# บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

**1. การสำรวจและรวบรวมเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในจังหวัดเชียงใหม่**

เก็บรวบรวมเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละอำเภอใน จ. เชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างดินในแปลงเกษตรกร จากบริเวณรอบรากพืชที่ความลึกจากผิวหน้าดิน 15- 50 เซนติเมตร จำนวน 15- 20 จุด ประมาณ 500 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกบันทึกชื่อพืชปลูก สถานที่ และวันที่เก็บ จากนั้นนำดินที่เก็บมาได้แต่ละจุดในแปลงปลูกพืชมาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน สำหรับวัสดุเพาะในฟาร์มเห็ด เก็บก้อนเห็ดเก่าที่พบเชื้อรา *Trichoderma* spp. ปริมาณ 5 – 10 ก้อน ผสมให้เข้ากัน บันทึกชื่อฟาร์ม ชนิดเห็ด และสถานที่เก็บ แล้วจึงนำไปแยกเชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยวิธี soil dilution plate บนอาหาร PDA ที่เติม Rose Bengal 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Streptomycin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่งดินและวัสดุเพาะในฟาร์มเห็ดมา 10 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากับน้ำนาน 15 นาที จะได้สารละลายดินที่มีความเข้มข้น $10^{-1}$ แล้วทำให้เจือจางความเข้มข้นตั้งแต่ $10^{-1}$ ถึง $10^{-5}$ ตามลำดับ แล้วนำเฉพาะความเข้มข้น $10^{-5}$ มาแยกโดยใช้ปิเปตดูดสารละลายดินแขวนลอย (soil suspension) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารที่เตรียมไว้ แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำจานเลี้ยงเชื้อวางไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 3-5 วัน เมื่อพบการเจริญของเชื้อราออกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ลักษณะคล้ายกำมะหยี่ จึงย้ายวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการแยกแบบ Hyphal Tip เพื่อเก็บเป็น stock culture และนำไปทดสอบต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**2 . ศึกษาการเจริญและปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อราไตรโคเดอร์มาแต่ละไอโซเลท**

**2.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp.**

เชื้อรา *Trichoderma* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้วัสดุเพาะในฟาร์มเห็ดและตัวอย่างดินในแปลงเกษตรกร จ.เชียงใหม่ จำนวน 156 ไอโซเลท นำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเจาะบริเวณขอบของโคโลนีแล้วย้ายวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* ในแต่ละไอโซเลท ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และบันทึกผลที่ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีทั้งแกนตั้งและแกนนอนแล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* มีหน่วยเป็นมิลลิเมตรต่อวัน

**2.2 ศึกษาปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.** (วาสนา, 2548)

เลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* แต่ละไอโซเลท จำนวน 4 ซ้ำ ทั้งหมด 156 ไอโซเลท บนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 10 วัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในจานเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล ขูดเส้นใยบริเวณผิวหน้าอาหารวุ้น PDA เบาๆ จากนั้นนำสารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) เทลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเขย่าให้สปอร์กระจาย แล้วจึงนำ spore suspension ที่ได้มานับจำนวนสปอร์โดยใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Haemacytometer แล้วทำการนับและบันทึกจำนวนสปอร์เปรียบเทียบกันในแต่ละไอโซเลทๆ ละ 4 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย มีหน่วยเป็นสปอร์ต่อมิลลิลิตร

**3. การสกัด Double-stranded RNA**

**3.1 เตรียมเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp.**

โดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* ที่แยกได้ทั้งหมดบนอาหารเหลว Malt Extract Broth (MEB) ประกอบด้วย Malt extract 20.0 กรัม, Glucose 20.0 กรัม และ Peptone 1.0 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร เป็นระยะเวลา 3 – 5 วัน จนเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อจึงซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เก็บในอลูมิเนียมฟอล์ยที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเช่นกันไว้ในอุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.2 การสกัด double-stranded RNA**

ใช้วิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Jordan and Dodds (1985) และ Valverde *et al*. (1990) นำเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทละ 1.5 กรัม บดด้วยโกร่งแช่เย็น (-80 องศาเซลเซียส) ที่มี extraction buffer (ประกอบด้วย 2X STE buffer, 2% SDS และ 1% PVP-40) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เมื่อบดละเอียดแล้วเทของเหลวที่ได้ใส่ในหลอดทดลอง (centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 400 ไมโครลิตรต่อหลอด แล้วเติม phenol 400 ไมโครลิตร และ chloroform : pentanol (24:1) 200 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันประมาณ 20-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกของเหลวใสที่อยู่ด้านบนถ่ายลงในหลอดทดลองใหม่ เก็บส่วนของเหลวใส แล้วปรับให้ของเหลวใสมีความเข้มข้นเท่ากับ 16% ethanol จากนั้นเติม cellulose CF-11 จำนวน 0.1 กรัม แล้วนำหลอดทดลองไปทำการผสมให้เข้ากันโดย vortex จำนวน 3 ครั้งในเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนของตะกอน cellulose CF-11 ต่อมาทำการล้างตะกอนด้วย 1X STE ที่มี 16% ethanol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำขั้นตอนนี้อีกครั้ง หลังจากล้างตะกอนครั้งสุดท้ายแล้ว ทำการชะ (eluted) dsRNA ด้วยการเติม 1X STE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในตะกอน cellulose แล้ว vortex ให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายส่วนของเหลวใสที่มี dsRNA ลงในหลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอน dsRNA ด้วยการปรับให้สารละลายมีความเข้มข้นเท่ากับ 67% ethanol (v/v) และปรับให้ของเหลวใสมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 mM sodium acetate แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อยที่สุดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้ตะกอน dsRNA แล้วละลายตะกอนที่ได้ในน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.3 การตรวจผลโดยเจลอิเลคโตรโฟรีซิส**

นำถาดและหวีสำหรับเตรียมเจลประกอบเข้าด้วยกัน เตรียม 1.5% agarose gel โดยละลาย agarose 0.45 กรัม ใน 1X TBE buffer 30 มิลลิลิตร หลอมเจลด้วยไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวจนเจลละลายดี ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส นำมาเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณครึ่งชั่วโมง จึงเท 1X TBE buffer บนผิวหน้าเจลเล็กน้อย ค่อย ๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่อง Gel MateTM-GEP102 (TOYOBO, Japan) เติม 1X TBE buffer จนท่วมผิวหน้าเจลประมาณ 5 มิลลิเมตร นำ 100 bp DNA Marker (Invitrogen$^{TM}$, USA) เพื่อใช้เป็น molecular weight marker แล้วจึงนำ product 8 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร แยกขนาดของ dsRNA บน 1.5 % agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ใช้ความต่างศักดิ์ไฟฟ้า 100 โวลท์ นาน 30 นาที จึงปิดสวิทซ์ นำเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide เป็นระยะเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า 5 นาที แล้วนำไปส่องดูด้วยแสง UV และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation (SYNGRNE รุ่น GENE Genius Bio Imaging System)

**3.4 การตรวจสอบคุณสมบัติ double-stranded RNA จากการย่อยด้วยเอนไซม์ DNase และ RNase**

ใช้วิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Castanho *et al*. (1978) และ Fekete *et al*. (1995) เพื่อพิสูจน์ว่าแถบของ dsRNA ที่ปรากฏบนเจลจากข้อ 3.3 เป็น dsRNA อย่างแท้จริงโดยการนำ dsRNA ที่ละลายในน้ำกลั่นจากข้อ 3.2 มาย่อยด้วยเอนไซม์ RNase ในสภาพความเข้มข้นของเกลือต่ำ(0.1XSSC) และที่มีความเข้มข้นเกลือสูง (2XSSC) (ภาคผนวก ก) ซึ่งในสภาพที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำเอนไซม์ RNase จะยังมีความสามารถในการย่อย dsRNA และ ssRNA ได้ ส่วนในสภาพที่ความเข้มข้นของเกลือสูงเอนไซม์ RNase จะไม่สามารถย่อย dsRNA ได้แต่จะยังคงย่อย ssRNA ได้เช่นเดิม ทำได้โดยเตรียมหลอดทดลอง (centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตรจำนวน 3 หลอด หลอดที่ 1 เติม dsRNA ที่ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ buffer ที่มีความเข้มข้นเกลือต่ำ (0.2XSSC) จำนวน 9 ไมโครลิตร และเติม RNase เข้มข้น 0.01 µg/µl จำนวน 1 ไมโครลิตร หลอดที่ 2 เติม dsRNA ที่ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ buffer ที่มีความเข้มข้นเกลือสูง (4XSSC) จำนวน 9 ไมโครลิตร และเติม RNase เข้มข้น 0.01 µg/µl จำนวน 1 ไมโครลิตร และหลอดที่ 3 ใช้ DNase ในการย่อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่ง DNase มีคุณสมบัติในการย่อย DNA โดยเติม dsRNA ที่ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 7 ไมโครลิตร และเติม DNase จำนวน 1 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองทั้ง 3 หลอดมาเขย่าให้สารละลายในหลอดผสมเข้ากัน แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจผลด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

**3.5 การตรวจผลโดยเจลอิเลคโตรโฟรีซิส**

โดยเตรียม 1.5% agarose gel ตามวิธีดังกล่าวในข้อ 3.3 นำมาเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณครึ่งชั่วโมง จึงเท 1X TBE buffer บนผิวหน้าเจลเล็กน้อย ค่อย ๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่อง Gel MateTM-GEP102 (TOYOBO, Japan) เติม 1X TBE buffer จนท่วมผิวหน้าเจลประมาณ 5 มิลลิเมตร นำ 100 bp DNA Marker (Invitrogen$^{TM}$, USA) เพื่อใช้เป็น molecular weight marker แล้วจึงนำ product 8 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร แยกขนาดของ dsRNA บน 1.5 % agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ใช้ความต่างศักดิ์ไฟฟ้า 100 โวลท์ นาน 30 นาที จึงปิดสวิทซ์ นำเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide เป็นระยะเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า 5 นาทีแล้วนำไปส่องดูด้วยแสง UV และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation (SYNGRNE รุ่น GENE Genius Bio Imaging System)

**4. ศึกษาความเสถียรและการขจัด ds RNA**

นำเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลทที่พบ dsRNA คือ TM10 และ TM20 โดยมาเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิ 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สลับกับการเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเจาะบริเวณขอบของโคโลนีแล้วย้ายวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จานใหม่ทำเช่นนี้เป็นจำนวน 10 รุ่น แล้วจึงนำไปศึกษาการเจริญ การสร้างสปอร์ การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ภายในห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง และเลี้ยงในอาหารเหลว Malt Extract Broth (MEB) เพื่อนำไปตรวจหา dsRNA ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**5. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ exo-chitinase**

**5.1 การเตรียมเชื้อรา *Trichoderma*** เลี้ยง *Trichoderma* ไอโซเลทที่ไม่พบ dsRNA ได้แก่ T15, T42 และ T75 และเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลทที่พบ dsRNA ได้แก่ TM10 และ TM20 รวมทั้งไอโซเลทที่ได้จากการศึกษาความเสถียรและการขจัด dsRNA ได้แก่ TM10h และ TM20h บนอาหารเหลว synthetic medium (SM) (Kucuk and Kivanc,2004) โดยบรรจุอาหารเหลวใน flasks 50 ml และเติม conidial suspension ของ *Trichoderma* ที่มีความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $1 \times 10^{10}$ spore/ml ปริมาตร 1 ml และเติม colloidal chitin เป็นแหล่ง carbon 2 $mg/ml^{-1}$ เขย่าบน rotary shaker ที่ 120 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 วัน จากนั้น centrifuge ที่ 12,000g ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วจึงนำส่วนของเหลวไปทดสอบ enzymatic activity

**5.2 ทำการวิเคราะห์ exo- chitinase** ตามวิธีของ Zaldivar *et al*. (2001) และ Enzymatic assay of β-N-Acetyl glucosaminidase, (1996) โดยเตรียมหลอดทดลองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 2 หลอดทดลองต่อเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 1 ไอโซเลท หลอดที่ 1 ประกอบด้วยสารละลาย citrate-phophate buffer pH 4.8 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร เติม substrate คือ 2.0 mM p-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminine ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างที่ได้จากข้อ 5.1 ที่ต้องการวิเคราะห์เอนไซม์ ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร สำหรับหลอดที่ 2 (หลอด blank ) ประกอบด้วยสารละลาย citrate-phophate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม substrate (2.0 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminine) ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง นำหลอดทดลองหลอดที่ 1 และ หลอดที่ 2 มาเขย่าให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จึงเติมสารละลาย 1 M sodium carbonate ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในทั้งหลอดที่ 1 และ หลอดที่ 2 หลังจากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างที่ได้จากข้อ 5.1 ที่ต้องการวิเคราะห์เอนไซม์ ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 2 พร้อมทั้งทำการผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ย้ายลง suitable cuvettes แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร จากนั้นจึงนำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณเอนไซม์โดย 1 Unit ของ exo- chitinase หมายถึง ปริมาณ enzyme ที่สามารถเปลี่ยน 1 μmol ของ p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosamide ไปเป็น p-nitrophenyl และ N-acetyl-β-D-glucosamide ใน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (pH 4.8)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาปริมาณเอ็นไซม์

$$\text{Units/ml enzyme} = \frac{(A_{405nm}\ \text{Test} - A_{405nm}\ \text{Blank})(3.1)(1)}{(5)(18.5)(0.1)}$$

โดย 3.1 = ปริมาตรรวมที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด (มล.)

1 = ค่าการเจือจางขณะเตรียมสาร

5 = ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ (นาที)

18.5 = ค่า millimolar extinction coefficient ของ p-Nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

0.1 = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เอนไซม์

**6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* บนอาหาร PDA ภายในห้องปฏิบัติการ**

ทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดย Dual culture technique โดยคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลทที่พบและไม่พบ dsRNA ในการทดสอบทั้งหมด 7 ไอโซเลท ดังต่อไปนี้

T15 คือ ไอโซเลทที่แยกได้จากสารชีวภัณฑ์ยูนิเซฟ, *T. harzianum*

T42 คือ ไอโซเลทที่มีการเจริญดี

T75 คือ ไอโซเลทที่มีการเจริญดี

TM10 คือ ไอโซเลทที่พบ dsRNA

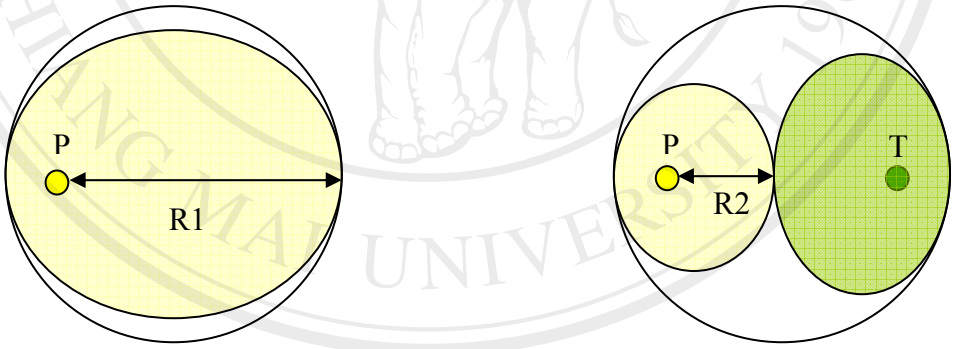
TM10h คือ ไอโซเลท TM10 ที่ผ่านการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงคือ 37 °C สลับกับอุณหภูมิห้อง

TM20 คือ ไอโซเลทที่พบ dsRNA

TM20h คือ ไอโซเลท TM20 ที่ผ่านการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงคือ 37 °C สลับกับอุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 7 ไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพกับเชื้อราสาเหตุของโรครากและโคนเน่าของถั่วเหลือง (*Sclerotium rolfsii*) นำเชื้อราทั้งหมดมาเลี้ยงบนอาหาร PDA จนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (เวลา 3 วัน) ทดสอบโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเจาะบริเวณขอบของโคโลนีของเชื้อรา *S. rolfsii* แล้วย้ายวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางห่างจากขอบจาน 2 เซนติเมตร แล้วจึงตัดเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* ให้มีขนาด 5 มิลลิเมตร มาวางตรงข้ามกับโคโลนีของ เชื้อรา *S. rolfsii* และห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้ออีกด้านเป็นระยะ 2 เซนติเมตร สำหรับชุดควบคุม (control) ไม่วางเชื้อราปฏิปักษ์ลงไป วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทำแต่ละวิธีการทดลองเป็นจำนวนทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5 วัน แล้ววัดการเจริญของเชื้อราสาเหตุ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของรัศมีการเจริญ (percent inhibition rate growth : PIRG) โดยใช้สูตร (R1 - R2/R1) × 100 (ภาพ 1) แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Statistix 8




(1) (2)

ภาพ 1 รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเมื่อเจริญควบคู่กับเชื้อราปฏิปักษ์
โดยวิธี Dual culture ชุดควบคุม (1) เชื้อราสาเหตุเจริญกับเชื้อราปฏิปักษ์(2)

P = Pathogen

T = *Trichoderma* sp.

R1 = รัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในจานควบคุม (control)

R2 = รัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในจานทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

โดย R1 = รัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในจานควบคุม (control)

R2 = รัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในจานทดสอบ

โดยประมาณค่าดังนี้ (เกษม, 2532)

> 75 % = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (very high antagonistic activity)

61-75 % = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง (high antagonistic activity)

51-60 % = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง(moderate antagonistic activity)

<50 % = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ (low antagonistic activity)

**7. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ภายในสภาพเรือนทดลอง**

**7.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุ *S. rolfsii* และ *Trichoderma* ในเมล็ดข้าวฟ่าง**

การเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุ *S. rolfsii* และ *Trichoderma* (T15, T42, T62, T75, TM10, TM20, T62h, TM10h และ TM20h ) ใช้วิธีการเลี้ยงแบบเดียวกันคือ เลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่างที่ต้มสุกและนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยเริ่มจากต้มเมล็ดข้าวฟ่างให้สุกโดยสังเกตจากเมล็ดข้าวฟ่างจะเริ่มปริแตกออกประมาณ 4-5 เมล็ด กรองน้ำทิ้ง ล้างด้วยน้ำสะอาดอีกประมาณ 2-3 ครั้ง ผึ่งให้พอแห้งหมาดๆ จากนั้นบรรจุลงถุงพลาสติกทนร้อน 250 กรัม/ถุง ปิดปากถุงให้สนิท จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำเชื้อที่ต้องการขยายปริมาณ ซึ่งได้ทำการเลี้ยงไว้บนอาหาร PDA นาน 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเจาะบริเวณขอบของโคโลนีแล้วใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตักชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยและสปอร์ของเชื้อเจริญอยู่ ใส่ลงในถุงพลาสติกที่บรรจุข้าวฟ่างอยู่จำนวน 2 ชิ้นต่อถุง โดยทำในสภาพปลอดเชื้อ เขย่าถุงเบาๆเพื่อให้สปอร์ของเชื้อกระจายลงสู่ ข้าวฟ่างในถุง แล้วบ่มเชื้อไว้ในห้องที่ร่มและเย็น อากาศถ่ายเทสะดวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไม่มีมดและแมลงรบกวน หลังบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วันเขย่าถุงอีกครั้งเพื่อให้เส้นใยกระจายตัว เมื่อเชื้อราเจริญเต็มถุงจึงนำไปใช้ทดสอบต่อไป

**7.2 การเตรียมดินปลูก**

การเตรียมดินปลูกโดยนำดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผสมวัสดุปลูกในสัดส่วนดังนี้ ดิน 5 ส่วน : แกลบ 1 ส่วน และปุ๋ยหมัก 1 ส่วน คลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นบรรจุกระถางปลูกขนาด 5 × 7 นิ้ว ปริมาณ 800 กรัมต่อกระถาง

**7.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Trichoderma* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าถั่วเหลือง**

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* โดยนำเชื้อรา *S. rolfsii* และเชื้อรา *Trichoderma* แต่ละไอโซเลท ที่เตรียมไว้ในข้อ 7.1 โดยผสมเชื้อรา *S. rolfsii* ปริมาณ 40 กรัม และเชื้อรา *Trichoderma* 40 กรัม เทลงในถุงพลาสติกที่มีดินปลอดเชื้อ (ข้อ 7.2) ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วจึงเทลงกระถางปลูก จากนั้นจึงปลูกเมล็ดถั่วเหลือง ดังรายละเอียดของแผนการทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม หรือ control (ไม่ปลูกเชื้อ ไม่ใส่ *Trichoderma*)
กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อสาเหตุเพียงอย่างเดียว (*S. rolfsii*)
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อสาเหตุ *S. rolfsii* + *Trichoderma* (T15)
กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อสาเหตุ *S. rolfsii* + *Trichoderma* (T42)
กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อสาเหตุ *S. rolfsii* + *Trichoderma* (T75)
กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อสาเหตุ *S. rolfsii* + *Trichoderma* (TM10)
กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อสาเหตุ *S. rolfsii* + *Trichoderma* (TM20)
กรรมวิธีที่ 8 ปลูกเชื้อสาเหตุ *S. rolfsii* + *Trichoderma* (TM10h)
กรรมวิธีที่ 9 ปลูกเชื้อสาเหตุ *S. rolfsii* + *Trichoderma* (TM20h)

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทำแต่ละวิธีการทดลองเป็นจำนวนทั้งหมด 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 เมล็ด ดูแลรดน้ำเป็นประจำทุกวัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สังเกตการเกิดอาการของโรคบันทึกผลและประมาณการเกิดโรคของพืชแต่ละต้น โดยให้ระดับต่างๆ คือ

ระดับที่ 0 = ไม่แสดงอาการ

ระดับที่ 1 = แสดงอาการเพียงเล็กน้อย

ระดับที่ 2 = แสดงอาการแต่ยังไม่แสดงอาการเน่า

ระดับที่ 3 = แสดงอาการตายหลังจากงอก

ระดับที่ 4 = แสดงอาการตายก่อนงอก

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ดั้งนี้ (สืบศักดิ์, 2540)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นที่สุ่ม}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของการเป็นโรค}}$$

**8. สถานที่ดำเนินงานวิจัยและรวบรวมข้อมูล**

1. ห้องปฏิบัติการวิจัยและเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนบน สำนักงานกรรมการวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved