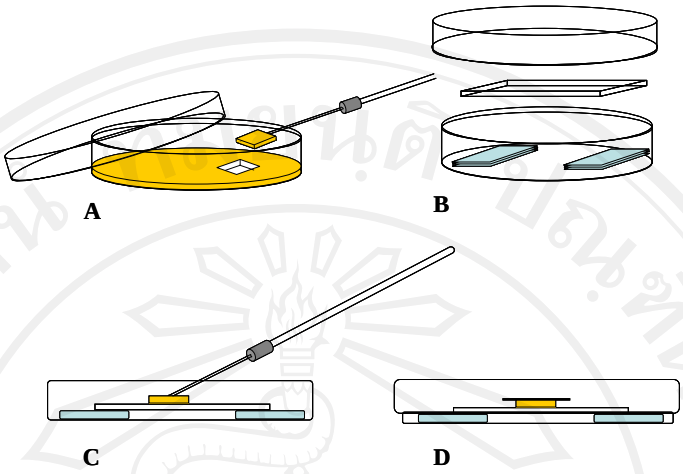
บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. แยกเชื้อราบริสุทธิ์ และเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลไม้

เก็บรวบรวมตัวอย่างผลไม้ 6 ชนิด ได้แก่ แอปเปิล,กล้วย, ฝรั่ง, มะม่วง, มะละกอ และส้ม ที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส จากตลาดในเขต อ.เมือง จ.เชียงใหม่ มาตรวจสอบเชื้อสาเหตุด้วยวิธีการ free hand section ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา หากพบว่าเชื้อสาเหตุเป็นเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จึงทำการแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting method โดยนำส่วนของพืชอาศัยมาล้างด้วยน้ำไหลนานประมาณ 15 นาที เพื่อล้างสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ออก ตัดชิ้นพืชบริเวณแผลกับเนื้อเยื่อปกติให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวโดยจุ่มชิ้นพืชใน 10% sodium hypochlorite นาน 1-3 นาที (ขึ้นอยู่กับความหนาบางของชิ้นพืช) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 3-5 นาที ซับชิ้นพืชให้แห้งด้วยกระดาษชำระที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นพืชวางลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน จึงเขี่ยบริเวณปลายเส้นใยมาวางบนอาหาร PDA ใหม่ เมื่อเชื้อเจริญเกือบเต็มจานอาหาร เขี่ยเส้นใยของเชื้อราไปทดสอบการเป็นสาเหตุของโรคโดยการปลูกเชื้อลงบนผลไม้ชนิดที่เป็นโรค เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อสาเหตุของโรคหรือไม่ โดยสังเกตลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น เก็บตัวอย่างเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรค โดยใช้ cork borer ตัดบริเวณปลายเส้นใยของโคโลนีที่บริสุทธิ์ เก็บตัวอย่างเส้นใยส่วนหนึ่งไว้เป็น stock ใน PDA slant และอีกส่วนหนึ่งนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ทำการวัดขนาดและรูปร่างของ conidium และ appressorium ของเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี slide culture โดยวางแผ่นสไลด์และ cover slip บนกระดาษชำระที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเทอาหาร PDA ลงบนจานอาหารให้หนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร แล้วตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร วางอาหารบนแผ่นสไลด์ เขี่ยเส้นใยเชื้อราหรือกลุ่ม conidium หรือ mass ป้ายที่ขอบของ PDA ทั้ง 4 ด้าน ปิดทับด้วย cover slip (ภาพ 7) แล้วเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงบนกระดาษชำระเพื่อให้ความชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3-4 วัน จึงนำแผ่น cover slide มาย้อมด้วย phenol cotton blue ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสุ่มเลือก conidium และ appressorium อย่างละ 30 อันที่กำลังขยาย 1000 เท่า บันทึกขนาดและรูปร่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 7 วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบ slide culture

2. ทดสอบความทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อผสมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้นระดับต่างๆ ดังนี้คือ 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1000 ppm เทอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้นต่างๆ ใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ทดสอบความทนทานต่อสารสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ด้วยวิธี culture disc technique โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดปลาย เส้นใยของเชื้อราแต่ละไอโซเลท ที่แยกได้จากการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเชื้อรากับชุดควบคุมซึ่งใช้อาหาร PDA ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ ต่อไอโซเลท บันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อรา และการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา เมื่อเชื้อราชุดควบคุมเจริญเต็มที่ โดยบันทึกทั้งในแกน X และแกน Y เพื่อหาค่าเฉลี่ยการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การประเมินระดับความทนทานของเชื้อราต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim นั้นพิจารณาจาก

2.1 ความสามารถเจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เป็นเวลา 5 วัน หรือจนกว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเชื้อราจากทุกไอโซเลท มาจัดระดับความทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim 4 ระดับ (Peres *et al.,* 2004; Koenraadt, *et al.,* 1992) ดังนี้คือ

- เชื้อราที่อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim หรือสายพันธุ์ปกติ (sensitive; S) คือเชื้อราที่ไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญได้เพียงเล็กน้อยบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิม ระดับความเข้มข้น 0.1-1 ppm
- เชื้อราที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ระดับต่ำ(weakly resistance; WR) คือเชื้อราที่เจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ระดับความเข้มข้น 0.1-10 ppm
- เชื้อราที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ระดับปานกลาง (moderately resistance; MR) คือเชื้อราที่เจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิม ระดับความเข้มข้น 0.1-100 ppm
- เชื้อราที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ระดับสูง (highly resistance; HR) คือเชื้อราที่สามารถเจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ระดับความเข้มข้นมากกว่า 100 ppm

2.2 อัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

นำค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อรา ที่ได้จากการทดลองมาประเมินหาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ในแต่ละความเข้มข้นเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้นต่างๆ คำนวณจากสมการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อรา = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดทดสอบ x 100
(เทียบกับชุดควบคุม) ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ชุดควบคุม

แล้วนำเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อราที่ได้ มาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราในแต่ละความเข้มข้น 5 ระดับการเจริญ ดังนี้คือ

-	=	เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 0-10 %เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
+	=	เชื้อราที่เจริญได้มากกว่า 10% แต่ไม่เกิน 35% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
++	=	เชื้อราที่เจริญได้มากกว่า 35% แต่ไม่เกิน 65% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
+++	=	เชื้อราที่เจริญได้มากกว่า 65% แต่ไม่เกิน 90% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
++++	=	เชื้อราที่เจริญได้มากกว่า 90% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

3 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างเชื้อราสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR)

3.1 การศึกษาลักษณะโคโลนี และเส้นใยของเชื้อรา

เลี้ยงเส้นใยเชื้อรา บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ระดับความเข้มข้น 500 ppm (อัตราแนะนำ) ด้วยวิธี poisoned food โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราแต่ละไอโซเลท ที่แยกได้จากการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ ต่อไอโซเลท เป็นเวลา 3 วัน หรือจนกว่าเส้นใยเชื้อราในชุดควบคุม (PDA ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim) จะเจริญเต็มที่ ตรวจสอบลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim เปรียบเทียบลักษณะโคโลนีและเส้นใยในชุดควบคุม กับสายพันธุ์ปกติ และทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim บันทึกลักษณะโคโลนี และการเจริญของเส้นใย

3.2 การศึกษาลักษณะ conidium และการงอก germ tube บนเยื่อหอม

ตรวจสอบลักษณะ conidium และ appressorium และหาอัตราการงอกของ conidium โดยการเลี้ยงบนเยื่อหอม ซึ่งประยุกต์จากวิธีการของ Hirata (1942) ดังนี้คือ เตรียมเยื่อหอม โดยนำหอมหัวใหญ่มาผ่าแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ลอกกลีบหอมหัวใหญ่ออกเป็นชิ้นๆ ใช้มีดกรีดผิวด้านในให้เป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 1x1 เซนติเมตร ใช้ปากคีบ (forceps) ลอกเซลล์ผิว (epidermal cell) ด้านใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลีบหอม นำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 80% ทิ้งไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ เมื่อต้องการใช้ นำเซลล์เยื่อหอมมาล้าง โดยเปิดน้ำไหลผ่านเบาๆ อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบ จากนั้นเตรียม spore suspension ของเชื้อราในข้อ 3.1 โดย เทน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล เกลี่ยให้สปอร์ของเชื้อราหลุดออกจากผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อ 3-4 ชั้น เพื่อกรองเอาเศษวุ้นและเส้นใยเชื้อราออก นำ spore suspension ไปปรับปริมาตรด้วย haemacytometer ให้ได้ความเข้มข้นสปอร์เท่ากับ 8×10^5 สปอร์/มิลลิลิตร เขี่ยเยื่อหอมวางบนกระจกสไลด์ที่สะอาด โดยให้หงายด้านที่มีแวกซ์ขึ้นด้านบน ซับน้ำส่วนที่เหลือด้วยกระดาษกรอง นำ spore suspension (8×10^5 สปอร์/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนเยื่อหอมที่เตรียมไว้ แล้วนำไปลอยบนน้ำกลั่นผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา 500 ppm เปรียบเทียบกับชุดที่ลอยอยู่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหาเปอร์เซ็นต์การงอกของ conidium บนเยื่อหอม โดยนำเยื่อหอมที่หยด spore suspension มาวางบนแผ่นสไลด์ แล้วหยด lactophenol cotton blue ลงไป เพื่อหยุดการงอกและการเจริญของ conidium ปิดทับด้วย cover slip นำไปตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกของ conidium และ appressorium โดยสุ่มนับ 100 conidium ต่อซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำต่อไอโซเลท ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ ที่เวลา 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง โดย conidium ที่นับว่างอกต้องเป็น conidium ที่งอก germ tube ออกมามากกว่าความกว้างของ conidium

4 ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา และสมุนไพรในการควบคุมเชื้อรา *Colletotruchum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลไม้

4.1 ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ต่อการเจริญของเส้นใย

นำสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจากกรมวิชาการเกษตร จำนวน 6 ชนิด (ตาราง 3) มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ด้วยวิธีการ poisoned food technique

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 ชนิด ความเข้มข้น และปริมาณของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

ชื่อสามัญ	ชื่อการค้า	ระดับความเข้มข้นของอัตราแนะนำ (ppm.)
benomyl	Benlate® OD	500
carbendazim	Vitavax®	500
carboxin	Vitavax®	525
captan	Orthocide®	1,250
copper oxychloride	Copina 85®	2,150
mancozep	Newtane M-45®	200

โดยนำสารเคมีป้องกับกำจัดเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ในอัตราแนะนำ มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละประมาณ 10 มิลลิลิตร ใช้ cork borer ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เจาะย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim เจริญอยู่ วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารป้องกันกำจัดโรคพืช โดยทดสอบสารเคมีละ 4 ซ้ำ ต่อไอโซเลท เปรียบเทียบลักษณะโคโลนี และเส้นใยกับชุดควบคุม (ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา) และชุดที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ของสายพันธุ์ปกติ และทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim บันทึกลักษณะโคโลนี และการเจริญของเส้นใย และทำการวัดขนาดโคโลนี เพื่อใช้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้ง ตามสูตรของ ธรรมศักดิ์ (2543) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม (0 ppm)

B = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารป้องกันกำจัดโรคพืช

เพื่อหาสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดเชื้อราที่ทนทานต่อสารกำจัดเชื้อรา carbendazim

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ต่อการงอกของ conidium บนเยื่อหอม

ทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืช ต่ออัตราการงอกของ conidium และการสร้าง appressorium ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยการเลี้ยงบนเยื่อหอมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2 โดยนำสารเคมีป้องกับกำจัดโรคพืชทั้ง 5 ชนิด (ตาราง 4) ในอัตราแนะนำ ผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 30 มิลลิลิตร (ภาคผนวก) เทใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตาราง 4 ชนิด ความเข้มข้น และปริมาณของสารป้องกันกำจัดโรคพืช ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของ conidium เชื้อรา *Colletotrichum* spp.

ชื่อสามัญ	ชื่อการค้า	ระดับความเข้มข้นของอัตราแนะนำ (ppm.)	ปริมาณสารที่ใช้ ต่อน้ำ 30 ml
benomyl	Benlate® OD	500	0.05 ml
carboxin	Vitavax®	525	0.021 g
captan	Orthocide®	1,250	0.075 g
copper oxychloride	Copina 85®	2,150	0.075 g
mancozep	Newtane M-45®	200	0.00075 g

จากนั้นใช้ปากคีบ (forceps) คีบเยื่อหอมมาวางบนสไลด์ ใช้กระดาษกรองซับน้ำที่ติดอยู่บนเยื่อหอมเบาๆ แล้วใช้ ปากคีบดึงเยื่อหอมลอยบนผิวของน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) และสารเคมีทั้ง 5 ชนิด จากนั้นทำการปลูกเชื้อด้วยการหยด spore suspension ลงบนเยื้อหอมด้วย micro pipette ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับอัตราการงอกของ conidium เชื้อรา ที่เวลา 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยวางเยื่อหอมบนแผ่น slide หยด lactophenol cotton blue ลงไป เพื่อหยุดการงอก และการเจริญของ conidium ปิดทับด้วย cover slips สุ่มนับเปอร์เซ็นต์การงอกของ conidium และ appressorium โดยสุ่มนับ 100 conidium ต่อซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำต่อไอโซเลท ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ โดย conidium ที่นับว่างอกต้องเป็น conidium ที่งอก germ tube ออกมามากกว่าความกว้างของ conidium โดยเปรียบเทียบระหว่างสารเคมีแต่ละชนิดกับชุดควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 ประสิทธิภาพของสมุนไพร ต่อการเจริญของเส้นใย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เพื่อผสมกับผงสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ ขิง ข่า และกระชาย โดยผสมผงสมุนไพรปริมาณ 0.15, 0.45, 0.75, 1.5, 4.5 และ 7.5 กรัม ตามลำดับ จะได้อาหารที่ผสมผงสมุนไพรความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นนำอาหารที่เตรียมได้ดังกล่าวไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เมื่ออาหารอุ่น ประมาณ 60 องศาเซลเซียส จึงนำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละประมาณ 10 มิลลิลิตร ทดสอบความเป็นพิษต่อการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ โดยวิธี culture disc technique โดยใช้ cork borer ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เจาะย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราเจริญอยู่ไปวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ ทำการทดลองละ 4 ซ้ำ ต่อไอโซเลท ทุกขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนเส้นใยเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มที่ จึงทำการเปรียบเทียบลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อราในชุดควบคุมกับเชื้อราสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และทำการวัดขนาดโคโลนี เพื่อใช้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้ง ตามสูตรของ ธรรมศักดิ์ (2543) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม (0 ppm)

B = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมผงสมุนไพร

นำผลที่ได้คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและค่าความเข้มข้นของสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 50 เปอร์เซ็นต์ (effective dose 50% หรือ ED_{50}) (ภาคผนวก)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR)

5.1 เตรียมเส้นใยเชื้อรา และสกัดดีเอ็นเอ

เตรียมเส้นใยเชื้อราโดยตัดส่วนปลายเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เจริญบนอาหาร PDA ด้วย cork borer วาง culture disc จำนวน 3-5 ชิ้นในอาหารเหลว PDB 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-7 วัน หรือจนกว่าเส้นใยเชื้อราจะเจริญเป็นแผ่นเต็มผิวอาหารเหลว จากนั้นกรองเส้นใยผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-5 ครั้งหรือจนกว่าเส้นใยจะสะอาด แล้วใช้กระดาษชำระแผ่นใหญ่ ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ซับน้ำออกจากเส้นใยให้หมด ฉีกเส้นใยให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยคีมคีบ (forceps) ที่ลนไฟฆ่าเชื้อ บรรจุเส้นใยนั้นใส่ไว้ในหลอด Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ให้ได้ประมาณ 1/3 ของหลอด แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

สกัดดีเอ็นเอด้วย Nuclospin Plant Kit® โดยชั่งเส้นใยมา 0.1-0.2 กรัม นำเส้นใยใส่โกร่งที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เติมไนโตรเจนเหลวลงไป เพื่อให้เส้นใยแข็งตัว จากนั้นบดเส้นใยให้เป็นผง ตักใส่ Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม PL1 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้ว Vortex ให้เข้ากัน เติม RNaseA 10 ไมโครลิตร และ PL1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร Vortex อีก นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นประกอบชุด kit ดูดของเหลวใสใส่ใน column สีม่วง นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม CP buffer 450 ไมโครลิตร ใช้ pipette ดูดขึ้นลง 5 ครั้ง จากนั้นประกอบชุด kit ดูดของเหลวใส่ใน column สีเขียวนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทของเหลวในหลอดทิ้ง เติม PW buffer 400 ไมโครลิตร ใน column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติม PW2 buffer 700 ไมโครลิตร ใน column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติม PW2 buffer อีก 200 ไมโครลิตร ใน column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที แล้วเติม PE elution buffer (อุ่นที่ 70 องศาเซลเซียส มาก่อน) 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเติม PE elution buffer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

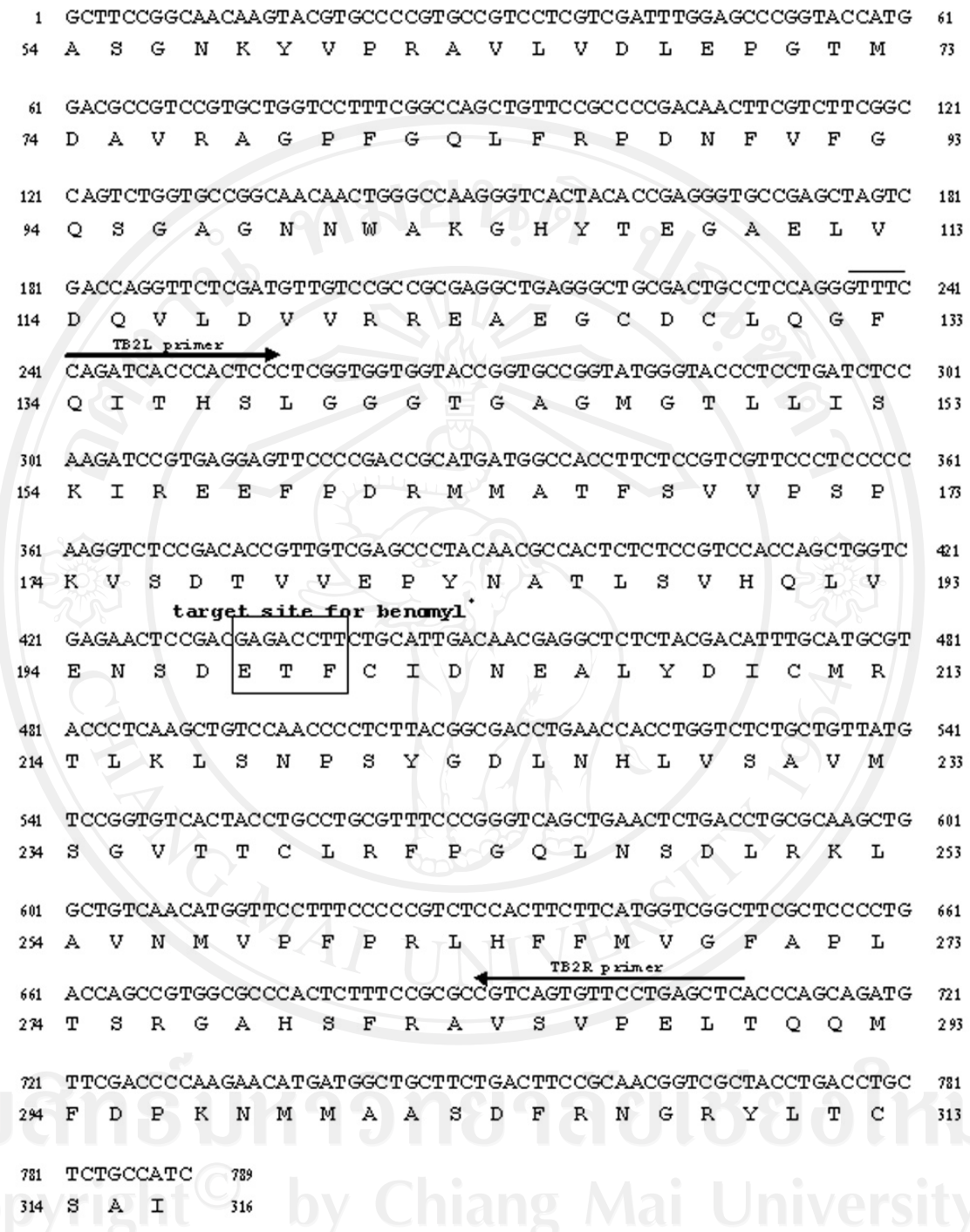
อีก 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บไว้ที่ 20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิส ใน agarose gel 1 เปอร์เซนต์ โดยชั่ง agarose 1 กรัม เติม running buffer (1x TBE buffer) 100 มิลลิลิตร หลอมเจลให้ละลายด้วยไมโครเวฟ ปล่อยให้เย็นลง อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียล เติม 1x EtBr (ethidium brimide) 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเทลงในถาดเจลให้มีความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เสียบหวีที่ปลายข้างหนึ่งของถาดเจล เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ (well) สำหรับใส่ตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็ง ค่อยๆ ดึงหวีออก นำถาดเจลใส่ลงไปในเครื่องอิเลคโตรโฟริซิส โดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ทางขั้วลบ เติม 1x TBE buffer ลงไปพอท่วมแผ่นเจล จากนั้นนำดีเอ็นเอมาผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 2 : 1 หยอดลงไปใน well และเปรียบเทียบกับ 100 นาโนกรัมมาตรฐาน ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หรือสังเกตจากสีของ loading buffer ที่เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายของแผ่น agarose gel จึงปิดสวิทช์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำไปตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพ จากนั้นทำการลดความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้อยู่ในระดับ 10-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003) เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการนำไปทำ PCR ในการทดลองต่อไป

5.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบางส่วนของตำแหน่งยีน beta-tubulin โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ใช้ไพร์เมอร์ 2 ชนิด คือ TB2L (5′-GTT TCC AGA TCA CCC ACT CC-3′) และ TB2R (5′-TGA GCT CAG GAA CAC TGA CG-3′) (Buhr and Dickman, 1994) ที่ผลิตโดยบริษัท iNtRON BIOTECHNOLOGY, INC. (ภาพ 8) ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดนี้ มีความเฉพาะเจาะจงต่อยีน beta-tubulin ซึ่งมักจะพบในเชื้อราที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา benomyl (Peres *et al.,* 2004) ออกแบบไพร์เมอร์โดยใช้ Primer 3 software ซึ่งอาศัยต้นแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน beta-tubulin ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (U14138) (ภาพ 9)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 8 รูปแบบไพร์เมอร์ TB2L และ TB2R ที่ออกแบบโดยอาศัยต้นแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน beta-tubulin ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (U14138)**

หมายเหตุ * Peres *et al.* (2004)

** Buhr and Dickman (1994)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 9 ลำดับนิวคลิโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน beta-tubulin (*TUB2*) ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* สายพันธุ์ปกติ (S) (Buhr and Dickman, 1994)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mix) ในหลอด PCR tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับต่อไปนี้

ตาราง 5 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (reaction mix) ในการเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน beta-tubulin

สารประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x PCR buffer	1x	5.0
dNTP mix	2.0 mM	4.0
Blend *Taq* DNA Polymerase	0.625 unit/µl	0.25
50 mM $MgCl_2$	2.5 mM	3.0
Primer TB2L	50 pmoles/µl	1.0
Primer TB2R	50 pmoles/µl	1.0
DNA template	10-100 ng	1.0
distilled water		34.75
ปริมาตรรวม		50

เมื่อเติมส่วนผสมทุกอย่างครบแล้ว นำหลอด PCR tube ที่เตรียมพร้อมแล้วไปเข้าเครื่อง thermal cycler Programable Thermal Controller PTC-200™ thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA) โดยกำหนดกำหนดอุณหภูมิ และเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
   extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
   ในขั้นตอนนี้ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ
3. primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ
   แล้วคงสภาพดีเอ็นเอไว้โดยใช้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว นำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นตรวจสอบผล PCR ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 5.1 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของ agarose gel ที่ใช้ในการการแยกขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ 1x EtBr (ethidium) ลงไปในอัตราส่วน 7 ไมโครลิตร ต่อปริมาตร agarose gel 100 มิลลิลิตร ใช้ running buffer เป็น 0.5x TBE buffer ผสม loading dye ลงไปในดีเอ็นเอ อัตราส่วน 1:5 ไมโครลิตรและใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 kb ladder (SibEnzyme, Russia) เพื่อเทียบขนาด ดีเอ็นเอ โดยผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 1 : 1 จากนั้นต่อเครื่องอิเลคโตรโฟริซิสเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำเจลตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพ

5.3 วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรม

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากขั้นตอนที่ 5.2 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Qiaquick purification kit® (Qiagen) จากนั้นหาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์บางส่วนในตำแหน่งของยีน beta-tubulin โดยใช้ ABI PRISM Dye Termination Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ที่ผลิตโดยบริษัท Applied Biosystems, Foster City, USA ซึ่งใช้ primer 2 ชนิด คือ TB2L และ TB2R โดยส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mix) ในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ในหลอด PCR tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตรตามลำดับต่อไปนี้

ตาราง 6 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (reaction mix) ในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

สารประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNA template	10-100 ng	1.0
Primer TB2L หรือ TB2R	10 pmoles/µl	1.0
Sequencing buffer	5x	1.0
Big Dye	1.1 v	2.0
distilled water		15.0
ปริมาตรรวม		20

ผสมส่วนผสมทุกอย่างให้เข้ากัน เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับทำปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. initial denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
   extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที
   ในขั้นตอนที่ 2 นี้ ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วดูดสารละลายทั้งหมด (ปริมาตร 20ไมโครลิตร) ย้ายไปใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ แล้วทำการตกตะกอนด้วย 70% EtOH (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำเข้าเครื่อง vacuum เพื่อให้ตะกอนแห้ง ที่ระดับความดัน 50 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เก็บตะกอนเพื่อนำไปตรวจหาลำดับเบสต่อไป

นำตะกอนดีเอ็นเอมาละลายด้วย loading dye ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2-5 นาที เพื่อให้ ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer โดยตั้งค่าต่างๆ ตามคู่มือการใช้ที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำไว้ในหนังสือคู่มือ โดยเครื่องจะทำงานประมาณ 14 ชั่วโมง การทำงานของเครื่องจะเป็นไปแบบอัตโนมัติ และบันทึกผลโดยเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ต่อกับเครื่องหาลำดับเบส ซึ่งเมื่อเสร็จสิ้นการทำงานของเครื่องแล้วสามารถนำข้อมูลออกจากเครื่องคอมพิวเตอร์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลต่อไป โดยเปรียบเทียบข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดกับข้อมูลจาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนในตำแหน่งยีน beta-tubulin ของทุกตัวอย่าง โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม CLUSTAL W จาก The DNA Data Bank of Japan (DDBJ) และเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่างกรดอะมิโนของทุกตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัยและรวบรวมข้อมูล

- ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยาระดับโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ห้องปฏิบัติการกลางงานวิจัยระดับโมเลกุล สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2548 ถึงเดือนสิงหาคม 2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved