สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *Trichoderma* sp. ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

นายชาติกร บุญไกร
นายสังวาลย์ เศละพฤกษ์กุล

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67284
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549

b.....
i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolation of *Trichoderma* sp. by Polymerase Chain Reaction

Chatikorn Bunkrai

Sangwan Selaprukkul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *Trichoderma* sp.
ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

นักศึกษา นายชาติกร บุญไกร รหัสประจำตัว 45050188
นายสังวาลย์ เศละพฤกษ์กุล รหัสประจำตัว 45050246

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์	
กรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *Trichoderma* sp.
ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

นักศึกษา นายชาติกร บุญไกร
นายสังวาลย์ เศละพฤกษ์กุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2548

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมนำสารเคมีมาใช้ในการปราบศัตรูพืช ซึ่งมักจะทำให้เกิดปัญหากับสิ่งแวดล้อม เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว ปัจจุบันนี้จึงได้มีการนำเชื้อรามาใช้ในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชแทนการใช้สารเคมี โดยกลุ่มเชื้อราที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชได้แก่ เชื้อรา *Trichoderma* sp. , *Gliocladium* sp. และ *Chaetomium* sp. โดยเชื้อ *Trichoderma* sp. เป็นเชื้อที่นิยมนำมาใช้มากที่สุด แต่เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. นั้นมีหลายสายพันธุ์ และแต่ละสายพันธุ์ก็มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่แตกต่างกันไป

การศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อทำการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ออกจากกัน ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยทำการศึกษาเชื้อจำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อ *Trichoderma* sp. ที่ใช้ทางการค้า เชื้อบริสุทธิ์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และเชื้อที่แยกได้จากดินแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ใช้ Universal primer ITS1 และ ITS4 โดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 600-700 bp และสามารถแยกตัวอย่างเชื้อราออกเป็น 2 กลุ่มตามขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ และเมื่อศึกษาด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ *Hin*dIII , *Hae*III , *Sma*I และ *Bam*HI พบว่าสามารถแยกเชื้อตัวอย่างออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ TISTR 3176, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, SRS 1 และ SRS 4 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ CHA, CHA 6, SCP II และ SCP III กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ KSR, SCP I และ SCP IV และกลุ่มที่ 4 คือเชื้อ CHA 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Isolation of *Trichoderma* sp. by Polymerase Chain Reaction
Name	Chatikorn Bunkrai
	Sangwan Selaprukkul
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Asist.Prof. Dr. Supattar Poeaim
Special Project co-advisor	Assoc.Prof. Dr. Nuanphan Naranong

ABSTRACT

Thailand is agricultural country. Most agriculturist popular use chemicals against plant pathogens, whereas these chemicals cause environmental pollution. To solve the problem, fungi are used against plant pathogens instead of chemicals. Genus of fungi are commercially applied as biological control agents such as *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., *Chaetomium* sp. *Trichoderma* sp. are used the most. However, *Trichoderma* sp. have various species and each species still have morphology and efficiency of biological control agents different from other species.

This study aimed to indentify species of *Trichoderma* sp. by Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Fifteen fungal samples were obtained from Thailand Institute of Scientific and Technological Research and collected from soil in many province of Thailand. Internal transcribed spacer (ITS) regions in ITS1 and ITS2 of rDNA from hypha of fifteen samples of *Trichoderma* sp. were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using universal primers ITS1 and ITS4. The 600-700 bp. DNA fragments of amplified products were detected and can separate fungi into 2 groups by size of DNA. And then the PCR products were clevaged by Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism using restriction enzyme consist of *Hin*dIII, *Hae*III, *Sma*I and *Bam*HI which can separate fungal samples into 4 groups such as first group consist of TISTR 3176, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, SRS 1 and SRS 4, second group consist of CHA, CHA 6, SCP II, third group consist of KSR, SCP I and SCP IV and the last group consist of CHA 4.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ถูกจัดทำขึ้นเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และโครงงานพิเศษนี้จะสำเร็จลงไม่ได้หากขาดซึ่งความกรุณาจาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ให้ความรู้และคำแนะนำที่มีประโยชน์ตลอดทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างสูง จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษ และรศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง กรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อคุมสอบโครงงานพิเศษนี้ รวมทั้ง คำแนะนำต่างๆที่มีประโยชน์แก่ข้าพเจ้า เป็นผลให้โครงงานพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน คุณพัชรินทร์ ขาวสวย เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องในโครงงานพิเศษนี้ ตลอดทั้งเพื่อนๆนักศึกษาปริญญาตรีทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆเป็นอย่างดีเสมอมา ทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินงานได้อย่างราบรื่นและมีประสิทธิภาพ

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาและทุกคนในครอบครัว ที่ให้คำแนะนำในการทำงานที่มีคุณค่าและมีประโยชน์อย่างมาก ตลอดทั้งกำลังใจที่มอบให้ด้วยดีตลอดมา

ข้าพเจ้าขอมอบประโยชน์ที่พึงจะได้รับจากโครงงานพิเศษฉบับนี้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นายชาติกร บุญไกร

นายสังวาลย์ เศละพฤกษ์กุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I
บดคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II
กิตติกรรมประกาศ.....III
สารบัญ.....IV
สารบัญตาราง.....VI
สารบัญภาพ.....VII
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ.....2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ.....2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....3
2.1 เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma* sp.).....3
2.2 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction).....4
2.3 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....8
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกสายพันธุ์.....10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....12
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....12
3.2 วิธีการทดลอง.....14
3.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* sp.....14
3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ.....15
3.2.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง.....16
3.2.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส.....16
3.2.5การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....17
3.2.6 การตัดผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP).....18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล..... 19
4.1 การสกัดดีเอ็นเอ..... 19
4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส.....20
4.3 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP) 21
4.3.1การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII 21
4.3.2 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III 22
4.3.3 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I 23
4.3.4 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI 24

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....26

เอกสารอ้างอิง 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาทำการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ออกจากกัน ด้วยเทคนิค PCR - RFLP โดยทำการศึกษาเชื้อจำนวน 15 ตัวอย่าง เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ Universal primer ITS1 และ ITS4 พบชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 590-610 bp และทำให้สามารถจำแนกตัวอย่างเชื้อออกเป็น 2 กลุ่มตามขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งผลที่ได้ยังไม่สามารถจำแนกเชื้อออกจากกันได้อย่างชัดเจน จึงทำการศึกษาต่อด้วยเทคนิค RFLP โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII , *Hae*III , *Sma*I และ *Bam*HI ผลที่ได้พบว่าสามารถแยกเชื้อตัวอย่างออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ TISTR 3176, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, SRS 1 และ SRS 4 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ CHA, CHA 6, SCP II และ SCP III กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ KSR, SCP I และ SCP IV และกลุ่มที่ 4 คือเชื้อ CHA 4

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP พบว่าสามารถทำการจำแนกตัวอย่างเชื้อออกได้เป็นกลุ่มๆเท่านั้น ไม่สามารถจำแนกเชื้อออกจากกันได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงควรทำการหาลำดับเบส (Sequencing) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของเชื้อแต่ละตัว เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ และทำการระบุสายพันธุ์ของเชื้อตัวอย่าง ซึ่งจะสามารถจำแนกเชื้อออกจากกันได้อย่างชัดเจน และสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปทำการศึกษาด้านอื่นๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอบริเวณ ITS 8
ตารางที่ 2 แหล่งที่มาของเชื้อ *Trichoderma* sp. ที่ใช้ในการทดลอง 14
ตารางที่ 3 สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในการทำพีซีอาร์ 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp. 3
รูปที่ 2 หลักการของ Polymerase Chain Reaction 6
รูปที่ 3 ยีนที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ
Internal transcribed spacer (ITS) region 7
รูปที่ 4 หลักการของ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 9
รูปที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* sp. 19
รูปที่ 6 ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส
ของตัวอย่างเชื้อทั้ง 15 ชนิด 20
รูปที่ 7 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII 21
รูปที่ 8 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III 22
รูปที่ 9 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I 23
รูปที่ 10 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม การเพาะปลูกพืชส่วนใหญ่มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ จึงมีการนำสารเคมีมาใช้ในการเพาะปลูก เนื่องจากสารเคมีมีข้อดีคือ ออกฤทธิ์รวดเร็วมีประสิทธิภาพแน่นอนและเห็นผลชัดเจน สะดวกในการจัดซื้อ การใช้และการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามข้อเสียบางประการของการใช้สารเคมีก็คือ ต้องใช้ประจำและต่อเนื่องทำให้ค่าใช้จ่ายสูง และบางกรณีใช้ไประยะหนึ่งเกิดการดื้อยาของเชื้อ ทำให้ต้องเพิ่มอัตราการใช้สารเคมีหรือเปลี่ยนชนิดของสารเคมีควบคุมโรคพืชในปริมาณมากและต่อเนื่อง ซึ่งมักทำให้เกิดปัญหากับสิ่งแวดล้อม เกิดสารพิษตกค้าง ตลอดจนทำให้สมดุลของจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตในดินตามธรรมชาติเสียไป ปริมาณจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์ลดลง เช่น จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ รวมทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นศัตรูหรือเป็นปฏิปักษ์ต่อต้านเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืช การลดลงของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganisms) เป็นสาเหตุให้เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืชเพิ่มจำนวนและเกิดการระบาดของโรคได้มากยิ่งขึ้น ในปัจจุบันจึงมีการนำเชื้อรามาใช้ในการควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืชแทนการใช้สารเคมี เพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้สารเคมีและป้องกันมลพิษที่อาจจะเกิดขึ้นได้ ซึ่งกลุ่มเชื้อราที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชได้แก่เชื้อรา *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp. และ *Chaetomium* sp. โดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. เป็นเชื้อที่ได้รับความสนใจมากที่สุด เนื่องจากราชนิดนี้นอกจากจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชแล้ว ยังมีส่วนช่วยในการเร่งการเจริญเติบโตของพืช ช่วยสร้างผลผลิตของพืชและยังสามารถสร้างความต้านทานโรคให้แก่พืชอีกด้วย(จิระเดช. 2538ก) ดังนั้นเชื้อรา *Trichoderma* sp. ส่วนใหญ่จึงถูกมองว่าเป็นเชื้อที่มีประโยชน์หรืออย่างน้อยก็ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์

แต่เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. นั้นมีหลายสายพันธุ์ และแต่ละสายพันธุ์ก็มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่แตกต่างกันไป เช่น การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ควบคุมโรค Damping-off ของแรดิช ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Rhizotonia solani* (Mihuta-Grimm and Rowe, 1986) หรือการใช้เชื้อรา *Trichoderma viride* ควบคุมโรค Dry root rot ของถั่วเหลือง ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Rhizotonia bataficola* (Vyas, 1994) ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ออกจากกัน เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆได้

การจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่างๆออกจากกันโดยอาศัยความรู้ทางด้านสัณฐานวิทยาก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันมาก แต่เนื่องจากลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp. นั้นสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงไปตามปัจจัยแวดล้อมต่างๆได้ง่าย ส่งผลให้การจำแนก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยวิธีนี้ในบางครั้งให้ผลที่ไม่ถูกต้องแม่นยำ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการนำเทคนิคการตรวจสอบในระดับโมเลกุลมาใช้ เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้นำเอาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาใช้ในการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่างๆออกจากกัน เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆอีกต่อไปได้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. บางสายพันธุ์ โดยทำการตรวจสอบในระดับโมเลกุลโดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma* sp.)

เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma* sp.) เป็นเชื้อราที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน จำพวกซาโปรไฟต์ (saprophyte) โดยอาศัยเศษซากพืชซากสัตว์และแหล่งอินทรีย์วัตถุเป็นแหล่งอาหาร ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA จะมีการเจริญเรียบบนผิวเนื้ออาหาร เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้นสีใส conidiophore มีลักษณะไม่แตกต่างจากเส้นใยและมีการแตกแขนงได้ดี ดังรูปที่1 ตอนปลายของ conidophore จะเป็นส่วนของ phialide ซึ่งแตกแขนงมาจาก phialophore ซึ่ง phialide นี้จะมีรูปร่างเรียวยาวเกิดเป็นแฉกมี 3 phialide มีสีใสผิวเรียบเกิดจาก aerial mycelium จะเกิดเป็นกลุ่ม (spore ball) ตรงส่วนปลายของ phialide และ phialospore มีรูปร่างกลม รูปไข่ มีสีเขียวผิวเรียบ บางชนิดอาจมีสีขาวหรือสีเหลืองก็ได้ โดยสามารถจัดหมวดหมู่ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ได้ดังนี้

Sub-Division	Deuteromycotina
Form-Class	Hyphomycetes
Form-Order	moniliales
Form-Family	moniliaceae
Form-Genus	Trichoderma

รูปที่ 1. สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

ที่มา : www.huck.psu.edu/stf/ em/Rosemary%20Pic%2012.jpg

ประโยชน์ของ *Trichoderma* sp. ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นการนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืชแทนการใช้สารเคมี โดยเชื้อราชนิดนี้มีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช (competition) ในด้านการใช้อาหารและสารที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใย มีผลทำให้ปริมาณเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชลดจำนวนลงได้ นับว่าเป็นกลไกในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคพืชที่สำคัญประการหนึ่ง นอกจากนี้เส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ยังสามารถรบกวนการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช โดยเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* sp. จะเจริญขนานไปกับเส้นใยของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช เกิดการพันรัดเส้นใยของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ทำให้เส้นใยของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชเสียรูปทรงและมีลักษณะผิดปกติ เกิดการเบียดบังการดูดซึมผ่านของสารอาหาร ส่งเสริมให้การเข้าทำลายเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชดียิ่งขึ้น เชื้อราบางชนิดสามารถดำรงชีวิตเป็นทั้งผู้ย่อยสลายและเป็นปรสิต (parasitism) โดยตรงต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช โดยการพันรัดเส้นใยแล้วสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเส้นใยของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช เช่น ไคติเนส และเซลลูเลส จากนั้นจึงแทงเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใยของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช มีผลทำให้เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชอ่อนแอและตายลง ขณะที่บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ(antibiotic) ออกมาเพื่อยับยั้งหรือทำลายเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้ จากกลไกการเข้าทำลายและกระบวนการต่างๆของเชื้อรา *Trichoderma* sp. เหล่านี้ มีผลทำให้เชื้อรา *Trichoderma* sp. เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้เป็นอย่างดี ทำให้การขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชลดลงไปเรื่อยๆ และลดลงจนอยู่ในปริมาณที่ไม่สามารถสร้างความเสียหายกับพืชได้ หรือสร้างความเสียหายบ้าง แต่อยู่ในระดับที่ยอมรับได้

2.2 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือที่เรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนา ขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะ แห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิคพีซีอาร์คือสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิคพีซีอาร์ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆด้าน จนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) และการสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) เป็นต้น

เทคนิคพีซีอาร์ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่เทคนิคนิคพีซีอาร์สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 หลักการของเทคนิคพีซีอาร์

แบ่งออกเป็นขั้นตอนหลักดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เรียกว่า denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 92-95 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 2 เรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็น ดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 3 เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนที่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน ดังรูปที่ 2

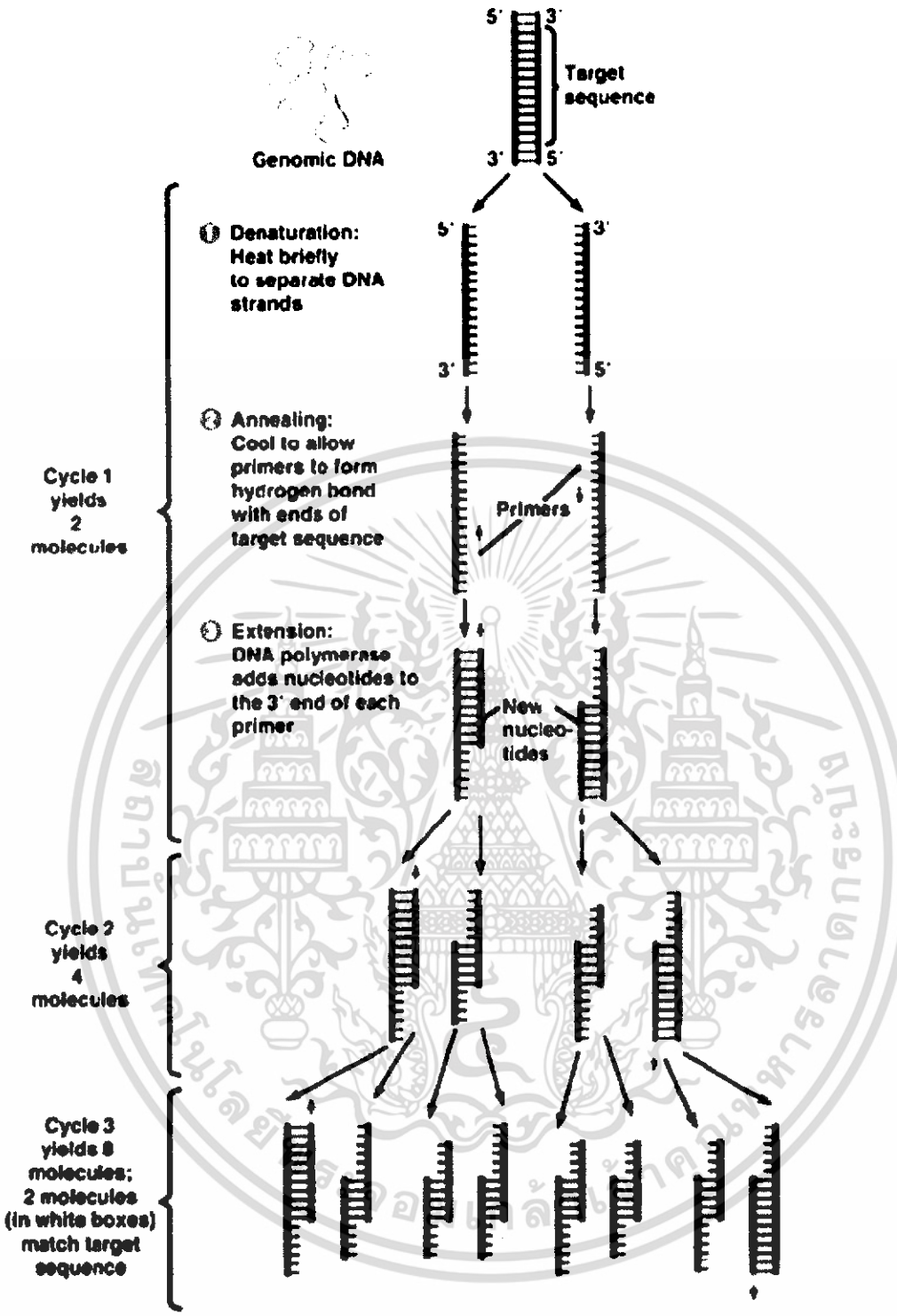
จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลายๆรอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า (อมรา, 2546)

2.2.2 สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาพีซีอาร์

เนื่องจากการทำพีซีอาร์เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีดังต่อไปนี้

1. Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ ดีเอ็นเอสายใหม่
2. DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยจะช่วยเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์
3. Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำพีซีอาร์จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ
4. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg^{++}) อยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2. หลักการของ Polymerase Chain Reaction

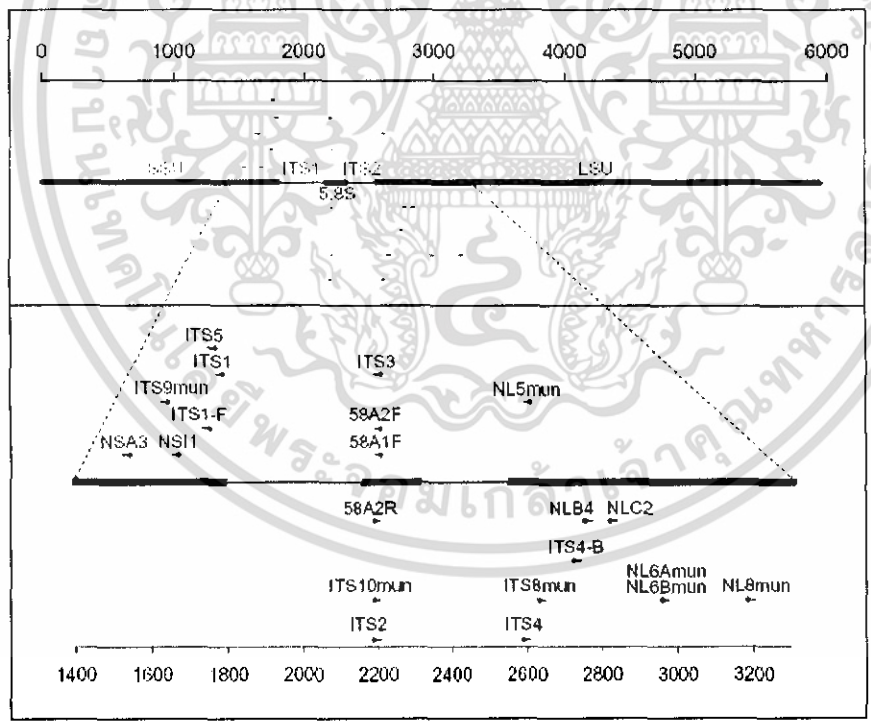
ที่มา : http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ

สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองขนาดเล็ก ปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycler (นิยมเรียกว่าเครื่องพีซีอาร์) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนด จะทำให้ได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

การประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์ เพื่อทำการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เมื่อทราบลำดับเบสที่ปลายทั้งสองด้านของดีเอ็นเอแล้ว (sequence tagged site) สามารถนำมาสร้างเป็นไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย และตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอบริเวณต่างๆ เช่นบริเวณ ซึ่งในการศึกษาจะใช้ลำดับเบสของไพรเมอร์ เพื่อทำการศึกษาในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) region เนื่องจากบริเวณนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าบริเวณอื่นๆ ในอาร์ดีเอ็นเอ (rDNA) ทำให้สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์และภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ บริเวณ ITS แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3. แสดงบริเวณยีนที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) region

ที่มา : Kendall, 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณ ITS มีไพรเมอร์หลากหลายชนิดที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอตำแหน่งต่างๆ และให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน แต่ไพรเมอร์ที่นิยมใช้คือ ไพรเมอร์ ITS 1 และไพรเมอร์ ITS 4 ซึ่งจะให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ประกอบด้วย ITS 1, 5.8S และ ITS 2 ซึ่งลำดับเบสของไพรเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาบริเวณ ITS แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอบริเวณ ITS

ที่มา: http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm

primer name	sequence (5'->3')	reference
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al, 1990
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White et al, 1990
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White et al, 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al, 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al, 1990
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns, 1993
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Gardes & Bruns, 1993
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG	Vilgalys lab
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG	Vilgalys lab
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG	Vilgalys lab

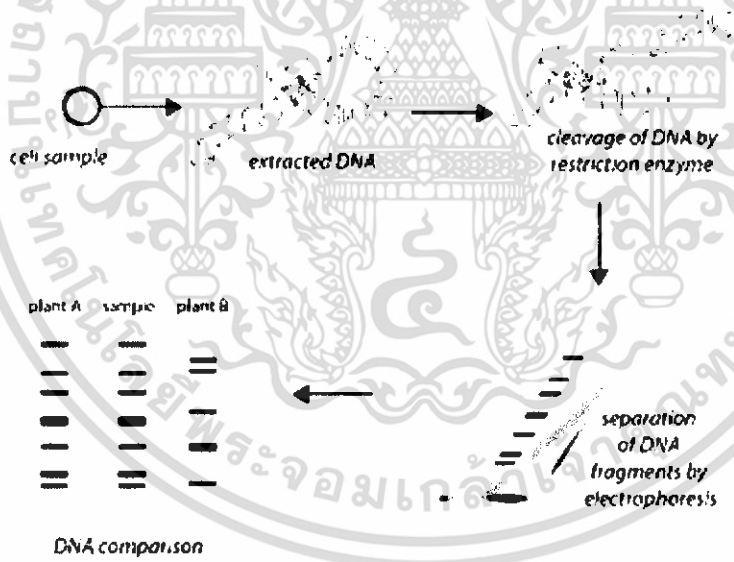
2.3 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

RFLP มาจากคำว่า Restriction Fragment Length Polymorphism หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเก็บอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลล์บางชนิด ได้แก่ คลอโรพลาสต์และไมโตคอนเดรียในรูปของดีเอ็นเอ โมเลกุลของดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนี้ มีความสามารถที่จำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไปแต่บางครั้งก็มีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้เนื่องจากสิ่งแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เองหรือเหตุอื่น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ได้เป็นเพียงการเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัวเท่านั้น อาจมีการเปลี่ยนแปลงถึงระดับโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (duplication) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของส่วนของดีเอ็นเอภายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครโมโซม (chromosome rearrangement หรือ inversion) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซมหรือแตกต่างจากโครโมโซม (transposition) โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จนสามารถกล่าวได้ว่าไม่มีสิ่งมีชีวิตคู่ใดมีลำดับเบสของดีเอ็นเอเหมือนกัน ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twins) หรือพืชเกิดจากการสืบพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ มีความหลากหลายดังกล่าวนี้สามารถตรวจพบได้ง่ายกว่า คือ นำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้นมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์นั้น (สุรินทร์, 2547) ดังรูปที่ 4

เอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นเอนไซม์ที่แยกจากแบคทีเรีย และจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวแบบจำเพาะ เรียกว่า ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลหนึ่งจะได้ชนิดดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายจากแหล่งต่างกันและมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป หรือมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่งดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อนำมาตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิม เรียกว่าเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) หรือมี RFLP



รูปที่ 4. หลักการของ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

ที่มา : http://www.bioteach.ubc.ca/MolecularBiology/DNAfingerprintherbs/rflp.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกสายพันธุ์

โดยทั่วไปแล้ว วิธีการจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่างๆออกจากกันสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การจัดจำแนกตามสัญฐานวิทยาของเชื้อ การทดสอบทางด้านชีวเคมี และการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล แต่วิธีที่เป็นที่ยอมรับมากที่สุด คือ การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เนื่องจากให้ผลการจัดจำแนกที่ถูกต้องแม่นยำ อันได้แก่เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR), Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และเทคนิค DNA sequencing เป็นต้น

ตัวอย่างการจำแนกสายพันธุ์โดยการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล ดังเช่นจากการศึกษาของ Castle A. และคณะ (1997) ที่ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่างๆที่พบอยู่ในฟาร์มเห็ดในอเมริกาเหนือออกจากกัน โดยอาศัยความรู้ทางด้านสัณฐานวิทยาและการตรวจสอบในระดับโมเลกุลโดยวิธี RAPD และ RFLP พบว่า ฟาร์มแห่งนี้มีเชื้อรา *Trichoderma* sp. หลากหลายสายพันธุ์ โดยในแต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันไป ส่วนการตรวจสอบในระดับโมเลกุลนั้น จากการนำเทคนิค RAPD มาใช้ในการศึกษา พบว่าเชื้อรา *T. citrinoviride* และ *T. konigii* ได้ให้ผลของ RAPD ที่เหมือนกัน แต่เมื่อทำการศึกษาเชื้อรา 2 ชนิดนี้ต่อโดยใช้เทคนิค RFLP ที่ตำแหน่ง internal transcribed spacers 1 และ 4 (ITS 1 และ ITS 4) พบว่า มีจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างกัน ดังนั้นจึงทำให้เราสามารถจำแนกเชื้อรา 2 สายพันธุ์นี้ออกจากกันได้

และจากการศึกษาของ Kubicek C.P. และคณะ (2002) ได้ทำการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp.ที่เก็บตัวอย่างมาจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ออกจากกัน โดยอาศัยการวิเคราะห์ทางด้านสัณฐานวิทยา ทางชีวเคมี และการวิเคราะห์ที่ตำแหน่ง ITS 1 และ ITS 2 พบว่าสามารถแยกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ได้หลายสปีชีส์ และแต่ละสปีชีส์ก็ยังสามารถแยกออกได้อีกหลาย strain เช่น เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สามารถแยกออกได้อีก 37 strains เป็นต้น

Zang C. และคณะ (2005) ทำการศึกษาความหลากหลายของสปีชีส์เชื้อรา *Trichoderma* sp. ใน 4 พื้นที่ของประเทศจีน ได้แก่พื้นที่ในจังหวัดเฮอเป่ย (Hebei), พื้นที่ในมณฑลจื่อเจียง (Zhejieng), พื้นที่ในเขตทิเบต (Tibet) และพื้นที่ในจังหวัดยูนาน (Yunnan) โดยอาศัยโปรแกรม Tricho Key V.1.0 และโปรแกรม TrichoBLAST ในการวิเคราะห์ พบเชื้อรา *Trichoderma* sp. หลายสายพันธุ์อันได้แก่ *T. asperellum*, *T. virens*, *T. harzianum*, *T. sinensis*, *T. citrinoviride* และ *T. longibrachiatum* นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่สันนิษฐานว่าเป็นเชื้อรา *Trichoderma* สปีชีส์ใหม่อีก 2 สปีชีส์ คือ *Trichoderma* sp. C1 และ *Trichoderma* sp. C2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในแถบยุโรปกลางโดย Wuczkowski M. และคณะในปี 2002 โดยอาศัยการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ระดับโมเลกุลในบริเวณ ITS 1 และ ITS 2 ซึ่งพบเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ คือ *T. harzianum*, *T. rossocum*, *T. hamatum* และ *T. atroviride* และยังพบเชื้อรา *Trichoderma* sp. อีก 4 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ จึงทำการจัดจำแนกเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ให้อยู่ในกลุ่มใหม่

นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่จำแนกสายพันธุ์ได้ยังถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อีกมากมายเช่น จากการศึกษาของ Gallo A. และคณะในปี 2004 ซึ่งได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน Trichodiene synthase และนำไพรเมอร์ดังกล่าวไปทำการตรวจสอบหาเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Trichodiene ซึ่งเป็นสารสำคัญในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี จากการศึกษาพบว่ามีเชื้อรา 2 สปีชีส์ที่ไม่มียีนชนิดนี้อยู่ในโมเลกุล ได้แก่เชื้อรา *T. citrinoviride* และ *T. hamatum*

Liu P. และคณะในปี 2004 ที่ได้ทำการศึกษายีนต่างๆของเชื้อรา *Trichoderma hazianum* ซึ่งมีการแสดงออกทำหน้าที่ในการควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืช โดยอาศัยวิธี Express Sequence Tag (EST) ซึ่งทำให้ทราบรายละเอียดของยีนต่างๆ มากขึ้น และมีการค้บพบลำดับของยีนใหม่จำนวน 673 ลำดับ โดยการค้นพบเหล่านี้จะทำให้ทราบรายละเอียดของการถอดรหัสของยีนต่างๆ ไปเป็นโปรตีนได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา

- จานเพาะเชื้อ
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- ตู้บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส
- อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ตัวอย่างเชื้อรา
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ (โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Qiagen)

- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- *Water bath 65 องศาเซลเซียส*
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- สารละลายบัฟเฟอร์ AP1
- สารละลายบัฟเฟอร์ AP2
- สารละลายบัฟเฟอร์ AP3/E
- สารละลายบัฟเฟอร์ AW
- สารละลายบัฟเฟอร์ AE
- 25 mM EDTA
- สารละลาย RNase
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- ไนโตรเจนเหลว
- โกร่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

- น้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน
- 10X PCR Buffer
- แมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์
- ไพรเมอร์ ITS1 ความเข้มข้น 20 พิโคโมล/ ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ ITS4 ความเข้มข้น 20 พิโคโมล/ ไมโครลิตร
- dNTPs ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์
- เอนไซม์ *Tag* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 U/µl
- ดีเอ็นเอต้นแบบ
- หลอดทดลองขนาด 0.2 และ 0.5 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- เครื่อง DNA thermal cycle

3.1.4 การทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

- สารละลาย TBE Buffer
- เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีส
- ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker)
- สีย้อม
- Ethidium bromide
- Agarose gel

3.1.5 การวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

- สารละลาย TE Buffer
- คิวเวตต์
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.1.6 การทำ RFLP

- น้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน
- สารละลาย 10X RE Buffer
- สารละลาย Bovine Serum Albumin
- สารละลายดีเอ็นเอเป้าหมาย
- เอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Hin*dIII, *Hae*III, *Sma*I และ *Bam*HI)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* sp.

ตัวอย่างเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่นำมาใช้ในการศึกษาทั้ง 15 ตัวอย่าง มีที่มาจากแหล่งต่างๆ ดังนี้

ตารางที่ 2. แสดงแหล่งที่มาของเชื้อ *Trichoderma* sp. ที่ใช้ในการทดลอง

รหัส	แหล่งที่มา
TISTR 3167	เชื้อบริสุทธิ์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
TISTR 3329	เชื้อบริสุทธิ์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
TISTR 3553	เชื้อบริสุทธิ์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
KMC 5	แปลงข้าวโพด คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
MK	เชื้อที่ใช้ทางการค้า
KSR	แปลงปลูกสัปปะรด อ. เขาสก จ. สุราษฎร์ธานี
CHA	ไร่มันสำปะหลัง พันธุ์ระยอง 90 อ.บ้านบัว จ.ชลบุรี
CHA 4	ไร่มันสำปะหลัง พันธุ์ระยอง 90 อ.บ้านบัว จ.ชลบุรี
CHA 6	ไร่มันสำปะหลัง พันธุ์ระยอง 90 อ.บ้านบัว จ.ชลบุรี
SRS 1	แปลงข้าวโพด จังหวัดสุราษฎ์ธานี
SRS 4	แปลงข้าวโพด จังหวัดสุราษฎ์ธานี
SCP I	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี
SCP II	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี
SCP III	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี
SCP IV	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* sp. มี ขั้นตอนดังนี้

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยละลาย PDA 39 กรัมในน้ำ 1 ลิตร นำสารละลาย PDA ที่ได้ไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเทอาหาร ประมาณ 20 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ รอจนอาหารแข็งตัว เขี่ยตัวอย่างเชื้อรา *Trichoderma* sp. แล้วนำไปบ่มในตู้บ่ม 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2-3 วัน

3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ (โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit ของ Qiagen)

เก็บเกี่ยวเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง เขี่ยเส้นใยเชื้อราลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างเส้นใยโดยเติมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500ไมโครลิตร นำไป vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไป vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาทีอีกครั้ง ดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง และถ่ายเส้นใยเชื้อราที่ได้ลงในโกร่ง จากนั้นทำการเติมไนโตรเจนเหลวลงไปประมาณ 50 มิลลิลิตร พร้อมบดให้เส้นใยเชื้อรากลายเป็นผง

นำผงเส้นใยเชื้อราใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 100 มิลลิกรัม เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และสารละลาย RNase ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการ vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการกลับหลอดไปมาเบาๆทุก 2-3 นาทีเพื่อให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร และนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายที่ได้ลงในคอลัมน์สีม่วง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรและเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP3/E ปริมาตร 675 ไมโครลิตร ดูดสารละลายที่ผสมแล้วปริมาตร 650 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์สีขาวนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที (ทำซ้ำอีกครั้ง) จากนั้นย้ายคอลัมน์สีขาว ใส่ลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตรที่มาพร้อมกับชุดสกัดดีเอ็นเอ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไปอีกครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ตามด้วยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำคอลัมน์ออกจากหลอดทดลอง โดยส่วนใสที่อยู่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง มีขั้นตอนดังนี้

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเจือจาง โดยดูดสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 495 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และนำไป vortex จากนั้นจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอหาได้จาก

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) = A x 50 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) x B

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

B = ค่าการเจือจาง (เท่า)

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ดูได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 /280 ค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 1.65-2.00 ถ้าค่าที่ได้มีค่ามากกว่า 2.00 แสดงว่าปนเปื้อน ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม หรือ อาร์เอ็นเอ ถ้าค่าที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่าปนเปื้อนโปรตีน

3.2.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

นำสารละลายดีเอ็นที่สกัดได้มาทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส เพื่อตรวจสอบว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีดีเอ็นเอตามที่ต้องการหรือไม่ โดยเทียบจากแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดของดีเอ็นเอ ทำได้โดยนำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกขนาดในสนามไฟฟ้า ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย Ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

เตรียมเจล โดยชั่งอะกาโรสให้มีความเข้มข้นของเจลตามที่ต้องการ ละลายในสารละลาย 1X TBE Buffer ใส่ในฟลาล์สเขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาอย่าให้แน่นนำไปให้ความร้อนโดยใช้ไมโครเวฟ ประมาณ 2 นาที ให้อะกาโรสละลายเป็นสารละลายใส ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในถาดใส่เจลที่เตรียมไว้ตามขนาดที่ต้องการ เจลควรหนาประมาณ 0.5-0.8 เซนติเมตร เสียบหวีลงไป ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ประมาณ 15 นาที สังเกตสีของเจลจะขุ่น จากนั้นนำหวีออก นำวุ้นไปใส่ในอ่างที่ใช้สำหรับทำอิเลคโตรโฟรีซีส เทสารละลาย 1X TBE Buffer ลงไปให้ท่วมเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร

เตรียมหยอดดีเอ็นเอที่ต้องการลงในหลุมเจล โดยทำการหยดน้ำกลั่นและสี ลงบนแผ่นพาราฟิล์ม ดูดดีเอ็นเอมาผสมกับน้ำกลั่นและสีที่อยู่บนพาราฟิล์ม ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดลงในหลุมตามเลนที่กำหนดให้ครบ ต่อสายขั้วบวกและลบ เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ 50 โวลต์ ให้สีวิ่งไปประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของความยาวของเจล แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย Ethidium bromide และนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส บริเวณ ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS 1 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ คือ 5' TCGGTAGGTGAACCTGCGG 3' และไพรเมอร์ ITS 4 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ คือ 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' (White และคณะ, 1990)

ขั้นตอนการทดลองทำโดย การเติมสารเคมีต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบในการทำพีซีอาร์ ดังตารางที่ 3 ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตรจากนั้นนำส่วนผสมพีซีอาร์ที่ได้เข้าเครื่อง DNA thermal cycle เพื่อเริ่มปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้สภาวะดังนี้คือ Initial Denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1.5 นาที Annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และ Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ทั้ง 3 สภาวะใช้จำนวนรอบ 35 รอบ และ Final Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ใช้เจลที่มีความเข้มข้น 1.5 % และตรวจผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ตารางที่ 3. แสดงสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในการทำพีซีอาร์

สารเคมี	ปริมาตร
DNA template (100 ng)	1 µl
ITS 1 primer (20 pmol/µl)	1 µl
ITS 4 primer (20 pmol/µl)	1 µl
1.25 mM dNTP	4 µl
10X PCR buffer	2.5 µl
$MgCl_2$ (50mM)	1.5 µl
Tag DNA polymerase (5 U/µl)	0.5 µl
DDW	13.5 µl
Total	25 µl

67284
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6 การตัดผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ซึ่งทราบปริมาณความเข้มข้น มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเติมผลผลิตพีซีอาร์ 5 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร สารละลาย 10X RE Buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร Bovine Serum Albumin ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออนปริมาตร 12.3 ไมโครลิตรเพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิตามที่กำหนดของเอนไซม์แต่ละชนิด เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยนำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจผลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาใช้ในการศึกษาคือ *Hin*dIII, *Hae*III, *Sma*I และ *Bam*HI เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แยกได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ มีโมเลกุลที่ไม่ซับซ้อนประกอบด้วยโพลีเพปไทด์เพียงชนิดเดียว มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงอย่างเดียวไม่สามารถเติมหมู่เมทธิลให้กับเบสได้ การตัดดีเอ็นเอจะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำ หรือจุดใกล้กับบริเวณจดจำ ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน เอนไซม์จะตัดดีเอ็นเอให้ปลายที่เป็น 5'- phosphase สายหนึ่งและ 3'- hydroxy อีกสายหนึ่ง บริเวณจดจำของเอนไซม์ประกอบด้วยเบส 4 คู่ ถึง 6 คู่ หรือมากกว่านั้น โดยลำดับเบสที่บริเวณจดจำมักจะมีการเรียงตัวของเบสเหมือนกันอยู่ตรงข้าม 2 สายของดีเอ็นเอ

*Hin*dIII และ *Bam*HI จะตัดดีเอ็นเอให้ขาดออกจากกัน แล้วชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองจะมีปลายที่ยาวไม่เท่ากัน เรียกว่าปลายเหนียว (cohesive end หรือ sticky end) ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะมีปลาย 5 ที่ยาวกว่าปลาย 3 เรียกว่า 5 protruding end โดย *Hin*dIII และ *Bam*HI มีบริเวณจดจำและจุดตัดดังนี้

*Hin*dIII	5'- AAGCTT -3'	5'- A 5'- AGCTT -3'
	3'- TTCGAA -5'	3'- TTCGA-5' A -5'
*Bam*HI	5'- GGATCC -3'	5'- G 5'- GATCC -3'
	3'- CCTAGG -5'	3'- CCTAG -5' G -5'

*Hae*III และ *Sma*I จะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งตรงกันทั้ง 2 สาย ทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีปลายทั้งสองยาวเท่ากันเรียกว่า ปลายทู่ (blunt end หรือ flush end) โดย *Hae*III และ *Sma*I มีบริเวณจดจำและจุดตัดดังนี้

*Hae*III	5'- GGCC -3'	5'- GG -3' 5'- CC -3'
	3'- *CCGG -5'*	3'- CC -5' 3'- GG-5'
*Sma*I	5'- CCCGGG -3'	5'- CCC -3' 5'- GGG -3'
	3'- GGGCCC -5'	3'- GGG -5' 3'- CCC -5'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

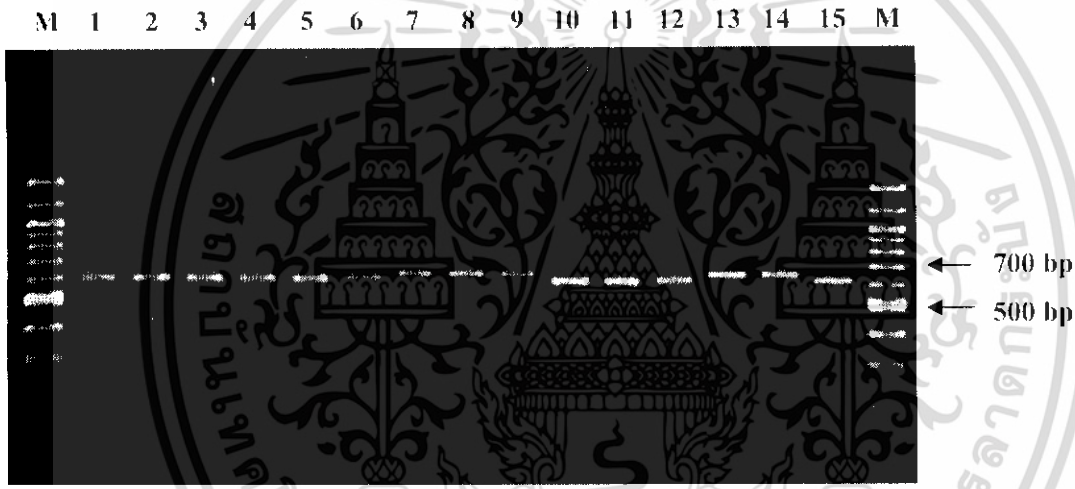
การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 15 สายพันธุ์ ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 วันที่ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำเส้นใยที่มีลักษณะการเจริญเป็นเส้นใยสีขาวที่ยังไม่มีการสร้างสปอร์ มาทำการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit ของ Qiagen และทำการตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 % ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ หลังจากนั้นย้อมแผ่นเจลด้วย Ethidium bromide แล้วตรวจผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ได้ผลแสดงตัวอย่างเชื้อที่ได้เช่น SCP IV และ SCP II ดังรูปที่ 5

รูปที่ 5. แสดงการวิเคราะห์ปริมาณและขนาดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* sp.
โดย M คือ marker ขนาด 100 bp
1 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ SCP IV
2 คือ ตัวอย่างจากเชื้อ SCP II

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

จากการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 15 ตัวอย่าง เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นที่ได้ด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อราทุกตัวอย่างได้ โดยเชื้อ TISTR 3167, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, KSR, SRS 1, SRS 4, SCP I และ SCP IV พบขนาดดีเอ็นเอประมาณ 590 bp และเชื้อ CHA, CHA 4, CHA 6, SCP II และ SCP III พบขนาดดีเอ็นเอประมาณ 610 bp ผลแสดงดังรูปที่ 6 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hermosa M.R. และคณะ (2000) ที่ได้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมเพื่อจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่ใช้เป็น Biocontrol เมื่อทำการตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณ ITS พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะมีขนาดประมาณ 560 bp ถึง 600 bp



รูปที่ 6. แสดงขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ของตัวอย่างเชื้อทั้ง 15 ชนิด โดย M คือ marker ขนาด 100 bp และเลนต่างๆ ดังนี้

1 : TISTR3167	2 : TISTR 3329	3 : TISTR 3553	4 : KMC 5	5 : MK
6 : KSR	7 : CHA	8 : CHA 4	9 : CHA 6	10 : SRS 1
11 : SRS 4	12 : SCP I	13 : SCP II	14 : SCP III	15 : SCP IV

ซึ่งผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของตัวอย่างทั้ง 15 ตัวอย่าง สามารถแบ่งตัวอย่างเชื้อออกเป็น 2 กลุ่มได้ ตามขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 590 bp ประกอบด้วยเชื้อ TISTR 3167, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, KSR, SRS 1, SRS 4, CP I และ SCP IV กลุ่มที่ 2 ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 610 bp ประกอบด้วยเชื้อ CHA, CHA 4, CHA 6, SCPII และ SCP III

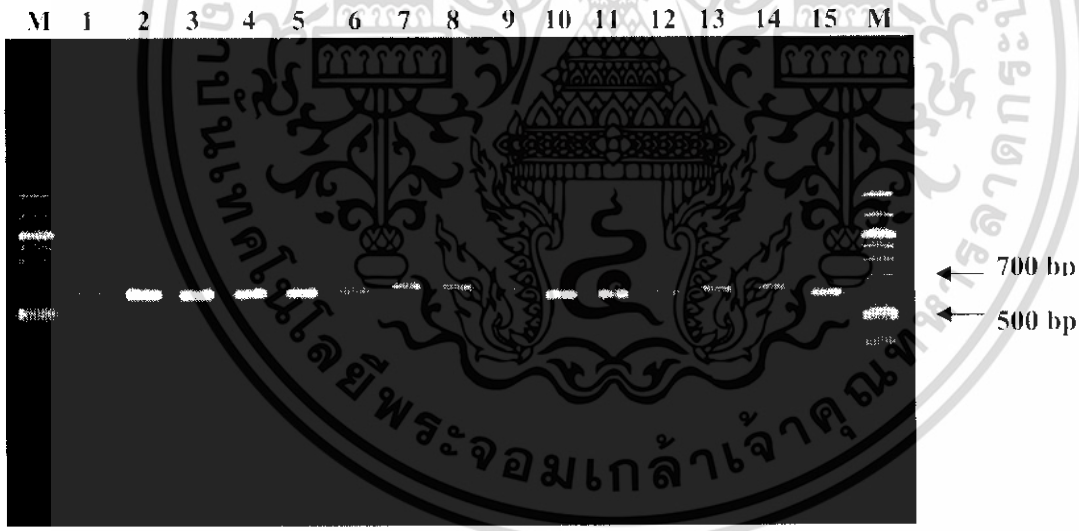
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP)

จากการทดลองนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของตัวอย่างเชื้อทั้ง 15 ตัวอย่าง มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Hin*dIII, *Hae*III, *Sma*I และ *Bam*HI ซึ่งมีตำแหน่งจดจำในการตัดแตกต่างกัน ปรากฏผลดังนี้

4.3.1 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

จากการทดลองนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII แล้วมาศึกษาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังรูปที่ 7 เป็นผลเนื่องมาจากบริเวณ ITS ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Hin*dIII จึงไม่เกิดการตัด ตรงกับรายงานของ Castle A. และคณะ (1997) ที่ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่พบในฟาร์มเห็ดของอเมริกาเหนือ ซึ่งรายงานว่าเมื่อตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII จะไม่เกิดการตัด ดังนั้นจึงสามารถแบ่งตัวอย่างเชื้อออกได้เป็น 2 กลุ่ม เช่นเดิม คือกลุ่มที่ 1 ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 590 bp ประกอบด้วยเชื้อ TISTR 3167, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, KSR, SRS 1, SRS 4, SCP I และ SCP IV กลุ่มที่ 2 ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 610 bp ประกอบด้วยเชื้อ CHA, CHA 4, CHA 6, SCP II และ SCP III



รูปที่ 7. แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

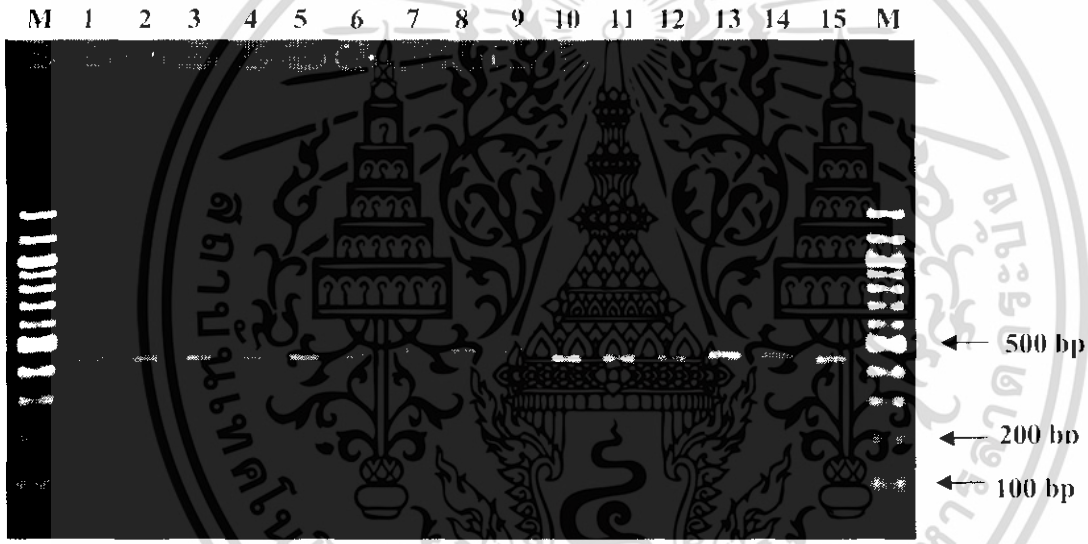
โดย M คือ marker ขนาด 100 bp และเลนต่างๆ ดังนี้

1 : TISTR3167	2 : TISTR 3329	3 : TISTR 3553	4 : KMC 5	5 : MK
6 : KSR	7 : CHA	8 : CHA 4	9 : CHA 6	10 : SRS 1
11 : SRS 4	12 : SCP I	13 : SCP II	14 : SCP III	15 : SCP IV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III

จากการทดลองนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ปรากฏผลดังรูปที่ 8. ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ 1 ตำแหน่ง ทำให้ได้ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 480 bp และ 120 bp ประกอบด้วยเชื้อ TISTR 3167, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, KSR, SRS 1, SRS 4, SCP I และ SCP IV และกลุ่มที่ 2 ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 500 bp และ 110 bp ประกอบด้วยเชื้อ CHA, CHA 4, CHA 6, SCP II และ SCP III ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Ranganath H.R. และคณะ (2002) ที่ทำการศึกษาการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในอินเดีย เมื่อตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III จะได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอซึ่งพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรม



รูปที่ 8. แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III

โดย M คือ marker ขนาด 100 bp และเลนต่างๆ ดังนี้

1 : TISTR3167	2 : TISTR 3329	3 : TISTR 3553	4 : KMC 5	5 : MK
6 : KSR	7 : CHA	8 : CHA 4	9 : CHA 6	10 : SRS 1
11 : SRS 4	12 : SCP I	13 : SCP II	14 : SCP III	15 : SCP IV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I

จากการทดลองนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ 1 ตำแหน่ง ผลจากการตัดให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 500 bp และ 100 bp ประกอบด้วยเชื้อ TISTR 3167, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, KSR, SRS 1, SRS 4, SCP I และ SCP IV กลุ่มที่ 2 มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 510 bp และ 100 bp ประกอบด้วยเชื้อ CHA, CHA6, SCP II และ SCP III และกลุ่มที่ 3 ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 480 bp กับ 120 bp คือเชื้อ CHA 4 ผลแสดงดังรูปที่ 9 โดยผลที่ได้แตกต่างจากการทดลองของ Castle A. และคณะ (1997) ที่ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่พบในฟาร์มเห็ดของอเมริกาเหนือ ซึ่งรายงานว่าเมื่อตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 550 bp กับ 125 bp และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 350 bp จำนวนสองชิ้น

รูปที่ 9. แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I

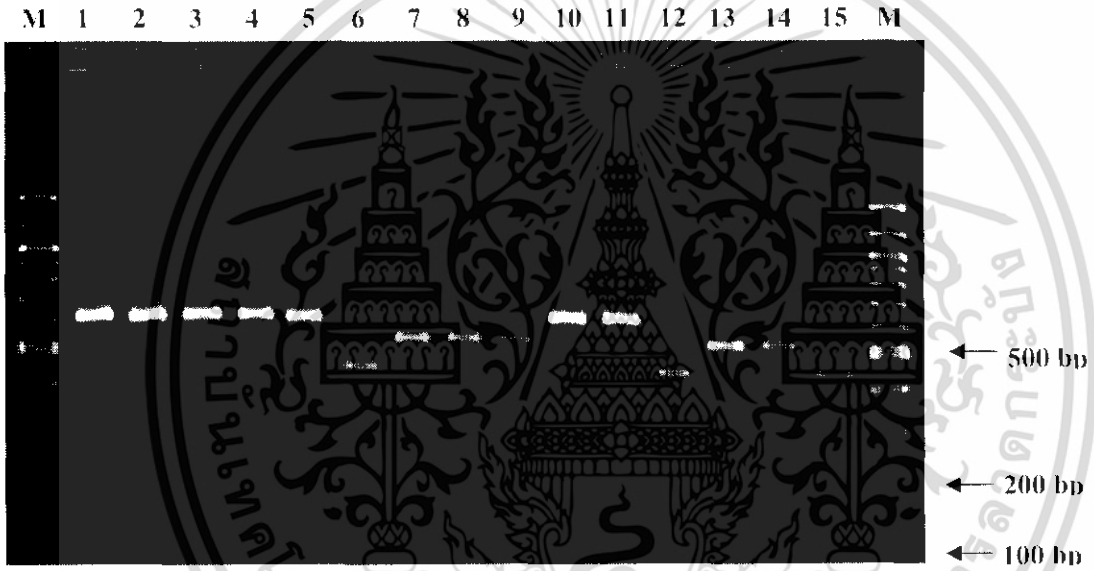
โดย M คือ marker ขนาด 100 bp และเลนต่างๆ ดังนี้

1 : TISTR3167	2 : TISTR 3329	3 : TISTR 3553	4 : KMC 5	5 : MK
6 : KSR	7 : CHA	8 : CHA 4	9 : CHA 6	10 : SRS 1
11 : SRS 4	12 : SCP I	13 : SCP II	14 : SCP III	15 : SCP IV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

จากการทดลองนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มีตำแหน่งจดจำในการตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ 1 ตำแหน่ง ผลจากการตัดให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไม่เกิดการตัด ประกอบด้วยเชื้อ *TISTR 3167*, *TISTR 3329*, *TISTR 3553*, KMC 5, MK, SRS 1 และ SRS 4 กลุ่มที่ 2 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 500 bp และ 110 bp ประกอบด้วยเชื้อ CHA, CHA 4, CHA 6, SCP II และ SCP III และกลุ่มที่ 3 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 430 bp กับ 180 bp ประกอบด้วยเชื้อ KSR, SCP I และ SCP IV ผลแสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 10. แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI โดย M คือ marker ขนาด 100 bp และเลนต่างๆ ดังนี้

1 : TISTR3167	2 : TISTR 3329	3 : TISTR 3553	4 : KMC 5	5 : MK
6 : KSR	7 : CHA	8 : CHA 4	9 : CHA 6	10 : SRS 1
11 : SRS 4	12 : SCP I	13 : SCP II	14 : SCP III	15 : SCP IV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองจากการทดลองนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Castle A. และคณะ (1997) ที่ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่พบในฟาร์มเห็ดของอเมริกาเหนือ ซึ่งพบว่าเมื่อตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ซึ่งมีขนาดประมาณ 700 bp ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จะให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ไม่เกิดการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ซึ่งจะเป็นเชื้อในกลุ่ม *T. harzianum, T. crassum, T. hamatum* หรือ *T. spirale* กลุ่มที่ 2 เกิดการตัดแล้วให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 560 bp และ 140 bp ซึ่งจะเป็นเชื้อ *T. koningii* หรือ *T. atroviride* และกลุ่มที่ 3 เมื่อเกิดการตัดแล้วให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 480 bp และ 220 bp ซึ่งจะเป็นเชื้อ *T. citrinoviride* หรือ *T. longibrachiatum*

จากผลการทดลองนี้ เชื้อในกลุ่มที่ 1 ที่ประกอบด้วยเชื้อ TISTR 3167, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, SRS 1 และ SRS 4 ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีมาก่อนหน้านี้นั้นอาจกล่าวได้ว่าเชื้อกลุ่มที่ 1 นี้อาจเป็นเชื้อ *T. harzianum, T. crassum, T. hamatum* หรือ *T. spirale* และเชื้อในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ CHA, CHA 4, CHA 6, SCP II และ SCP III ซึ่งมีตำแหน่งจดจำและตำแหน่งตัดของ *Bam*HI ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500 bp และ 110 bp อาจเป็นเชื้อ *T. koningii* หรือ *T. atroviride* และกรณีของเชื้อในกลุ่มที่ 3 ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ KSR, SCP I และ SCP IV เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI แล้วได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 430 bp และ 180 bp อาจเป็นเชื้อ *T. citrinoviride* หรือ *T. longibrachiatum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2538ก. จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชในรูปชีวภัณฑ์ : ผลิตภัณฑ์ที่ต้องพิจารณา ตอนที่ 2. วารสารเคหการเกษตร. 19(10) : 159-165.

อมรา คัมภิรานนท์.2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์ ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

ธวัชชัย เปรมศรี. 2543. การศึกษาเชื้อสาเหตุโรคโคนต้นเน่าและรากเน่าของต้นโป๊ยเซียน และการควบคุมโดยชีววิธีด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดเลือกจากดินปลูก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Castle A., Speranzini D., Rghei N., Alm G., Rinker D. and Bissett J. 1997.Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on north American mushroom farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 133-137.

Grimm M., Rowe L. and R.C. 1986. *Trichoderma* ssp. as biocontrol agents of Rhizoctonia damping-off of radish in organic soil and comparison of four delivery systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 306-312.

Hermosa M.R., Grondona I., Iturriaga E.A., Diaz-Minguez J.M., Castro C., Monte E. and Garcia-Acha I. 2000. Molecular Characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1890-1898.

Kubicek C.P., Bissett J., Druzhinina I.S., Gradinger C.K. and Szakacs G. 2002. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 38, 310-319.

Lieckfeldt E., Kullnig C.M., Kubicek C.P., Samuels G.J. and Borner T. 2000. *Trichoderma aureoviride*: phylogenetic position and characterization. *Mycol Research*, 105, 313-322.

Liu P. and Qian Y. 2004. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. *Research in Microbiology*, 156, 416-423.

Martin K.J. and Rygiewicz P.T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5:28.

Ranganath H. R., Shyam P.G. and Sheeba. 2002. PCR-fingerprinting of some *Trichoderma* isolates from two Indian type culture collections – a need for re-identification of these economically important fungi. *Scientific Correspondence*, 83, 372-373.

Singh S.K., Sharma V.P., Sharma S.R., Kumar S. and Tiwari M. 2006. Molecular characterization of *Trichoderma* taxa causing green mould disease in edible mushrooms. *Research Communication*, 90, 427-431.

Vyas and S.C. 1994. Integrated biological and chemical control of dry root rot on soybean. *Indian jouranal of Mycology and Plant Pathology*, 24 (2), 132-134 .

Wuczkowski M., Druzhinina I.S., Gherbawy Y., Klug B., Prillinger H. and Kubicek C.P. 2002. Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. *Microbiology Research*, 158, 125-133.

Zhang C., Druzhinina I.S., Kubicek C.P. and Xu T. 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: Evidence for a North to South distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiology Letters*, 251, 251-257.

http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/genetic-engin/pcr.html

http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg

http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm

http://www.bioteach.ubc.ca/MolecularBiology/DNAfingerprintherbs/rflp.gif

http://www.huck.psu.edu/stf/ em/Rosemary%20Pic%2012.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้