

บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคในพืชตระกูลกะหล่ำในหลอดทดลอง (*in vitro* test)

3.1.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคในพืชตระกูลกะหล่ำ

ทำการทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท คือ F2, F3, I4, J2 และ K1 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท นวัตกรรมขั้น จำกัด) ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Rhizoctonia* sp. และ *Pythium* sp. (สาเหตุโรคเน่าคอดิน), *Alternaria* sp. (สาเหตุโรคใบจุด) เชื้อรา *Fusarium* sp. (สาเหตุโรคเหี่ยว) และเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* (สาเหตุโรคเน่าเละ) ในพืชตระกูลกะหล่ำ ด้วยวิธี Dual culture bioassay และ Filter paper disc technique

กรณีเชื้อสาเหตุโรคเป็นเชื้อราใช้วิธี Dual culture bioassay โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดที่เลี้ยงบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) (ภาคผนวก ก. 1) อายุ 3-5 วัน และนำ mycelia disc มาวางตรงกลางจานอาหาร Inhibitory mold agar-2 (IMA-2) (ภาคผนวก ก. 1) ที่มีเชื้อ *Streptomyces* spp. อายุ 7 วัน โดยวางห่างกันเป็นระยะทาง 3 เซนติเมตร โดยใช้ชิ้นวุ้น (sterile agar) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางฝังตรงข้ามเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (รูปที่ 3.1) ทำการบ่มเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยแต่ละไอโซเลทมี 4 ซ้ำ (จานอาหารเลี้ยงเชื้อ) บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดความกว้างของการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชในหน่วยมิลลิเมตร และรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (Radial Mycelia Growth (%), RMG (%)) (Vincen, 1947) โดยคำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{Inhibition of Radial Mycelium Growth (\%)} = \frac{(C-T) \times 100}{C}$$

เมื่อ C คือ ระยะการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางด้านฝั่งควบคุม (มิลลิเมตร)

T คือ ระยะการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางด้านฝั่ง *Streptomyces* spp. (มิลลิเมตร)