บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาลักษณะอาการและการแยกเชื้อสาเหตุของโรคไฟทอปธอร่าไบลท์

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างพริกหวานที่แสดงอาการของโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ จากโรงเรือนเพาะปลูกของเกษตรกร บ้านม่วงคำ ตำบลโป่งแยง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ เริ่มต้นด้วยการสำรวจพริกหวานที่แสดงอาการของโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ภายในโรงเรือนปลูกพริกหวาน บันทึกอาการของโรคที่เห็นพร้อมทั้งถ่ายรูป จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างโดยนำวัสดุปลูกจากต้นที่แสดงอาการของโรคมาศึกษาหาเชื้อสาเหตุต่อไป

1.1 การแยกเชื้อสาเหตุโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ของพริกหวาน

นำตัวอย่างของโรคมาทำการแยกเชื้อโดยวิธีต่างๆ ดังนี้

1.1.1 วิธีการแยกเชื้อจากชิ้นพืชที่แสดงอาการของโรคภายในสภาพกล่องที่มีความชื้นสูง ต้นที่เกิดโรค

นำตัวอย่างต้นพริกหวานที่เป็นโรคมาตัดบริเวณโคนต้นเหนือดิน ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง และล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปวางในกล่องความชื้นซึ่งภายในปูด้วยกระดาษทิชชู ซึ่งเทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปให้พอชุ่ม ปิดฝาให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง นำเส้นใยของเชื้อที่เจริญออกมาจากแผล มาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) จานละ 4 ตำแหน่งทำในสภาพปลอดเชื้อ เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นใช้ cork borrer เจาะบริเวณปลายเส้นใยขอบโคโลนีมาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์และเก็บไว้ศึกษาต่อไป

ผลที่เกิดโรค

นำตัวอย่างผลพริกหวานที่เป็นโรค มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง และล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปวางในกล่องความชื้นซึ่งภายในปูด้วยกระดาษทิชชูซึ่ง เทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปให้พอชุ่ม ปิดฝาให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง ใช้เข็มเขี่ยเส้นใยที่ขึ้นฟูบนบริเวณผลพริกหวาน มาเลี้ยงลงบนอาหาร half PDA จานละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 วัน เมื่อเชื้อเจริญเป็นโคโลนีใช้ cork borrer เจาะบริเวณปลายของเส้นใยที่ขอบโคโลนีมาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และพร้อมจะนำไปทดสอบการเกิดโรคกับต้นพริกเพื่อหาสาเหตุของโรคที่แท้จริงต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.2 วิธีการล่อเชื้อจากวัสดุปลูก

ล่อเชื้อจากวัสดุปลูกจากต้นที่แสดงอาการของโรคโดยใช้แครอทและพริกหวาน

ฆ่าเชื้อที่ติดมากับผิวของพืชที่ใช้ล่อเชื้อในวัสดุปลูกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยการใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อล้างแอลกอฮอล์ออก หั่นพืชด้วยมีดฆ่าเชื้อให้ชิ้นพืชมีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส (ลูกเต๋า) ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำชิ้นพืชไปวางบนวัสดุปลูกให้ชิ้นพืชจมลงไปประมาณ 0.5 เซนติเมตรซึ่งบรรจุอยู่ในกล่องพลาสติกใส ใส่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปพอดินชื้นหมาดๆ ปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้นาน 5 วันตรวจดูการเจริญของเชื้อที่ขึ้นบนชิ้นพืชโดยการทำสไลด์และนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเขี่ยเส้นใยที่ขึ้นบนเหยื่อล่อไปเลี้ยงลงบนอาหาร half PDA จานละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน ใช้ cork borrer เจาะบริเวณปลายของเส้นใยของเชื้อมาเลี้ยงลงบนอาหาร half PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

ล่อเชื้อจากวัสดุปลูกจากต้นที่แสดงอาการของโรคโดยใช้ใบสับปะรด

นำใบสับปะรดมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง ใช้มีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว หั่นตรงส่วนโคนใบเพื่อให้มีพื้นที่ผิวมากที่สุด จากนั้นนำชิ้นส่วนดังกล่าวไปจุ่มลงในบีกเกอร์ที่บรรจุสารละลายของวัสดุปลูก (ผสมด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ซึ่งเป็นวัสดุปลูกจากต้นที่แสดงอาการของโรค โดยจุ่มตรงโคนใบลงไป จากนั้นนำบีกเกอร์ที่มีใบสับปะรดจุ่มในสารละลายวัสดุปลูกใส่ลงในถุงพลาสติกและมัดปากถุงให้แน่น ตรวจผลทุกวันเพื่อดูแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Phytophthora* sp. หลังจากนั้น 8 วันนำใบสับปะรดดังกล่าวไปบ่มเชื้อไว้ในกล่องให้ความชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมินาน 4- 5 วันเพื่อให้เชื้อเจริญออกมาจากแผล จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเขี่ยเส้นใยบริเวณดังกล่าวไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนำไปเลี้ยงลงบนอาหาร half PDA จานละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 4 วัน ใช้ cork borrer เจาะบริเวณปลายของเส้นใยเส้นใยขอบโคโลนีของเชื้อมาเลี้ยงลงบนอาหาร half PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และพร้อมจะนำไปทดสอบการเกิดโรคกับต้นพริกหวานเพื่อหาสาเหตุของโรคที่แท้จริงต่อไป

1.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคไฟทอปธอร่าไบลท์

1.2.1 ปลูกเชื้อที่ใบ ทำความสะอาดใบให้พร้อมสำหรับการปลูกเชื้อ นำเชื้อราที่แยกได้เจาะด้วย cork borer วางบนใบพริกหวาน 2 จุด ต่อ 1 ใบด้านหนึ่งทำแผลอีกด้านหนึ่งไม่ได้ทำแผลทำ 5 ใบต่อต้น ติดฉลาก (label) ระบุรายละเอียดของเชื้อราที่ใช้ปลูกเชื้อ จากนั้นนำไปวางในกระบะพลาสติกซึ่งบรรจุอยู่ในกล่องพลาสติกที่ภายในใส่น้ำเล็กน้อย ปิดฝาเพื่อทำเป็นกล่องที่มีความชื้นสูง สังเกตการเปลี่ยนแปลงทุกวัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2 <u>ปลูกเชื้อที่โคนต้น</u> นำชิ้นวุ้น PDA ที่มีเชื้อราแต่ละไอโซเลทเจริญอยู่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร มาวางบริเวณโคนต้นพริกหวานอายุ 2 เดือนที่ทำแผลและไม่ทำแผล โดยทำ 2 ถุงต่อ 1 ไอโซเลท (ถุงทำแผลและไม่ทำแผล) ติดฉลาก (label) ระบุรายละเอียดของเชื้อราที่ใช้ปลูกเชื้อ นำไปวางไว้ในกระบะพลาสติก ใส่น้ำลงไปเล็กน้อย เก็บไว้ในถุงพลาสติกมัดปากถุงเพื่อทำให้เกิดสภาพความชื้นสูง สังเกตผลทุกวัน

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคไฟทอปธอร่าไบลท์

1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Phytophthora* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อและภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาการเจริญเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่อายุ 3 5 7 และ 9 วันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในลักษณะแกน X และ Y แล้วจึงหาค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต รูปแบบการเจริญของเส้นใยบนอาหาร PDA รูปร่างลักษณะของ sporangium วัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามวิธีการของ Pongpisutta และ Sangchote (2004) พร้อมทั้งทำการบันทึกภาพลักษณะโคโลนีที่อายุ 10 วันและรูปร่างลักษณะของ sporangium ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2 การจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* sp.

นำเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แยกได้แต่ละไอโซเลทมาจำแนกชนิดโดยอาศัยเทคนิค PCR

2.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* sp.

2.2.1.1 การเตรียมเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* sp.

เลี้ยงเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แยกได้ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri disc) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose broth (PDB) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บรวบรวมเส้นใยเชื้อราโดยตักเอาเส้นใยของเชื้อรามาซับให้แห้งบนกระดาษทิชชู (tissue) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใช้ปากคีบ (forcep) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เมื่อได้เส้นใยมากพอสามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอได้ทันที หรืออาจเก็บเส้นใยที่ได้ไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส ได้นานจนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอในขั้นต่อไป

2.2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

ชั่งน้ำหนักของเส้นใยประมาณ 0.2 กรัม และนำไปใส่ไว้ในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 -15 นาที บดเส้นใยให้ละเอียด เติม extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 750 ไมโครลิตรผสมกับ PVPP 0.01 กรัม ให้เข้ากัน ถ่ายใส่หลอด centrifuge

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ใส่ลงหลอดใหม่ เติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 1:1 ส่วนผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ได้สารละลายแยกชั้นเป็น 2 ชั้น ให้เก็บสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม isopropanal เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมงหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วคว่ำหลอดทิ้งไว้จนตะกอนแห้ง เมื่อแห้งแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย น้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตรเก็บที่ 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจสอบคุณภาพขั้นต่อไป

2.2.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เตรียม agarose gel 1% โดยชั่ง agarose 0.3 กรัม ละลายให้เข้ากันกับ 1X TBE buffer (Tris Borate Buffer) 30 มิลลิลิตร ลงในขวดที่เตรียมไว้ จากนั้นหลอมให้เข้ากันในไมโครเวฟ จากนั้นรอให้เจล (gel) อุ่นพอมือจับได้ แล้วจึงเทเจลลงในถาดเจล (gel tray) ที่เตรียมไว้ เสียบหวี (comb) ที่มีจำนวนช่องตามต้องการลงไปในเจล เพื่อให้เกิดเป็นหลุมเล็ก (well) รอจนเจลแข็งตัวแล้วจึงดึงหวีออกอย่างระมัดระวัง จากนั้นนำเจลที่ได้วางลงใน electrophoresis gel tank และเท 1X TBE buffer ให้ท่วมแผ่นเจลผสม loading buffer 2 ไมโครลิตร กับสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง 7 ไมโครลิตร ให้เข้ากันแล้วหยอดตัวอย่างลงในหลุม (well) ปิดฝาและเปิดสวิตซ์ electrophoresis gel tank ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก ด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์เวลา 20 นาที จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำนาน 10 นาที นำแผ่นเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGRNE; Gene Genius Bio Imaging System)

2.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ด้วย specific primer CAPFW (forward primer) (5’ TTTAGTTGGGGGTCTTGTACC 3’) และ CAPRV2 (reverse primer) (5’ TACGGTTCACCAGCCCATCA 3’) ที่พัฒนาโดย Silvar *et al.* (2005) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตรดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (H_2O)	37
5 mM dNTPs (2.5 mM each)	2
10X PCR buffer	5
Primer CAPFW (20μM)	1
Primer CAPRV2 (20μM)	1
50mM $MgCl_2$	2
Tag DNA polymerase (5Unit/μl)	0.5
ดีเอ็นเอต้นแบบ	1

ผสมส่วนประกอบดังกล่าวให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่อง programmable thermal controller, PTC -100 ™ (MJ Research) โดยมีเงื่อนไขในการทำปฏิริยาดังนี้

initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	นาน	2 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน	30 วินาที	จำนวน 35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส	นาน	30 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน	1 นาที	
final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน	10 นาที	

จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1% agarose gel โดยนำผลผลิตจากการทำ PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอบน 1% agarose gel ใน 1X TBE buffer ด้วยเครื่อง electrophoresis gel tank โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำนาน 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGRNE ; Gene Genius Bio Imagine System)

3. การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนต่างๆของพริกหวาน

3.1 การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างใบ ลำต้น ราก และวัสดุปลูกของพริกหวานจากโรงเรือนปลูกพริกหวาน ตำบลโป่งแยง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ โดยเลือกเก็บเฉพาะส่วนที่สมบูรณ์ ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลงหรือแสดงอาการของโรค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การฆ่าเชื้อที่ผิวและการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนต่างๆ ของพริกหวาน

นำตัวอย่างใบพืชมาล้างน้ำให้สะอาด โดยล้างผ่านน้ำไหล (running water) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผึ่งลมให้แห้ง ใช้กรรไกรตัดใบ ลำต้นและราก ให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนของพืชแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงย้ายแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นซับชิ้นพืชให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่ฆ่าเชื้อ ผึ่งลมให้แห้ง วางชิ้นพืชจำนวน 15 ชิ้นต่อ 1 จาน อาหารบนอาหาร Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิม (บาวิสติน 50% เอฟแอล) อัตรา 150 ไมโครลิตรต่ออาหาร IMA-2 150 มิลลิลิตร บ่มเชื้อไว้ที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ loop ที่ลนไฟฆ่าเชื้อ ย้ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช streak ลงบนอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง แล้วคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวๆ เก็บไว้เป็น stock culture ในหลอดอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากผิวใบหรือผิวราก

นำตัวอย่างใบพริกหวานหรือรากพริกหวาน มาแช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายดังกล่าวมา 0.2 มิลลิลิตร spread plate ลงบนอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว ไปทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.4 การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในใบและในราก

นำตัวอย่างใบหรือรากพริกหวานมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของใบใช้เวลา 3 นาที ส่วนรากใช้เวลา 5 นาที จากนั้นทำการบดใบหรือรากในโกร่งที่ฆ่าเชื้อ เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปอัตราส่วนใบหรือราก 1 กรัม ต่อน้ำ 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร spread plate บนอาหาร NA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง แล้วย้ายเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวมา streak plate บนอาหาร NA ให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp.

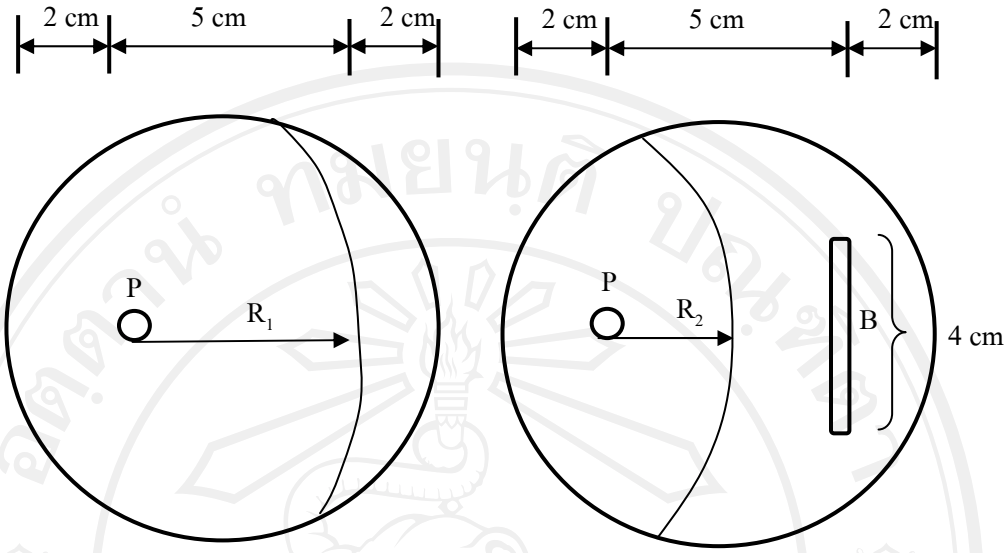
4.1 การทดสอบขั้นต้น

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพโดยเริ่มจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร PDA โดยลากยาว 4 เซนติเมตร ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 2 เซนติเมตร จำนวน 4 ไอโซเลท ต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้านละ 1 ไอโซเลท บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 - 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เจริญสมบูรณ์ จากนั้นจึงใช้ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อ *Phytophthora* sp. แต่ละไอโซเลทมาวางตรงกลางจานอาหารให้ห่างจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท 2 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เมื่อเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุมเจริญจนเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคไปทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธี dual culture ต่อไป

4.2 Dual Culture

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ทำการคัดเลือกแล้วในขั้นต้นมาทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ ด้วยวิธี dual culture โดยทดสอบในจานอาหารขนาด 9 เซนติเมตรและนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA โดยลากยาว 4 เซนติเมตรให้ห่างจากตำแหน่งที่จะวางเชื้อสาเหตุ 5 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24- 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เจริญสมบูรณ์ จากนั้นจึงใช้ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อ *Phytophthora* sp. แต่ละไอโซเลทวางบนอาหาร PDA ที่ขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แล้ว (ภาพ 1) วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมจะวางเชื้อสาเหตุอย่างเดียวในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุมเจริญจนมีรัศมี 5 เซนติเมตร จึงบันทึกผลโดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุในชุดควบคุมและชุดทดสอบและนำข้อมูลที่ได้มา คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG) ตามสูตร (Tronsmo, 1992)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 ลักษณะการวัดผลในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ในพริกหวานโดยวิธี Dual culture (P: Pathogen, B: Antagonistic bacteria, R: Radial growth of Pathogenic fungi)

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIRG)

$$PIRG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

5. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2 ไอโซเลท ที่ให้ผลในการทดสอบจากขั้นต้นที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. capsici* สาเหตุโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ของพริกหวานมาทำการจำแนกเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติด้านสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีดังนี้

5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์

ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร NA และศึกษาการติดสีแกรม ขนาด รูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ โดยการย้อมสีแบบแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาคผนวก ค)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

ศึกษาปฏิกิริยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลต่อสารเคมีที่เติมลงในอาหาร (ภาคผนวก ข) และดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐานซึ่งได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B.subtilit* และ *Pseudomonas aeruginosa* (ภาคผนวก ค)

5.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์

ทำการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง Biolog™ Microlog System, Release 4.2 ซึ่งทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน (carbon source) ของแบคทีเรียที่แตกต่างกันจำนวน 95 ชนิด และวิเคราะห์ผลโดยเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐาน ซึ่งได้รับความร่วมมือในการตรวจสอบจาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม (ภาคผนวก ง)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการงอกของเมล็ดพริกหวาน

6.1 การเตรียมเมล็ดพริกหวาน

นำเมล็ดพริกหวานพันธุ์ลูกผสม วีก้า (Vega 1288) จากบริษัท เพื่อนเกษตรกร จำกัด มาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวตามวิธีการของ Errakhi *et al*. (2007) โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง นำไปผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที

6.2 การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. capsici* สูงสุดจำนวน 2 ไอโซเลท จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณโดยใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อแบคทีเรีย มา streak ลงบนผิวหน้าอาหาร NA ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เทลงในจานอาหาร 20 มิลลิลิตรต่อจานอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขูดแบคทีเรียให้หลุดจากผิวหน้าของอาหารเบาๆ แล้วเทรวมกันในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปรับให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร

6.3 การทดสอบการงอกของเมล็ดพริกหวานบนกระดาษชื้น

นำเมล็ดพริกหวานที่ฆ่าเชื้อแล้ว แช่ในสารละลายแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุจากขั้นตอนที่ 4 จำนวน 2 ไอโซเลท ความเข้มข้น 10^8 cfu/ มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นผึ่งให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะบนกระดาษชื้น (blotter method) โดยนำเมล็ดพริกหวานวางบนกระดาษเพาะในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ซึ่งภายในบรรจุกระดาษกรอง Whatman No.1 จำนวน 1 แผ่น ไว้ด้านบนและกระดาษฟาง 3 แผ่นที่ชุบน้ำจนชุ่มไว้ด้านล่าง วางเมล็ดพริกหวาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวน 25 เมล็ดต่อจาน โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ ตรวจสอบการงอกของเมล็ดพริกหวานโดยการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพร้อมทั้งชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์

7. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ของพริกหวานในสภาพเรือนทดลอง

การเตรียมดินปลูก

ดินที่ใช้ในการทดลองเป็นดินผสมที่เหมาะในการปลูกพืช นำไปบรรจุลงในถุงพลาสติก 2 ชั้น มัดปากถุงให้แน่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เมื่อดินเย็นตัวลงแล้วจึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมต้นกล้าพริกหวาน

นำต้นกล้าพริกหวานอายุ 30 วัน ที่ปลูกไว้ในถาดเพาะกล้าบรรจุดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยการย้ายลงปลูกในกระถางใหม่จำนวน 4 ต้นต่อกระถาง (บรรจุดินในกระถาง 800 กรัม)

การเตรียม inoculums ของเชื้อสาเหตุ (Wang, 2008)

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร carrot agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง fluorescent เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงแบ่งชิ้นวุ้นออกเป็น 4 ส่วนเท่ากัน แต่ละส่วนตัดแบ่งออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5 - 1 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ท่วมนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทน้ำออกแล้วเติมน้ำใหม่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้แสง fluorescent หลังจากนั้นจึงย้ายไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วย้ายมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30-60 นาที เพื่อให้ zoosporangia ปลดปล่อย zoospores ทำการตรวจนับจำนวน zoospores ด้วย haemacytometer

การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา *Trichoderma* sp.

ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. capsici* สูงสุด โดยใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อแบคทีเรีย มา streak ลงบนผิวหน้าอาหาร NA ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เทลงในจานอาหาร 20 มิลลิลิตรต่อจานอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขูดแบคทีเรียให้หลุดจากผิวหน้าของอาหารเบาๆแล้วเทรวมกันในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปรับให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร ส่วนเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T 75 ทำการเพิ่มปริมาณในเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7.1 ทดสอบความเป็นพิษต่อพืช

เพื่อให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกมา 2 ไอโซเลท จะไม่ทำให้เกิดโรคหรือยับยั้งการเจริญแก่ต้นพริกหวาน จึงนำเมล็ดพริกหวานที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว ปลูกลงในดินฆ่าเชื้อซึ่งบรรจุในกระบะเพาะ ดูแลรดน้ำอย่างสม่ำเสมอจนต้นพริกหวานอายุ 30 วัน จึงย้ายไปปลูกในกระถางพลาสติก กระถางละ 4 ต้น ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ แล้วทดสอบความเป็นพิษต่อพืชโดยการราดสารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทและผสมระหว่างไอโซเลททั้งสองความเข้มข้น 10^8 cfu/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อต้นลงบนต้นพืชเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งราดด้วยน้ำกลั่น สังเกตและบันทึกผลหลังการใช้สารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นเวลา 28 วัน

7.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อ *P. capsici* ในสภาพเรือนทดลอง

ทำการราดสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (10^8 cfu/มิลลิลิตร) ต่อกระถาง ส่วนเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T 75 จะใช้ข้าวฟ่างปริมาตร 20 เมล็ดต่อกระถาง หลังจากนั้น 1 วันจึงทำการปลูกเชื้อ *P. capsici* โดยการราดลงบนกระถางปริมาตร 4 มิลลิลิตร (10^5 zoospores/มิลลิลิตร) ต่อต้น แต่ละการทดลองใช้แผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD) มี 20 ซ้ำ และ 8 กรรมวิธีการทดลองโดยมีรายละเอียดของแต่ละกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม 1 ปลูกพริกหวานลงในกระถางที่บรรจุดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม 2 ราดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่ได้จากการเทลงบนผิวหน้าอาหาร NA แล้วปลูกพริกหวานในดินที่มีเชื้อ *P. capsici*

กรรมวิธีที่ 3 ราดโคนต้นพริกหวานด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 1 แล้วปลูกในดินที่มีเชื้อ *P. capsici*

กรรมวิธีที่ 4 ราดโคนต้นพริกหวานด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 1 ร่วมกับเชื้อ *Trichoderma* sp. T 75 แล้วปลูกในดินที่มีเชื้อ *P. capsici*

กรรมวิธีที่ 5 ราดโคนต้นพริกหวานด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 2 แล้วปลูกในดินที่มีเชื้อ *P. capsici*

กรรมวิธีที่ 6 ราดโคนต้นพริกหวานด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 2 ร่วมกับเชื้อ *Trichoderma* sp. T 75 แล้วปลูกในดินที่มีเชื้อ *P. capsici*

กรรมวิธีที่ 7 ราดโคนต้นพริกหวานด้วยส่วนผสมระหว่างแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 1 และ 2 แล้วปลูกในดินที่มีเชื้อ *P. capsici*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 8 ราดโคนต้นพริกหวานด้วยส่วนผสมระหว่างแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 1 และ 2 ร่วมกับเชื้อ *Trichoderma* sp. T 75 แล้วปลูกในดินที่มีเชื้อ *P. capsici*

ทำการประเมินต้นเป็นโรค ภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุนาน 21 วัน โดยกำหนดระดับความรุนแรงตามวิธีการของ Wang (2008) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1 = ไม่แสดงอาการเหี่ยว
2 = รอยแผลสีน้ำตาล 1-10% ของลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง และ/หรือเหี่ยวเล็กน้อย
3 = รอยแผลสีน้ำตาล 11-50% ของลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง และ/หรือเหี่ยวชัดเจน
4 = รอยแผลสีน้ำตาล 50-100% ของลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง และ/หรือใบร่วง
5 = รอยแผลสีน้ำตาลขยายไปยังส่วนเหนือใบเลี้ยงหรือต้นพริกตาย

สถานที่ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. โรงเรือนปลูกพริกหวานของเกษตรกร ในพื้นที่บ้านม่วงคำ ตำบลโป่งแยง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการวิจัยและเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

สิงหาคม 2550 – สิงหาคม 2552

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved