บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกและการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* จากบริเวณ rhizosphere ของต้นพริก และ จากสารชีวภัณฑ์ รวมทั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และเชื้อรา *Penicillium* sp. ที่ไม่ได้เป็นเชื้อราสาเหตุของโรค

1.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อและแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากบริเวณ rhizosphere รวมทั้งเชื้อราชนิดอื่นๆ ในบริเวณ rhizosphere

เก็บตัวอย่างดินในบริเวณรากของต้นพริกที่มีลักษณะของต้นที่สมบูรณ์แข็งแรงและไม่เป็นโรค จาก 5 แหล่ง ได้แก่

1. แปลงเกษตรกร บ้านแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
2. แปลงเกษตรกร อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่
3. แปลงเกษตรกร อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่
4. แปลงเกษตรกร อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่
5. แปลงเกษตรกร จังหวัดลำพูน

นำตัวอย่างดินที่เก็บได้จาก 5 แหล่ง มาทำการแยกเชื้อรา โดยการเก็บตัวอย่างดินจะเก็บดินจากบริเวณรอบๆรากพืช ที่ระดับความลึกจากผิวหน้าดิน 15-50 เซนติเมตร จากนั้นนำดินมาแยกเชื้อราปฏิปักษ์ และเชื้อราอื่นๆ โดยชั่งดิน 1 กรัม แล้วทำให้เจือจางในน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความเข้มข้น 10^{-3} ไมโครลิตร แล้วจึงหยดสารละลายดังกล่าว 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร PDA-Rose Bengal ที่เตรียมไว้ แล้วใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้สารละลายกระจายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน เพื่อให้เชื้อราสร้างสปอร์และเส้นใยบนอาหารก่อนนำไปแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการ hyphal tip isolation โดย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นบริเวณส่วนปลายของเส้นใยเชื้อรา จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่ได้มาวางบนอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ (นุชนารถ, 2540) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกว่าเชื้อราจะสร้างโคโลนีขึ้นมาเต็มจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงนำเชื้อราที่ได้มาตรวจสอบ

1.2 การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากสารชีวภัณฑ์ที่ได้จากแหล่งการค้า

นำสารชีวภัณฑ์ที่ได้จาก 6 แหล่ง มาทำการแยกเชื้อรา โดยนำสารชีวภัณฑ์มาชั่ง 1 กรัม แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร PDA-Rose Bengal ที่เตรียมไว้ จากนั้นบ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน เพื่อให้เชื้อราสร้างสปอร์และเส้นใยบนอาหารก่อนนำไปแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการ hyphal tip isolation โดย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นบริเวณส่วนปลายของเส้นใยเชื้อรา จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่ได้มาวางบนอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ (นุชนารถ, 2540) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกว่าเชื้อราจะสร้างโคโลนีขึ้นมาเต็มจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงนำเชื้อราที่ได้มาตรวจสอบ

1.3 การจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาและจัดจำแนกสันฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ได้มาจากสารชีวภัณฑ์และจากในดิน รวมทั้งเชื้อรา *Penicillium* sp. และเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่แยกได้จากดิน ตามลักษณะสันฐานวิทยา โดยใช้เทคนิค slide culture บ่มทิ้งไว้ 3 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยอาศัยหลักการของ Rifai (1969) ที่ใช้ลักษณะของ phialide, phialospore และ conidiophore ในการจัดจำแนก species

2. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP

2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนอาหาร potato dextrose broth

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากบริเวณ rhizosphere ของต้นพริกและจากสารชีวภัณฑ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง orbital shaker ที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เพื่อนำเส้นใยที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอ

2.2 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

นำ 0.1-0.3 กรัมของเส้นใยเชื้อรา ย้ายลงหลอด microtube แล้วเติม 0.2 กรัม ของ glass bead Vortex 5 นาทีเพื่อทำลายผนังเซลล์จากนั้น เติม 500 ไมโครลิตร ของ lysis buffer (Tris-HCl pH 7.2 0.5 มิลลิโมล , EDTA 50 มิลลิโมล, 3 เปอร์เซ็นต์ SDS และ 1 เปอร์เซ็นต์ ß-mercaptophenol) Vortex จนกว่าจะผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม phenol : choloroform : isoamyl alcohol ในปริมาตรที่เท่ากัน ขยับหลอดเบาๆ ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดเอาส่วน aqueous phase ย้ายลงหลอดใหม่

แล้วทำให้ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติม 0.03 volume ของ 3M sodium acetate และ 0.5 volume ของ isopropanol โดย invert ไปมาเบาๆ จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 15 นาที เทส่วน supernatant ทิ้ง ล้าง pellet ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ เท ethanol ออก แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย 1X TE buffer นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

2.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP

ผลผลิตของ PCR ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* 12.5 นาโนกรัม แต่ละส่วนของ deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) 100 ไมโครโมล *Taq* polymerase 1.25 ยูนิต Magnesium Chloride ($MgCl_2$) 1.5 มิลลิโมล primer 0.4 ไมโครโมล (ITS 1 – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G และ ITS 4 – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) Tris(pH 8.3) 10 มิลลิโมล KCl 50 มิลลิโมล และ gelatin 0.001 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ โดย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที annealing ที่ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ผลผลิต PCR ที่ได้จะนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและใช้เป็น template ในขั้นตอนต่อไป

เมื่อได้ผลผลิตของ PCR นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้ 3 ชนิด คือ เอนไซม์ *Eco*RI, *Bam*HI และ *Sma*I ปริมาณของสารที่ใช้ คือ ผลผลิตของ PCR 10 ไมโครลิตร buffer 2 ไมโครลิตร 10X BSA 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ไมโครลิตร และ น้ำ 5 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร นำมาบ่มในแต่ละช่วงอุณหภูมิตามชนิดของ เอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนี้ เอนไซม์ *Eco*RI และ *Bam*HI บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ *Sma*I บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำไปวิเคราะห์แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอบน agarose gel

นำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบผสมกับ loading buffer 6 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่ผสมแล้วหยอดลงในหลุม 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel แล้วปิดฝากล่อง electrophoresis เปิดสวิทช์ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งในทิศทางจากขั้วลบไปยังขั้วบวก สังเกตจากสีทั้งสองที่ผสมใน loading buffer เคลื่อนที่ห่างกันเป็นระยะทาง 2.5 เซนติเมตร จึงทำการปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ดีเอ็นเอแล้วนำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide นำเจลที่ได้ไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้กล่อง transilluminator

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏบน RFLP gel บนตาราง matrix โดยแต่ละแถบดีเอ็นเอ (band) จะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ (character) ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งๆนั้น จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ Numerical Taxonomy System (NTSYS version 2.0) (Rohlf, 1993) โดยเปลี่ยนเป็น similarity matrix ด้วยโปรแกรม SIMQUAL (similarity for qualitative data) โดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient จากนั้นนำมาจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี unweighted pair group by arithmatic mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม SAHN (sequential, agglomerative, hierachical and nested clustering method) และวิเคราะห์ bootstrap (1,000 ซ้ำ) ด้วยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996)

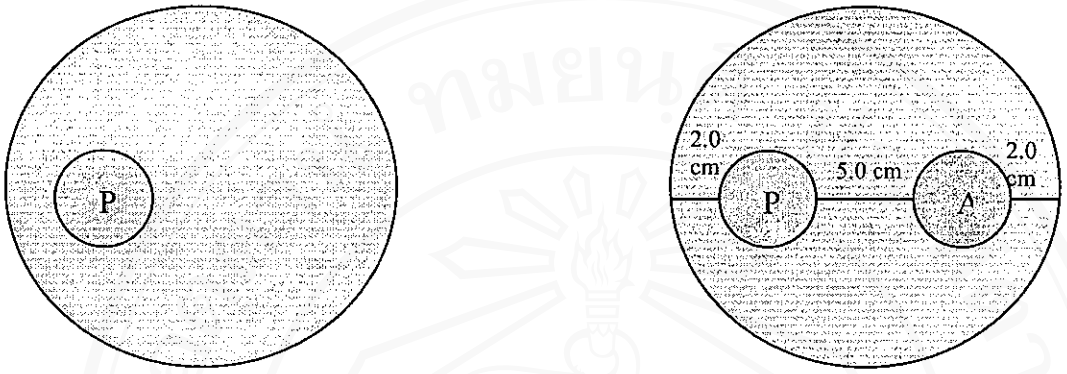
3.แยกเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชจากต้นพริก

เก็บตัวอย่างโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* ในต้นพริก โดยการนำตัวอย่างที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาด แล้วตัดชิ้นส่วนที่กำลังเป็นโรค ให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 3x4 มิลลิเมตร นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA บ่มให้เชื้อเจริญในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นประมาณ 2-3 วัน ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์จากอาหาร PDA โดยวิธีการ hyphal tip isolation โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นบริเวณส่วนปลายของเส้นใยเชื้อรา จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่ได้มาวางบนอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ (นุชนารถ, 2540) และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกว่าเชื้อราจะสร้างโคโลนีขึ้นมาเต็มจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงนำเชื้อราที่ได้มาตรวจสอบแยกและจำแนกสันฐานวิทยาของเชื้อรา เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

4. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริกจำนวน 2 ไอโซเลต

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ได้จากบริเวณ rhizosphere ของต้นพริก และจากสารชีวภัณฑ์ทั้งหมด ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้ง 2 ไอโซเลต โดยใช้วิธีการ dual culture technique (ภาพที่ 1) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ตัดชิ้นอาหาร PDA ที่ใช้เลี้ยงเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากบริเวณ rhizosphere ของต้นพริก และจากสารชีวภัณฑ์ และชิ้นอาหาร PDA ที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *F. oxysporum* โดยนำชิ้นวุ้นทั้งสองวางบนจานเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA ที่เตรียมไว้โดยห่างกัน 4 เซนติเมตร และห่างจากขอบจานอาหารทั้งสองด้าน 2.5 เซนติเมตร (วันพร, 2543) จากนั้นทำการจัดกลุ่มเชื้อราโดยอาศัยปฏิกิริยาที่

เกิดขึ้นระหว่างเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากบริเวณ rhizosphere ของต้นพริก และจากสารชีวภัณฑ์กับเชื้อรา *F. oxysporum* บนอาหาร PDA ทำการทดสอบ ทำการบ่มจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการวัดผลการทดลอง



จานชุดควบคุม **จานชุดทดสอบ**

ภาพที่ 1 การทดสอบ dual culture technique (bi-culture)

การวัดอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) โดยทำการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อราทุกๆวัน เพื่อคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในแต่ละกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพ ของเชื้อราปฏิปักษ์ในขั้นตอนต่อไป นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* จากสูตร

$$\%\text{การยับยั้ง} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุด control} - \text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีทดลอง}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุด control}} \times 100$$

5. คัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในแต่ละ species ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีที่สุดเพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพซ้ำในการควบคุมโรค

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่นำมาจากตัวแทนในแต่ละกลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรมจากขั้นตอนที่ 3 และจากการทดสอบประสิทธิภาพในขั้นตอนที่ 4 เพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *F. oxysporum* โดยวิธีการ dual culture technique โดยตัดชิ้นอาหาร PDA ที่ใช้เลี้ยงเชื้อราบริสุทธิ์ของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ถูกคัดเลือก และชิ้นอาหาร PDA ที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *F. oxysporum* ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ ทำการบ่มจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการวัดผลการทดลองและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามการทดลองในข้อ 4

6. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Penicillium* sp. ที่ไม่ได้เป็นสาเหตุของโรค

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่นำมาจากตัวแทนในแต่ละกลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรมจากขั้นตอนที่ 3 และจากการทดสอบประสิทธิภาพในขั้นตอนที่ 4 เพื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราอื่นๆ ที่ไม่ได้เป็นเชื้อสาเหตุของโรค โดยใช้วิธีการ dual culture technique โดยตัดชิ้นอาหาร PDA ที่ใช้เลี้ยงเชื้อราบริสุทธิ์ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่ถูกคัดเลือก และชิ้นอาหาร PDA ที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus flavus* และเชื้อรา *Penicillium* sp. ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ ทำการบ่มจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการวัดผลการทดลอง และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามการทดลองในข้อ 4

7. สถานที่ดำเนินงานวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการลานนา
3. ห้องปฏิบัติการ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved