บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

1.1 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยวิธี Agar well method

การเตรียมน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, OMA60-34, SEA120-4, SEA120-28 และ SEA120-38 ซึ่งเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จ. เชียงใหม่ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากคุณณัฐพงษ์ (2553) ในรูปสปอร์ผสมน้ำ (spore suspension) เตรียมได้โดยเทน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงบนอาหารวุ้น Hickey Tresner agar (ภาคผนวก ก) ที่มีเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อและสร้างสปอร์สีดำ จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) ขูดสปอร์แอคติโนมัยซีทหลุดกระจายออกมาแล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกเศษวุ้นและเซลล์ออก นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemacytometer ปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำ spore suspension ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (1% v/v) ใส่ลงในอาหาร enzyme production medium (EPM) (ภาคผนวก ก) ที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างน้ำกรองเลี้ยงเชื้อทุกวันเพื่อนำมาวิเคราะห์ผล โดยนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกยังมีสปอร์อยู่เรียกว่า น้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ไม่กรองสปอร์ออก (NF) และนำส่วนที่ 2 มากรองด้วยเครื่องกรองแบคทีเรีย Minisart® ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตร เพื่อกรองเอาสปอร์ออก เรียกส่วนนี้ว่า น้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่กรองสปอร์ออก (F) นำทั้ง 2 ส่วนเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การทดสอบโดยวิธี Agar well method

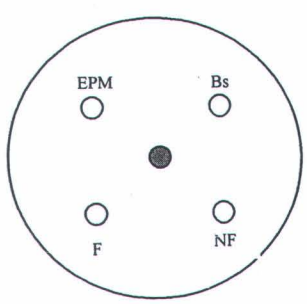
เทอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรแบบ 2 ชั้น (double layer) โดยเทชั้นแรกให้มีความหนาประมาณ 0.1 เซนติเมตร รอให้หน้าอาหารวุ้นแห้ง จากนั้นเทชั้นที่สองให้หนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร เมื่อหน้าอาหารวุ้นแห้งสนิท ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อห่างจากเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร โดยเจาะ 4 ตำแหน่ง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน โดยนำชิ้นเชื้อรา (culture disc) วางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมไว้ หยดน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ไม่กรองสปอร์ออก (NF) และน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่กรองสปอร์ออก (F) ปริมาตรอย่างละ 30 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เจาะไว้ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ enzyme production medium (EPM) และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สารชีวภัณฑ์ทางการค้าตามอัตราแนะนำเท่ากับ $1x10^9$ CFU/g ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ภาพ 3) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประเมินผลการทดลองโดยวัดขนาดรัศมีโคโลนีเพื่อคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

สูตรการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Percent inhibition of radial growth: PIRG) (เกษม, 2532)

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

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดทดสอบ



EPM = อาหารเลี้ยงเชื้อ enzyme production medium

Bs = *Bacillus subtilis*

NF = น้ำกรองเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเอาสปอร์แอคติโนมัยซีทออก

F = น้ำกรองเลี้ยงเชื้อที่กรองเอาสปอร์แอคติโนมัยซีทออก

ภาพ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

1.2 การยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยวิธี Agar well method

เตรียมสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเทลงในอาหาร ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเขี่ยเบาๆ บริเวณเส้นใยจนสปอร์หลุด กรองเส้นใยและสปอร์ผสมนี้ด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemacytometer แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย Tween 20 อัตราส่วน 100 : 0.04 v/v เพื่อให้สปอร์กระจายตัวได้ดี จากนั้นดูดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหาร PDA ที่เทอาหารไว้ 2 ชั้น (double layer) เช่นเดียวกับข้อ 1.1 แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร รอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อห่างจากเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร โดยเจาะ 4 ตำแหน่ง ทดสอบโดยหยดน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ NF และ F ปริมาตรอย่างละ 30 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เจาะไว้ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ EPM และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สารชีวภัณฑ์ทางการค้าตามอัตราแนะนำเท่ากับ $1x10^9$ CFU/g ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดวงใส (clear zone) และบันทึกผล

การทดลองที่ 2. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท

2.1 การวัดการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสโดยการหาค่า chitinase activity

หาค่า chitinase activity โดยวัดได้จาก *N*-acetylglucosamine ที่ถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเทรต โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959) และใช้ *N*-acetylglucosamine ในการทำกราฟมาตรฐาน โดยเตรียม reaction mixture ดังนี้ (อภิญญา และคณะ, 2545)

- Enzyme control : น้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร
- Substrate control : substrate buffer ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร (25% (w/v) colloidal chitin ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.5) ผสมกับ 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร
- Enzyme substrate : น้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับ substrate buffer ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร

บ่ม reaction mixture ใน Water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม DNS reagent (ภาคผนวก ค) ในแต่ละหลอดปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยลูกแก้วแล้วนำไปต้มที่น้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงทันทีแล้วเติมสารละลาย 40% (w/v) sodium potassium tartrate (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer นำ reaction mixture ของ substrate control กับ enzyme substrate แต่ละหลอดไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 6,000 รอบต่อนาที แยกเอาเฉพาะส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยใช้ 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 (ภาคผนวก ค) เป็นค่า blank แล้วนำค่าที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากกราฟมาตรฐานเพื่อนำไปคำนวณหาค่า enzyme activity

หน่วยการทำงานของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการปลดปล่อย *N*-acetylglucosamine 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

2.2. ประสิทธิภาพของเอนไซม์ไคติเนสในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

การทำเอนไซม์ไคติเนสให้เข้มข้นโดยวิธี Ultrafiltration (Wang *et al.*, 2001) โดยนำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่กรองสปอร์ออก (F) ของไอโซเลท OMA60-1 ในวันที่ 3, 5 และ 6 มากรองผ่านแผ่นกรอง Amicon YM 10 (10 kDa MW cut-off) เพื่อแยกเอาสารที่มีมวลโมเลกุลเล็กกว่า 10 kDa ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเทน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่กรองสปอร์ออก (F) ลงในหลอด concentrator (membrane pore size 10 kDa) แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่ไม่ผ่านแผ่นกรอง (MW > 10 kDa) และส่วนของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่ผ่านแผ่นกรอง (MW < 10 kDa) มาทำการทดสอบหาค่า chitinase activity และทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกสปอร์ของเชื้อรา โดยส่วนของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่ไม่ผ่านแผ่นกรองถือว่าเป็นส่วนที่มีเอนไซม์ไคติเนส (Wang *et al.*, 2001; Tanabe *et al.*, 2000)

2.2.1 การวัดการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสโดยการหาค่า chitinase activity

หาค่า chitinase activity โดยเตรียม reaction mixture ดังนี้ (อภิญญา และคณะ, 2545)

- Enzyme control : ส่วนของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่ไม่ผ่านแผ่นกรอง (MW > 10 kDa) หรือส่วนของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่ผ่านแผ่นกรอง (MW < 10 kDa) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร
- Substrate control : substrate buffer ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร (25% (w/v) colloidal chitin ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.5) ผสมกับ 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร
- Enzyme substrate : ส่วนของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่ไม่ผ่านแผ่นกรอง (MW > 10 kDa) หรือส่วนของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่ผ่านแผ่นกรอง (MW < 10 kDa) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับ substrate buffer ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร

บ่ม reaction mixture ใน Water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม DNS reagent ในแต่ละหลอดปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยลูกแก้วแล้วนำไปต้มที่น้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงทันทีแล้วเติมสารละลาย 40% (w/v) sodium potassium tartrate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer นำ reaction mixture ของ substrate control กับ enzyme substrate แต่ละหลอดไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 6,000 รอบต่อนาที แยกเอาเฉพาะส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยใช้ 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 เป็นค่า blank แล้วนำค่าที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากกราฟมาตรฐานเพื่อนำไปคำนวณหาค่า enzyme activity

หน่วยการทำงานของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการปลดปล่อย *N*-acetylglucosamine 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

2.2.2 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยวิธี Agar well method

เทอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรแบบ 2 ชั้น (double layer) โดยเทชั้นแรกให้มีความหนาประมาณ 0.1 เซนติเมตร รอให้หน้าอาหารวุ้นแห้ง จากนั้นเทชั้นที่สองให้หนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร เมื่อหน้าอาหารวุ้นแห้งสนิท ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อห่างจากเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร โดยเจาะ 4 ตำแหน่ง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน โดยนำชิ้นเชื้อรา (culture disc) มาวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมไว้ หยดส่วนของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่ไม่ผ่านแผ่นกรอง และน้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่ผ่านแผ่นกรอง Amicon YM 10 ปริมาตรอย่างละ 30 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เจาะไว้ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ enzyme production medium (EPM) และน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่กรองสปอร์ออก (F) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประเมินผลการทดลองโดยวัดขนาดรัศมีโคโลนีเพื่อคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

2.2.3 การยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยวิธี Agar well method

เตรียมสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเทลงในอาหาร ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเขี่ยเบาๆ บริเวณเส้นใยจนสปอร์หลุด กรองเส้นใยและสปอร์ผสมนี้ด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemacytometer แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย Tween 20 อัตราส่วน 100 : 0.04 v/v เพื่อให้สปอร์กระจายตัวได้ดี จากนั้นดูดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหาร PDA ที่เทอาหารไว้ 2 ชั้น (double layer) เช่นเดียวกับข้อ 1.1 แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร รอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อห่างจากเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร โดยเจาะ 4 ตำแหน่ง ทดสอบโดยหยดส่วนของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่ไม่ผ่านแผ่นกรอง และน้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่ผ่านแผ่นกรอง Amicon YM 10 ปริมาตรอย่างละ 30 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เจาะไว้ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ EPM และน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่กรองสปอร์ออก (F) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดวงใส (clear zone) และบันทึกผล

การทดลองที่ 3. ประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้าแดง

เตรียมน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยนำเชื้อแอคติโนมัยซีทในรูปสปอร์ผสมน้ำ (spore suspension) ซึ่งเตรียมโดยเทน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงบนอาหารวุ้น Hickey Tresner agar ที่มีเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท OMA60-1 เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อจนสร้างสปอร์สีดำ จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อขูดให้สปอร์ของแอคติโนมัยซีทหลุดจากผิวหน้าอาหาร นำมากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกเศษวุ้นและเซลล์ออก นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemacytometer ปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ดูด spore suspension ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (1% v/v) ใส่ลงในอาหาร enzyme production medium (EPM) ที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร จำนวน 6 ขวด บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกยังมีสปอร์อยู่เรียกว่า น้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ไม่กรองสปอร์ออก (NF) และนำส่วนที่ 2 นำมากรองด้วยเครื่องกรองแบคทีเรีย Minisart® ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตรเพื่อกรองเอาสปอร์ออก เรียกส่วนนี้ว่า น้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่กรองสปอร์ออก (F) เก็บรักษาน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 2 ชนิดนี้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เตรียมเชื้อราสาเหตุโดยเลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเทลงในอาหาร ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเขี่ยเบาๆ บริเวณเส้นใยจนสปอร์หลุด กรองเส้นใยออกด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemacytometer แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย Tween 20 อัตราส่วน 100 : 0.04 v/v เพื่อให้สปอร์กระจายตัวได้ดี

เตรียมผลพริกที่ใช้ในการทดสอบ โดยคัดเลือกผลพริกชี้ฟ้าที่มีสีผิวเป็นสีแดงสด น้ำหนักผลอยู่ในช่วง 20.1-25.5 กรัม ปราศจากตำหนิ ไม่มีร่องรอยการถูกทำลายด้วยโรคและแมลง จากนั้นนำผล

พริกมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.5% (w/v) sodium hypochlorite ล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ผึ่งให้แห้ง และฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วย 70% (v/v) ethyl alcohol โดยกำหนดชุดการทดสอบออกเป็น 2 ชุด

3.1 การแช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ โดยมีกรรมวิธีดังนี้ (ภาพ 4)

กรรมวิธีที่ 1: ไม่มีการทำแผลและไม่มีวิธีป้องกันกำจัดใดๆ (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2: ทำแผลและปลูกเชื้อด้วย spore suspension (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 3: ทำแผลและแช่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาปลูกเชื้อด้วย spore suspension (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 4: ทำแผลและแช่ในอาหาร EPM เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาปลูกเชื้อด้วย spore suspension (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 5: ทำแผลและแช่ใน *B. subtilis* ($1x10^9$ CFU/g) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาปลูกเชื้อด้วย spore suspension (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 6: ทำแผลและแช่ใน NF เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงปลูกเชื้อด้วย spore suspension

กรรมวิธีที่ 7: ทำแผลและแช่ใน F เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงปลูกเชื้อด้วย spore suspension

กรรมวิธีที่ 8: ทำแผลและแช่ใน F เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจึงปลูกเชื้อด้วย spore suspension

กรรมวิธีที่ 9: ทำแผลและแช่ใน F เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงปลูกเชื้อด้วย spore suspension

เตรียมบาดแผลโดยใช้ cork borer ขนาด 1.0 เซนติเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อมากดลงบนผลพริกผลละ 3 แผล คือ หัว กลางและท้ายของผลพริก (ดัดแปลงจาก Chanchaichaovivat *et al.*, 2007) เติมสารละลาย Tween 80 ในอัตราส่วน 0.1% (v/v) ลงในสารที่นำมาใช้ในการแช่ผลพริกทุกกรรมวิธี จากนั้นผสมให้เข้ากันก่อนนำมาใช้แช่ผลพริก นำผลพริกที่ผ่านการแช่ในแต่ละกรรมวิธีวางบนถาดพลาสติก แล้วคลุมด้วยถุง polyethylene (PE) นำฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสำลีชุบน้ำมาวางไว้เพื่อให้ความชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง มีอากาศถ่ายเท บันทึกจำนวนแผลที่เกิดเพื่อนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และเปอร์เซ็นต์ biocontrol efficacy โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซึ่ง 1 ถาดเท่ากับ 1 ซ้ำๆ ละ 5 ผล

3.2 การแช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุ

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตรที่ฆ่าเชื้อแล้วมากดลงบนผลพริกเพื่อทำให้เกิดบาดแผลผลละ 3 แผล คือ หัว กลางและท้ายของผล (ดัดแปลงจาก Chanchaichaovivat *et al.*, 2007) นำมาปลูกเชื้อโดยหยด spore suspension ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงบนแผลๆ ละ 30 ไมโครลิตร รอจนกระทั่ง spore suspension ของเชื้อราซึมเข้าแผลประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำการป้องกันกำจัดดังนี้ (ภาพ 4)

กรรมวิธีที่ 1: ไม่มีการทำแผลและไม่มีวิธีป้องกันกำจัดใดๆ (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2: ทำแผลและปลูกเชื้อด้วย spore suspension (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 3: ทำแผลและปลูกเชื้อด้วย spore suspension นำมาแช่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาที (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 4: ทำแผลและปลูกเชื้อด้วย spore suspension นำมาแช่ในอาหาร EPM เป็นเวลา 1 นาที (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 5: ทำแผลและปลูกเชื้อด้วย spore suspension นำมาแช่ใน *B. subtilis* ($1x10^9$ CFU/g) เป็นเวลา 1 นาที (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 6: ทำแผลและปลูกเชื้อด้วย spore suspension นำมาแช่ใน NF เป็นเวลา 1 นาที

กรรมวิธีที่ 7: ทำแผลและปลูกเชื้อด้วย spore suspension นำมาแช่ใน F เป็นเวลา 1 นาที

กรรมวิธีที่ 8: ทำแผลและปลูกเชื้อด้วย spore suspension นำมาแช่ใน F เป็นเวลา 3 นาที

กรรมวิธีที่ 9: ทำแผลและปลูกเชื้อด้วย spore suspension นำมาแช่ใน F เป็นเวลา 5 นาที

โดยเติมสารละลาย Tween 80 ในอัตราส่วน 0.1% (v/v) ลงในสารที่นำมาใช้แช่ผลพริกในแต่ละกรรมวิธี ผสมให้เข้ากันก่อนนำมาใช้แช่ผลพริก จากนั้นบรรจุผลพริกที่ผ่านการแช่ในแต่ละกรรมวิธีบนถาดพลาสติก แล้วคลุมด้วยถุง polyethylene (PE) นำฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสำลีชุบน้ำมาวางไว้เพื่อให้ความชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง มีอากาศถ่ายเท บันทึกจำนวนแผลที่เกิดเพื่อนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และเปอร์เซ็นต์ biocontrol efficacy โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซึ่ง 1 ถาดเท่ากับ 1 ซ้ำๆ ละ 5 ผล

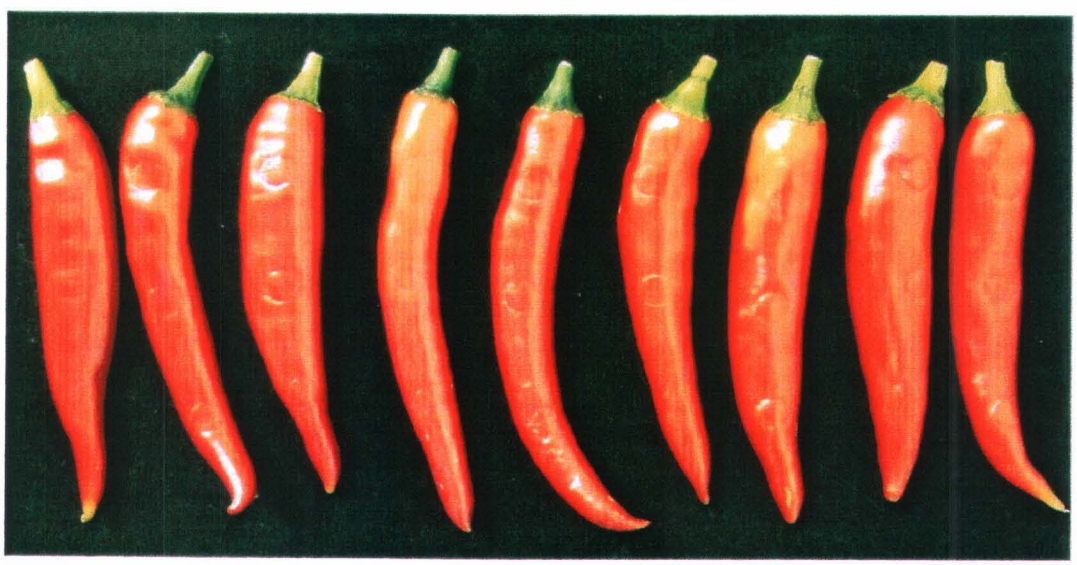
การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์ biocontrol efficacy (Chanchaichaovivat *et al.*, 2007)

สูตรการคำนวณ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (disease incidence) = (A/T) x 100

เปอร์เซ็นต์ biocontrol efficacy = [(T-A) / T] x 100

T = จำนวนบาดแผลบนผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสเมื่อปลูกเชื้อด้วย spore suspension ของ *Colletotrichum* spp. เพียงอย่างเดียว

A = จำนวนบาดแผลบนผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสเมื่อปลูกเชื้อด้วย spore suspension ของ *Colletotrichum* spp. และผ่านการแช่ในกรรมวิธีต่างๆ



1	2	3	4	5	6	7	8	9
		แช่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (1 นาที)	แช่ EPM (1 นาที)	แช่ Bs (1 นาที)	แช่ NF (1 นาที)	แช่ F (1 นาที)	แช่ F (3 นาที)	แช่ F (5 นาที)

ภาพ 4 การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้าแดงในกรรมวิธีต่างๆ

EMP = Enzyme production medium

Bs = *Bacillus subtilis*

NF = น้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ไม่กรองสปอร์ออก

F = น้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่กรองสปอร์ออก

การทดลองที่ 4. ประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนเมล็ดพริก

นำเมล็ดพันธุ์พริกมาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด โดยแช่ในสารละลาย 2% (w/v) sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้งผึ่งให้แห้ง ปลูกเชื้อเมล็ดด้วย spore suspension ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยการแช่เมล็ดเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นซับด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อ ผึ่งเมล็ดให้แห้งประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดแช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้แก่ NF และ F ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท OMA60-1 เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง นำเมล็ดมาผึ่งให้แห้ง แบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกเพาะบนอาหาร PDA โดยนำเมล็ดในแต่ละกรรมวิธีมาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทำการทดลองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 25 เมล็ดต่อจาน ตรวจสอบการติดเชื้อและเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพริกเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนที่ 2 นำมาเพาะบนดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยนำดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาบรรจุใส่ในถาดหลุมขนาด 100 หลุม วางเมล็ดพันธุ์ลงในหลุม หลุมละ 1 เมล็ดภายในโรงเรือน นับตรวจดูการงอก การเจริญเติบโตและการเกิดโรคบนต้นกล้าหลังจากเพาะเมล็ดแล้ว 7, 14 และ 28 วัน โดยบันทึกจำนวนต้นกล้าที่งอกปกติ และต้นกล้าที่มีความผิดปกติ เช่นแคระแกรน ตาย เมื่อทำการปลูกครบ 28 วันทำมาวัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง โดยทำกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 50 เมล็ด โดยการทดลองทั้ง 2 ส่วนมีกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1: เมล็ดที่ไม่ผ่านกรรมวิธีใดๆ (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2: เมล็ดที่ผ่านการปลูกเชื้ออย่างเดียว (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 3: เมล็ดที่ปลูกเชื้อและนำมาแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMP (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 4: เมล็ดที่ปลูกเชื้อและนำมาแช่ในสารป้องกันกำจัดเชื้อรา captan ในอัตราส่วนที่แนะนำ คือ 20 กรัมในน้ำ 20 ลิตร (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 5: เมล็ดที่ปลูกเชื้อและนำมาแช่ในเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอัตราส่วนที่แนะนำ คือ $1x10^9$ CFU/g (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 6: เมล็ดที่ปลูกเชื้อและนำมาแช่ใน NF

กรรมวิธีที่ 7: เมล็ดที่ปลูกเชื้อและนำมาแช่ใน F

การทดลองที่ 5. น้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของพริกชี้ฟ้าแดง

นำผลพริกที่ไม่ผ่านการใช้สารเคมีและไม่มีรอยแผลมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.5% (w/v) sodium hypochlorite ล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ผึ่งไว้ให้แห้งและฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วย 70% (v/v) ethyl alcohol กำหนดกรรมวิธีได้ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ผลพริกที่ไม่ผ่านกรรมวิธีใดๆ (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 แช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่กรองสปอร์ออก (F) เป็นเวลา 1 นาที

กรรมวิธีที่ 3 แช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่กรองสปอร์ออก (F) เป็นเวลา 3 นาที

กรรมวิธีที่ 4 แช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่กรองสปอร์ออก (F) เป็นเวลา 5 นาที

นำมาบรรจุในถุง polyethylene (PE) จากนั้นนำมา seal ปิดปากถุงให้สนิท เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ผล ตรวจสอบคุณภาพของพริกทุกๆ 2 วัน โดยเริ่มวัดผลตั้งแต่วันแรกที่เริ่มทำการทดลอง ดังนี้

5.1. การสูญเสียน้ำหนัก

ชั่งน้ำหนักพริกในแต่ละถุงโดยใช้เครื่องชั่ง นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{(\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักสุดท้าย})}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

5.2. สีผิว

วัดสีผิวด้านนอกของผลพริก โดยวัดผลละ 3 ตำแหน่ง หัว กลางและท้ายของผลทั้ง 2 ด้าน โดยใช้เครื่องวัดสี ColorQuestXE โดยก่อนใช้เครื่องวัดสีทุกครั้งต้องมีการปรับมาตรฐานด้วยแผ่นเทียบสีมาตรฐาน (Light trap และ White trap) ซึ่งค่าที่ได้จากการวัดรายงานเป็นค่า L*, a* และ b*

L* เป็นค่า The lightness factor values ถ้าค่า L* = 100 แสดงว่าวัตถุมีสีขาว และถ้า L* =0 แสดงว่าวัตถุมีสีดำ

a* เป็นค่าแสดงสีเขียวและสีแดงของวัตถุ ถ้าค่า a* เป็น (+) แสดงวัตถุมีสีแดง ถ้าค่า a* เป็น (-) แสดงวัตถุมีสีเขียว

b* เป็นค่าแสดงสีเหลืองและสีน้ำเงินของวัตถุ ถ้าค่า b* เป็น (+) แสดงวัตถุมีสีเหลือง ถ้าค่า b* เป็น (-) แสดงวัตถุมีสีน้ำเงิน

5.3. การวัดลักษณะเนื้อสัมผัส

โดยนำเอาผลพริกมาวัดลักษณะเนื้อสัมผัสที่ผิวด้านนอกด้านละ 3 จุด หัว กลาง และท้ายของแต่ละผล ด้วยเครื่อง Texture analyzer (TA. XT2i/50) โดยใช้ probe ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ระดับความเร็ว 5 มิลลิเมตรต่อวินาที บันทึกค่าแรงกดที่ไว้ได้ในหน่วยของนิวตัน

5.4. การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 5 คน โดยทำการทดสอบในวันแรกของการทดลองและทุกๆ 2 วัน ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาโดยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสได้แยกการประเมินดังนี้

5.4.1 การประเมินการยอมรับได้ของสีด้านนอก โดยวัดเป็นระดับคะแนนดังนี้

1 = สีผิดปกติมาก

2 = สีผิดปกติน้อย

3 = สีปกติ

5.4.2 การประเมินการยอมรับได้ของผิวผล โดยวัดเป็นระดับคะแนนดังนี้

1 = ผิวเหี่ยวมาก

2 = ผิวเหี่ยวเล็กน้อย

3 = ผิวปกติ

5.4.3 การประเมินการยอมรับได้ของกลิ่น โดยวัดเป็นระดับคะแนนดังนี้

1 = มีกลิ่นแปลกปลอมหรือไม่พึงประสงค์

2 = มีกลิ่นแปลกปลอมเล็กน้อยหรือไม่พึงประสงค์แต่ยังยอมรับได้เล็กน้อย

3 = ไม่มีกลิ่นแปลกปลอม (ปกติ)

5.4.4 การประเมินการยอมรับได้ความชอบโดยรวม โดยวัดเป็นระดับคะแนนดังนี้

1 = ไม่ชอบเลย

2 = ไม่ค่อยชอบ

3 = เฉยๆ

4 = ชอบ

5 = ชอบมาก