บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานเลี้ยงเชื้อ ฟลาสก์ บีกเกอร์ กระบอกตวง หลอดเลี้ยงเชื้อ และเครื่องแก้วอื่น ๆ
2. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ย ลูป มีดผ่าตัด ตะเกียงแอลกอฮอล์ แท่งแก้ว
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (analytical balance)
4. เครื่องเขย่า (shaker)
5. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
6. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
7. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)
8. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
9. ตู้ย้ายเชื้อ (laminar air flow cabinet)
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
11. ตู้เย็น
12. ไมโครเวฟ
13. ไมโครปิเปต (micropipette)
14. กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)
15. กล้องถ่ายรูป
16. อุปกรณ์การเกษตร ได้แก่ กระถางต้นไม้ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร เมล็ดมะเขือเทศพันธุ์ สีดาทิพย์ 3 ดินลำดวน ปุ๋ยคอก ป้ายพลาสติก

อาหารเลี้ยงเชื้อและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

1. Potato semi-synthetic agar (PSA)
2. Nutrient agar (NA)
3. Tetra Zolium Chloride (TZC)
4. King *et al*.'s medium B agar (KB)

5. Yeast extract-dextrose-$CaCO_3$ (YDC)
6. D1M agar
7. Nutrient glucose agar (NGA)
8. Modified yeast salts broth (YS broth)
9. Nutrient broth yeast extract agar (NBY)
10. Nutrient broth (NB)
11. Hugh and Leifson's medium (H-L medium)
12. Liquid 523 medium

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Beef extract
2. Peptone
3. Yeast extract
4. Cellobiose
5. Dextrose
6. Glucose
7. Gycerol
8. $CaCO_3$
9. KH_2PO_4
10. K_2HPO_4
11. $MgSO_4.7H_2O$
12. NaCl
13. Na_2HPO_4
14. NH_4Cl
15. $NH_4H_2PO_4$
16. Bromthymol blue (1% aq. solution)
17. Cresol red
18. Malachite green
19. Clorox 10%
20. Ethyl alcohol 70% และ 95%

วิธีการวิจัย

1. เชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากแบคทีเรีย

1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเหี่ยวของพืชต่าง ๆ ที่เกิดจากแบคทีเรีย

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียในพื้นที่ปลูกต่าง ๆ ของประเทศไทย จำนวน 38 แปลงปลูกทั่วประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย สกลนคร อุบลราชธานี กาญจนบุรี สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ภูเก็ต ตรัง พัทลุง และสงขลา ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2543-กันยายน 2544 และได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ ส่งตัวอย่างโรคเหี่ยวมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ ตัวอย่างโรคที่เก็บมาได้จากพืชอาศัย 17 ชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ มะเขือเปราะ มะเขือยาว พริกขี้หนูสวน พริกชี้ฟ้า พริกยักษ์ ถั่วลิสง มันฝรั่ง มันเทศ แมงลัก ดาวกระจาย ปทุมมา ยาสูบ โหระพา งา หน้าวัว และขิง จากนั้นทดสอบว่าเกิดจากแบคทีเรียหรือไม่ โดยการตัดส่วนของโคนต้นและแช่ในน้ำสะอาด หากตัวอย่างโรคเหี่ยวนั้น เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย จะปรากฏกลุ่มแบคทีเรียเคลื่อนที่เป็นสายในน้ำที่แช่นั้นในเวลา 1–5 นาที บันทึกข้อมูลต่าง ๆ และนำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์

1.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างพืชจากข้อ 1.1 ล้างน้ำให้สะอาด ตัดให้เป็นชิ้นยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แช่ในclorox 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างในน้ำกลั่น และแช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ได้สารแขวนลอยแบคทีเรีย นำไปสตรีคบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เลือกเก็บโคโลนีเดี่ยวๆ ที่มีลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ผิวหน้าโค้งนูน ขอบเรียบ โดยใน 1 ตัวอย่างพืชจะเลือก เก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ 4-5 โคโลนี

1.3 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

การเตรียมพืช เตรียมต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 อายุ 25 วัน ปลูกในกระถางพลาสติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร จำนวน 1,854 ต้น ภายในเรือนกระจก

การเตรียมเชื้อ เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียของเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง จากข้อ 1.2 โดยใช้เชื้อ 2 ลูปต่อน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตร ปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนี / มิลลิลิตร ที่ 0.5 McFarland

การปลูกเชื้อ ทำการปลูกเชื้อโดยการตัดใบ โดยนำกรรไกรจุ่มในสารแขวนลอยแบคทีเรียแล้วตัดใบเริ่มจากใบที่ 3 นับจากยอดลงมา ต้นละ 4 ใบ ทำการทดลองไอโซเลทละ 3 ต้น (3 ซ้ำ) ส่วนชุดควบคุม ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนสารแขวนลอยแบคทีเรีย

การตรวจผล บันทึกอาการเหี่ยว หรือต้นตาย เป็นเวลา 3-15 วัน และคัดเลือกเชื้อที่ทำให้เกิดโรคเพื่อศึกษาต่อไป

2. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคเหี่ยว นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี การเจริญในอาหารธรรมดา และอาหารจำเพาะ โดยศึกษาตั้งแต่ระดับสกุล (genus) และชนิด (species) ของเชื้อ โดยใช้รูปแบบการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชของ Schaad และคณะ (2001)

2.1 การจำแนกชนิดของเชื้อในระดับสกุล (genus)

เตรียมน้ำเชื้อที่เป็นสารแขวนลอย จากเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญในอาหาร PSA slant โดยใช้เชื้อ 2 ลูป ในน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ปรับให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนี ต่อมิลลิลิตร ที่ 0.5 McFarland เขย่าให้เข้ากัน แล้วใช้ลูปแตะมา 1 ลูป ทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีรายละเอียดในภาคผนวกที่ 1 ตามขั้นตอนและวิธีการดังนี้

2.1.1 ปฏิกิริยาแกรม (Gram reaction)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : NA (slant)

วิธีการ : สตรีค จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด หยด 3% KOH บนสไลด์ 1 หยด แล้วเขี่ยเชื้อมาแตะบนหยด KOH จากนั้นคนให้ เข้ากัน ยกลูปขึ้นมาตรง ๆ หากเชื้อเหนียวติดลูปขึ้นมา อ่านผลว่าเป็นบวก แสดงว่า แบคทีเรียเป็น Gram negative หากไม่เหนียวติดลูปขึ้นมา อ่านผลเป็นลบ แสดงว่า แบคทีเรียเป็น Gram positive

2.1.2 การเจริญแบบต้องการและไม่ต้องการออกซิเจน (grows anaerobically, aerobically)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : H-L medium จำนวน 2 หลอด

วิธีการ : ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายตรงที่มีเชื้อ แทงลงไปตรง ๆ ในหลอดอาหารประมาณครึ่งหลอด ของอาหารทั้ง 2 หลอด เทปิดทับด้วย parafin oil ให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร 1 หลอด ส่วนอีก 1 หลอดไม่เท parafin oil ปิดทับ นำไปบ่มทันทีที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนและไม่เปลี่ยนสีของอาหารทั้ง 2 หลอด ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 หลังจากการทดสอบ หากหลอดที่ไม่มี parafin oil เปลี่ยนสี แสดงว่าเชื้อต้องการออกซิเจน แต่หากเปลี่ยนสีทั้ง 2 หลอดแสดงว่าใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนก็ได้

2.1.3 โคโลนีสีเหลืองบนอาหาร YDC (yellow colonies on YDC)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : YDC (plate)

วิธีการ : สตรีค จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจผลโดยการดูสีของโคโลนี พร้อมทั้งลักษณะต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ รูปร่าง ขนาด ความโค้งนูนของผิวหน้า ขอบ และความขุ่นใสของโคโลนี

2.1.4 โคโลนีมีลักษณะ mucoid บนอาหาร YDC ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (colonies mucoid on YDC at 30^{O}C)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : YDC (plate)

วิธีการ : สตรีค จากนั้นบ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจผลโดยการดูลักษณะผิวหน้าของโคโลนี การโค้งนูน เมือกและเป็นมัน

2.1.5 การสร้างสารเรืองแสงในอาหาร KB (fluorescent pigment on KB)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : KB (King *et al*.'s medium B agar plate)

วิธีการ : สตรีค จากนั้นบ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยการนำจานเลี้ยงเชื้อไปส่องใต้หลอดไฟ ซึ่งมีคลื่นแสงยาว 360-366 nm (black light) โดยสังเกตสารเรืองแสงสีเขียว (fluorescin) ในอาหารที่ใช้ในการทดสอบ

2.1.6 การแพร่ของสารไม่เรืองแสงในอาหาร KB (diffusible non-fluorescent pigment on KB)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : KB (King *et al*.'s medium B agar plate)

วิธีการ : สตรีค จากนั้นบ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยการนำจานเลี้ยงเชื้อไปส่องใต้แสงไฟธรรมดา สังเกตการสร้างสารสีน้ำตาลอ่อนในอาหารที่ใช้ในการทดสอบ

2.1.7 การสร้างเอนไซม์ urease (urease production)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : YS broth (control) และ YS broth+urea (tube)

วิธีการ : แทงตรงๆ ทั้ง 2 หลอด บ่มเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจผลโดยการดูการเปลี่ยนสีของอาหาร หากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง

2.1.8 การสร้างเอนไซม์ oxidase (oxidase production)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : NGA (plate)

วิธีการ : สตรีค จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจผลภายใน 24 ชั่วโมง โดยใช้ไม้จิ้มฟันตักเชื้อปริมาณเล็กน้อยแตะบนกระดาษกรอง จากนั้นหยดสาร 1%

(w/v) tetramethyl-p-p-phenylenediamine dihydrochloride solution สังเกตการเปลี่ยนเป็นสีม่วงของเชื้อ โดยหากเชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วงภายใน 10-60 วินาที อ่านผลเป็นบวก ถ้าเปลี่ยนหลัง 60 วินาที อ่านผลเป็นลบ

2.1.9 **การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส** (grows at 40 ^{0}C)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : NBY (broth) จำนวน 2 หลอดต่อเชื้อ

วิธีการ : เลี้ยงเชื้อใน NBY เหลว เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดเชื้อที่เจริญในอาหาร NBY นั้นจำนวน 20 ไมโครลิตรใส่ใน NBY หลอดใหม่ และบ่มเลี้ยงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าเพื่อให้เชื้อ ในหลอดได้รับความร้อนอย่างสม่ำเสมอทั่วหลอด ตรวจดูความขุ่นของอาหารหลังจากเลี้ยงไว้ เป็นเวลา 15 และ 24 ชั่วโมง

2.1.10 **การมี flagella มากกว่า 4 เส้น** (more than four peritrichous flagella)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : semi-solid NA (slant)

วิธีการ 1 : การตรวจสอบโดยวิธี wet mount staining

แทงตรง ๆ บนผิว หน้าของอาหาร บ่มเลี้ยงไว้ 16-18 ชั่วโมง จากนั้นหยด น้ำ 1 หยดเล็ก ๆ บนสไลด์ ค่อย ๆ เขี่ยเชื้อ มาแตะที่ขอบหยดน้ำเบา ๆ ไม่กวนหรือ smear ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์เบาๆ จากนั้นหยดสีย้อม flagella ที่ขอบกระจกปิดสไลด์ ทิ้งไว้ 5 นาที ตรวจและนับ flagella ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound

วิธีการ 2 : การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ก. เลี้ยงเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรง 1007-1 ในอาหาร NA อายุ 18-24 ชั่วโมง แล้วย้อมสีเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Negative staining

ข. ค่อย ๆ เท 0.1 M phosphate buffer ลงไปในหลอดเลี้ยงเชื้อตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แบคทีเรียจะเคลื่อนขึ้นมา

ค. ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรีย หยดลงบน parafilm เป็นหยดเล็ก ๆ แล้วนำตาข่าย ทองแดง (grid) ขนาด 200 mesh ที่มี plastic film (formvar) เคลือบอยู่ นำด้าน plastic film แตะบนหยด สารแขวนลอยแบคทีเรีย นาน 1 นาที

ง. ซับตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง แล้วย้อมด้วย 2% uranyl acetate (UA) 8-9 หยด

จ. ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง

ช. นำไปส่องดูด้วยกล้อง TEM –100 CX-II JEOL ใช้กระแสไฟฟ้า 80 กิโลวัตต์ บันทึกภาพ

2.1.11 การเจริญบนอาหาร D1M (growth on D1M agar)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : D1M agar (plate)

วิธีการ : สตรีค จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจผลโดยการ ดูว่ามีเชื้อเจริญบนอาหารหรือไม่ รูปร่าง ลักษณะและสีเป็นอย่างไร

2.1.12 การสร้างสปอร์ (spore formation)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : NA (slant)

วิธีการ : สตรีค จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-5 วัน ตรวจผลใน วันที่ 1 และ 5 ย้อมสปอร์โดยหยดน้ำบนสไลด์ ใช้ลูปแตะแบคทีเรียจำนวนเล็กน้อย คนให้เข้ากัน ปล่อยทิ้งให้แห้ง จากนั้นหยดด้วย 5.0% (w/v) aq.malachite green ให้ท่วม ปล่อยทิ้งไว้ 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำไหล ปล่อยให้แห้ง จากนั้น counter stain ด้วย 5.0% (w/v) safranin O เป็นเวลา 15 วินาที ล้างโดยผ่านน้ำ ซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound ที่ 40x เซลล์ของแบคทีเรียติดสีแดง ส่วนสปอร์ติดสีเขียว

2.1.13 ลักษณะโคโลนีคล้ายเส้นใย (aerial mycelium)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : NA (plate)

วิธีการ : สตรีค จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจผลโดยการดูลักษณะของ โคโลนีว่า มีลักษณะคล้ายเส้นใยของเชื้อราหรือไม่ อย่างไร

2.2 การจำแนกชนิดของเชื้อในระดับชนิด (species)

นำเชื้อบริสุทธิ์จากข้อ 1.3 ซึ่งผ่านการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศ และจำแนกระดับสกุลแล้ว มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สีรรวิทยาและ ชีวเคมี โดยศึกษาในระดับชนิด ตามวิธีการของ Schaad และคณะ (2001) เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียจากเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญในอาหาร PSA slant โดยใช้เชื้อ 2 ลูป ในน้ำ 3 มิลลิลิตร ปรับให้ มีความเข้มข้น ประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ที่ 0.5 McFarland เขย่า ให้เข้ากันแล้วใช้ลูปแตะเชื้อ 1 ลูป ทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ ลักษณะ และคุณสมบัติที่ทำการศึกษา ได้แก่ การสะสม poly-β-hydroxybutyrate (PHB) การสร้าง N_2 จาก NO_3 การใช้ arginine, betaine, citraconate, L-arabinose, sucrose และ n-propanol เป็นแหล่งคาร์บอน

2.2.1 **การสะสม** poly-β-hydroxybutyrate (PHB accumulation)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : Nutrient agar+5% sucrose,Mineral medium

วิธีการ : สตรีค จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจผลโดยการย้อมดูเม็ด PHB โดย smear เชื้อบนสไลด์ ทิ้งให้แห้ง ตรึงด้วยความร้อน หยด Sudan Black B solution ทิ้งไว้ 10-15 นาที เทสีทิ้ง ซับให้แห้ง ล้างสไลด์ด้วย xylene ซับให้แห้ง หลังจาก นั้นย้อมทับด้วย safranin 0.5% ประมาณ 5-10 วินาที ล้างด้วยน้ำและทำให้แห้งอีกครั้ง ตรวจดู เม็ด PHB สีภายในเซลล์แบคทีเรียซึ่งจะปรากฏเม็ดสีน้ำเงินดำในเซลล์

2.2.2 **การสร้าง** N_2 **จาก** NO_3

อาหารที่ใช้ทดสอบ : Nitrate reduction medium +Starch iodide solution

วิธีการ : แทงเชื้อลงไปตรง ๆ 2 หลอด หลอดหนึ่งให้ปิดทับด้วย 3%Water agar บ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลหลอดที่ปิดทับนี้ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน ถ้ามี N_2 จะปรากฏฟองอากาศในอาหาร หรือใต้ WA ที่ปิดทับ หลอดที่ไม่ได้ปิดทับด้วย WA นำมาตรวจหา nitrite ($NO_{2)}$ หลังจากปลูกเชื้อ 3-7 วัน โดยเติม starch iodine solution และ HCl โดยอาหารทดสอบจะ มีสีน้ำเงิน

2.2.3 **การใช้** arginine, betaine, citraconate, L-arabinose, sucrose **และ** n-propanol **เป็นแหล่งคาร์บอน** (Carbon source utilization)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : Ayers *et al*.'s mineral salts medium

วิธีการ : สตรีคเชื้อบนอาหาร ที่เติม arginine, betaine, citraconate, L-arabinose, sucrose และ n-propanal ในแต่ละอาหารทดสอบ จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส ตรวจผลโดยดูการเจริญของเชื้อ ในวันที่ 3, 7, 14

3. **คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่รุนแรงและไม่รุนแรง**

จากเชื้อที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคและจำแนกชนิดแล้ว นำมาจัดกลุ่มสายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรง

3.1 **คัดเลือกโดยใช้อาหารทดสอบ** TZC medium

เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย จากเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง นำมาสตรีคบนอาหาร TZC บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ศึกษาลักษณะโคโลนีซึ่งมี 2 ประเภท คือ โคโลนีเยิ้มสีขาวขุ่น ตรงกลางโคโลนีมีสีชมพูอ่อน มีเมือกสีขาวรอบ ๆ โคโลนี และ โคโลนีสีแดงเข้ม ไม่มีสารเมือกรอบ ๆ โคโลนี ซึ่งโคโลนีทั้ง 2 แบบนี้ จัดเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรง (virulent

strain) และสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรง (avirulent strain) ตามลำดับ (Kelman,1954) บันทึกข้อมูล บันทึกภาพ เลือกเก็บโคโลนีเดี่ยวไว้เพื่อศึกษาต่อไป

3.2 คัดเลือกจากความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ

ทำการปลูกเชื้อตามวิธีการในข้อ 1.3 โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย ปลูกเชื้อบนต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 25 วัน ด้วยวิธีการตัดใบ เริ่มจากใบที่ 3 นับจากยอดลงมา จำนวน 4 ใบ หลังจากนั้นตรวจผลภายใน 7-10 วัน และประเมินความรุนแรงของโรคตามวิธีของ Winstead และ Kelman (1952) โดยคำนวณดัชนีการเกิดโรคเหี่ยว

การแสดงออกของโรคเหี่ยวแบ่งเป็น 6 ระดับ ดังนี้

0 = ไม่แสดงอาการเหี่ยว

1 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 1-2 ใบ

2 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 3-4 ใบ

3 = ยอดเริ่มแสดงอาการเหี่ยว

4 = ต้นพืชแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น

5 = ต้นเหี่ยวและแห้งตาย

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ x 100}}{\text{จำนวนต้น x ระดับการเกิดโรคสูงสุด}}$$

จากนั้นประมวลข้อมูลจากข้อ 3.1 และ 3.2 เพื่อจัดกลุ่มสายพันธุ์ที่รุนแรงและไม่รุนแรง

4. ศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงต่อสายพันธุ์รุนแรง

4.1 การเตรียมเชื้อ

เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียจากเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ทั้งสายพันธุ์รุนแรง และไม่รุนแรง ที่คัดเลือก จากข้อ 3 โดยใช้เชื้อ 2 ลูปต่อน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตร ปรับความขุ่นของสารแขวนลอยแบคทีเรีย ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนี / มิลลิลิตร ที่ 0.5 McFarland

4.2 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

นำสารแขวนลอยของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์รุนแรง ผสมกับอาหาร PSA ที่หลอม และปล่อยให้อุ่นประมาณ 53 องศาเซลเซียสเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ เมื่ออาหารเริ่มแข็งตัว นำไปเก็บในตู้เย็น เพื่อลดการเจริญของเชื้อ จากนั้นหยดด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรียสายพันธุ์ ไม่

รุนแรง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการเกิดความกว้างบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดจากปฏิกิริยาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์รุนแรง และบันทึกภาพ ทำการทดลองโดยใช้เชื้อทุกตัวทั้ง 2 กลุ่ม และคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรงที่ยับยั้งเชื้อสายพันธุ์รุนแรงได้ดีที่สุด ไว้ทำการศึกษาต่อไป

5. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรงในเรือนกระจก

นำเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรงที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง สายพันธุ์รุนแรง (สายพันธุ์ที่ถูกยับยั้งในห้องปฏิบัติการ) ในสภาพเรือนกระจก ซึ่งจากการศึกษาในข้อ 4 พบว่า เชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรง 1034-1 สามารถยับยั้งเชื้อสายพันธุ์รุนแรงได้ดีที่สุด โดยคัดเลือกจากความกว้างวงใส ที่เกิดจากปฏิกิริยาการยับยั้งของเชื้อทั้ง 2 กลุ่ม โดยยับยั้งได้ 8 ไอโซเลท ได้แก่ 1003-5, 1021-4, 1032-2, 1073-2, 1134-5, 1167-2, 1170-2 และ 1184-6 โดยมีขั้นตอนสรุปดังนี้

5.1 การทำเครื่องหมาย (marker) ในเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรง

5.1.1 นำเชื้อ *R. solanacearum* 1034-1 สายพันธุ์ไม่รุนแรงมาทำเครื่องหมาย (marker) เพื่อประโยชน์ในการศึกษาและติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อในดิน โดยใช้สารปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ nalidixic acid และ rifampicin ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm.

5.1.2 เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย ให้มีความเข้มข้นของเชื้อ ประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนี / มิลลิลิตร ที่ 0.5 McFarland นำมาหยดลงบนผิวหน้าอาหาร NGA ที่ผสม nalidixic acid ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ ห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง เก็บโคโลนีเดี่ยวๆ ที่เจริญบนอาหาร แล้วสตรีคบนอาหาร NGA ที่ผสม nalidixic acid ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 –72 ชั่วโมง

5.1.3 เก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่เจริญบนอาหาร แล้วสตรีคบนอาหาร NGA ที่ผสม nalidixic acid ความเข้มข้นเดิม ประมาณ 1-2 ครั้ง แล้วนำเชื้อที่ได้มาทดสอบความต้านทานต่อ rifampicin ที่มีความเข้มข้น 100 ppm. ด้วยวิธีแบบเดียวกัน เก็บโคโลนีของเชื้อที่ได้ มาสตรีคบนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด โดยให้มีความเข้มข้นในอาหาร 50 หรือ 100 ppm.(nalidixic acid) และ 100 ppm. (rifampicin) และทดสอบความสามารถของเชื้อที่ผ่านการทำเครื่องหมายแล้ว ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum*

5.2 การเตรียมเชื้อสายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรง เพื่อใช้ในการทดสอบ

5.2.1 ย้ายเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์รุนแรง จำนวน 8 ไอโซเลท ที่เลี้ยงบนอาหาร PSA อายุ 48 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหารเหลว 523 medium เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10^4 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ที่ 0.5 McFarland สำหรับใช้ในการ ทดลอง

5.2.2 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ไม่รุนแรง 1034-1 ที่ต้านทานต่อ nalidixic acid และ rifampicin ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของสารแขวนลอยแบคทีเรีย ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^4 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ที่ 0.5 McFarland สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

5.3 การทดลอง ในการทดลองประกอบด้วย 8 กรรมวิธี 10 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD)

5.3.1 การเตรียมพืช เพาะกล้ามะเขือเทศสีดาทิพย์ 3 อายุ 25 วัน เตรียมกระถาง ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร บรรจุดินที่อบฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

5.3.2 ดำเนินการทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 (T1) ปลูกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ไม่รุนแรง 30 นาที จากนั้นปลูกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์รุนแรง 30 นาที ด้วยวิธีการแช่ราก

กรรมวิธีที่2(T2)ปลูกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์รุนแรง 30 นาที จากนั้นปลูกเชื้อ แบคทีเรียสายพันธุ์ไม่รุนแรง 30 นาที ด้วยวิธีการแช่ราก

กรรมวิธีที่3(T3)ปลูกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ไม่รุนแรง และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์รุนแรงพร้อมกันเป็นเวลา 30 นาที ด้วยวิธีการแช่ราก

กรรมวิธีที่ 4 (T4)ปลูกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ไม่รุนแรงในวัสดุปลูก 3 วัน ด้วยวิธีราดเชื้อในดิน จากนั้น ปลูกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์รุนแรง 30 นาที ด้วยวิธีการแช่ราก

กรรมวิธีที่ 5 (T5) แช่เมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ไม่รุนแรง 30 นาที ก่อนนำ ไปแช่ในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์รุนแรงอีก 30 นาที

กรรมวิธีที่ 6 (T6) ปลูกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์รุนแรง 30 นาที ด้วยวิธีการแช่ราก

กรรมวิธีที่ 7 (T7) ปลูกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ไม่รุนแรง 30 นาที ด้วยวิธีการแช่ราก

กรรมวิธีที่ 8 (T8) ชุดควบคุม โดยแช่รากในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

บันทึกอาการของโรคและประเมินความรุนแรงของโรคตามวิธีของ Winstead และ Kelman (1952) โดยคิดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยว หลังจากปลูกเชื้อ 3-15 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในดิน