บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสและการจัดจำแนก

1.1 การเก็บตัวอย่างดินและการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีส

การเก็บตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากพริกและมะเขือเทศที่แสดงลักษณะต้นแข็งแรงสมบูรณ์และไม่เป็นโรค นำมาแยกเชื้อแอคติโนมัยซีส โดยทำการเก็บจากสวนของเกษตรกรจำนวน 8 สวน ในพื้นที่ อ. แม่ริม และ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดิน (ชนินทร, 2545)

1. นำตัวอย่างดินผึ่งให้แห้ง เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วใช้โกร่งบดเม็ดดินให้ละเอียด
2. นำตัวอย่างดิน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร และเจือจางจนถึง 10^{-3}
3. นำตัวอย่างดินที่ทำการเจือจางแล้ว 0.2-0.3 มิลลิลิตร ทำการ spread plate ลงบนอาหาร Traders protein agar บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์
4. สังเกตโคโลนีที่มีลักษณะแห้งและหยาบเป็นปุยสั้นๆ หรือมีสปอร์คล้ายผงแป้งขึ้นกลางโคโลนี แล้วแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และการเก็บเชื้อ (Shimizu *et al.*, 2000)

ใช้เข็มเขี่ยสปอร์ที่คล้ายผงแป้ง หรือโคโลนีที่คาดว่าเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีส แล้วนำมาขีดบนแผ่นเซลลูโลสขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร ที่วางบนอาหาร IMA-2 (ภาพที่ 4) จากนั้นนำไปบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วเปิดแผ่นเซลลูโลสออก ถ้าหากเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีสจะพบเชื้อเจริญผ่านแผ่นเซลลูโลสมาที่ผิวอาหาร จากนั้นเก็บเชื้อเป็น stock culture โดยเก็บในหลอดอาหาร IMA-2 บ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมกับตั้งชื่อไอโซเลทของเชื้อที่แยกได้

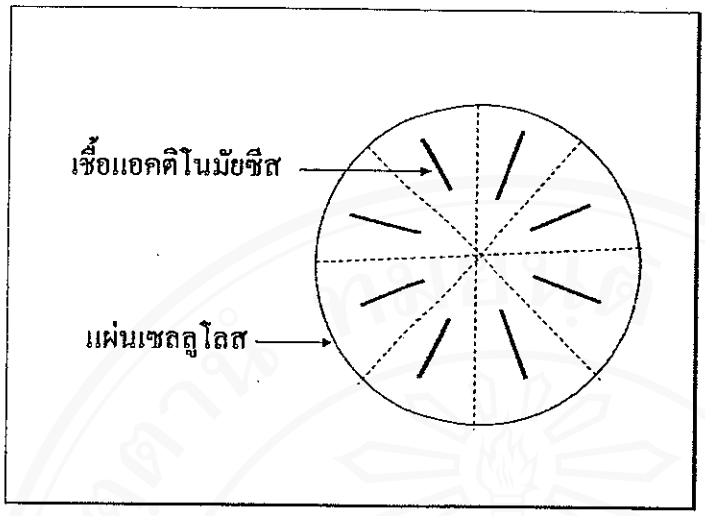
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตั้งชื่อไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยซีส

ทำการตั้งชื่อไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยซีส โดยแยกตามแหล่งพื้นที่ และชนิดของพืช ดังนี้คือ

1. กลุ่มของ C1 คือเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินบริเวณรากพริกของสวนที่ 1 ในพื้นที่ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่
2. กลุ่มของ C2 คือเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินบริเวณรากพริกของสวนที่ 2 ในพื้นที่ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่
3. กลุ่มของ C3 คือเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินบริเวณรากพริกของสวนที่ 1 ในพื้นที่ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่
4. กลุ่มของ C4 คือเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินบริเวณรากพริกของสวนที่ 2 ในพื้นที่ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่
5. กลุ่มของ T1 คือเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินบริเวณรากมะเขือเทศของสวนที่ 3 ในพื้นที่ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่
6. กลุ่มของ T2 คือเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินบริเวณรากมะเขือเทศของสวนที่ 4 ในพื้นที่ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่
7. กลุ่มของ T3 คือเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินบริเวณรากมะเขือเทศของสวนที่ 3 ในพื้นที่ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่
8. กลุ่มของ T4 คือเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินบริเวณรากมะเขือเทศของสวนที่ 4 ในพื้นที่ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

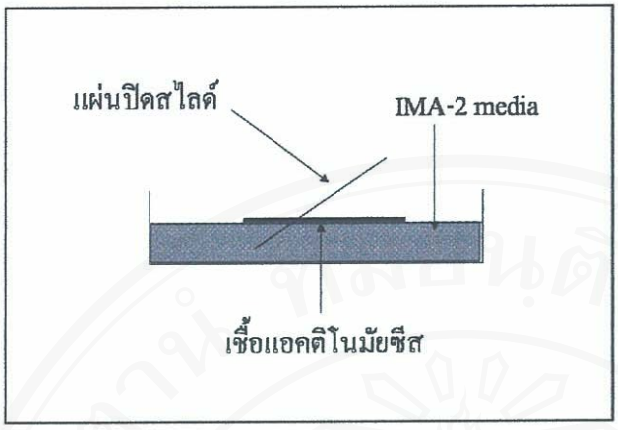


ภาพที่ 4 การขีดเชื้อแอคติโนมัยซีสลงบนแผ่นเซลลูโลส (cellulose membrane filters)

1.2 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Williams *et al.*, 1989)

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 โดยวิธี streak plate แล้วปักแผ่นปิดสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อทำมุมประมาณ 45 องศา กับผิวหน้าอาหาร (ภาพที่ 5) จากนั้นบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำแผ่นปิดสไลด์ที่มีเชื้อแอคติโนมัยซีสเจริญติดอยู่มาย้อมสีด้วย crystal violet ความเข้มข้น 0.1% เพื่อตรวจดูลักษณะของ เส้นใย, conidium, sporangium และโครงสร้างอื่นๆ ที่เชื้อสร้างขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ตามเอกสารของ Miyadoh (1997) และ Williams *et al.* (1989) เพื่อจำแนกสกุลของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 5 การทำ slide culture เพื่อตรวจดูลักษณะเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogeniticity) ของเชื้อรา *Pythium* sp. และ *Rhizoctonia solani* (ดัดแปลงจากวิธีการของ Shimizu *et al.*, 2000)

<u>วิธีการเตรียม spore suspension ของเชื้อรา *Pythium* sp.</u>

ทำการแยกเชื้อรา *Pythium* sp. จากดิน โดยเก็บตัวอย่างดินจากต้นกล้าพริกที่แสดงอาการเน่าคอดิน จากพื้นที่ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ โดยใช้แตงกวาเป็นตัวล่อ จะพบเชื้อเจริญบนแตงกวาภายใน 1-2 วัน จากนั้นนำเชื้อไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วนำเชื้อไปทำการเพิ่มปริมาณ บนอาหาร PDA บ่มในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ให้เชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร ลงในจานที่มีเชื้อรา *Pythium* sp. เจริญอยู่ แล้วย้ายแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นการสร้างสปอร์ แล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรลงในจานแก้ว และใช้แท่งแก้วรูปตัว L คน จากนั้นเทใส่ใน flask และเขย่าเพื่อให้สปอร์หลุด แล้วนำไปกรองผ่านผ้าขาวบาง ตรวจนับสปอร์บน hemacytometor ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) และเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพิ่มเพื่อให้ได้สปอร์เข้มข้น 10^4–10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

<u>วิธีการเตรียม mycelium suspension ของเชื้อรา *Rhizoctonia solani*</u>

เชื้อรา *Rhizoctonia solani* ได้รับมาจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) (สำนักงานภาค ชั้น 2 อาคารเฉลิมพระเกียรติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) นำมาเลี้ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บนอาหาร PDA ในจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร บ่มในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตรลงในจานแก้ว และใช้ loop ขูดเส้นใยของเชื้อให้หลุดจากผิวหน้าอาหาร จากนั้นเทใส่ใน flask แล้วเขย่าเพื่อให้เส้นใยหลุดและแตกหัก แล้วนำไปกรองผ่านผ้าขาวบางและเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพิ่มอีก 10 มิลลิลิตร

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogeniticity) ของเชื้อรา *Pythium* sp. และ *Rhizoctonia solani*

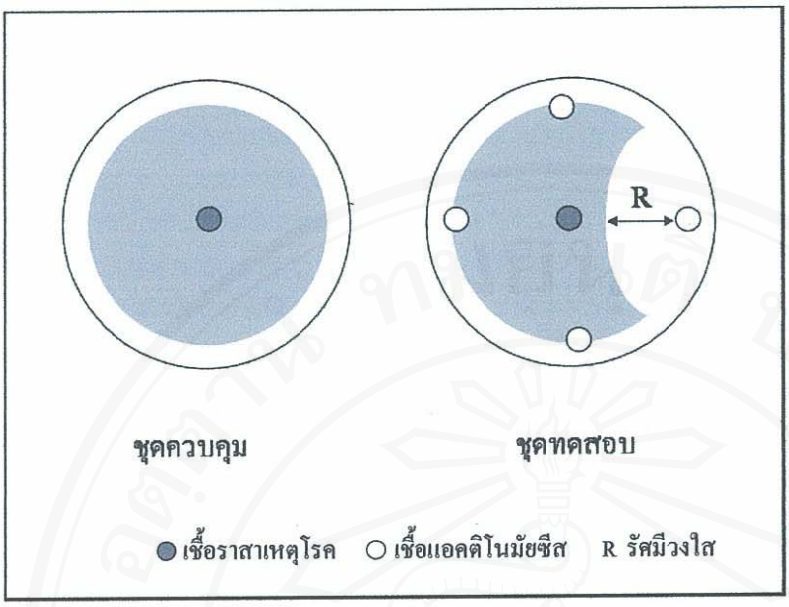
นำ spore suspension ของเชื้อรา *Pythium* sp. และ mycelium suspension ของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคเน่าคอดินของพริกในอัตรา 2 มิลลิลิตร/ต้น ใส่ลงในดินที่มีต้นกล้าพริกอายุ 30 วัน หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 วัน สังเกตอาการของโรคที่เกิดขึ้น

3. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสเบื้องต้นที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค

(Cao *et al.*, 2005)

ทำการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส ต่อเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินของพริก 2 ชนิดคือ *Pythium* sp. และ *Rhizoctonia solani* โดยวางเชื้อราสาเหตุโรคตรงกลาง และวางเชื้อแอคติโนมัยซีสในจานอาหาร IMA-2 ทั้งหมด 4 จุด แต่ละจุดห่างจากเชื้อราสาเหตุโรค 3 เซนติเมตร (ภาพที่ 6) โดยทำการวางเชื้อแอคติโนมัยซีสก่อนเป็นเวลา 4 วัน แต่ละกรรมวิธีทำการทดสอบ 4 ซ้ำ ในชุดควบคุมทำการวางเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อราสาเหตุโรคที่ใช้ทดสอบในชุดควบคุมเจริญถึงตำแหน่งที่วางเชื้อแอคติโนมัยซีส แล้ววัดรัศมีวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นระหว่างเชื้อแอคติโนมัยซีสกับเชื้อราสาเหตุโรค จากนั้นนำไปวิเคราะห์สถิติเพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสไปทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 6 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินของพริก โดยวิธี dual culture (Shimizu *et al.*, 2000)

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ได้จากการคัดเลือกเบื้องต้น มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. และ *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคเน่าคอดินของพริก โดยวิธี dual culture ทำการขีดเชื้อแอคติโนมัยซีสความเข้มข้น 10^6-10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงบนอาหาร IMA-2 ความยาว 4 เซนติเมตร เมื่อครบ 2 วัน ทำการวางเชื้อราสาเหตุโรคห่างจากเชื้อแอคติโนมัยซีส 5 เซนติเมตร (ภาพที่ 7) แต่ละกรรมวิธีทำการทดสอบ 4 ซ้ำ ในชุดควบคุมทำการขีดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนเชื้อแอคติโนมัยซีส และวางเชื้อราสาเหตุโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อราสาเหตุโรคที่ใช้ทดสอบในชุดควบคุมเจริญถึงตำแหน่งรอยขีดของน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำการวัดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบแล้วนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent inhibition of radial growth: PIRG) โดยคำนวณจากสูตรดังนี้คือ

$$PIRG = (R1-R2)/R1 \times 100$$

เมื่อ R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

และ R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

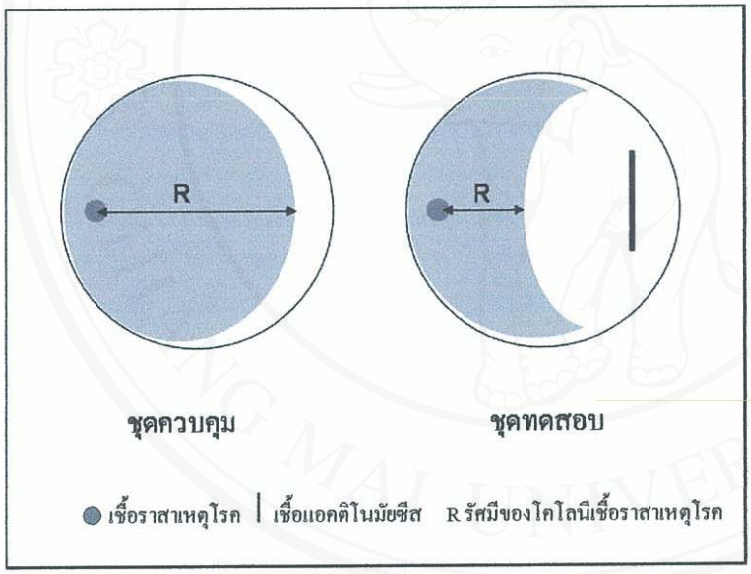
โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

>75 เปอร์เซ็นต์ = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูงมาก

61-75 เปอร์เซ็นต์ = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูง

50-60 เปอร์เซ็นต์ = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับปานกลาง

<50 เปอร์เซ็นต์ = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับต่ำ



ภาพที่ 7 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินของพริก โดยวิธี dual culture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การทดสอบผลของเชื้อแอคติโนมัยซีสต่อการงอกของเมล็ดพริก (ดัดแปลงจากวิธีการของ Hultberg *et al.*, 2000)

วิธีการเตรียม spore suspension ของเชื้อแอคติโนมัยซีส

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสมา streak บนอาหาร IMA-2 ในจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อ แล้วนำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์ จากนั้นใช้ loop ขูดเอาสปอร์บนผิวหน้าอาหารมาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 20 มิลลิลิตร ใน flask แล้วเขย่าเพื่อให้สปอร์หลุดออกจากกลุ่มก้อน จากนั้นนำไปกรองผ่านผ้าขาวบางนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วตรวจนับสปอร์บน hemacytometor ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) และเติมน้ำกลั่นเพิ่มเพื่อให้ได้สปอร์เข้มข้น 10^6–10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

5.1 การทดสอบผลของเชื้อแอคติโนมัยซีสต่อการงอกของเมล็ดพริกบนกระดาษชื้น

นำเมล็ดพริกมาฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปล้างในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ติดเมล็ดออกไป แล้วนำเมล็ดพริกไปแช่ใน spore suspension ของเชื้อแอคติโนมัยซีส ความเข้มข้น 10^6-10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวางบนจานแก้วที่มีกระดาษกรองและเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตรต่อจาน วางเมล็ด 20 เมล็ดต่อจาน แต่ละกรรมวิธีทำการทดสอบ 4 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมทำการแช่เมล็ดพริกในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ตารางที่ 1) แล้วนำแต่ละกรรมวิธีไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นจึงนำมาบ่มไว้ที่แสงปกติ หลังจากวางเมล็ดเป็นเวลา 14 วัน ทำการตรวจนับเมล็ดพริกที่งอกในแต่ละกรรมวิธี แล้วนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 กรรมวิธีในการทดสอบผลของเชื้อแอคติโนมัยซีสต่อการงอกของเมล็ดพริกบนกระดาษชื้น

กรรมวิธีที่	วิธีการ
1	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C2-11
2	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C2-13
3	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C3-9
4	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C4-1
5	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท T1-7
6	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท T3-6
7	แช่เมล็ดพริกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

5.2 การทดสอบผลของเชื้อแอคติโนมัยซีสต่อการงอกของเมล็ดพริกในโรงเรือน

นำเมล็ดพริกมาฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 0.5 % เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปล้างในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ติดเมล็ดออกไป แล้วนำเมล็ดพริกไปแช่ใน spore suspension ของเชื้อแอคติโนมัยซีส ความเข้มข้น 10^6-10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะในถาดหลุมพลาสติกที่มีดินผสมกับแกลบเผาและปุ๋ยคอกที่ฆ่าเชื้อแล้ว ในอัตราส่วน 1:1:1 (จงรักษ์ และอดิศร์, 2549) โดยเพาะ 1 เมล็ดต่อหลุม แต่ละกรรมวิธีทำการทดสอบ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 เมล็ด สำหรับชุดควบคุมทำการแช่เมล็ดพริกในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ตารางที่ 2) หลังจากเพาะเมล็ดเป็นเวลา 14 วัน ทำการตรวจนับเมล็ดพริกที่งอกในแต่ละกรรมวิธี แล้วนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด เมื่อกล้าพริกอายุ 30 วัน สุ่มถอนต้นกล้าจำนวน 10 ต้นต่อกรรมวิธี แล้วล้างดินที่รากออกให้หมด จากนั้นนำต้นกล้าไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง โดยแยกส่วนน้ำหนักของรากและลำต้น แต่ละกรรมวิธีทำการทดสอบ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ต้น แล้วนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 กรรมวิธีในการทดสอบผลของเชื้อแอคติโนมัยซีสต่อการงอกของเมล็ดพริกในโรงเรือน

กรรมวิธีที่	วิธีการ
1	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C2-11
2	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C2-13
3	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C3-9
4	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C4-1
5	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท T1-7
6	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท T3-6
7	แช่เมล็ดพริกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพริก ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium* sp. และ *Rhizoctonia solani* ในเมล็ดพริก (ดัดแปลงจากวิธีการของ Hultberg *et al.*, 2000 และ Shimizu *et al.*, 2000)

6.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพริกบนกระดาษชื้น

นำเมล็ดพริกมาฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปล้างในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ติดเมล็ดออกไป แล้วนำเมล็ดพริกไปแช่ใน spore suspension ของเชื้อแอคติโนมัยซีสความเข้มข้น 10^6-10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (วิธีการเตรียม spore suspension หน้า 28) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวางบนจานแก้วที่มีกระดาษกรองและเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตรต่อจาน วางเมล็ด 10 เมล็ดต่อจาน แต่ละกรรมวิธีทดสอบ 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมทำการแช่เมล็ดพริกในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ตารางที่ 3 และตารางที่ 4) จากนั้นนำแต่ละกรรมวิธีไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 2 วัน แล้วทำการฉีดพ่น spore suspension ของเชื้อรา *Pythium* sp. และ mycelium suspension ของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (วิธีการเตรียม spore suspension และ mycelium suspension หน้า 24) สาเหตุโรคเน่าคอดินของพริกลงในจานแก้วที่มีเมล็ดพริกในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อจาน จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาบ่มไว้ที่แสงปกติ หลังจากวางเมล็ดเป็นเวลา 14 วัน ทำการตรวจนับ

เมล็ดพริกที่งอกในแต่ละกรรมวิธี และประเมินดัชนีการทำลายของโรค (ดัดแปลงจากวิธีการของ Hultberg *et al.*, 2000) โดยให้คะแนนดังนี้

0 คือ ต้นแข็งแรงปกติ

1 คือ เกิดการตายของเนื้อเยื่อเล็กน้อยในส่วนของปลายราก

2.คือ เกิดการตายของเนื้อเยื่อจากปลายรากจนถึงกลางราก

3 คือ เกิดการตายของเนื้อเยื่อตั้งแต่ปลายรากถึงโคนราก

4 คือ เมล็ดไม่งอก หรือรากพริกสั้นกว่า 1 เซนติเมตร

ตารางที่ 3 กรรมวิธีในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพริก ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium* sp. ในเมล็ดพริกบนกระดาษชื้น

กรรมวิธีที่	วิธีการ
1	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C2-11 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
2	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C2-13 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
3	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C3-9 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
4	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C4-1 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
5	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท T1-7 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
6	แช่เมล็ดพริกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. (ชุดควบคุม 1)
7	แช่เมล็ดพริกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 กรรมวิธีในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพริก ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในเมล็ดพริกบนกระดาษชื้น

กรรมวิธีที่	วิธีการ
1	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C2-11 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
2	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C3-9 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
3	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C4-1 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
4	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท T1-7 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
5	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท T3-6 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
6	แช่เมล็ดพริกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (ชุดควบคุม 1)
7	แช่เมล็ดพริกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม 2)

6.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพริกในโรงเรือน

นำเมล็ดพริกมาฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปล้างในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ติดเมล็ดออกไป แล้วนำเมล็ดพริกไปแช่ใน spore suspension ของเชื้อแอคติโนมัยซีสความเข้มข้น 10^6-10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (วิธีการเตรียม spore suspension หน้า 28) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะในถาดหลุมพลาสติกที่มีดินผสมกับแกลบเผาและปุ๋ยคอกที่ฆ่าเชื้อแล้ว ในอัตราส่วน 1:1:1 (จงรักษ์ และอดิศร์, 2549) โดยเพาะ 1 เมล็ดต่อหลุม แต่ละกรรมวิธีทำการทดสอบ

3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 เมล็ด สำหรับชุดควบคุมทำการแช่เมล็ดพริกในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ตารางที่ 5 และตารางที่ 6) เมื่อครบ 2 วัน ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคลงในดิน โดยใช้ spore suspension ของเชื้อรา *Pythium* sp. และ mycelium suspension ของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (วิธีการเตรียม spore suspension และ mycelium suspension หน้า 24) ในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อหลุม หลังจากเพาะเมล็ดเป็นเวลา 14 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

ตารางที่ 5 กรรมวิธีในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพริก ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium* sp. ในโรงเรือน

กรรมวิธีที่	วิธีการ
1	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C2-11 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
2	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C2-13 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
3	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C3-9 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
4	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C4-1 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
5	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท T1-7 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
6	แช่เมล็ดพริกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. (ชุดควบคุม 1)
7	แช่เมล็ดพริกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 กรรมวิธีในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพริก ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในโรงเรือน

กรรมวิธีที่	วิธีการ
1	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C2-11 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
2	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C3-9 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
3	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C4-1 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
4	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท T1-7 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
5	แช่เมล็ดพริกด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท T3-6 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
6	แช่เมล็ดพริกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (ชุดควบคุม 1)
7	แช่เมล็ดพริกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม 2)

7. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพริก ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium* sp. และ *Rhizoctonia solani* ในต้นกล้าพริกในโรงเรือน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Takenaka *et* al., 2003)

ทำการเพาะเมล็ดในถาดหลุมที่มีดินผสมกับแกลบเผาและปุ๋ยคอก ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 (จงรักษ์ และอดิศร์, 2549) โดยเพาะ 1 เมล็ดต่อหลุม เมื่อต้นกล้าอายุ 40 วัน นำ spore suspension ของเชื้อแอคติโนมัยซีสความเข้มข้น 10^6-10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (วิธีการเตรียม spore suspension หน้า 28) ใส่ลงในดินของต้นกล้าพริก ในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อต้น เมื่อครบ 5 วัน จึงปลูกเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินของพริกลงในดิน โดยใช้ spore suspension ของเชื้อรา *Pythium* sp. และ mycelium suspension ของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (วิธีการเตรียม spore suspension และ mycelium suspension หน้า 24) ในอัตรา 2 มิลลิลิตรต่อต้น แต่ละกรรมวิธีทดสอบ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ต้น ในชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนเชื้อแอคติโนมัยซีส (ตารางที่ 7 และตารางที่ 8) หลังจากปลูก

เชื้อราสาเหตุโรคเป็นเวลา 4 วัน ทำการประเมินดัชนีการทำลายของโรค (ดัดแปลงจากวิธีการของ Takenaka *et* al., 2003) โดยให้คะแนนดังต่อไปนี้

0 คือ ต้นแข็งแรงปกติ

1 คือ เกิดการตายของเนื้อเยื่อน้อยกว่า 50% ในส่วนของ hypocotyl

2 คือ เกิดการตายของเนื้อเยื่อตั้งแต่ 50% ขึ้นไป ในส่วนของ hypocotyl

3 คือ เกิดการตายของเนื้อเยื่อตั้งแต่ตำแหน่งของใบเลี้ยงขึ้นไป

4 คือ เกิดการตายของเนื้อเยื่อจนถึงปลายยอด

ตารางที่ 7 กรรมวิธีในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพริก ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium* sp. ในต้นกล้าพริก

กรรมวิธีที่	วิธีการ
1	รดดินด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C2-11 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
2	รดดินด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C2-13 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
3	รดดินด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C3-9 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
4	รดดินด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C4-1 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
5	รดดินด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท T1-7 และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp.
6	รดดินด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. (ชุดควบคุม 1)
7	รดดินด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 กรรมวิธีในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพริก ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในต้นกล้าพริก

กรรมวิธีที่	วิธีการ
1	รดดินด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C2-11 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
2	รดดินด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C3-9 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
3	รดดินด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท C4-1 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
4	รดดินด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท T1-7 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
5	รดดินด้วยเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท T3-6 และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani*
6	รดดินด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (ชุดควบคุม 1)
7	รดดินด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved