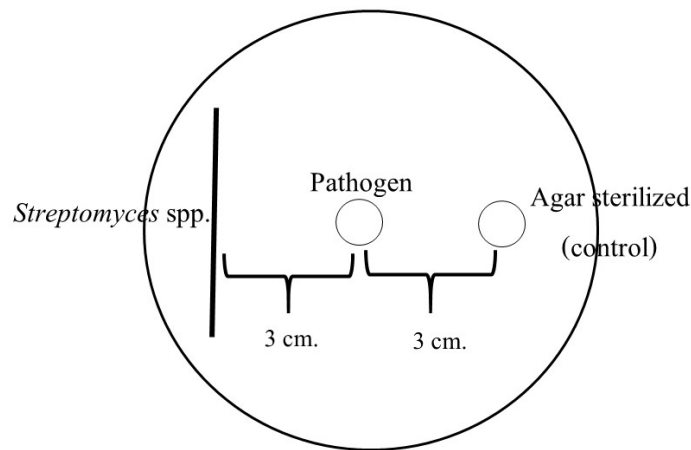




รูปที่ 3.1 การทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ด้วยวิธี Dual culture bioassay กับเชื้อสาเหตุโรคพืช (ดัดแปลงจาก Boukaew และคณะ, 2011)

กรณีเชื้อสาเหตุโรคเป็นเชื้อแบคทีเรียคือ *Erwinia carotovora* นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่ต้องการทดสอบนำมาเกลี่ยให้ทั่วบนหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก. 1) จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. ที่มีอายุ 24 ชั่วโมงมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Filter paper disc technique จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยวัดความกว้างของ clear zone และรายงานผลในหน่วยมิลลิเมตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยแต่ละไอโซเลทมี 4 ซ้ำ (จานอาหารเลี้ยงเชื้อ)

3.1.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Chitinase ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp.

นำชิ้นส่วนของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท คือ F2, F3, I14, J2 และ K1 ที่มีอายุ 7 วัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางบนจานอาหาร Chitin selective agar จำนวน 3 จุด (Gomez และคณะ, 2004) (ภาคผนวก ก. 1) จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ ทำการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Chitinase จากการวัดขนาด clear zone ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และรายงานผลในหน่วยมิลลิเมตร (Sadegui และคณะ, 2006) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ซึ่งแต่ละไอโซเลทมี 4 ซ้ำ (จานอาหารเลี้ยงเชื้อ)

3.1.3 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp.

3.1.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. ที่เลี้ยงบนอาหาร IMA-2 อายุ 7 วัน มาชุดเอาสปอร์ที่ผิวหน้าจานอาหารออกโดยใช้ Spreader จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ใช้ autopipete คูดสปอร์แขวนลอยจากจานอาหาร นำมากรองบนผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1800 (Japan) โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 จากนั้นทำการคูดสปอร์แขวนลอยที่ได้มา 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว Inhibitory mold brotg-2 (IMB-2) (ภาคผนวก ก. 1) ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ทำการบ่มภายใต้สภาวะเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ New Brunswick Scientific รุ่น Innova 43R (Germany) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ทุกๆ 4 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยแต่ละไอโซเลตมี 4 ซ้ำ (หอดทดลอง)

3.1.3.2 การเตรียม Crude enzyme

นำสปอร์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 3.1.3.1 จำนวน 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงยี่ห้อ Sorvall รุ่น RC 5C Plus (United states) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสต่อไป

3.1.3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ในน้ำเลี้ยงเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. (Gomez และคณะ, 2004)

ชั่ง colloidal chitin (ภาคผนวก ก. 4) จำนวน 0.2 กรัม ใส่ในหอดทดลอง เติม citrate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่ pH 6 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม crude enzyme ที่ได้จากข้อ 3.1.3.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยนำไปแช่ในน้ำแข็ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1800 (Japan) อ่านค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายเทียบกับกราฟมาตรฐาน *N*-acetylglucosamine (NAG) (รูปที่

3.2) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยแต่ละไอโซเลตมี 4 ซ้ำ (หาค่าเฉลี่ย)

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ในหน่วย Unit/ml

การคำนวณปริมาณ *N*-acetylglucosamine ($\mu\text{g/ml}$) เทียบกับกราฟมาตรฐาน

นำค่า Absorbance ที่วัดได้จากตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. แทนในสมการกราฟมาตรฐาน *N*-acetylglucosamine (รูปที่ 3.2)

$$y = 0.0427x + 0.0063$$

$$x = \frac{y - 0.0063}{0.0427}$$

เมื่อ y คือค่า Absorbance ที่วัดได้จากของตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ *Streptomyces* spp.

นำค่าที่ได้ไปคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส (unit/ml)} = A \times \frac{1}{B} \times C \times \frac{1}{D} \times \frac{1}{E} \times \text{dilution factor}$$

เมื่อ

A = ปริมาณ *N*-acetylglucosamine ($\mu\text{g/ml}$)

B = มวลโมเลกุลของ *N*-acetylglucosamine (221.2)

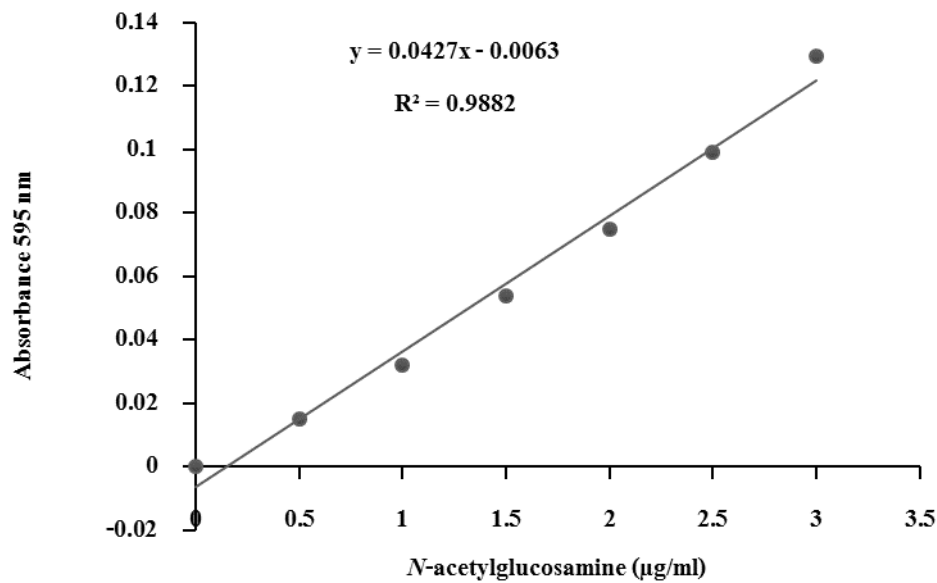
C = ปริมาณของสารละลายทั้งหมดที่ทำปฏิกิริยา (ml)

D = เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (60 นาที)

E = ปริมาตรสารตัวอย่าง (ml)

Dilution factor = ความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase

หมายเหตุ: unit/ml เท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ 1 ml ที่สามารถย่อยสลายไคตินให้เป็น *N*-acetylglucosamine 1 $\mu\text{g/ml}$ ในเวลา 60 นาที



รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ *N*-acetylglucosamine กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร สำหรับกิจกรรมเอนไซม์ Chitinase ในน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp.

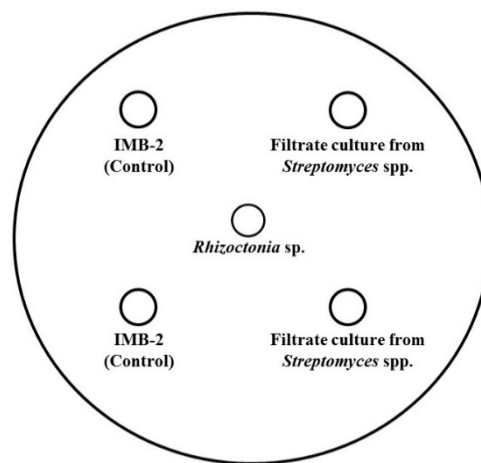
3.1.4 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. (culture filtrate) ในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตระกูลกะหล่ำ

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. มาเลี้ยงในอาหารเหลว Inhibitory mold broth-2 (IMB-2) ปริมาตร 125 มิลลิลิตร บ่มในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ New Brunswick Scientific รุ่น Innova 43R (Germany) นาน 24 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราหรือเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชด้วยวิธี Filter paper disc technique โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไปกรองผ่าน Millipore filter ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยมีขนาดรูเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

กรณีเชื้อสาเหตุโรคเป็นเชื้อรา นำ mycelial disc (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร) ของเชื้อสาเหตุโรคพืชในที่นี้คือเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. เป็นตัวแทนในการศึกษา โดยนำไปวางตรงกลางจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำ Filter paper disc (Advantec, Japan) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 เซนติเมตร จำนวน 4 ชิ้น วางเป็น 4 มุม โดยแต่ละมุมห่างจากเชื้อราสาเหตุโรคพืชประมาณ 2 เซนติเมตร (รูปที่ 3.3) จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ *Streptomyces* spp.

ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดบน Filter paper disc จำนวน 2 แผ่น และหยดอาหารเหลว IMB-2 (control) ลงบน Filter paper disc อีก 2 แผ่นที่เหลือ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดความกว้างของการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช ในหน่วยมิลลิเมตร และรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (Inhibition Radial Mycelia Growth (%), RMG (%)) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยแต่ละไอโซเลทมี 4 ซ้ำ (จานอาหารเลี้ยงเชื้อ)

กรณีเชื้อสาเหตุโรคเป็นเชื้อแบคทีเรีย นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml มาเกลี่ยลงบนหน้าอาหาร NA จากนั้นนำ Filter paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 เซนติเมตร จำนวน 4 แผ่น วางเป็น 4 มุม จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ *Streptomyces* spp. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงที่ Filter paper disc 2 แผ่น และหยดอาหารเหลว IMB-2 (control) ลงบน Filter paper disc ที่เหลือ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดความกว้างของ clear zone ในหน่วยมิลลิเมตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยแต่ละไอโซเลทที่ทดสอบมี 4 ซ้ำ (จานอาหารเลี้ยงเชื้อ)



รูปที่ 3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ด้วยวิธี Filter paper disc กับเชื้อสาเหตุโรคพืช (ดัดแปลงจาก Boukaew และคณะ, 2011)

3.2 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรคเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ในพืชตระกูลกะหล่ำในระดับโรงเรือน (Greenhouse)

3.2.1 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรคเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ในพืชตระกูลกะหล่ำที่ปลูกด้วยระบบดิน

3.2.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp.

การศึกษาในระดับโรงเรือน (Greenhouse) เลือกใช้เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท F3 มาใช้ในการทดสอบ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท F3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. สาเหตุโรคเน่าคอดินได้ดีที่สุดจากผลการทดสอบในสภาพ *in vitro* โดยขั้นตอนการเตรียมเชื้อแบคทีเรียทำโดย นำ Spreader ชุดที่ผิวหน้าจานอาหารเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ที่เลี้ยงบนอาหาร IMA-2 อายุ 7 วัน เพื่อให้สปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. หลุดออก จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ใช้ autopipete ดูดสปอร์แขวนลอยจากจานอาหารแล้วนำมากรองบนผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1800 (Japan) โดยให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยมาหาความเข้มข้นเชื้อด้วยวิธี Serial dilutions plate count (ภาคผนวก ก. 3) ซึ่งความเข้มข้นเชื้อที่ได้มีค่าเท่ากับ 10^8 colony/ml

3.2.1.2 การเตรียมเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. สาเหตุโรคเน่าคอดิน

การเตรียมเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ทำโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะที่บริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. อายุ 3 วันจำนวน 10 ชิ้น จากนั้นนำชิ้นวุ้นมาเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) (ภาคผนวก ก. 1) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการบ่มภายใต้สภาวะเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ New Brunswick Scientific รุ่น Innova 43R (Germany) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการปั่นเส้นใยให้ละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer ยี่ห้อ Heidolph รุ่น Silent Crusher M (Germany) ที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้เส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ขนาดเล็กจำนวนมาก จากนั้นนำเส้นใยเชื้อราไปหาความเข้มข้นด้วยวิธี Serial dilutions plate count (ภาคผนวก ก. 3) ซึ่งความเข้มข้นของเส้นใยเชื้อราที่ได้มีค่าเท่ากับ 10^6 colony/ml

3.2.1.3 การเตรียมต้นกล้าผักกวางตุ้งสำหรับปลูกในระบบดิน

ในการทดลองนี้ใช้ผักกวางตุ้ง เป็นตัวแทนของพืชตระกูลกะหล่ำ เนื่องจากเป็นพืชที่เพาะปลูกง่าย เจริญเติบโตเร็ว และอ่อนแอต่อโรคเน่าคอดิน ทำการศึกษาโดยเพาะเมล็ดกวางตุ้งในตะกร้าเป็นเวลา 14 วัน ย้ายต้นกล้าที่มีลักษณะแข็งแรง ลำต้นไม่หัก ลงในถุงเพาะต้นกล้า และเพาะปลูกไว้ในโรงเรือน ทำการให้น้ำทุกวัน ในช่วงเช้าและเย็น และให้ปุ๋ยสูตร 16-16-16 จำนวน 1 กรัมต่อต้นกวางตุ้ง 1 ต้น ทุกๆ 5 วัน เป็นเวลา 20 วัน (ผักกวางตุ้งมีอายุรวม 34 วัน)

3.2.1.4 การปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. และเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Rhizoctonia* sp.

นำต้นกวางตุ้งอายุ 20 วันหลังย้ายปลูกที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1.3 มาทำการปลูกเชื้อลงในดินที่ใช้ในการเพาะปลูกตามวิธีการของ Curtis และคณะ (2010) โดยปริมาตรของเส้นใยแวนดอยเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. (เตรียมได้จากข้อ 3.3.1.2) และปริมาตรของสปอร์แวนดอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท F3 (เตรียมได้จากข้อ 3.2.1.1) ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 200 ไมโครลิตร และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับต้นกวางตุ้งที่ราดด้วยสารกำจัดเชื้อรา Benomyl ความเข้มข้น 200 ppm. (ภาคผนวก ก. 2) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และต้นกวางตุ้งที่ราดด้วยน้ำประปา ใช้เป็นชุดควบคุม ซึ่งในการปลูกเชื้อลงในดินที่ปลูกต้นกวางตุ้งนี้ สามารถสรุปออกเป็นทรีตเมนต์ต่างๆ ได้ ดังนี้

- | | |
|----------------|---|
| ทรีตเมนต์ที่ 1 | ผักกวางตุ้งที่ราดด้วยน้ำประปา (Control) |
| ทรีตเมนต์ที่ 2 | ผักกวางตุ้งที่ราดสปอร์แวนดอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Streptomyces</i> sp. |
| ทรีตเมนต์ที่ 3 | ผักกวางตุ้งที่หยดเส้นใยแวนดอยของเชื้อรา <i>Rhizoctonia</i> sp. |
| ทรีตเมนต์ที่ 4 | ผักกวางตุ้งที่ราดสปอร์แวนดอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Streptomyces</i> sp. และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยดเส้นใยแวนดอยของเชื้อรา <i>Rhizoctonia</i> sp. |
| ทรีตเมนต์ที่ 5 | ผักกวางตุ้งที่หยดเส้นใยแวนดอยของเชื้อรา <i>Rhizoctonia</i> sp. และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นราดสปอร์แวนดอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Streptomyces</i> sp. |
| ทรีตเมนต์ที่ 6 | ผักกวางตุ้งที่หยดเชื้อรา <i>Rhizoctonia</i> sp. และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นฉีดพ่นด้วยสารกำจัดเชื้อรา Benomyl ความเข้มข้น 200 ppm. |

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยแต่ละทรีตเมนต์มีต้นกวางตุ้งที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 21 ซ้ำ (ต้นกวางตุ้ง)

3.2.1.5 บันทึกผลการทดลอง

3.2.1.5.1. เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

ทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเน่าคอดินของต้นกวางตุ้งหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 5 วัน โดยนับจำนวนต้นกวางตุ้งที่แสดงอาการของโรคเน่าคอดินทั้งหมดเทียบกับจำนวนต้นกวางตุ้งทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยใช้สูตรคำนวณดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นกวางตุ้งที่แสดงอาการเหี่ยวของโรคเน่าคอดิน} \times 100}{\text{จำนวนต้นกวางตุ้งทั้งหมดในแต่ละทรีตเมนต์}}$$

3.2.1.5.2 กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค

1. กิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ในใบกวางตุ้ง (Gupta และคณะ, 1995)

1.1 การเตรียม Crude enzyme

ชั่งใบกวางตุ้งน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในหลอดพลาสติกปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม acetate buffer ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 5.2 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และเติม mercaptoethanol ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer ยี่ห้อ Heidolph รุ่น Silent Crusher M (Germany) ที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ขณะปั่นตัวอย่างต้องอยู่บนน้ำแข็งตลอดเวลา) จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกเอากากบางส่วนออก นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาแต่สารละลายส่วนใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Sorvall รุ่น RC 5C Plus (United states) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแยกส่วนใสมาเก็บไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

1.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase

ชั่ง colloidal chitin จำนวน 0.2 กรัม ใส่ในหลอดทดลองแก้ว เติม citrate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่ pH 6 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม crude enzyme ที่ได้จากข้อ 1.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ดูดส่วนใสที่ได้หลังจากการบ่มปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่จำนวน 2 หลอด จากนั้นเติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำหลอดที่ 1 ไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที ส่วนอีกหลอดตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำเย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV1800 (Japan) อ่านค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายเทียบกับกราฟมาตรฐาน *N*-acetylglucosamine (NAG) (รูปที่ 3.4) และค่าโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 3.6) นำค่าที่ได้ไปคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase โดยกำหนดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1 หน่วย (Unit)

เท่ากับ 1 µg/ml ของ *N*-acetylglucosamine ซึ่งเกิดจากไคตินที่ถูกย่อยสลายในเวลา 60 นาที วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 4 ซ้ำ (หาค่าทดลอง)

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ในหน่วย Unit/mg protein

การคำนวณปริมาณตัวอย่างในหน่วย Unit

การคำนวณปริมาณ *N*-acetylglucosamine (µg/ml) เทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3.4)

$$y = 0.045x + 0.0015$$

$$x = \frac{y - 0.0015}{0.045}$$

เมื่อ y คือค่า Absorbance ที่วัดได้จากของตัวอย่าง crude enzyme ของใบกวางตุ้ง
นำค่าที่ได้ไปคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase (unit/mg protein)} = A \times \frac{1}{B} \times C \times \frac{1}{D} \times \frac{1}{E} \times \text{dilution factor}$$

เมื่อ

A = ปริมาณ *N*-acetylglucosamine (µg/ml)

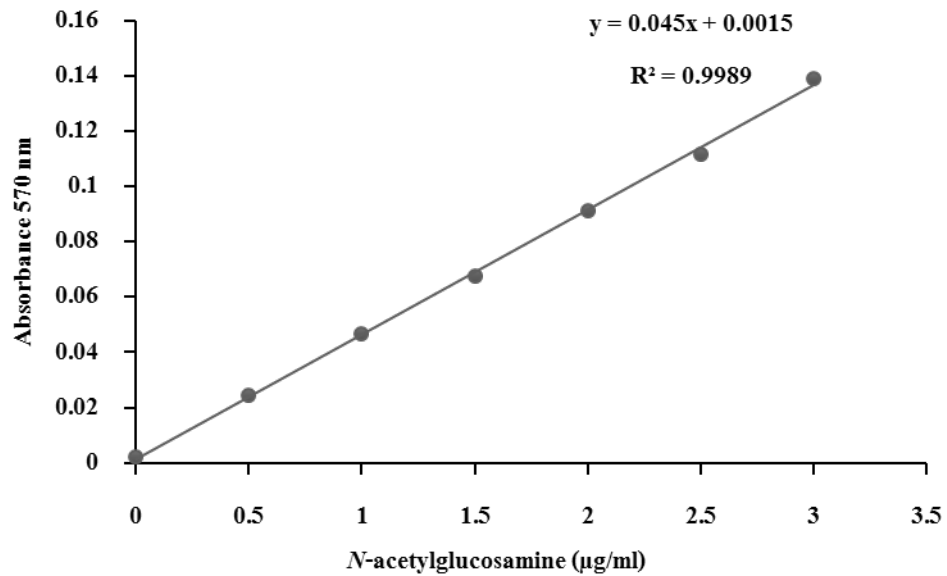
B = มวลโมเลกุลของ *N*-acetylglucosamine 221.2

C = ปริมาตรของสารละลายทั้งหมดที่ทำปฏิกิริยา (ml)

D = เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (60 นาที)

E = ปริมาตรสารตัวอย่าง

Dilution factor = ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase



รูปที่ 3.4 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ *N*-acetylglucosamine กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร สำหรับกิจกรรมเอนไซม์ Chitinase ในใบกวาดตุง

การคำนวณปริมาณของโปรตีนทั้งหมดในหน่วย mg protein

นำค่า Absorbance ของโปรตีนทั้งหมดที่วัดได้จากตัวอย่าง แทนในสมการปริมาณโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 3.6)

$$y = 0.0069x + 0.0418$$

$$x = \frac{y - 0.0418}{0.0069}$$

เมื่อ y คือค่า Absorbance ของโปรตีนที่วัดได้จากตัวอย่าง

ผลลัพธ์ที่ได้มีหน่วยเป็น mg protein

การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ Chitinase ในหน่วย Unit/mg protein

นำค่า Unit มาหารด้วยปริมาณโปรตีนทั้งหมดจะได้ หน่วย Unit/mg protein

2. กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-Glucanase ในใบกวาดตุง (Salles และคณะ, 2002)

2.1 การเตรียม Crude enzyme

ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.1

2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-Glucanase ในใบกวาด้าง

นำ crude enzyme ที่ได้จากข้อ 2.1 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแก้ว เดิม Laminarin 1.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Sorvall รุ่น RC 5C Plus (United states) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที จากนั้นดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ เดิมสารละลาย Somogyi's ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำเย็น จากนั้นเติมสารละลาย Nelson's reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV1800 (Japan) นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Glucose (รูปที่ 3.5) และ โปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 3.6) เพื่อหาปริมาณของเอนไซม์ β -1,3-Glucanase 1 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิดน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัมในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-Glucanase ในหน่วย Unit

การคำนวณปริมาณ Glucose เทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3.5)

$$y = 0.0013x + 0.0027$$

$$x = \frac{y - 0.0027}{0.0013}$$

เมื่อ y คือค่า Absorbance ที่อ่านได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-Glucanase

นำค่า x ที่ได้ คูณด้วย Dilution factor ผลลัพธ์ที่ได้มีหน่วยเป็น Unit

การคำนวณปริมาณของโปรตีนทั้งหมดในหน่วย mg protein

นำค่า Absorbance ของโปรตีนทั้งหมดที่วัดได้จากตัวอย่าง แทนในสมการปริมาณโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 3.6)

$$y = 0.0069x + 0.0418$$

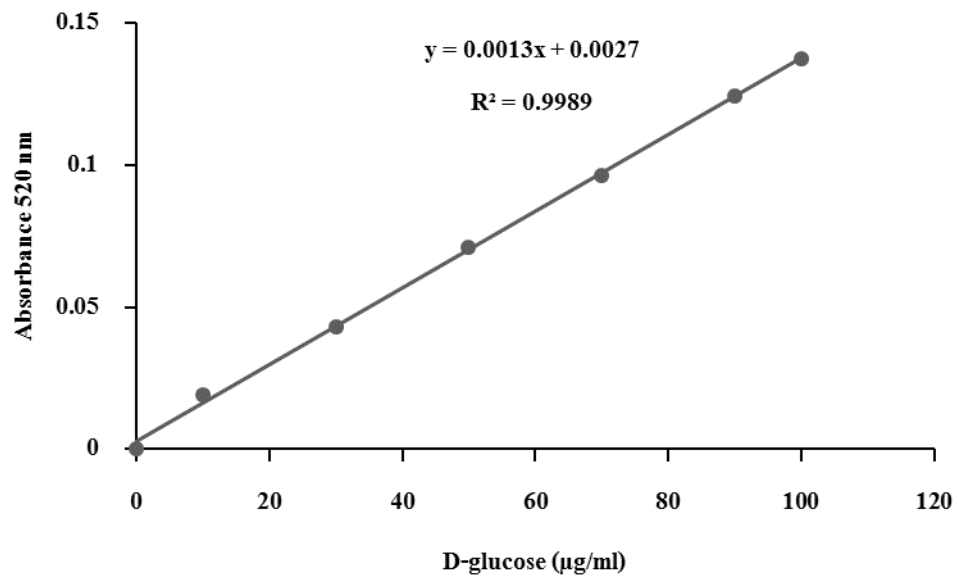
$$x = \frac{y - 0.0418}{0.0069}$$

เมื่อ y คือค่า Absorbance ของโปรตีนที่อ่านได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-Glucanase

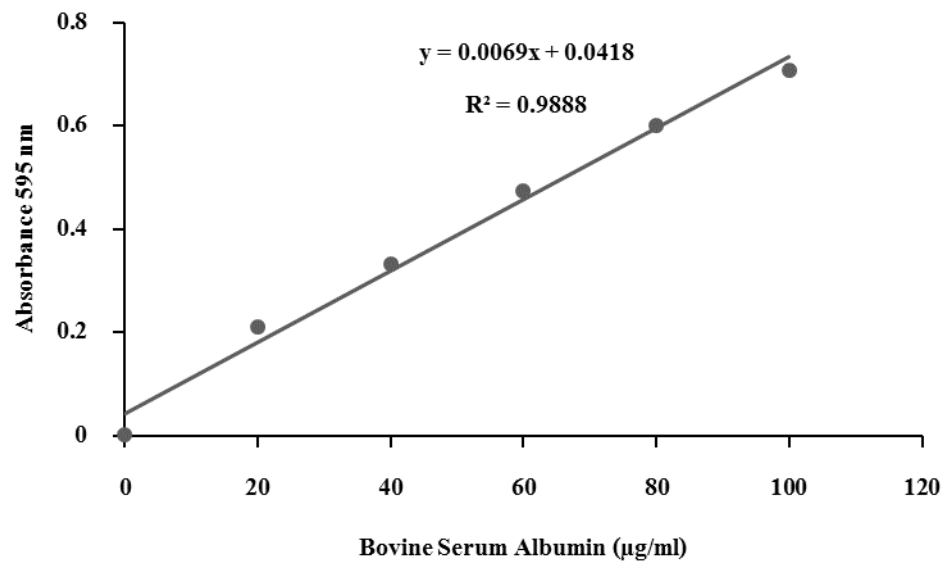
ผลลัพธ์ที่ได้มีหน่วยเป็น mg protein

การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ β -1,3-Glucanase ในหน่วย Unit/mg protein

นำค่า Unit มาหารด้วยปริมาณโปรตีนทั้งหมดจะได้ หน่วย Unit/mg protein



รูปที่ 3.5 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ D-glucose กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-Glucanase ในใบกวางตุ้ง



รูปที่ 3.6 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ Bovine Serum Albumin กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase และ β -1,3-Glucanase ในใบกวางตุ้ง

3. กิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase ในใบกว้างดั่ง (ดัดแปลงจาก Zucker, 1968)

3.1 การเตรียม Crude enzyme

ชั่งใบกว้างดั่งน้ำหนัก 2 กรัม ใส่ในหลอดทดลองพลาสติกปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลละลายบัฟเฟอร์ Sodium borate ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 8 จำนวน 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer ยี่ห้อ Heidolph รุ่น Silent Crusher M (Germany) ที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ขณะปั่นตัวอย่างต้องอยู่บนน้ำแข็งตลอดเวลา) จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกเอากากบางส่วนออก นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาแต่น้ำตาลละลายส่วนใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Sorvall รุ่น RC 5C Plus (United states) ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกส่วนใสมาเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase โดยเติมน้ำกลั่นจำนวน 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองแก้ว ตามด้วยน้ำตาลละลาย Phenylalanine ความเข้มข้น 10 โมลาร์ จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม crude enzyme ที่ได้จากข้อ 3.1 จำนวน 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรด HCl ที่ความเข้มข้น 5 นอร์มอล จำนวน 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1800 (Japan) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA (Bovine Serum Albumin) (รูปที่ 3.7)

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase ในหน่วย Unit

นำค่า Absorbance ที่อ่านได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase ทารด้วยเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาคือ 60 นาที

$$x = \frac{y}{60}$$

เมื่อ y คือค่า Absorbance ที่อ่านได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase

นำค่า x ที่ได้ คูณด้วย Dilution factor ผลลัพธ์ที่ได้มีหน่วยเป็น Unit

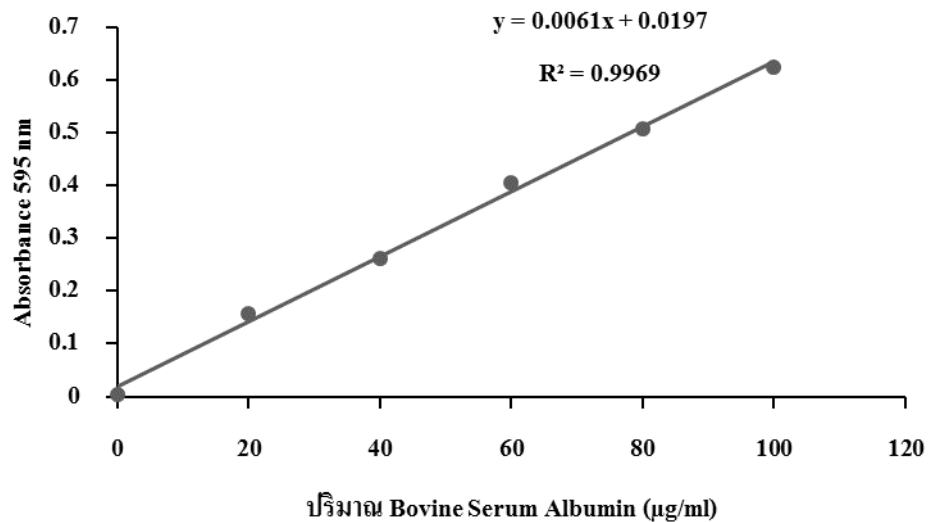
การคำนวณปริมาณของโปรตีนทั้งหมดในหน่วย mg protein

นำค่า Absorbance ของโปรตีนทั้งหมดที่วัดได้จากตัวอย่าง แทนในสมการปริมาณโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 3.7)

$$y = 0.0061x + 0.0797$$

$$x = \frac{y - 0.0418}{0.0069}$$

เมื่อ y คือค่า Absorbance ของโปรตีนที่อ่านได้
ผลลัพธ์ที่ได้มีหน่วยเป็น mg protein



รูปที่ 3.7 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ Bovine Serum Albumin กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร สำหรับกิจกรรมเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase ในใบกวางตุ้ง

การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase ในหน่วย Unit/mg protein
นำค่า Unit มาหารด้วยปริมาณโปรตีนทั้งหมดจะได้ หน่วย Unit/mg protein

3.2.2 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรคเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ในพืชตระกูลกะหล่ำที่ปลูกด้วยระบบไฮโดรโปนิคส์

3.2.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp.

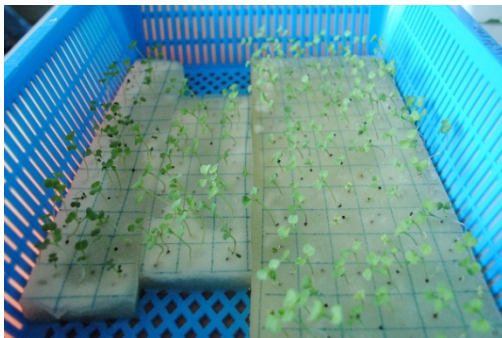
ทำเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.2.1

3.2.2.2 การเตรียมเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. สาเหตุโรคเน่าคอดิน

ทำเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.2.2

3.2.2.3 การเตรียมต้นกล้าผักกวางตุ้ง

นำเมล็ดพันธุ์ผักกวางตุ้งมาเพาะในฟองน้ำขนาด 2x2 เซนติเมตร เป็นเวลา 7 วัน ย้ายต้นกล้าลงระบบไฮโดรโปนิคส์แบบ Deep flow technique (DFT) (รูปที่ 3.8) โดยนำต้นกล้าผักกวางตุ้งมาวางบนแผ่นโฟมที่เจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร นำแผ่นโฟมที่มีต้นกล้าผักกวางตุ้งวางบนกระบะขนาด 30x40x11 เซนติเมตร ที่บรรจุธาตุอาหารพืชไร้ดินสูตรพระนคร 1 (รูปที่ 3.9) โดยผสมอาหารสูตร A ในอัตราส่วน 1 ลิตร ต่อน้ำประปา 50 ลิตรในกระบะทิ้งไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารสูตร B ในอัตราส่วน 1 ลิตร ต่อน้ำประปา 50 ลิตร เติมอากาศลงในกระบะสารละลายโดยใช้ปั๊มลมเติมอากาศตลอดระยะเวลาการเพาะปลูก เป็นเวลา 12 วัน ในระหว่างการเพาะปลูก ทำการวัด pH ของสารละลายและปรับให้มีค่า pH อยู่ระหว่าง 5.5-7.0



1. ต้นอ่อนผักกวางตุ้งที่เพาะบนฟองน้ำอายุ 7 วัน



2. แยกต้นอ่อนที่อยู่บนฟองน้ำให้มีขนาด 2x2 ซม.



3. นำต้นอ่อนใส่บนโฟมที่เจาะรู ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2x2 ซม. จากนั้นนำไปวางบนกระบะเติมธาตุอาหารพืชไร้ดิน และเปิดปั๊มลมตลอดระยะเวลาการเพาะปลูก



4. ต้นกวางตุ้งที่มีอายุครบ 12 วัน

รูปที่ 3.8 วิธีการปลูกผักกวางตุ้งด้วยระบบไฮโดรโปนิคส์แบบ Deep Flow Technique (DFT)



รูปที่ 3.9 ธาตุอาหารพืชไร้ดิน สูตรพระนคร สูตร A (ข้าว) และสูตร B (ข้าว)

3.2.2.4 การปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. และเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Rhizoctonia* sp.

ย้ายต้นกล้าตั้งอายุ 12 วัน (มีจำนวนใบ 4-5 ใบ) ออกจากระบบไฮโดรโปนิกส์ นำมาใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 21×31×12 เซนติเมตร ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคพืชและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงในรากของต้นกล้าตั้งดังต่อไปนี้

- ทรีตเมนต์ที่ 1 ผักกวางตุ้งที่ปลูกเลี้ยงโดยใช้น้ำกลั่นปริมาณ 250 มิลลิลิตร (control)
- ทรีตเมนต์ที่ 2 ผักกวางตุ้งที่เติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ปริมาตร 250 มิลลิลิตร
- ทรีตเมนต์ที่ 3 ผักกวางตุ้งที่เติมเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ปริมาตร 250 มิลลิลิตร
- ทรีตเมนต์ที่ 4 ผักกวางตุ้งที่เติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ปริมาตร 250 มิลลิลิตร
- ทรีตเมนต์ที่ 5 ผักกวางตุ้งที่เติมเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ปริมาตร 250 มิลลิลิตร
- ทรีตเมนต์ที่ 6 ผักกวางตุ้งที่เติมเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการฉีดพ่นด้วยสารกำจัดเชื้อรา Benomyl ความเข้มข้น 200 ppm. ปริมาตร 150 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยแต่ละทรีตเมนต์มีต้นกล้าตั้งที่ทดสอบ 12 ซ้ำ (ต้นกล้าตั้ง)

3.2.2.5 บันทึกผลการทดลอง

3.2.2.5.1 ความรุนแรงการเกิดโรคเน่าคอดิน

การประเมินผลความรุนแรงของการเกิดโรคเน่าคอดินของต้นกวางตุ้งทุกวันเป็นเวลา 3 วัน โดยแบ่งระดับความรุนแรงของการเกิดโรคเน่าคอดิน ออกเป็น 4 ระดับ ดังนี้

- 0 คะแนน = ต้นกวางตุ้งไม่ปรากฏอาการเหี่ยว
- 1 คะแนน = ต้นกวางตุ้งเริ่มปรากฏอาการเหี่ยวที่บริเวณปลายใบ
- 2 คะแนน = ต้นกวางตุ้งปรากฏอาการเหี่ยวทั้งใบและใบเริ่มร่วงลงนานกับลำต้น
- 3 คะแนน = ต้นกวางตุ้งปรากฏอาการเหี่ยวทั้งต้นและใบร่วงลงนานกับลำต้น

3.2.2.5.2. เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเน่าคอดิน

$$\text{ร้อยละการเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นกวางตุ้งที่แสดงอาการเหี่ยวของโรคเน่าคอดิน} \times 100}{\text{จำนวนต้นกวางตุ้งทั้งหมดในแต่ละทรีตเมนต์}}$$

3.2.2.5.3 กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค

ทำเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.1.5.2

3.3 สถานที่ดำเนินงานวิจัย

ดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน) กรุงเทพมหานคร