# บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีการ

## 3.1. ศึกษาลักษณะอาการของโรครากเน่าของส้ม

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างส้มที่แสดงอาการของโรครากเน่า จากสวนส้มที่ปลูกในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ เก็บตัวอย่างโดยนำตัวอย่างดินและส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรคมาทำการศึกษาเพื่อหาเชื้อสาเหตุของโรคต่อไป

## 3.2. แยกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

นำตัวอย่างของโรคมาทำการแยกเชื้อโดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

### 3.2.1 แยกเชื้อโดยวิธีการล่อเชื้อจากดิน (baiting technique)

**ล่อเชื้อจากดินจากต้นที่แสดงอาการของโรคโดยใช้แตงกวาและแครอท**

นำแตงกวาและแครอท มาทำการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 เปอร์เซ็นต์ หรือ แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง เพื่อล้างโซเดียมไฮโปคลอไรต์ หรือแอลกอฮอล์ออก หั่นแตงกวาและแครอทด้วยมีดฆ่าเชื้อ ให้ชิ้นพืชมีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส (ลูกเต๋า) มีขนาดประมาณ 1x1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำชิ้นพืชวางลงบนดินที่เก็บมาจากแปลงของส้มที่เป็นโรค โดยวางให้ชิ้นพืชจมลงไป 0.5 เซนติเมตร ใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไปให้ชื้น ปิดฝากล่องให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้นาน 5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อที่ขึ้นบนชิ้นพืช จากนั้นตรวจดูเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แล้วจึงเขี่ยเส้นใยที่ขึ้นบนเหยื่อล่อด้วยเข็มเขี่ยไปเลี้ยงบนอาหาร half PDA จานอาหารละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 วันแล้วจึงใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร half PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

**ล่อเชื้อจากดินจากต้นที่แสดงอาการของโรคโดยใช้ใบสับปะรด**

นำใบสับปะรดมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 เปอร์เซ็นต์ หรือแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง ใช้ใบมีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว หั่นตรงส่วนโคนใบเพื่อให้มีพื้นที่ผิวมากที่สุด จากนั้นนำชิ้นส่วนดังกล่าวไปจุ่มลงในบีกเกอร์ที่บรรจุสารละลายของตัวอย่างดิน (ผสมด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ซึ่งเป็นวัสดุปลูกจากต้นที่แสดงอาการของโรค โดยจุ่มตรง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โคนใบลงไป จากนั้นนำบีกเกอร์ที่มีใบสับปะรดจุ่มในสารละลายของวัสดุปลูกใส่ลงในถุงพลาสติก และมัดปากถุงให้แน่น ตรวจผลทุกวันเพื่อดูแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Phytophthora* spp. หลังจากนั้น 8 วัน นำใบสับปะรดไปบ่มไว้ในกล่องความชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 4-5 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญออกมาจากแผล จากนั้นตรวจดูเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แล้วจึงเขี่ยเส้นใยด้วยเข็มเขี่ยไปเลี้ยงบนอาหาร half PDA จานอาหารละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 วันแล้วจึงใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร half PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

**ล่อเชื้อจากดินจากต้นที่แสดงอาการของโรคโดยใช้ใบส้ม**

นำใบส้มมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 เปอร์เซ็นต์ หรือแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง เพื่อล้างโซเดียมไฮโปคลอไรต์ หรือแอลกอฮอล์ออก ใช้ใบมีดที่ฆ่าเชื้อแล้วหั่นให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร นำน้ำกลั่นฆ่าเชื้อใส่ให้ท่วมดินที่เก็บมาจากต้นของส้มที่แสดงอาการของโรค จากนั้นจึงนำใบส้มที่เตรียมไว้ลอยบนผิวน้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนำใบส้มมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เมื่อพบ sporangium ของเชื้อ *Phytophthora* spp. จึงตัดใบส้มเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปวางบนอาหาร WA จานอาหารละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง จึงใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และพร้อมที่จะนำไปทดสอบการเกิดโรคกับต้นส้มเพื่อหาสาเหตุของโรคที่แท้จริงต่อไป

**3.2.2 แยกเชื้อโดยวิธี moist chamber**

เริ่มจากนำชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรคมาฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 เปอร์เซ็นต์ หรือ แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปวางลงในกล่องความชื้น ซึ่งภายในปูด้วยกระดาษทิชชู่ เทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปให้พอชุ่ม ปิดฝากล่องให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน จากนั้นสำรวจดูการเจริญของเส้นใยและเขี่ยเส้นใยไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แล้วจึงเขี่ยเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหาร half PDA จานอาหารละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 วันแล้วจึงใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร half PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยแม่โจ้
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

### 3.3. ทดสอบความสามารถของเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค

เก็บรวบรวมเมล็ดส้มจากสถานที่ขายส้มต่างๆที่จังหวัดเชียงใหม่ เช่น ตลาดต้นพะยอม หรือตามร้านค้าทั่วไป จากนั้นนำไปเพาะในกระบะเพาะ รอจนต้นส้มเจริญจนมีใบจริง จากนั้นย้ายต้นกล้าส้มลงปลูกในกระถางเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

#### 3.3.1 ปลูกเชื้อด้วย mycelia disc บนต้นกล้าส้ม บนจานอาหาร WA

นำต้นกล้าส้มอายุ 5 เดือน วางบนอาหาร WA ในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราที่แยกได้ ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วนำ mycelia disc ไปปลูกเชื้อบนต้นกล้าส้ม โดยวางบนใบและรากส้ม ที่ทำแผล จำนวน mycelia disc 2 ชิ้นต่อแผล ใส่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปเล็กน้อย ปิดฝาเพื่อให้ความชื้น ติดฉลาก (label) ระบุรายละเอียดของเชื้อราที่ใช้ปลูกเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการปลูกเชื้อ 2 ซ้ำต่อ 1 ไอโซเลท สังเกตการเปลี่ยนแปลงทุกวัน

#### 3.3.2 ปลูกเชื้อด้วย mycelia disc ที่โคนต้นกล้าส้ม ที่ปลูกลงในกระถาง

เตรียมเชื้อราที่แยกได้แต่ละไอโซเลทบนอาหาร PDA จากนั้นใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราที่แยกได้ นำ mycelia disc ไปปลูกเชื้อที่โคนต้นกล้าส้มอายุ 5 เดือน ที่ทำแผลบริเวณโคนต้น โดยปลูกส้มลงในกระถาง และใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 500 กรัม โดยทำการปลูกเชื้อ 2 ซ้ำ ต่อ 1 ไอโซเลท ติดฉลาก (label) ระบุรายละเอียดของเชื้อที่ใช้ปลูกเชื้อ นำกระถางไปวางไว้ในกระบะพลาสติก ใส่น้ำลงไปเล็กน้อย เก็บไว้ในถุงพลาสติกเพื่อทำให้เกิดความชื้นสูง โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลทุกวัน และบันทึกผล

### 3.4. แยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินรอบ ๆ ราก

ทำการเก็บตัวอย่างรากส้ม และดินบริเวณรอบ ๆ ต้นส้มจากสวนส้มในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ จากดินบริเวณรอบ ๆ รากพริกกะเหรี่ยง ที่ตำบลสบเมย จังหวัดแม่ฮ่องสอน และจากดินบริเวณรอบ ๆ รากมะเขือเทศ ที่ตำบลสบโขง อำเภอออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่ ที่สมบรูณ์ ปกติ ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลงหรือแสดงอาการของโรค โดยทำการตัดรากของส้มที่ปกติแล้วเขย่าเบา ๆ เพื่อกำจัดดินส่วนใหญ่ออกไป ให้เหลือดินที่ติดอยู่เฉพาะกับผิวราก จากนั้นจึงนำรากส้มและดินบริเวณรอบ ๆ ต้นส้ม ปริมาณ 1 กรัม มาทำการ serial dilution วิธีนี้ทำได้โดยการนำรากส้มและดินที่ต้องการแยกเชื้อมาจำนวน 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ดูดสารละลายมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง ทำไปเรื่อยๆ จนมีความเข้มข้น $10^{-4}$-$10^{-5}$ จากนั้นนำ suspension ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ด้วยวิธีการ spread plate เมื่อพบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จึงแยกเชื้อไปเลี้ยงเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวต่อไป

**3.5. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม โดยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์**

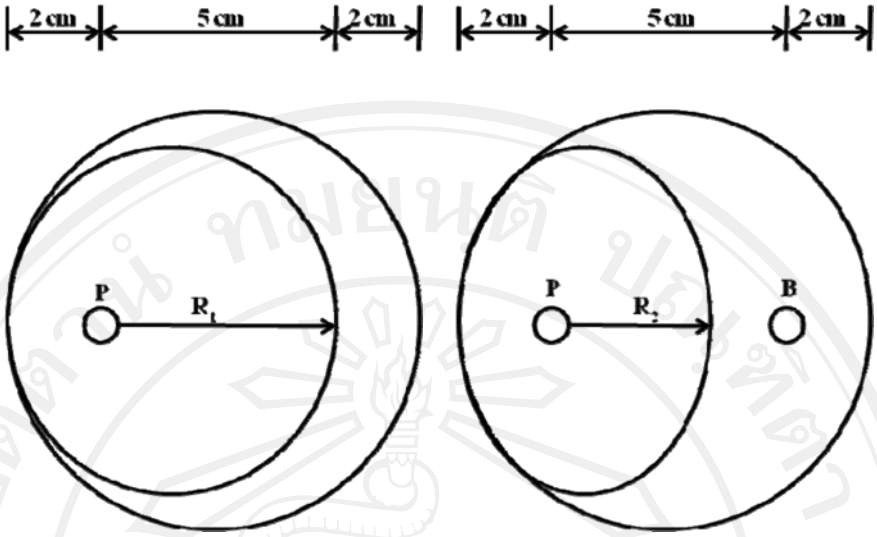
**3.5.1 การทดสอบขั้นต้น**

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพ โดยเริ่มจากนำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ชุบโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดที่ไม่ซ้ำกัน วางลงบนอาหาร PDA ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 2 เซนติเมตร จำนวน 4 ไอโซเลท ต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้านละ 1 ไอโซเลท จากนั้นจึงใช้ cork borer เจาะปลายเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* spp. แต่ละไอโซเลท มาวางตรงกลางจานอาหารให้ห่างจากแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท 2 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เมื่อเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุมเจริญจนเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคไปทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อไป

**3.5.2 การเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์**

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ โดยทดสอบในจานอาหารขนาด 9 เซนติเมตร นำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ชุบโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบ วางลงบนอาหาร โดยให้ห่างจากตำแหน่งที่จะวางเชื้อสาเหตุ 5 เซนติเมตร จากนั้นจึงใช้ cork borer เจาะปลายเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* spp. แต่ละไอโซเลท มาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้านตรงข้ามกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ สำหรับชุดควบคุมจะวางเชื้อสาเหตุอย่างเดียวในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพ 3) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Complete Randomized Design โดยทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ เมื่อเชื้อ *Phytophthora* spp. ในชุดควบคุมเจริญจนมีรัศมีขนาด 5 เซนติเมตร จึงทำการวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุ และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth : PIRG) (ภาพ 4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved




**ภาพ 4** ลักษณะการวัดผลในการเป็นปฏิปักษ์ ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Phytophthora* spp สาเหตุโรครากเน่าของส้มโดยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ (P: Pathogen, B: Antagonistic bacteria, R: Radial growth of Pathogenic fungi)

**การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ (เกษม, 2532)**

ใช้สูตรดังนี้ percent inhibition = $\frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$

โดย $R_1$ = ความยาวรัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม

$R_2$ = ความยาวรัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

**3.6. ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์**

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. มาทดสอบหาคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีการต่างๆ เช่น การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร NA และการศึกษาการติดสีแกรม ขนาด รูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ โดยการย้อมสีแบบแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ การทดสอบเซลลูเลส การทดสอบฟอสฟาเตส, และการทดสอบไคติเนส เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.7. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครากเน่าของส้มโดยใช้เทคนิค PCR**

**3.7.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Phytophthora* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อและภายใต้กล้องจุลทรรศน์**

ศึกษาการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ PDA, CMA, WA และ CA ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ได้แก่ 16 25 และ 31 องศาเซลเซียส โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในลักษณะแกน X และ Y แล้วจึงหาค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต รูปร่างลักษณะของ sporangium วัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามวิธีการของ Pongpisutta and Sangchote (2004)

**3.7.2 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Phytophthora* spp.**

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Phytophthora* spp. ในอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บรวบรวมเส้นใยของเชื้อมาซับให้แห้งบนกระดาษทิชชู่ (tissue) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อได้เส้นใยมากพอ จึงนำไปทำการสกัดดีเอ็นเอทันที หรืออาจเก็บเส้นใยที่ได้ไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิประมาณ 1-4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยชั่งเส้นใยของเชื้อราประมาณ 0.2 กรัม และนำไปบดในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที บดเส้นใยให้ละเอียด เติม extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0.5 % SDS) ปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร ผสมกับ polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) 0.02 กรัม ให้เข้ากัน ถ่ายใส่หลอด cenfrifuge นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ใส่ลงในหลอดใหม่ที่ปลอดเชื้อ เติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol อัตราส่วน 25: 24: 1 ปริมาตร 1: 1 ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ได้สารละลายแยกชั้นเป็น 2 ชั้น ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม isopropanol เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้ง แล้วทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งคว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูให้แห้ง และทำการละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°C จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ทำการเตรียม agarose gel 1% โดยชั่ง agarose 0.3 กรัม ละลายให้เข้ากันกับ 1X TBE buffer (Tris Borate Buffer) 30 มิลลิลิตรลงในขวดที่เตรียมไว้ จากนั้นหลอมให้เข้ากันแล้วรอให้เจล (gel) อุ่นพอมือจับได้ แล้วเติม Ethidium bormide 3 µl ลงในเจล จากนั้นจึงเทเจลลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในถาดเจล (gel tray) ที่เตรียมไว้ เสียบหวีลงไปในเจล (comb) ที่มีจำนวนช่องตามต้องการ เพื่อให้เกิดเป็นหลุมเล็ก (well) รอจนเจลแข็งตัวแล้วดึงหวีออก จากนั้นนำเจลที่ได้วางลงใน electrophoresis gel tank และเท 1X TBE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล ผสม loading buffer 2 ไมโครลิตร กับสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ให้เข้ากันแล้วหยอดตัวอย่างลงในหลุม (well) ปิดฝาและเปิดสวิตช์ electrophoresis gel tank ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก ด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 30 นาที แล้วจึงปิดสวิตช์ จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation (SYNGRNE; Gene Genius Bio Imaging System)

**3.7.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)**

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ โดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ด้วย specific primer Par1s (forward primer) (5'-ACGTTTGGGCTTCGGCCTGATT-3') และ Par2a (reverse primer) (5'-GATGCATACCGAAGTACACATTA-3') , specific primer Pal1s (forward primer) (5'-CACGTGAACCGTATCAAAACT-3') และPal2a (reverse primer) (5'-CAATCATACCACCACAGCTGA-3') ที่พัฒนาโดย Tsai *et al*. (2006) และ specific primer CAPFW (forward primer) (5'-TTTAGTTGGGGGTCTTGTACC-3') และ CAPRV2 (reverse primer) (5'-TACGGTTCACCAGCCCATCA-3') ที่พัฒนาโดย Silvar *et al.* (2005)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 105 ไมโครลิตร ดังนี้

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) |
|---|---|
| น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ($H_2O$) | 78.8 |
| 5 mM dNTPs | 4.2 |
| 10X PCR buffer | 10.5 |
| Primer (20 µM) | 2.6 |
| Primer (20 µM) | 2.6 |
| 50 mM $MgCl_2$ | 5.3 |
| *Tag* DNA polymerase (5 Unit/µl) | 1 |
| ดีเอ็นเอต้นแบบ | 1 |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ผสมส่วนประกอบดังกล่าวให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่อง programmable thermal controller, PTC-100™ (MJ Research) โดยมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยาสำหรับ specific primer Par1s และ Par2a, specific primer Pal1s และPal2a ดังนี้

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | นาน | 3 นาที | |
| denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | นาน | 30 วินาที | จำนวน 35 รอบ |
| annealing | ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส | นาน | 30 วินาที | |
| extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | นาน | 1 นาที | |
| final extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | นาน | 10 นาที | |

และเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยาสำหรับ specific primer CAPFW และ CAPRV2 ดังนี้

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | นาน | 3 นาที | |
| denaturation | ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | นาน | 30 วินาที | จำนวน 35 รอบ |
| annealing | ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส | นาน | 30 วินาที | |
| extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | นาน | 45 วินาที | |
| final extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | นาน | 10 นาที | |

จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ผลด้วย gel electrophoresis บน 1% agarose gel โดยนำผลผลิตจากการทำ PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอบน 1% agarose gel ใน 1X TBE buffer ที่เติม Ethidium bormide แล้ว ด้วยเครื่อง electrophoresis gel tank โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation (SYNGRNE; Gene Genius Bio Imaging System)

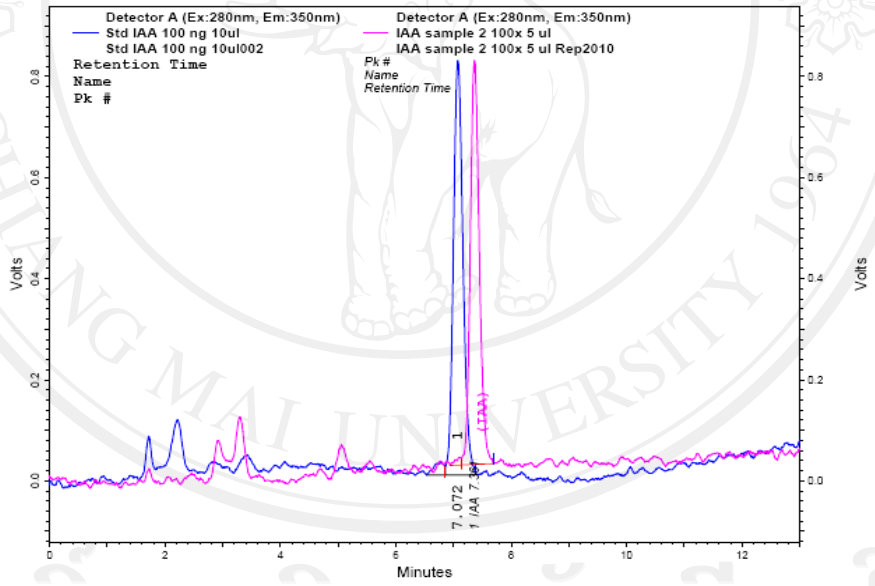
## 3.8. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าของส้มในสภาพเรือนทดลอง

### 3.8.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อพืช

เพื่อให้ทราบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ จะไม่ทำให้เกิดโรคหรือยับยั้งการเจริญกับต้นส้ม จึงทำการทดสอบความเป็นพิษต่อพืชโดยการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท และแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในห้องปฏิบัติการคือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท T13 ที่สามารถสังเคราะห์ IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB โดยวิเคราะห์การสร้างฮอร์โมนพืชด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งมีการสังเคราะห์ IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 1,270.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ปนัดดา และอังสนา, 2552) (ภาพ 5) มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ โดย streak แบคทีเรียลงบนอาหาร NA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร เทลงบนอาหาร แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัว แอล (L) ที่ปลอดเชื้อ ขูดผิวหน้าอาหารเบาๆ เท cell suspensions ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้ รวมไว้ในบีกเกอร์ นำมาทำการนับโคโลนีโดยวิธี dilution plating ปรับให้มีระดับความเข้มข้น $10^8$ cfu/ml จากนั้นนำเมล็ดส้มที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว ปลูกลงในดินฆ่าเชื้อซึ่งบรรจุในกระบะเพาะ ดูแลรดน้ำสม่ำเสมอ จนต้นกล้าส้มมีอายุ 8 เดือน จึงทำการทดสอบความเป็นพิษ โดยการใส่สารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์บริเวณโคนต้นส้ม ความเข้มข้น $10^8$ cfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อต้น ทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน วัดการเจริญของต้นส้มเปรียบเทียบกับชุดควบคุมหลังจากใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์นาน 28 วัน




**ภาพ 5** โครมาโตรแกรมของ IAA วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) (ปนัดดา และอังสนา , 2552)

ก. IAA มาตรฐาน ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (กราฟสีน้ำเงิน)

ข. ปริมาณ IAA จากการสังเคราะห์ของแบคทีเรียไอโซเลท T13 (กราฟสีชมพู)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.8.2 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าของส้มในสภาพเรือนทดลอง**

ทำการเตรียม inoculums ของเชื้อสาเหตุ ตามวิธีการของ Bowman *et al*. (2007) โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างไปแช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อข้ามคืน แล้วนำข้าวฟ่างไปนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 2 ครั้ง เวลาห่างกัน 24 ชั่วโมง จากนั้นปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้มลงในข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ mycelia disc ของเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR03 จำนวน 2 disc ต่อข้าวฟ่าง 100 กรัม บ่มที่อุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 วัน ในที่มืด เมื่อเชื้อเจริญจนเต็มถุง จึงนำไปใช้ต่อไป จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าของส้มในสภาพเรือนทดลอง โดยใส่สารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์บริเวณโคนต้นส้ม ความเข้มข้น $10^8$ cfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อต้น ทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน จึงทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม โดยการใส่ inoculums ของเชื้อสาเหตุ ลงในกระบะเพาะ ปริมาตร 20 กรัมต่อวัสดุปลูก 1,000 มิลลิลิตร แต่ละการทดลองใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) 6 กรรมวิธี 12 ซ้ำ โดยมีรายละเอียดของแต่ละกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 1 บริเวณโคนต้นส้ม แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

กรรมวิธีที่ 2 ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 2 บริเวณโคนต้นส้ม แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

กรรมวิธีที่ 3 ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 3 บริเวณโคนต้นส้ม แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

กรรมวิธีที่ 4 ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 4 บริเวณโคนต้นส้ม แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

กรรมวิธีที่ 5 ชุดควบคุม 1 ใส่น้ำกลั่นบริเวณโคนต้นส้ม แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

กรรมวิธีที่ 6 ชุดควบคุม 2 ใส่น้ำกลั่นที่ได้จากการเทลงบนผิวหน้าอาหาร NA บริเวณโคนต้นส้ม แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำการประเมินต้นเป็นโรคภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุนาน 75 วัน โดยกำหนดระดับความรุนแรงของโรคประยุกต์จากวิธีการของ Bekker *et al.* (2007) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1 = ไม่แสดงอาการเหี่ยว

2 = แสดงอาการเหี่ยวเล็กน้อยหรือเหี่ยวบางส่วน

3 = แสดงอาการเหี่ยว 25-50%

4 = แสดงอาการเหี่ยว 50-80% และ/หรือใบร่วง

5 = แสดงอาการเหี่ยว 80-100% หรือต้นส้มตาย

ทำการประเมินต้นเป็นโรคภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุนาน 75 วัน โดยกำหนดระดับความรุนแรงของโรคตามวิธีการของ Orbovic (2008) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1 = ไม่แสดงอาการรากเน่า

2 = แสดงอาการรากเน่า 1-10% หรือส่วนมากมีรากที่สมบรูณ์

3 = แสดงอาการรากเน่า 11-50% หรือมีรากที่สมบรูณ์เป็นบางส่วน

4 = แสดงอาการรากเน่า 50-80% หรือมีรากที่สมบรูณ์เพียงเล็กน้อย

5 = แสดงอาการรากเน่า 80-100% หรือไม่มีรากที่สมบรูณ์เลย

**สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล**

1. แปลงปลูกส้มในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

2. ห้องปฏิบัติการกลางโรคพืช สาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. ห้องปฏิบัติการ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย**

พฤศจิกายน 2551- ตุลาคม 2553

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved