ (DNA template) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน of ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA; rDNA) บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ 5.8S ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยการใช้ไพรเมอร์ (primer) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ซึ่งในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม (ng) ต่อไมโครลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร, ไดออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate; dNTP) 100 มิลลิโมลาร์ (mM) จำนวน 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Tag* DNA polymerase 5 ยูนิต (unit) ต่อไมโครลิตร จำนวน 0.1 ไมโครลิตร, 10X PCR Buffer จำนวน 2.5 ไมโครลิตร, MgCl₂ 50 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (μM) อย่างละ 1 ไมโครลิตร ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตรด้วย deionized H₂O แล้วนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1 : 95 °ซ นาน 5 นาที, ในรอบแรก

ขั้นที่ 2 : 94 °ซ นาน 2 นาที, 56 °ซ นาน 2 นาที, 72 °ซ นาน 2 นาที, จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 3 : 72 °ซ นาน 10 นาที, ในรอบสุดท้าย

ขั้นที่ 4 : 4 °ซ เก็บรักษา (hold) หากจำเป็นจนกว่าจะเอาผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ออก

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ด้วยวิธีการ agarose gel electrophoresis จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ด้วยเครื่อง automate sequencer MegaBACE, ICM ver. 2.5 ซึ่งเป็นบริการของภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสามารถจำแนกชนิดเชื้อราปฏิบัติได้โดยตรวจสอบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ศึกษากับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> และเว็บไซต์ <http://www.ebi.ac.uk>.