# บทที่ 2

# วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

## วัสดุ

1. ถุงเห็ดเป็นโรค ถุงเห็ดปกติ ดอกเห็ดปกติ และดอกเห็ดผิดปกติ
2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา
   - potato dextrose agar (PDA)
   - malt extract agar (MEA)
   - Czapek-Dox medium (CZA)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
   - nutrient agar (NA)
   - HL – medium (Huge Leifson)
   - KB (King *et al.*'s medium B agar plate)
4. สารเคมี
   - 2-mercapto-ethanol
   - xylene cyanole FF
   - polyvinyl-pyrolidone
   - hexadecyl trimethyl - ammonium bromide (CTAB)
   - tris (hydroxymethyl-aminomethane)
   - 3-methyl-1 butanol
   - glycerol 87 เปอร์เซ็นต์
   - sodium chloride
   - chloroform
   - isopropanol
   - nucleic acid sample loading buffer
   - LE agarose
   - boric acid
   - ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA)

- Tris-base
- lactophenol
- ethidium bromide
- กระดาษกรองเบอร์ 4
- dNTP 100 mM
- $MgCl_2$ 1.5 µl
- *Taq*. polymerase 1.5 unit
- DNA template 40 nanogram
- 10X PCR buffer 2 µl
- เอทธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

5. กระบอกฉีดพ่น (foggy sprayer)
6. ไพรเมอร์ (primer)

**อุปกรณ์**

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานเลี้ยงเชื้อ ฟลาสก์ บีกเกอร์ กระบอกตวง หลอดเลี้ยงเชื้อ และเครื่องแก้วอื่น ๆ
2. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
3. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ย ลูป มีดผ่าตัด ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เครื่อง PCR
5. เครื่องเขย่า (shaker)
6. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (analytical balance)
7. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
8. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
9. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)
10. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
11. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow)
12. กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)
13. กล้องถ่ายรูป (camera)
14. เครื่องนับเซลล์ (haemacytometer)

15. กล้องโพลาลอยด์
16. Transilluminator
17. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
18. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
19. ตู้เย็น ตู้แช่
20. ไมโครเวฟ

**วิธีการ**

1. การเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคราเขียว (*Trichoderma* spp.)

เก็บตัวอย่างถุงเห็ดที่เป็นโรคราเขียวจากฟาร์มเห็ดต่าง ๆ จำนวน 59 ฟาร์ม จาก 22 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศ (ตารางที่ 2) โดยเก็บตัวอย่างโรคฟาร์มละ 1-8 ถุง เลือกลักษณะถุงที่มีอาการของโรคต่าง ๆ กัน จากถุงเห็ดหลายชนิด เช่น ถุงเห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม เห็ดหูหนู เห็ดลม และเห็ดขอนขาว

นำถุงเห็ดชนิดต่าง ๆ ที่เป็นโรคราเขียวมาทำการแยกเชื้อ *Trichoderma* spp. โดยใช้วิธี dilution pour plate ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ต่อวัสดุปนเปื้อนเชื้อ *Trichoderma* 1 กรัม เขย่าให้เข้ากัน 10 นาที ทำ serial dilution ที่ระดับความเข้มข้น $10^{-2}$ – $10^{-6}$ ใช้ปิเปตดูดน้ำละลายเชื้อมา 0.1 มิลลิลิตร หยดบนอาหาร PDA เกลี่ยด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อเชื้อเจริญจึงแยกโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อ *Trichoderma* spp. ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บใส่หลอดอาหาร PDA slant เพื่อศึกษาต่อไป โดยเชื้อที่ได้จากถุงเห็ดเป็นโรค 1 ถุง จะเก็บเชื้อ *Trichoderma* ไว้เพียง 1 โคโลนีเท่านั้น เพื่อเป็นตัวแทนสำหรับศึกษาต่อไป

2. การจำแนกชนิด (species) ของเชื้อ *Trichoderma* spp.

2.1 การจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เลี้ยงเชื้อราเขียวบนจานอาหาร PDA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เป็นเวลา 5-7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) แล้วทำการตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างโคโลนี ลักษณะผิวและสีของสปอร์ ขนาดเส้นใย ไฟอะไลด์ แล้วทำการจำแนกชนิดโดยอาศัยคู่มือของ Rifai (1969) และ Gams และ Bissett (1998)

2.2 การจำแนกโดยใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างสุ่ม โดยอาศัยกระบวนการ PCR (Polymerase Chain Reaction) ของเชื้อ *Trichoderma* spp. จำนวน 23 ไอโซเลท ซึ่ง 22 ไอโซเลท เป็นตัวแทนเชื้อราที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ ทั่วประเทศ อีก 1 ไอโซเลท เป็นเชื้อ *T. harzianum* ที่บริษัทโซตัสผลิตออกจำหน่ายเพื่อใช้ควบคุมและป้องกันโรคพืช รายละเอียดมีดังนี้

2.2.1 ย้ายเชื้อราในหลอด PDA ไปเลี้ยงบนอาหาร MEA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายเชื้อ *Trichoderma* จากจานเลี้ยงเชื้อไปเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek-Dox-medium ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสก์นำไปวางบนเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 150 รอบ/นาที ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน กรองเอาแต่เส้นใยโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4

2.2.2 นำเส้นใยจากข้อ 2.2.1 ไปสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธีการประยุกต์ ของ Doyle และ Doyle (1990) อ้างโดย มานะ กาญจนมณีเสถียร และคณะ (2543)

2.2.2.1 บดตัวอย่างเส้นใยเชื้อรา 0.4 กรัม ในโกร่งแช่เย็น (-20 องศาเซลเซียส) ใช้ CTAB buffer (PVP-40 1 เปอร์เซ็นต์, NaCl 1.5 M, EDTA pH 8.0 20 mM, Tris-HCl pH 8.0 100 mM และ CTAB 2 เปอร์เซ็นต์) เติม mercaptoethanol 2 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากันก่อนที่จะสกัดแต่ละวัน

2.2.2.2 นำส่วนผสมของเชื้อและบัฟเฟอร์ที่บดเรียบร้อยแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที กลับหลอดไปมาเป็นระยะ นำตัวอย่างออกมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

2.2.2.3 เติมสารละลาย chloroform ปริมาตร 800 µl เขย่าเบา ๆ ให้ตัวอย่างผสมกับ chloroform พลิกหลอดตัวอย่างไปมา 10-20 ครั้ง นำหลอดตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.2.4 นำตัวอย่างออกจากเครื่อง centrifuge ดูดเฉพาะส่วนใสที่อยู่ชั้นบนออก แล้วนำไปใส่หลอดใหม่

2.2.2.5 เติม isopropanol ปริมาตร 700 µl เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำหลอดตัวอย่างหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.2.6 เทส่วนที่เป็นสารละลายชั้นบนสุดในหลอดทดลองทิ้ง ล้างตะกอนก้นหลอดด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 µl เขย่าเบา ๆ เทส่วนของ ethanol ทิ้ง (ล้างตะกอน 2 ครั้ง)

2.2.2.7 เปิดฝาหลอดตัวอย่าง แล้วตากตะกอนให้แห้ง โดยคว่ำหลอดเพื่อป้องกันการปนเปื้อน ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย TE ปริมาตร 100 µl เก็บดีเอ็นเอที่ได้ในตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ต่อไป

2.2.3 เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยเทคนิค PCR

ทำการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *Trichoderma* sp. โดยใช้ไพรเมอร์ 7 ชนิด (ตารางที่ 1) ซึ่งผ่านการทดสอบแล้วว่า เป็นตัวแทนไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราในกลุ่มนี้ได้ (มานะ กาญจนมณีเสถียร และคณะ, 2543) องค์ประกอบของสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ RAPD-PCR คือ 10X PCR buffer 2 µl, dNTP เข้มข้น 100 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, ไพรเมอร์ 1.5 µl, *Taq*. polymerase 1.5 unit ดีเอ็นเอต้นแบบ 40 นาโนกรัม สภาพที่ใช้ในการทำ PCR คืออุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 37 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 39 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 37 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ

**ตารางที่ 1** ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการจำแนกเชื้อ *Trichoderma* spp.

| ชนิดของไพรเมอร์ | ลำดับเบส |
|---|---|
| OPC-04 | 5'CCGCATCTAC3' |
| OPC-08 | 5'TGGACCGGTG3' |
| OPC-14 | 5'TGCGTGCTTG3' |
| OPT-01 | 5'GGGCCACTCA3' |
| OPT-02 | 5'GGAGAGACTC3' |
| OPT-05 | 5'GGGTTTGGCA3' |
| OPT-08 | 5'AACGGCGACA3' |

2.2.4 ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธี electrophoresis

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพิ่มดีเอ็นเอแล้ว นำตัวอย่างดีเอ็นเอแต่ละไอโซเลทที่ผ่านขั้นตอนการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่คัดเลือกแยกความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ บน agarose gel 0.7 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้การให้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำการย้อมแผ่น gel ด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตร ต่อน้ำ 300 มิลลิลิตร 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 30 นาที ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ภายใต้

transilluminator แล้วจึงทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายโพลาลอยด์ นำภาพที่เป็นแถบของดีเอ็นเอจากแต่ไอโซเลท มาทำการศึกษาเปรียบเทียบและแปลผลการทดลอง

3. ผลของเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดนางฟ้า (*P. pleumonarius*)

ทดสอบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่จำแนกได้ กับเส้นใยเห็ดนางฟ้า โดยวิธี dual culture ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะปลายเส้นใย *Trichoderma* sp. อายุ 7 วัน และเส้นใยเห็ดนางฟ้า อายุ 7 วัน นำไปวางในตำแหน่งตรงข้ามกันบนอาหาร PDA สังเกตและเปรียบเทียบความเร็วในการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสอง เปรียบเทียบกับการทดลองปลูกเชื้อเห็ดนางฟ้าก่อนเป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้เส้นใยเห็ดเจริญและเข้าครอบครองพื้นที่ได้ก่อน จึงปลูกเชื้อ *T. harzianum* ลงไป ในตำแหน่งตรงกันข้าม สังเกตปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างเส้นใยของเชื้อทั้งสองที่อายุ 40 ชั่วโมง และ 7 วัน

4. การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็นปฏิปักษ์

4.1 การแยกแบคทีเรียจากถุงเห็ดเป็นโรค

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากถุงเห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม และเห็ดหูหนู จากฟาร์มต่าง ๆ ในจังหวัดสงขลา โดยวิธี dilution pour plate โดยนำวัสดุเพาะเห็ดปริมาณ 1 กรัม ต่อน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที ทำการเจือจางแบบ serial dilution ที่ระดับความเข้มข้น $10^{-2}$ – $10^{-6}$ โดยใช้อาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2-5 วัน จะปรากฏโคโลนีของเชื้อ *Trichoderma* และแบคทีเรียเจริญปะปนกันอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ เลือกเก็บเฉพาะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีวงใส (clear zone) ล้อมรอบ วงใสนี้เกิดเนื่องจากแบคทีเรียตัวนั้นสร้างสาร ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* หรือเชื้ออื่น ๆ และปล่อยออกมารอบโคโลนี ทำให้เชื้อ *Trichoderma* ไม่สามารถเจริญรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรียได้ นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เก็บได้ไปเลี้ยงบนอาหาร NA slant เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อศึกษาต่อไป

4.2 การแยกแบคทีเรียจากถุงเห็ดปกติ ดอกเห็ดปกติ และดอกเห็ดผิดปกติ

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย จากถุงและดอกเห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม และเห็ดหูหนู โดยการเขี่ยผิวหน้าถุงก้อนเชื้อเห็ด หรือส่วนของหมวกเห็ด ปริมาณ 1 กรัม ต่อน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที เจือจางแบบ serial dilution ที่ระดับความเข้มข้น $10^{-2}$ – $10^{-10}$ ใช้ปิเปตดูดน้ำละลายเชื้อมา 0.1 มิลลิลิตร หยดบนอาหาร NA เกลี่ยด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม บ่มไว้เป็น

เวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) เลือกเก็บเฉพาะโคโลนีที่แตกต่างกัน แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

หลังจากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *T. harzianum* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคราเขียวอย่างรุนแรงในฟาร์มจังหวัดสงขลา ด้วยวิธี dual culture โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใย *T. harzianum* ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน วางให้ห่างจากด้านหนึ่งของขอบจานประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ขีดเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ใน NA slant อายุ 24 ชั่วโมง ตรงตำแหน่งตรงกันข้ามโคโลนีเชื้อรา บ่มไว้ 7 วัน คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *T. harzianum* ได้ โดยดูจากลักษณะการเจริญของปลายเส้นใยเชื้อราที่ไม่สามารถเจริญเข้าไปใกล้บริเวณที่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญอยู่ เกิดเป็นช่องว่างลักษณะใสระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับเชื้อรา เก็บแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับเชื้อ *T. harzianum* ไปเลี้ยงในอาหาร NA เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อศึกษาต่อไป

5. การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เก็บรวบรวมได้จำนวน 174 ไอโซเลท ซึ่งทั้งหมดเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* ได้ เลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ เพื่อจำแนกชนิด โดยใช้คู่มือของ Schaad และคณะ (2001) ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกเบื้องต้นได้แก่

การทดสอบปฏิกิริยาของเชื้อกับ KOH 3 เปอร์เซ็นต์ โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA slant บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หยด KOH 3 เปอร์เซ็นต์ บนสไลด์ 1 หยด เขี่ยเชื้อแตะบนหยด KOH คนให้เข้ากัน ยกลูปขึ้นตรง ๆ หากเชื้อนั้นเหนียวติดลูปขึ้นมา อ่านผลเป็นบวกแสดงว่าแบคทีเรียชนิดนั้นเป็นแกรมลบ แต่หากไม่ติดลูปขึ้นมาอ่านผลเป็นลบแสดงว่าแบคทีเรียตัวนั้นเป็นชนิดแกรมบวก

การทดสอบว่าเชื้อสามารถเจริญในสภาพที่มีหรือไม่มีออกซิเจนได้หรือไม่ โดยใช้อาหาร H-L medium 2 หลอด ใช้เข็มเขี่ยแทงลงไปตรง ๆ ประมาณครึ่งหลอดของอาหารทั้ง 2 หลอด เทปิดทับด้วย paraffin oil สูงประมาณ 1 เซนติเมตร 1 หลอดทันที บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) การตรวจผลวันที่ 1, 3, 5 และ 7 โดยดูการเปลี่ยนสีหรือไม่เปลี่ยนสีของอาหารทั้ง 2 หลอดทุกวัน หากอาหารในหลอดที่ปิดทับด้วย paraffin oil เปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่าไม่ต้องการออกซิเจน

การสร้างสารเรืองแสงในอาหาร KB เป็นการตรวจดูการสร้างสาร fluorescin จากอาหาร KB ซึ่งสามารถแพร่ละลายออกมาผสมในอาหาร โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยการนำจานเลี้ยงเชื้อไปส่องใต้หลอดไฟซึ่งมีคลื่นแสงยาว 360 นาโนเมตร (black light)

ดูการสร้างสารเรืองแสงสีเขียว (fluorescin) ซึ่งแพร่ออกมาในอาหาร หากมีสารเรืองแสงอ่านผลเป็นบวก

6. ผลของเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญและการสร้างตุ่มดอกของเห็ดนางฟ้า

นำแบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *T. harzianum* ที่คัดเลือกได้เบื้องต้น มาทำการทดสอบกับเชื้อเห็ด โดยวิธี dual culture บนอาหาร PDA ในการทดลองนี้ใช้เห็ดนางฟ้าเป็นตัวแทน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ดนางฟ้า นำไปวางในอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยง 1 เซนติเมตร เลี้ยงไว้ประมาณ 2 วัน หลังจากนั้นขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร NA slant อายุ 24 ชั่วโมง เป็นแนวยาวบริเวณขอบอีกด้านหนึ่งของจานอาหาร สังเกตปฏิกิริยาสัมพันธ์ บันทึกการเจริญของเส้นใยเห็ดว่าเชื้อแบคทีเรียมีผลต่อการเจริญและการสร้างตุ่มดอกของเห็ดนางฟ้าหรือไม่อย่างไร

7. เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Trichoderma* ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ที่สามารถกระตุ้นให้เห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอก

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ศึกษาเบื้องต้นพบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *Trichoderma* และสามารถกระตุ้นให้เห็ดสร้างดอก มาศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Trichoderma* ในจานทดลองอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้วิธี dual culture ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะปลายเส้นใยเห็ด และเชื้อ *T. harzianum* วางบนอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบ 1 เซนติเมตร หลังจากนั้น 1 วัน ทำการขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร NA slant อายุ 24 ชั่วโมง เป็นแนวยาวบริเวณอีกด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) เลือกเก็บเฉพาะแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* เพื่อนำไปใช้ทดลองต่อไป

8 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการออกดอกของเห็ดในโรงเรือนเพาะเห็ด

การเตรียมน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้จากข้อ 7 ในอาหาร NA slant ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เทน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อใส่หลอดอาหาร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วขูดผิวหน้าอาหารเบา ๆ นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยใช้ haemacytometer ปรับความเข้มข้นของน้ำละลายเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ $1 \times 10^6$ cell/ml เทน้ำละลายเชื้อลงในบีกเกอร์

Central Library
Prince of Songkla University



การเตรียมก้อนเชื้อเห็ด

ผสมขี้เลื่อย รำ 5 เปอร์เซ็นต์ และปูนขาว 1 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความชื้น 65 เปอร์เซ็นต์ บรรจุลงถุงร้อนขนาด 6 x 14 นิ้ว น้ำหนัก 900 กรัม ใส่คอขวดพลาสติก ปิดด้วยจุกสำลีและกระดาษ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อวัสดุเพาะเย็น จึงเทหัวเชื้อเห็ดที่เตรียมไว้บนเมล็ดข้าวฟ่างถุงละ 15-20 เมล็ด ปิดจุกสำลีอย่างเดิม บ่มไว้เป็นเวลา 30 วัน ซึ่งเส้นใยเห็ดเจริญเกือบเต็มถุง จึงนำไปทดสอบ

นำน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ จำนวน 22 ไอโซเลท ไปฉีดพ่นบนถุงก้อนเชื้อเห็ด โดยฉีดพ่นน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียบริเวณปากถุงเห็ดปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต่อ 1 ถุง ชนิดละ 10 ถุง เปรียบเทียบกับไม่ฉีดพ่นแบคทีเรีย (control) รวมจำนวนทั้งสิ้น 230 ถุง บันทึกระยะเวลาในการออกดอก จำนวนดอก และน้ำหนักเห็ดในช่วงเก็บเกี่ยว 30 วันหลังจากฉีดพ่นเชื้อ

คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ทำให้ระยะเวลาในการออกดอกของเห็ดเร็ว จำนวนดอกมาก และได้น้ำหนักมาก เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

9. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคราเขียวในโรงเรือน

การเตรียมน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 6 ไอโซเลท ที่ได้จากการคัดเลือกจากข้อ 8 ในหลอดอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง เทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วขูดผิวอาหารเบา ๆ นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยใช้ haemacytometer ทำการปรับความเข้มข้นของน้ำละลายเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ 1 x $10^6$ cell/ml เทน้ำละลายเชื้อลงในบีกเกอร์

การเตรียมน้ำละลายเชื้อ *T. harzianum*

เชื้อ *T. harzianum* สายพันธุ์ที่ได้จากฟาร์มที่ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรง มาเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) เทน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อขูดผิวหน้าอาหารเบา ๆ โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร ต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อรา 4 จาน เทน้ำละลายเชื้อรารวมลงในบีกเกอร์ จากนั้นนำไปไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Chee, 1968 อ้างโดย นริสา จันทร์เรือง, 2543) ทำการปรับความเข้มข้นของน้ำละลายเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ 1 x $10^6$ spore/ml จำนวนสปอร์โดยใช้ haemacytometer

การเตรียมก้อนเชื้อเห็ด เตรียมวิธีเช่นเดียวกับข้อ 8

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วว่าส่งผลให้เห็ดออกดอกดี และให้น้ำหนักมาก จากข้อ 8 ไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคราเขียวในโรงเรือนเพาะเห็ด โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) จำนวน 8 สิ่งทดลอง ทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยก้อนเชื้อเห็ดจำนวน 10 ถุง รวม 240 ถุง โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

1. แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B004-013 + *T. harzianum*
2. แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B006-017 + *T. harzianum*
3. แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-021 + *T. harzianum*
4. แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-022 + *T. harzianum*
5. แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-034 + *T. harzianum*
6. แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-054 + *T. harzianum*
7. *T. harzianum* (control)
8. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (check)

การทดลองกระทำโดยฉีดพ่นน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บริเวณปากถุงเห็ด ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต่อ 1 ถุง ทิ้งไว้ 2 วัน หลังจากนั้นฉีดพ่นด้วยน้ำละลายสปอร์เชื้อ *T. harzianum* ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต่อ 1 ถุง บันทึกอัตราการเกิดโรคในระยะเวลา 30 วัน หลังปลูกเชื้อ บันทึกระยะเวลาในการออกดอก จำนวนดอกเห็ด และน้ำหนักเห็ด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นเฉพาะสปอร์ *T. harzianum* และ ฉีดพ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ในช่วงเก็บเกี่ยวเวลา 60 วัน

10. การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดบนดอกเห็ด

ทำการตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมดบนดอกเห็ด ที่ได้จากถุงที่ฉีดพ่นด้วยน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ น้ำละลายสปอร์เชื้อรา และน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมกับน้ำละลายสปอร์เชื้อรา โดยเลือกบริเวณโคนดอกเห็ด และขอบหมวก

การแยกแบคทีเรียจากหมวกเห็ด กระทำโดยตัดชิ้นหมวกเห็ดพื้นที่ผิว 1 ตารางเซนติเมตร หั่นให้ละเอียด ผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 15 นาที วางทิ้งไว้ 20 นาที ทำ dilution pour plate ที่ระดับความเข้มข้น $10^{-2}$ - $10^{-22}$ ใช้ปิเปตดูดมา 0.1 มิลลิลิตร บนอาหาร NA ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่ว บ่มไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) นับจำนวนโคโลนีในจานอาหาร NA ที่มีปริมาณ 30-300 โคโลนี (ทำ 3 ซ้ำ)

การแยกแบคทีเรียจากโคนดอกเห็ด ตัดโคนดอกเห็ดเป็นรูปทรงกระบอกวัดขนาดและคำนวณพื้นที่ผิว โดยใช้สูตร $2\pi r^2 \times L$ หั่นให้ละเอียด เขย่าด้วยเครื่อง shaker 15 นาที วางทิ้งไว้ 20 นาที ทำ

dilution pour plate ที่ระดับความเข้มข้น $10^{-2}$-$10^{-22}$ ใช้ปิเปตดูดมา 0.1 มิลลิลิตร หยดบนอาหาร NA ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่ว บ่มไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) นับจำนวนโคโลนี ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโคโลนี 30-300 โคโลนี (ทำ 3 ซ้ำ) เปรียบเทียบกับการฉีดพ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ