บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกและจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์

1.1 การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร โดยเลือกเก็บเฉพาะส่วนที่สมบูรณ์ ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลงหรือแสดงอาการของโรค โดยแบ่งเป็นพืชที่เก็บในส่วนของใบ ได้แก่

- ผักชีฝรั่ง (Fit weed: E*ryngium foetidum*)
- สะเดา (Neem: *Azadiachta indica*)
- พลูคาว (Houttuynia : *Houttuynia cordata*)
- สะระแหน่ (Kitchen mint: *Mentha cordifolia*)
- กะเพรา (Sacred basil: *Ocimum tenuiflorum*)

และเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรที่เก็บในส่วนลำต้นและหัว ได้แก่

- กระชาย (Galingale: *Boesenbergia pandurata*)
- ขมิ้น (Turmaric: *Curcuma longa*)
- ข่า (Galanga: *Alpinia galangal*)
- ตะไคร้ (Lemon grass: *Cymbopogon citratus*)
- เปราะหอม (—: *Kaempferia galanga*)

1.2 การฆ่าเชื้อที่ผิวและการแยกเชื้อ (Shimizu *et al*., 2000)

1. นำตัวอย่างพืชสมุนไพรจากข้อ 1.1 มาล้างน้ำให้สะอาด โดยล้างน้ำไหลผ่าน (running water) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผึ่งลมให้แห้ง
2. ใช้กรรไกรตัดใบผักชีฝรั่ง สะเดา พลูคาว สะระแหน่ และกะเพรา เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 1×1 เซนติเมตร และใช้มีดหั่นส่วนหัวของกระชาย ขมิ้น ข่า ตะไคร้ และเปราะหอม เป็นชิ้นเล็กๆ โดยมีลักษณะเป็นลูกเต๋าความกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. นำชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในสารละลาย Heritage เข้มข้น 0.6 เปอร์เซนต์ นาน 1 นาที

4. ซับชิ้นพืชให้แห้งด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อ นำมาวางบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งลมให้แห้ง

5. วางชิ้นพืชจำนวน 15 ชิ้น ต่อ 1 จานอาหาร Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) (ภาคผนวก ก) ที่ผสมสารปฏิชีวนะ 3 ชนิด ได้แก่

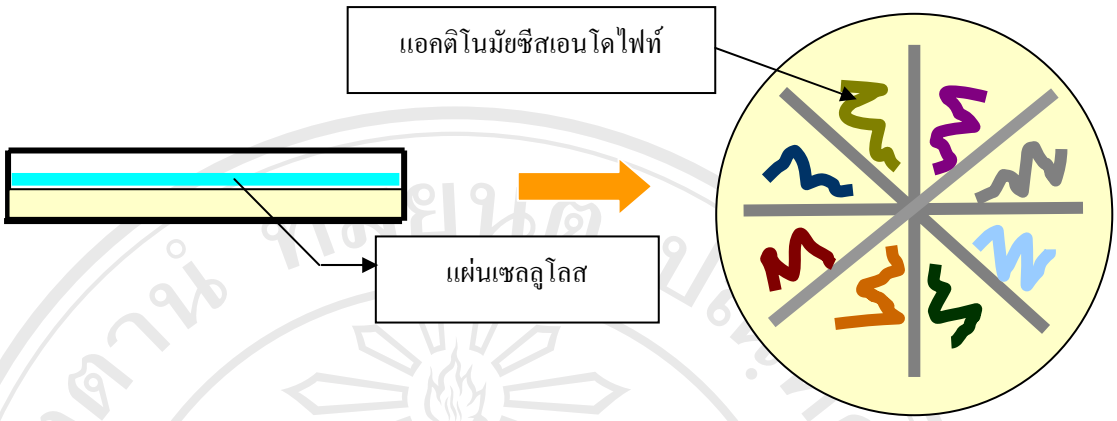
- Trimethoprim
- Naldixic acid
- Heritage

6. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

1.3 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และการเก็บเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ (Shimizu *et al*., 2000)

ใช้เข็มเขี่ย ย้ายเชื้อเอนโดไฟท์ที่คาดว่าจะเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่เจริญขึ้นบนชิ้นพืช มาขีดลงบนแผ่นกรองเซลลูโลส (cellulose membrane filter) ขนาดรูเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตรที่วางบนอาหาร IMA-2 (ภาพที่ 4) นำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 วัน จากนั้นนำแผ่นกรองเซลลูโลสออก หากเชื้อจุลินทรีย์นั้นเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ จะพบว่าเชื้อนั้นสามารถเจริญรอดผ่านแผ่นกรองไปยังผิวอาหารได้ แล้วจึงเก็บเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่ได้ไว้เป็น stock culture ในหลอดอาหาร IMA-2 บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 วัน แล้วเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

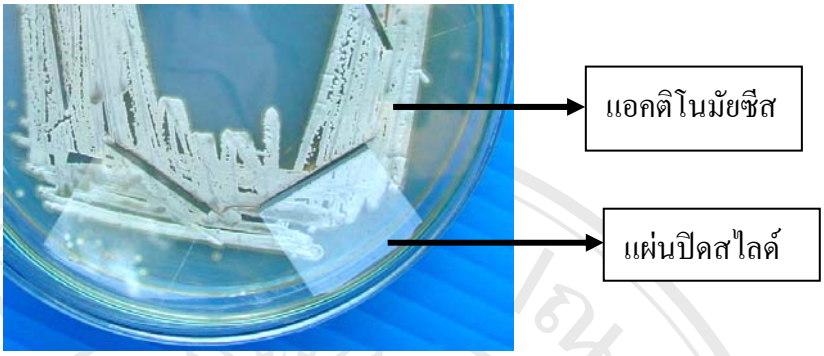


ภาพที่ 4 การขีด (streak) เชื้อแอคติโนมัยซีสลงบนอาหาร IMA-2 ที่ผิวหน้าของอาหารวางด้วยแผ่นกรองเซลลูโลส (cellulose membrane filters)

1.4 การจำแนกสกุลของแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Williams *et al.*, 1989)

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่แยกได้แต่ละไอโซเลท (isolate) มาเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 โดยวิธี streak plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 7 วัน แล้วปักแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในจานอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่มีโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์เจริญอยู่หนาแน่น โดยให้ทำมุมประมาณ 45 องศากับผิวหน้าอาหาร (ภาพที่ 5) บ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 7 วัน แล้วนำแผ่นปิดสไลด์ที่มีเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์เจริญขึ้นติดอยู่มาย้อมสีแบบ simple stain โดยหยดด้วยสารละลาย crystal violet 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจดูลักษณะของเส้นใย (mycelium) การสร้างสปอร์ และการเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเปรียบเทียบลักษณะต่างๆตามเอกสารของ Miyadoh (1997) และ Stanley *et al.* (1989) เพื่อจำแนกสกุลของแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์เบื้องต้น และตั้งชื่อไอโซเลท ของเชื้อที่ไม่ซ้ำกันในแต่ละสกุลตามชื่อของสมุนไพรพืชอาศัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 5 ลักษณะการเลี้ยงเชื้อแบบ slide culture เพื่อตรวจดูลักษณะการเรียงตัวของเส้นสาย และการสร้างสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส เอนโดไฟท์

2. การคัดเลือกแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้า

เชื้อราสาเหตุโรคของคะน้าที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อ
แอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ ได้แก่

1. เชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของคะน้า
2. เชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคโคนก้านใบและต้นเน่าของคะน้า
3. เชื้อรา *Sclerolium rolfsii* สาเหตุโรครากเน่าของคะน้า

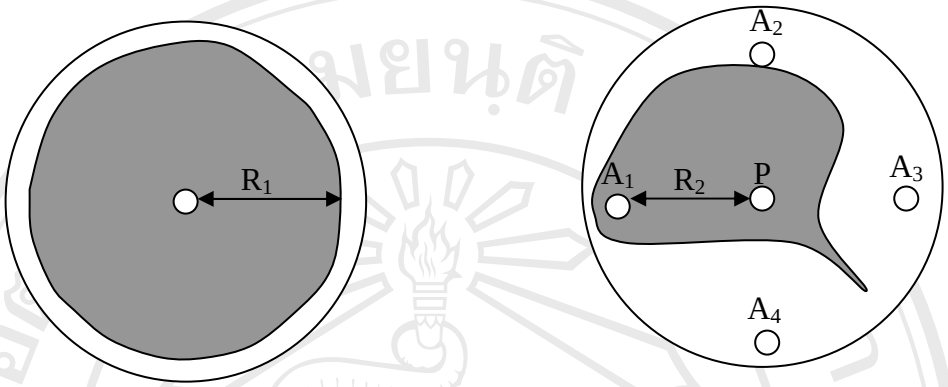
ทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้าโดยวิธี dual culture ตามวิธีการของ Crawford *et. al.* (1993) และ El-Tarabily *et al.* (1997)

เริ่มจากเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟทที่ไม่ซ้ำกันบนอาหาร IMA-2 จำนวน 4 ไอโซเลทต่อจานโดยเลี้ยงนาน 3 วัน เพื่อให้เชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์เจริญเป็นโคโลนีที่สมบรูณ์และสร้างสารปฏิชีวนะ จากนั้นนำเชื้อสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดมาวางตรงกลางจานอาหารให้ห่างจากเชื้อแอคติโนมัยซีสแต่ละไอโซเลท 2 เซนติเมตร (ภาพที่ 6)

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทดลอง 4 ซ้ำ ในแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์แต่ละชนิด สำหรับชุดควบคุมจะวางเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม เจริญจนเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงบันทึกผลโดยวัดขนาดบริเวณการยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้นระหว่างโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่เป็นปฏิปักษ์ รวมทั้งวัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมและชุดทดสอบ คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG)



ภาพที่ 6 ลักษณะการวัดผลในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์) ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 โดยวิธี Dual culture (A: Actinomycetes, P: Pathogenic fungi, R: Radial growth of Pathogenic fungi)

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ (PIRG)

$$PIRG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในกลุ่มที่มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ โดยเลือกเฉพาะเชื้อที่ให้ค่าการยับยั้งสูงสุดในแต่ละเชื้อราสาเหตุโรคพืชมาศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM : Scanning Electron Microscope)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์บนอาหาร IMA-2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตเต็มที่และสร้างสปอร์ที่สมบูรณ์ นำเชื้อส่งไปที่ศูนย์วิจัยและบริการจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอน สวท.-มช. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่างมี ดังนี้

1. ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์เจริญอยู่ ขนาดประมาณ 5 x 5 มิลลิเมตร จำนวน 3 - 4 ชิ้น ต่อเชื้อตัวอย่าง
2. รักษาสภาพ (fixing) โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ของตัวอย่าง โดยแช่ใน glutaraldyhyde 2.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M phosphate buffer
3. ล้างออกด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7.2
4. รักษาสภาพ (fixing) อีกครั้ง โดยการแช่ในสารละลาย osmium tetroxide 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M phosphate buffer
5. ล้างออกด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7.2
6. ไล่น้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยการแทนที่น้ำด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามลำดับจาก 30 50 70 80 90 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ 2-3 ครั้งตามลำดับโดยใช้เวลาแช่ในแต่ละความเข้มข้น 5 - 10 นาที
7. ทำให้แห้ง (drying) ด้วยการรมตัวอย่างด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
8. เคลือบด้วยอนุภาคทองหนา 30 นาโนเมตร

นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาส่องดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL รุ่น JSM-5910LV) พร้อมทั้งบันทึกภาพลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ คือ ลักษณะสปอร์และรูปแบบของการสร้างสปอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การศึกษาคุณสมบัติและปัจจัยในการเจริญของเชื้อเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ (Shirling and Gottlieb, 1966)

4.1 การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร ISP

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ISP2-5 ในที่มืด ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการเจริญของ substrate mycelium, aerial mycelium และ diffusible pigment ของเชื้อที่ปรากฏบนอาหาร

4.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้บนอาหาร IMA-2 จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ กันได้แก่ 10 20 25 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สังเกตและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์

4.3 การศึกษาค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญ (Shimizu *et al*., 2000)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ในอาหาร IMA-2 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ กัน ตั้งแต่ pH 4 ถึง pH 9 (ใช้ 0.1 N. HCl, 0.1 N. NaOH เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 วัน สังเกตการณ์เจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ เปรียบเทียบระหว่างอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ

4.4 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์

ใช้อาหาร ISP 9 (Daigo, Nihon Pharmaceutical Co., Japan) เป็นอาหารพื้นฐานในการศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ โดยละลายอาหาร ISP 9 ในน้ำกลั่น อัตราส่วน 1.6 กรัมต่อน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

เตรียมน้ำตาล *D*-glucose, *L*-arabinose, sucrose, *D*-xylose, inositol, *D*-mannose, *D*-fructose, *L*-rhamnose และ raffinose แต่ละชนิด จำนวน 0.6 กรัมใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมเอธิลอีเทอร์ $(C_2H_5)_2O$ (Nacalai Tesque, Japan) ลงในแต่ละขวดแล้วปิดฝา เอธิลอีเทอร์จะถูกระเหยอย่างช้าๆภายในตู้ chemical fume hood ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อเอธิลอีเทอร์ระเหยหมดและน้ำตาลแต่ละชนิดจะแห้ง

นำอาหาร ISP 9 ที่เตรียมไว้มาละลาย และเมื่ออุณหภูมิลดลงถึง 60 องศาเซลเซียส เติมน้ำตาลแต่ละชนิดลงไป โดยน้ำตาล 1 ชนิด ต่ออาหาร ISP 9 จำนวน 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำ เชื้อแอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกมา streak ลงบนผิวหน้าอาหารที่เติมน้ำตาลชนิดต่างๆ บ่มเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 วัน เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีและไม่มี *D*-glucose

4.5 การผลิตเมลานิน

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ISP-6 (Difco, Peptone iron agar ที่เติม 0.1% yeast extract) และ ISP-7 (Shinobu's modification of Masumoto's tyrosine agar, Daigo, Nihon Pharmaceutical Co., Japan) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 วัน บันทึกผลการผลิตเมลานินซึ่งสามารถสังเกตได้จากการเกิดสีน้ำตาลขึ้นบนอาหาร

4.6 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการเปลี่ยนสีของรงควัตถุ

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ISP 2-5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อพบว่าเกิดรงควัตถุขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อ หยด 1 N HCl หรือ 1 N NaOH ลงบนผิวหน้าอาหารบริเวณใกล้กับโคโลนีของเชื้อ

4.7 การย่อยสลายแป้งของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ในอาหาร ISP-4 โดยมีวิธีทดสอบ 2 วิธี คือ ทดสอบในอาหารแข็ง และอาหารเหลว การทดสอบบนอาหารทั้งสองชนิดใช้วิธีเดียวกันคือ ปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ในอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีน (Lugol's iodine) 2-3 หยดลงบนผิวหน้าอาหาร

การทดสอบการย่อยแป้งใช้สารละลายไอโอดีน จะเกิดสีน้ำเงินในชุดควบคุม ซึ่งมีเฉพาะอาหาร ISP 4 การดูผลต้องดูทันทีหลังจากหยดสารละลายลงไป เพราะสีน้ำเงินอาจเกิดขึ้นได้กับแป้งส่วนที่เหลือ การทดสอบบนอาหารแข็งจะหยดสารละลายลงบริเวณใกล้กับโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ หากเกิดสีน้ำเงินทั้งหมดแสดงว่ายังคงมีแป้งอยู่ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจึงเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน การทดสอบบนอาหารแข็ง หากเชื้อสามารถย่อยแป้งได้ บริเวณรอบโคโลนีจะไม่มีสี ส่วนในอาหารเหลวจะไม่มีการเปลี่ยนสีหากเชื้อสามารถย่อยแป้งได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.8 การเปลี่ยนนมให้เป็นเพปโทน

นำ suspension ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ 0.5 มิลลิลิตร ใน 10% litmus milk medium (Difco, U.S.A.) ใส่ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-10 วัน

เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่มีเฉพาะ 10% litmus milk หากเชื้อสามารถผลิตเพปโทนได้ จะพบว่า litmus milk จะใสขึ้น (ดวงพร, 2537)

5. ทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้าของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกได้ (ดัดแปลงวิธีของ Hirata, 1942)

การเตรียมสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว IMB-2 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำอาหารเหลวด้านบนที่มีสารปฏิชีวนะผสมอยู่ไปกรองผ่าน millipore filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

5.1 ทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

เปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้าระหว่างสารปฏิชีวนะที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ กับสารกำจัดเชื้อรา 2 ชนิดดังนี้

กลุ่มที่ 1 สารปฏิชีวนะที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีส

กลุ่มที่ 2 สารกำจัดเชื้อรา เจือจาง 100 เท่าจากอัตราแนะนำ โดยใช้

- สารละลาย iprodione (สำหรับทดสอบเชื้อ *A. brassicicola*)
- สารละลาย carboxin (สำหรับทดสอบเชื้อ *R. solani* และ *S. rolfsii*)

กลุ่มที่ 3 น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

นำสารแต่ละกลุ่มกรองผ่าน millipore filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วผสมกับอาหาร IMA-2 ในอัตรส่วน สารปฏิชีวนะ 10 มิลลิลิตร ต่ออาหาร IMA-2 5 มิลลิลิตรแล้วเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวางเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้า ได้แก่เชื้อ *A. brassicicola*, *R. solani* และ *S. rolfsii* ลงบริเวณกลางจานอาหาร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อในชุดควบคุม เจริญจนเกือบเต็มจานอาหาร บันทึกผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค วางแผนการทดลองแบบ CRD และทำการทดลอง 4 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้าในระยะต้นกล้า (Shimizu *et al*., 2000)

เพาะเมล็ดคะน้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดในถาดเพาะกล้าที่บรรจุดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน หยด suspension ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์แต่ละชนิดในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อ 1 หลุม ในชุดควบคุม ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ เมื่อคะน้ามีอายุ 7 พ่น suspension ของเชื้อ *A. brassicicola* ลงบนใบ สำหรับเชื้อ *R. solani* และ *S. rolfsii* จะใช้วิธีการหยดลงบริเวณโคนต้นกล้าในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อ 1 หลุม แบ่งการทดลองเป็น 9 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ต้น เมื่อคะน้าอายุได้ 14 วัน วัดค่าความรุนแรงของโรค ความสมบูรณ์ของต้นและราก ความสูงจากปลายราก ถึงปลาย

ยอดและวิเคราะห์ผลการทดลองแบบ CRD

- การวัดค่าความรุนแรงของโรคแบ่งเป็น

ระดับ 0 หมายถึง ไม่มีแผล ระดับ 1 หมายถึง 1-10%

ระดับ 2 หมายถึง 11-25% ระดับ 3 หมายถึง 26-50%

ระดับ 4 หมายถึง มากกว่า 50% ระดับ 5 หมายถึง มีแผลจนตาย

- ความสมบูรณ์ของต้น แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ

− : ต้นตาย และแสดงอาการของโรคชัดเจน

\+ : ต้นสมบูรณ์น้อย และแสดงอาการของโรคชัดเจน

++ : ต้นสมบูรณ์ปานกลาง

+++ : ต้นสมบูรณ์มาก

++++ : ต้นสมบูรณ์มาก ใบมีขนาดใหญ่

- ความสมบูรณ์ของราก แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ

− : รากถูกทำลาย

\+ : รากสั้นมาก

++ : รากเจริญบ้างเล็กน้อย

+++ : รากเจริญดี ยาวและสมบูรณ์ปานกลาง

++++ : รากเจริญดี ยาว และสมบูรณ์มาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การตรวจสอบความสามารถในการอยู่อาศัยของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ภายในเนื้อเยื่อของคะน้า

เพาะเมล็ดคะน้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดในถาดเพาะกล้า ขนาด 4 × 4 ×4 เซนติเมตร บรรจุดินนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นหยด suspension ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้แต่ละชนิดอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อ 1 หลุมและใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อโดยใช้อัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อ 1 หลุม ในชุดควบคุม ทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ต้น เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน แยกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์จากต้นกล้าคะน้าอีกครั้ง (reisolation) สังเกต บันทึกและเปรียบเทียบกับลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่แยกได้กับเชื้อที่ทำการปลูกลงบนพืชในครั้งแรก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved