สำนักหอสมุด แม่โจ้ ๒๕๔๙ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง บทบาทของสารประกอบที่ว่องไวปฏิกิริยาต่อการเจริญและเปลี่ยนแปลงของเซลล์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

Role of Reactive Species in Fungal Cellular Differentiations and Developments of Chili Anthracnose Disease

ได้รับการจัดสรรงบประมาณการวิจัย ประจำปี 2560

จำนวนเงิน 346,800 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวกมลพร ปานง่อม

ผู้ร่วมโครงการ นางสาวขวัญจรัส เชิงปัญญา

นางศิริโสภา อินขะ วรรณวงศ์

งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

30 /พฤษภาคม/2562

บทบาทของสารว่องไวปฏิกิริยาต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เชื้อรา ก่อโรคแอนแทรคโนสพริก

ROLE OF REACTIVE SPECIES IN FUNGAL CELLULAR DEVELOPMENTS OF CHILI ANTHRACNOSE DISEASE

กมลพร ปานง่อม[1] ศิริโสภา อินขะ วรรณวงศ์[2] และ ขวัญจรัส เชิงปัญญา[1]

KAMONPORN PANNGOM[1] SIRISOPHA INKHA WANNAWONG[2]

AND KHAUNJARAT CHEONGPANYA[1]

[1]สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ [2]สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ต. แม่ทราย อ. ร้องกวาง จ. แพร่ 54140

[1]Applied Biology Program [2]Crop Production Technology Program, Maejo University Phrae Campus Mae Sai Subdistrict, Rong Kwang District, Phrae Province, 54140, Thailand

บทคัดย่อ

โรคแอนแทรคโนสในพริกเป็นโรคที่ทำความเสียหายให้กับผลผลิตและคุณภาพของผลพริกในพื้นที่ที่มีการระบาดมากกว่า 80% การระบาดพบมากในช่วงฤดูฝนที่มีอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมต่อการแพร่ระบาดของเชื้อโรค ทำให้เกิดการควบคุมและป้องกันโรคได้ยาก ปัจจุบันสารประกอบที่ว่องไวปฏิกิริยาทั้งโมเลกุลของออกซิเจนและไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญในช่วงการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคหลายชนิดในพืช ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินบทบาทของสารประกอบที่ว่องไวปฏิกิริยาทั้งในกลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดแพร่ โดยการใช้สารเคมีที่ว่องไวปฏิกิริยาจำนวน 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มโมเลกุลของออกซิเจน คือ สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกลุ่มโมเลกุลของไนโตรเจน คือ สารโซเดียมไนโตรปรัสไซด์และโซเดียมไนไตร์ท โดยละลายสารในตัวทำละลายจำนวน 3 ชนิด คือ โซเดียมคลอไรด์ น้ำกลั่น และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซา

ลีน และบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ดีที่สุด ขณะที่สารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ พบว่ามีการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายทั้งสามชนิด พบว่าน้ำกลั่นและสารละลายโซเดียมคลอไรด์นั้นมีความเหมาะสมในการใช้เป็นตัวทำละลายสารว่องไวปฏิกิริยา เพราะให้ผลการการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคได้ดีที่สุด นอกจากนั้นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคบนผลพริกได้ และสารละลายโซเดียมไนไตร์ทและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมได้เท่ากับ 12.61 และ 0.00% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์และเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา ลดเปอร์เซ็นต์การเกิดและความรุนแรงของโรค และการยับยั้งการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกได้มากกว่าสารละลายโซเดียมไนไตร์ท และโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ตามลำดับ และโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อราก่อโรคนั้นมีลักษณะขรุขระและเกิดรอยบุ๋มขึ้นเมื่อได้รับสารว่องไวปฏิกิริยา ค่าพีเอชของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ขณะที่สารละลายโซเดียมไนไตร์ทมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในอนาคตควรมีการศึกษาหากลไกในระดับโมเลกุลเพื่อให้ทราบถึงปฏิสัมพันธ์ของสารว่องไวปฏิกิริยาต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริก และการทำการทดลองในสภาพของพื้นที่แปลงปลูกพริก เพื่อหาแนวทางในการป้องกันการระบาดของเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวต่อไป

คำสำคัญ; แอนแทรคโนส พริก สารว่องไวปฏิกิริยา ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โซเดียมไนโตรปรัสไซด์ โซเดียมไนไตร์ท

ABSTRACT

Anthracnose disease in chili can cause up to 80% damages in both quantity and quality of chili fruits. This disease is widely spread in rainy season due to suitable temperature and moisture for the fungal growth and infection. It has been shown that reactive oxygen and reactive nitrogen species are related to the pathogen infection in the plant host. Therefore, this study focused on the evaluation of the reactive species generated from oxygen and nitrogen containing substances on the development of the chili–anthracnose fungus in Phrae Province. Two groups of reactive species donors were used, namely hydrogen peroxide (H_2O_2) and sodium nitroprusside (SNP) and sodium nitrite. H_2O_2 was used for generating reactive oxygen, while SNP and sodium nitrite were used for generating reactive nitrogen. These donors were prepared as solutions in 3 different solvents; distilled water, sodium chloride and phosphate buffer saline. The fungal spores were soaked in these solutions for 0, 3 and 6 hrs. And the results showed that soaking fungal spores in 20 mM H_2O_2 and 100 mM sodium nitrite for 6 hr caused the highest inhibition of spore germination and hyphae development. In case of SNP, spore germination and hyphae growth could still be observed. Comparison of the effect of solvents on the production of reactive species revealed that distilled water and sodium chloride were suitable solvents because they showed the highest inhibition on fungal growth. 40 and 80 mM H_2O_2 could reduce the infection rate and disease severity on chili fruits *in vivo*. 10 mM H_2O_2 showed higher effect on appressorium development than SNP and sodium nitrite. SEM analysis revealed that the surface structure of the fungal spores was rough and depressed upon treatment with reactive species. The pH of the H_2O_2 and SNP solutions were not changed, but the pH of sodium nitrite solution was increased to 8.03. Among three chemical donor substances, H_2O_2 was the best reactive species donor used to inhibit fungal development. Further study will be performed to obtain more detail on the interaction mechanism between the fungal pathogen and the reactive species. Moreover, a field study will be performed in order to draw the protection guideline against anthracnose outbreak in the future.

Keywords; Anthracnose, Chili, Reactive species, Hydrogen peroxide, Sodium nitroprusside, Sodium nitrite

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยเรื่อง บทบาทของสารว่องไวปฏิกิริยาต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก (Role of Reactive Species in Fungal Cellular Developments of Chili Anthracnose Disease) รหัสโครงการวิจัย มจ.1-60-060 ได้รับการสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2560 คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนักศึกษาช่วยปฏิบัติงานวิจัยจากสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ดังรายชื่อต่อไปนี้ คือ นางสาวพัชรพร บุตรบัว นางสาวจันทกานต์ พงษ์กูล นายวิโรจ ชมภู และนักศึกษาสาขาวิชาเกษตรป่าไม้ ดังรายชื่อต่อไปนี้ นางสาววิริญทิพย์ เกตุยา นางสาวนัชณิชา นาคน้อย นางสาววรนุช นันทะบุตร และนางสาวสุภาภรณ์ ผลเสน ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยเป็นอย่างดี จนทำให้ผลงานวิจัยออกมาเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ (ST-206) ห้องปฏิบัติการโรคพืช (ST-303) ห้องเตรียมสารเคมี (ST-202 และ ST-302) ห้องปฏิบัติการกลาง (ST 204) และห้องปฏิบัติการวิจัยพืชสมุนไพร (ST-107) ประจำอาคารปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (อาคารกิตติพงษ์ วุฒิจำนงค์) ที่กรุณาอำนวยความสะดวกและช่วยสนับสนุนในการทำวิจัย ส่งผลทำให้การวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ iii
กิตติกรรมประกาศ iv
สารบัญ v
สารบัญภาพ ix
สารบัญตาราง xvi
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและปัญหาของการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย 3
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ 3
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย 4
1.5 สถานที่ทำการวิจัย 4
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมและเอกสารที่เกี่ยวข้อง 5
2.1 บทบาทความสำคัญของสารประกอบที่ว่องไวปฏิกิริยาต่อกระบวนการทางชีววิทยา . 5
2.2 กลุ่มของสารว่องไวปฏิกิริยาและโครงสร้าง 7
2.3 ความสำคัญและปัญหาของโรคแอนแทรคโนส 10
2.4 ระบบการจัดจำแนกเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส 12
2.5 กลไกการเข้าทำลายพริกของเชื้อราสาเหตุ 13
2.6 การแพร่ระบาดและวงจรชีวิตของเชื้อโรค 15
2.7 การป้องกันกำจัดโรค 19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 23
3.1 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และครุภัณฑ์ 23
3.2 วิธีดำเนินการทดลอง 26
3.2.1 การสำรวจและและเก็บตัวอย่างผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนส 26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา 26
3.2.3 การศึกษาลักษณะอาการของโรคและการแยกเชื้อ 27
3.2.4 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity) ของเชื้อราชนิด *C. gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพริก 27
3.2.5 การทดสอบผลของสารว่องไวปฏิกิริยาต่อการยับยั้งเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก 28
3.2.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกหลังได้รับสารว่องไวปฏิกิริยา 30
3.2.7 การทดสอบผลของสารว่องไวปฏิกิริยาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกในผลพริก 30
3.2.8 การทดสอบการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก 32
3.2.9 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อรา 33
3.2.10 การศึกษาค่าพีเอชของสารว่องไวปฏิกิริยาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 34
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล 34
บทที่ 4 ผลการวิจัย 36
4.1 สำรวจพริกที่เป็นโรคจากแปลงปลูกพริกของเกษตรกรใน อำเภอหนองม่วงไข่ จังหวัด แพร่ และลักษณะอาการของโรค 36
4.2 การตรวจเชื้อและการแยกเชื้อโรคแอนแทรคโนส 36
4.3 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity) ของเชื้อรา ชนิด *C. gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพริก 38
4.4 ผลของสารว่องไวปฏิกิริยาต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ก่อโรคแอนแทรคโนสของพริก 40

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4.1 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการยับยั้ง
การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก 40
4.4.2 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการเจริญเติบโต
ของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก 46
4.4.3 ผลของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ต่อการยับยั้ง
การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก 52
4.4.4 ผลของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ต่อการเจริญเติบโต
ของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของพริก 56
4.4.5 ผลของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทต่อการยับยั้งการงอก
ของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก 65
4.4.6 ผลของสารละลายโซเดียมไนไตรท์ต่อการเจริญเติบโต
ของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของพริก 69
4.5 ผลการทดสอบสารว่องไวปฏิกิริยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา
ก่อโรคแอนแทรคโนสพริกในผลพริก 80
4.6. ผลของสารว่องไวปฏิกิริยาต่อการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อรา
ก่อโรคแอนแทรคโนสพริก 84
4.7 ผลของสารว่องไวปฏิกิริยาต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อรา
ก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก 89
4.8 ผลการศึกษาค่าพีเอชของสารละลายว่องไวปฏิกิริยาที่มีผลต่อการเจริญเติบโต
ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก 91
บทที่ 5 สรุปการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 92
5.1 สรุปผลการวิจัย 92
5.2 อภิปรายผลการวิจัย 94
5.3 ข้อเสนอแนะ 100

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

เอกสารอ้างอิง 102

ภาคผนวก 108

ภาคผนวก ก. 109

ภาคผนวก ข. 120

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่

2.1 กลไกการสังเคราะห์สารประกอบที่ว่องไวปฏิกิริยาในกลุ่มโมเลกุลของออกซิเจน และกลไกการสลายสารว่องไวปฏิกิริยาด้วยระบบกลุ่มของเอนไซม์ที่พบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต 6
2.2 บทบาทของสารว่องไวปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในกลุ่มเชื้อรา 6
2.3 กลไกการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์บทบาทในเชื้อรา 8
2.4 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสที่ทำความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจ..... 11
2.5 ลักษณะของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกในจีนัส *Colletotrichum* จำนวน 4 ชนิด..... 12
2.6. ลักษณะของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกในจีนัส *Colletotrichum* จำนวน 4 ชนิด.. 13
2.7 อาการของโรคแอนแทรคโนสที่ก่อโรคบนผลพริกสีเขียวและสีแดงที่เกิดขึ้นในแปลง..... 14
2.8 อาการของโรคแอนแทรคโนสที่ก่อโรคบนผลพริกสีแดงหลังการปลูกเชื้อ 14
2.9 กลไกการเข้าทำลายของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก 16
2.10 วงจรชีวิตของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก 17
3.1 แผนผังสรุปวิธีการทำการทดลอง 35
4.1 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกที่เก็บตัวอย่างมาจากแปลงปลูกของเกษตรกร ในพื้นที่อำเภอหนองม่วงไข่ จังหวัดแพร่ 36
4.2 ลักษณะสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกชนิด *C. gloeosporioides* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X 37
4.3 โคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA ภายหลังการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5 วัน 39
4.4 ลักษณะของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides* และการพิสูจน์โรคบนผลพริก .39
4.5 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายในตัวทำลายน้ำกลั่นต่อการงอกสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก 41

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่

4.6 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายในตัวทำลายโซเดียมคลอไรด์ต่อการงอกสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก..... 42

4.7 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายในตัวทำลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตซาลีนต่อการงอกสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส 43

4.8 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกที่เตรียมในตัวทำละลายน้ำกลั่น 47

4.9 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกที่เตรียมในตัวทำละลายโซเดียมคลอไรด์ 48

4.10 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกที่เตรียมในตัวทำละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตซาลีน 49

4.11 เปอร์เซ็นต์การงอกและลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายโซเดียมคลอไรด์ 53

4.12 เปอร์เซ็นต์การงอกและลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายน้ำกลั่น 54

4.13 เปอร์เซ็นต์การงอกและลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 55

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่

4.14 ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกที่สปอร์เชื้อรา ผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในสารโซเดียมคลอไรด์ และการบ่มเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ในชั่วโมงการเจริญเติบโตที่ 48, 72, 96, 120 และ 168 ชั่วโมง และลักษณะของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก ของการบ่มสปอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในระยะการเจริญเติบโตของวันที่ 7 58

4.15 ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกที่สปอร์เชื้อรา ผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในตัวทำละลายน้ำกลั่น และการบ่มเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ในชั่วโมงการเจริญเติบโตที่ 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง 59

4.16 ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกที่สปอร์เชื้อรา ที่บ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน และบ่มเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ในชั่วโมงการเจริญเติบโตที่ 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง .....
60

4.17 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่สปอร์ผ่านการแช่ใน สารโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อรา เป็นเวลา 0 ชั่วโมง 63

4.18 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส ที่สปอร์ผ่านการบ่มใน สารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ในการบ่มสปอร์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 64

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่

4.19 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง 65

4.20 เปอร์เซ็นต์การงอกและลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ละลายในโซดียมคลอไรด์ ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง 66

4.21 เปอร์เซ็นต์การงอกและลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ละลายในน้ำกลั่น ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง 68

4.22 เปอร์เซ็นต์การงอกและลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง 69

4.23 ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์บ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ในชั่วโมงการเจริญเติบโตของเส้นใยที่ 48, 72, 96, 120 และ 168 ชั่วโมง และลักษณะของโคโลนีเส้นใยเชื้อราที่บ่มสปอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ของอายุการเจริญเติบโตในวันที่ 7 72

4.24 ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนไตร์ท ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในน้ำกลั่น เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ในชั่วโมงการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราที่ 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง 73

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่

4.25 ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนไตร์ท ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ในชั่วโมงการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราที่ 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง 74

4.26 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 0 ชั่วโมง 77

4.27 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 78

4.28 ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง 79

4.29 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่แสดงบนผลพริก หลังการปลูกเชื้อราที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40, และ 80 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน 80

4.30 ความรุนแรงของการเกิดโรคของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่แสดงบนผลพริก หลังการปลูกเชื้อราที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ที่มีระยะของการปลูกเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน 81

4.31 ลักษณะของผลพริกที่ผ่านการปลูกเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส ที่สปอร์ผ่านการบ่มด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ที่มีระยะของการปลูกเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน 81

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่

4.32 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่แสดงบนผลพริก หลังการปลูกเชื้อรา และฉีดพ่นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน 82
4.33 ความรุนแรงของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่แสดงบนผลพริกหลังการปลูกเชื้อรา และฉีดพ่นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน 83
4.34 ลักษณะของผลพริกที่เกิดจากเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่แสดงบนผลพริก หลังการปลูกเชื้อรา และฉีดพ่นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน 83
4.35 เปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก หลังได้รับสารละลายโซเดียมไนไตร์ท ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง 85
4.36 ลักษณะของโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก หลังได้รับสารละลายโซเดียมไนไตร์ท ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง 85
4.37 เปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส ในพริก หลังได้รับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง 87
4.38 ลักษณะของโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก หลังได้รับสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง 88
4.39 การเปรียบเทียบของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารละลายโซเดียมไนไตร์ท ในระดับที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ ในการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของพริกเป็นเวลา 0 ชั่วโมง 89

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่

4.40 โครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก หลังได้รับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมไนไตร์ท และโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง 90

4.41 ค่าพีเอชของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โซเดียมไนโตรปรัสไซด์ และโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่วัดด้วยเครื่องพีเอชรุ่น Laqua twin pH 22 91

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

3.1 สารเคมี เกรด และยี่ห้อที่ใช้ในการทดลอง 23
3.2 วัสดุอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ 24
3.3 ครุภัณฑ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ 25
4.1 ผลของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่ออัตราการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส บนอาหาร PDA ที่มีระยะการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง 45
4.2 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา บนอาหาร PDA ด้วยวิธี หยดสปอร์บนอาหาร PDA ที่ 120 ชั่วโมง 51
4.3 ผลของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา ก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกบนอาหาร PDA หลังการบ่มสปอร์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 56
4.4 ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของเส้นใยหลังสปอร์ผ่านการบ่มด้วยสารละลาย โซเดียมไนโตรพลัสไซด์ในชั่วโมงที่ 48, 96 และ 168 61
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 0 ชั่วโมง 62
4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 63
4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการแช่ในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง 64
4.8 ผลของสารละลายโซเดียมไนไตทร์ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส ในพริกบนอาหาร PDA หลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง 70

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่

4.9 ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของเส้นใยหลังสปอร์ผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนไตร์ทในชั่วโมงที่ 48, 96 และ 168 75
4.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 0 ชั่วโมง 76
4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 77
4.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง 78
ตารางภาคผนวก ข 1 120
ตารางภาคผนวก ข 2 121

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและปัญหา

สารประกอบที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (reactive species) เป็นกลุ่มสารที่ไม่มีความเสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีและมีอายุสั้น เนื่องจากมีอิเล็กตรอนที่ขาดคู่อยู่ในวงรอบของอะตอม ส่งผลทำให้เกิดการแย่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของสารอื่น และส่งผลให้สารที่ถูกแย่งอิเล็กตรอนเกิดการแย่งจากสารอื่นเป็นลำดับ และส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ขึ้นในระบบ (อนันต์ สกุลกิม, 2551) ชนิดของโมเลกุลที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มของออกซิเจน (reactive oxygen species: ROS) และกลุ่มของไนโตรเจน (reactive nitrogen species: RNS) ซึ่งเรียกรวมกันว่า สารประกอบออกซิเจนและไนโตรเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen and nitrogen species: RONS) โดยระบบร่างกายของสิ่งมีชีวิต สารประกอบที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา เกิดขึ้นจากผลพลอยได้ของกระบวนการหายใจระดับเซลล์ที่เกิดขึ้นในออแกเนลล์ไมโทรคอนเดรียและการสังเคราะห์ด้วยแสงของคลอโรพลาสต์ในเซลล์พืช นอกจากนี้ระบบเซลล์ของสิ่งมีชีวิตยังสามารถสังเคราะห์สารประกอบออกซิเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาได้จากเอนไซม์ NADPH oxidase (Nox) และการสังเคราะห์สารประกอบไนโตรเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาชนิด Nitric oxide (NO) จากกิจกรรมของเอนไซม์ Nitric oxide synthase (NOS) (Graves, 2012, Heller and Tudzynki, 2011, Aguirre *et al.*, 2005)

บทบาทและหน้าที่ของสารประกอบที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาในสัตว์นั้น มีรายงานว่าทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ในการป้องกันการเข้าทำลายเชื้อโรค (immune system) การตายของเซลล์ (program cell death) การอักเสบของเนื้อเยื่อ (inflammation) (Prats *et al.*, 2008) ในพืชมีรายงานว่ามีบทบาทหน้าที่ในการเป็นสารส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (signaling molecule) ในกระบวนการต่าง ๆ ของพืช เช่น การตอบสนองต่อการตายของเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็ว (hypersensitive response: HR) การต้านทานความเครียด (stress tolerance) กระตุ้นการงอกของเมล็ด (seed germination activation) (Desikan *et al.*, 2004) การสังเคราะห์ฮอร์โมนพืช (plant hormones synthesis) การขยายขนาดของเซลล์ใบ (cell elongation) การพัฒนาของราก (root development) และการต่อต้านการบุกรุกเชื้อโรคในเซลล์พืช (pathogen defense) (Liu *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2010) บทบาทของสารประกอบที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาของเซลล์เชื้อรามีรายละเอียดที่ชัดเจนเฉพาะสารประกอบออกซิเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาโดยมี

ความสำคัญต่อการเจริญและพัฒนาของเชื้อรา (development and differentiation) และการก่อโรคในพืชอาศัย (pathogen infection) (Scott and Eaton, 2008) ในทางตรงกันข้ามกลไกการสังเคราะห์และบทบาทหน้าที่ของสารประกอบไนโตรเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาในเชื้อรามีรายละเอียดที่ค่อนข้างน้อย เนื่องจากไม่พบเอนไซม์ Nitric oxide synthase ที่ใช้ในการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ อย่างไรก็ตามมีกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารประกอบออกซิเจนและไนโตรเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาอาจมีวิถีที่เกี่ยวข้องกันต่อการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ของกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์เชื้อรา (Heller and Tudzynki, 2011)

รายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารประกอบไนโตรเจนที่ว่องไวปฏิกิริยาชนิดไนตริกออกไซด์มีบทบาทที่สำคัญต่อช่วงระยะการเจริญและการพัฒนาของกลุ่มเชื้อรา (Scott and Eaton, 2008) ไนตริกออกไซด์ที่ได้จากสารที่แตกตัวของสารเคมีที่เป็นตัวให้ (donor) มีบทบาทในการกระตุ้นการเกิดโครงสร้างอะแพรสโซเรียม (appressorium) ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญที่ช่วยให้เชื้อราเกิดการก่อโรคในพืช (Prats, *et al.*, 2008) และกระตุ้นหรือยับยั้งการงอกและการเจริญของโคนิเดียในเชื้อราสกุล *Colletotrichum* spp. ที่เป็นเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสในมะเขือเทศ (Wang and Higgins, 2005) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาบทบาทของสารไนตริกออกไซด์ต่อการเจริญและเปลี่ยนแปลงของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่มีการแพร่ระบาดในวงกว้างของพื้นที่ภาคเหนือ ซึ่งเป็นแหล่งปลูกพริกที่สำคัญรองจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (สุชีลา, 2557, นิพัฒน์ และคณะ, 2556) โดยมีเชื้อสาเหตุโรคจากเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* spp. โรคแอนแทรคโนสหรือโรคกุ้งแห้ง เป็นโรคที่ได้ทำความเสียหายต่อผลผลิตและคุณภาพของพริกมากถึง 80% โดยขึ้นอยู่กับความรุนแรงและการแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรค (Than *et al.*, 2008, Montri *et al.*, 2009) นอกจากนี้ในช่วงระยะของการติดเชื้อสาเหตุโรคในพืชอาศัย สารประกอบที่ว่องไวปฏิกิริยายังมีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ที่กระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญและพัฒนาของโครงสร้างอะแพรสโซเรียมของเชื้อสาเหตุโรคในการก่อโรคในพืช (Heller and Tudzynki, 2011, Wang and Higgins, 2005) ขณะเดียวกันสารประกอบที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาในพืชอาศัย (host plant) นั้นก็จะกระตุ้นระบบการต่อต้านเชื้อโรค (plant defense system) เพื่อไม่ให้เกิดการติดโรคหรือยับยั้งการเจริญและพัฒนาของเชื้อโรคไม่ให้สามารถก่อโรคในพืชได้ (Torres, 2010)

เพื่อให้เกิดความเข้าใจและสร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับบทบาทของสารประกอบที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาต่อการยับยั้งการเจริญและพัฒนาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อประเมินบทบาทของสารประกอบที่ว่องไวปฏิกิริยาทั้งในกลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนต่อการยับยั้งการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เชื้อรา

สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกที่ปลูกในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะในช่วงของการเกิดโครงสร้างอะแพรสโซเรียมซึ่งเป็นโครงสร้างหลักที่สำคัญในช่วงของการก่อโรคในพริก และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก การบรรลุวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้จะช่วยให้ทราบบทบาทและหน้าที่ที่สำคัญในของสารประกอบที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาในการยับยั้งการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ตลอดจนได้องค์ความรู้ใหม่เพื่อเข้าใจกลไกการก่อโรคของเชื้อสาเหตุโรค เพื่อหาแนวทางในการป้องกันการระบาดของเชื้อสาเหตุโรคต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาบทบาทของสารที่ว่องไวต่อปฏิกิริยากลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของโคนิเดียเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่พบในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

2.2 เพื่อศึกษาบทบาทของสารที่ว่องไวต่อปฏิกิริยากลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่พบในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

2.3 เพื่อประเมินบทบาทของสารที่ว่องไวต่อปฏิกิริยากลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่พบในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

2.4 เพื่อประเมินบทบาทของสารที่ว่องไวต่อปฏิกิริยากลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนต่อการพัฒนาของโครงสร้างอะแพรสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่พบในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 ทราบบทบาทของสารที่ว่องไวต่อปฏิกิริยากลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของโคนิเดียในเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่พบในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

3.2 ทราบบทบาทของสารที่ว่องไวต่อปฏิกิริยากลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่พบในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

3.3 ทราบบทบาทของสารที่ว่องไวต่อปฏิกิริยากลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่พบในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

3.4 ทราบบทบาทของสารที่ว่องไวต่อปฏิกิริยากลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนต่อการการเจริญและพัฒนาของโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่พบในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

3.5 ได้องค์ความรู้ใหม่ทางวิชาการ เพื่อใช้เป็นแนวทางการพัฒนางานวิจัยให้ทันต่อความก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

3.6 นำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการหรือการตีพิมพ์บทความในวารสารระดับชาติหรือนานาชาติ

1.4 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาบทบาทของสารที่ว่องไวปฏิกิริยากลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญและเปลี่ยนแปลงของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่พบการแพร่ระบาดในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยแผนงานวิจัยนี้เลือกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส ชนิด *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคที่ทำความเสียหายให้กับเกษตรกรที่ปลูกพริกเป็นวงกว้าง โดยในการศึกษาครั้งนี้มีความต้องการที่จะทดสอบสารประกอบที่ว่องไวปฏิกิริยาชนิดต่างๆ ทั้งที่มีอะตอมของออกซิเจนและไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไนตริกออกไซด์ (NO) มาใช้ในการทดสอบเพื่อศึกษาบทบาทของสารดังกล่าวในการกระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเส้นใยและการเกิดโครงสร้างอะแพรสโซเรียมในเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกซึ่งเป็นโครงสร้างหลักที่ใช้ในการก่อโรคในพืช ตลอดจนตรวจสอบบทบาทของสารที่ว่องไวปฏิกิริยาชนิดต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวภายนอกของเซลล์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

1.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการโรคพืช (ST-303) และห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ (ST-206) และห้องปฏิบัติการวิจัยสมุนไพร (ST-107) อาคารปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ

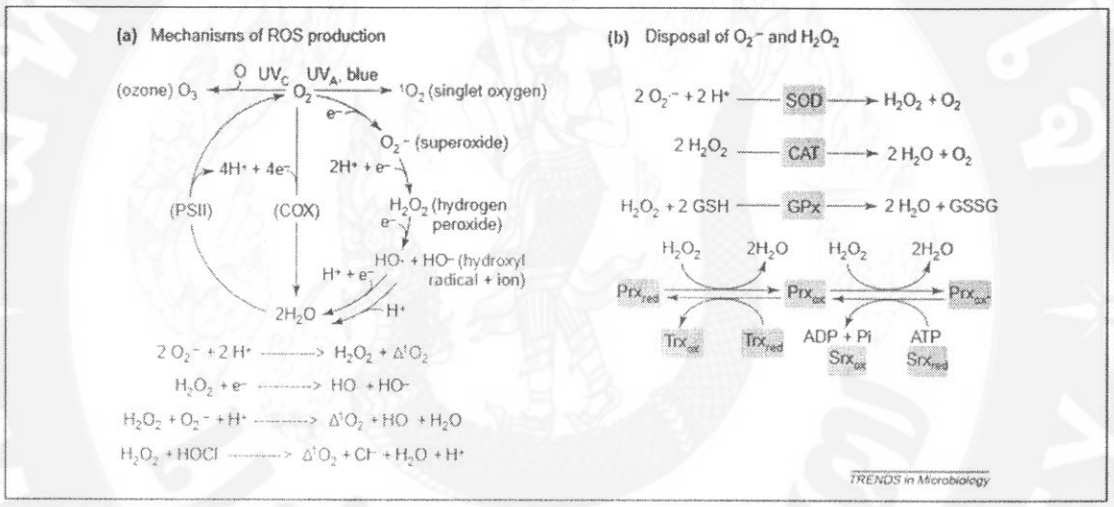
บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรมและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 บทบาทความสำคัญของสารประกอบที่ว่องไวปฏิกิริยาต่อกระบวนการทางชีววิทยา

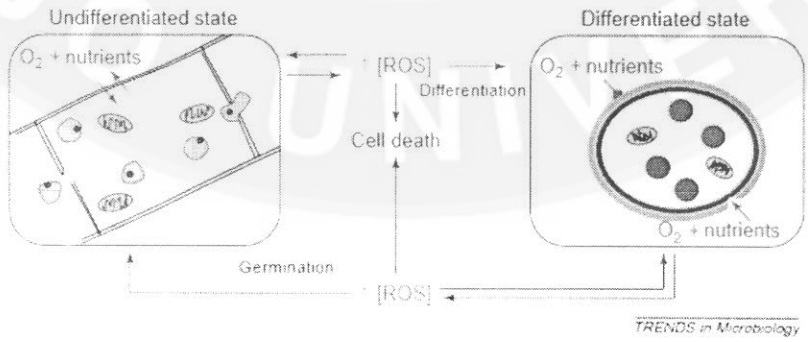
สารประกอบที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (reactive species) เป็นกลุ่มสารที่ไม่มีความเสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีและมีอายุสั้น เนื่องจากมีอิเล็กตรอนที่ขาดคู่อยู่ในวงรอบของอะตอม ส่งผลทำให้เกิดการแย่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของสารชนิดอื่น และทำให้สารที่ถูกแย่งอิเล็กตรอนเกิดการแย่งอิเล็กตรอนจากสารชนิดอื่นเป็นลำดับ และส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ขึ้นในระบบ (อนันต์, 2551) ชนิดของสารประกอบที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตที่สำคัญประกอบด้วยสารว่องไวปฏิกิริยาในกลุ่มหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มของออกซิเจน (reactive oxygen species: ROS) อาทิเช่น superoxide (O^{-}_{2}), hydroxyl radical (OH), hydrogen peroxide (H_2O_2) และกลุ่มของไนโตรเจน (reactive nitrogen species: RNS) อาทิเช่น nitric oxide, nitrogen dioxide (NO_2), nitrate radical (NO_3) ซึ่งเรียกรวมกันว่าสารประกอบออกซิเจนและไนโตรเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen and nitrogen species: RONS) (Graves, 2012) โดยทั่วไปแล้วในระบบของร่างกายของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะพบทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สามารถผลิตสารประกอบออกซิเจนที่ว่องไวปฏิกิริยาที่ได้จาก 2 วิถีหลัก คือ เกิดจากผลพลอยได้ (by product) จากปฏิกิริยาการสลายสารชีวโมเลกุลในระดับเซลล์ของกระบวนการหายใจที่เกิดขึ้นในออกาเนลล์ไมโทคอนเดรีย (respiration process) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และเกิดขึ้นได้จากการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase (Nox) ซึ่งพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตทั้งสัตว์ พืช และเชื้อรา (Aguirre *et al.*, 2005) ในส่วนของกลไกการสังเคราะห์สารและปฏิกิริยาที่เกิดกับสารอื่นในกลุ่มสารประกอบออกซิเจนที่ว่องไวปฏิกิริยา แสดงในภาพที่ 2.1

โดยสารประกอบออกซิเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยามีบทบาทหน้าที่ที่สำคัญในหลาย ๆ กระบวนการทางชีววิทยา เช่น ระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต (immune system) การเจริญเติบโต (growth and development) กระบวนการเมตาบอลิซึมของฮอร์โมน (hormones metabolism) และการแก่และตายของเซลล์ (senescence and cell death) (Scott and Eaton, 2008) ซึ่งบทบาทของสารประกอบออกซิเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาที่พบในเชื้อราก่อโรคนั้นมีความแน่ชัดในการเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเชื้อราก่อโรคหลายชนิด ตลอดจนการเหนี่ยวนำให้เซลล์ของเชื้อราเข้าสู่กระบวนการตายของเซลล์ (program cell death) ซึ่งเกิดได้ทั้งกระบวนการ apoptosis-like cell death และ necrosis โดยขึ้นอยู่กับปริมาณของ

สารประกอบออกซิเจนที่ว่องไวปฏิกิริยาที่เซลล์ได้รับจากภายนอกหรือกระบวนการผลิตขึ้นภายในเซลล์ อย่างไรก็ตามในระบบร่างกายของสิ่งมีชีวิตยังมีระบบลดหรือปรับระดับของปริมาณของสารประกอบออกซิเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาที่เซลล์ผลิตขึ้นให้มีความเหมาะสมและไม่เป็นอันตรายแก่เซลล์ โดยมีระบบของเอนไซม์ในกลุ่มเปอร์ออกซิเดส (peroxidase), คะตะเลส (catalase), กลูตาไธโอน ซินเทส (glutathione synthase; GSH) ซึ่งเรียกระบบนี้ว่า ระบบแอนตี้ออกซิแดน (antioxidant system) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Aguirre *et al.*, 2005) โดยกระบวนสร้างและสลายสารในกลุ่มว่องไวปฏิกิริยานั้นจะต้องมีความสัมพันธ์กันในการกำหนดปริมาณของสารที่ถูกผลิตขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต กลไกการทำงานของสารประกอบที่ว่องไวปฏิกิริยาที่พบในกลุ่มของเชื้อรา แสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.1 กลไกการสังเคราะห์สารประกอบที่ว่องไวปฏิกิริยาในกลุ่มโมเลกุลของออกซิเจนและกลไกการสลายสารว่องไวปฏิกิริยาด้วยระบบกลุ่มของเอนไซม์ที่พบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (ที่มาภาพ: Aguirre et al., 2005)



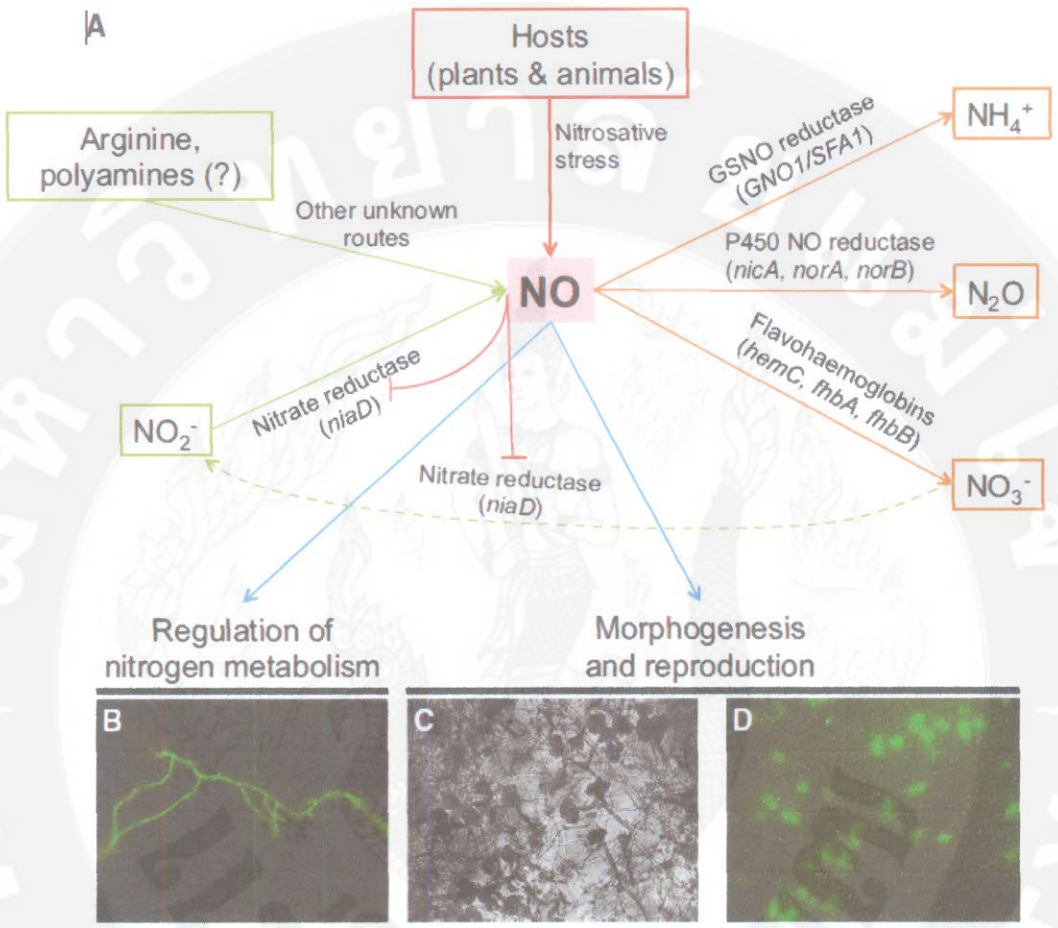
ภาพที่ 2.2 บทบาทของสารว่องไวปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในกลุ่มเชื้อรา (ที่มาภาพ: Aguirre *et al.*, 2005)

ส่วนบทบาทและหน้าที่ของสารประกอบไนโตรเจนที่ว่องไวปฏิกิริยาทางระบบชีววิทยานั้น มีรายงานว่าทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณที่สำคัญภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ เช่นเดียวกับสารว่องไวปฏิกิริยาในกลุ่มของออกซิเจน โดยเฉพาะในพืชทำหน้าที่เป็นสัญญาณที่สำคัญที่ทำงานร่วมกับสารว่องไวปฏิกิริยาในกลุ่มของออกซิเจนในการกระตุ้นระบบการต้านทานของเชื้อโรคของพืช (defense system) (Nanda *et al.*, 2010) ส่วนเชื้อก่อโรคในกลุ่มของเชื้อราพบว่า สารประกอบไนโตรเจนที่ว่องไวปฏิกิริยาชนิดไนตริกออกไซด์ นั้นมีบทบาทสำคัญในการช่วยกระตุ้นในการเจริญของโคนิเดียของเชื้อรา แต่ข้อมูลของบทบาทดังกล่าวยังมีรายละเอียดที่ไม่แน่ชัด เนื่องจากเชื้อราไม่มีเอนไซม์ nitric oxide synthase (Nos) ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สารประกอบของไนโตรเจนที่ว่องไวปฏิกิริยาชนิดไนตริกออกไซด์จากสารตั้งต้น คือ กรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) จากหลายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเซลล์ของเชื้อราชนิด *Blumeriagraminis* ที่ได้รับสารเคมีที่แตกตัวให้โมเลกุลของไนตริกออกไซด์ (nitric oxide donors) จากปฏิกิริยาทางเคมีนั้น มีบทบาทที่สำคัญในการกระตุ้นการพัฒนาของโครงสร้างอะแพรสโซเรียม (Prats *et al.*, 2008) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สำคัญที่เชื้อราใช้ในการก่อโรคในพืช ขณะเดียวกันก็พบว่าสารเคมีที่แตกตัวให้โมเลกุลของไนตริกออกไซด์นั้น ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและความมีชีวิตของเชื้อราชนิด *Aspergillus fumigatus* (Kunert, 1995) และ Wang and Higgins (2005) ได้รายงานว่าสารไนตริกออกไซด์ ที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาของสารเคมีที่ให้โมเลกุลดังกล่าว มีบทบาทที่สำคัญต่อการยับยั้งและกระตุ้นการงอกและการเจริญของโครงสร้างโคนิเดียในเชื้อราสกุล *Colletotrichum* spp. ที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในมะเขือเทศ

2.2 กลุ่มของสารว่องไวปฏิกิริยาและโครงสร้าง

ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO) หรือไนโตรเจนออกไซด์ หรือไนโตรเจนมอนอกไซด์ เป็นโมเลกุล ที่มีสูตรทางเคมีเป็น NO เป็นสารอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปของก๊าซ สามารถเคลื่อนที่ได้ดีในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตในส่วนที่บริเวณที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ และมีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม โดยสารไนตริกออกไซด์เป็นผลพลอยได้ของการเผาไหม้สารอินทรีย์ในที่มีในอากาศ เช่น เครื่องยนต์ โรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้เชื้อเพลิงจากฟอสซิล และเกิดขึ้นตามธรรมชาติระหว่างการเกิดฟ้าผ่า พืชสามารถสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ ขึ้นได้โดยวิถีกระบวนการสร้างและสลายที่ใช้กรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) หรือไนไตรต์ (nitrite) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องที่สำคัญในพืช ได้แก่ เอนไซม์ไนเตรท รีดัคเตส (nitrate reductase; NR) ซึ่งทำหน้าที่ในการเปลี่ยนไนไตร์ทให้เป็นไนตริกออกไซด์ โดยมีโมลิบดินัมเป็นโคแฟกเตอร์ (ภาพที่ 2.3) เอนไซม์อีกตัวหนึ่งที่เกี่ยวข้องคือเอนไซม์ซานทีน ออกซิโดรีดัคเตส (xanthine oxidoreductase) ซึ่งมีโมลิบดินัมและโคบอลต์เป็นองค์ประกอบอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มสารเคมีบางชนิดเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำแล้วสามารถที่จะปลดปล่อยโมเลกุลของไนตริกออกไซด์ออกมาได้ เช่น สารโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ สารโซเดียมไนไตร์ท (Kunert, 1995) ซึ่งเป็นที่ทราบ

กันดีว่าสารไนตริกออกไซด์มีบทบาทที่สำคัญต่อสิ่งมีชีวิต โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตในหลายๆ กระบวนการ



ภาพที่ 2.3 กลไกการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์บทบาทในเชื้อรา

ที่มาภาพ; Canovas et al., 2016, Current Genetics, 62, 513–518.

ในส่วนของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide; H_2O_2) เป็นสารประกอบเปอร์ออกไซด์ หรือสารที่ประกอบด้วยออกซิเจนสองตัวและเชื่อมกันด้วยพันธะเดี่ยว มีสภาพเป็นของเหลวใส หนืดกว่าน้ำเล็กน้อย มีรสขม ไม่อยู่ตัว ซึ่งสามารถสลายตัวเป็นออกซิเจนกับน้ำ เมื่อเจือจางจะเป็นสารละลายไม่มีสี และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์สามารถสลายตัวเป็นน้ำได้เมื่อถูกแสงและความร้อน โดยยจะพบว่าสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยปกติไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะสามารถสลายตัวไปเองอย่างช้า ๆ ซึ่งจะได้เป็นน้ำและแก๊สออกซิเจน โดยปัจของแสงและความร้อนจะช่วยเร่งให้เกิดการสลายตัวเร็วขึ้น นอกจากนี้หากมีส่วนผสม

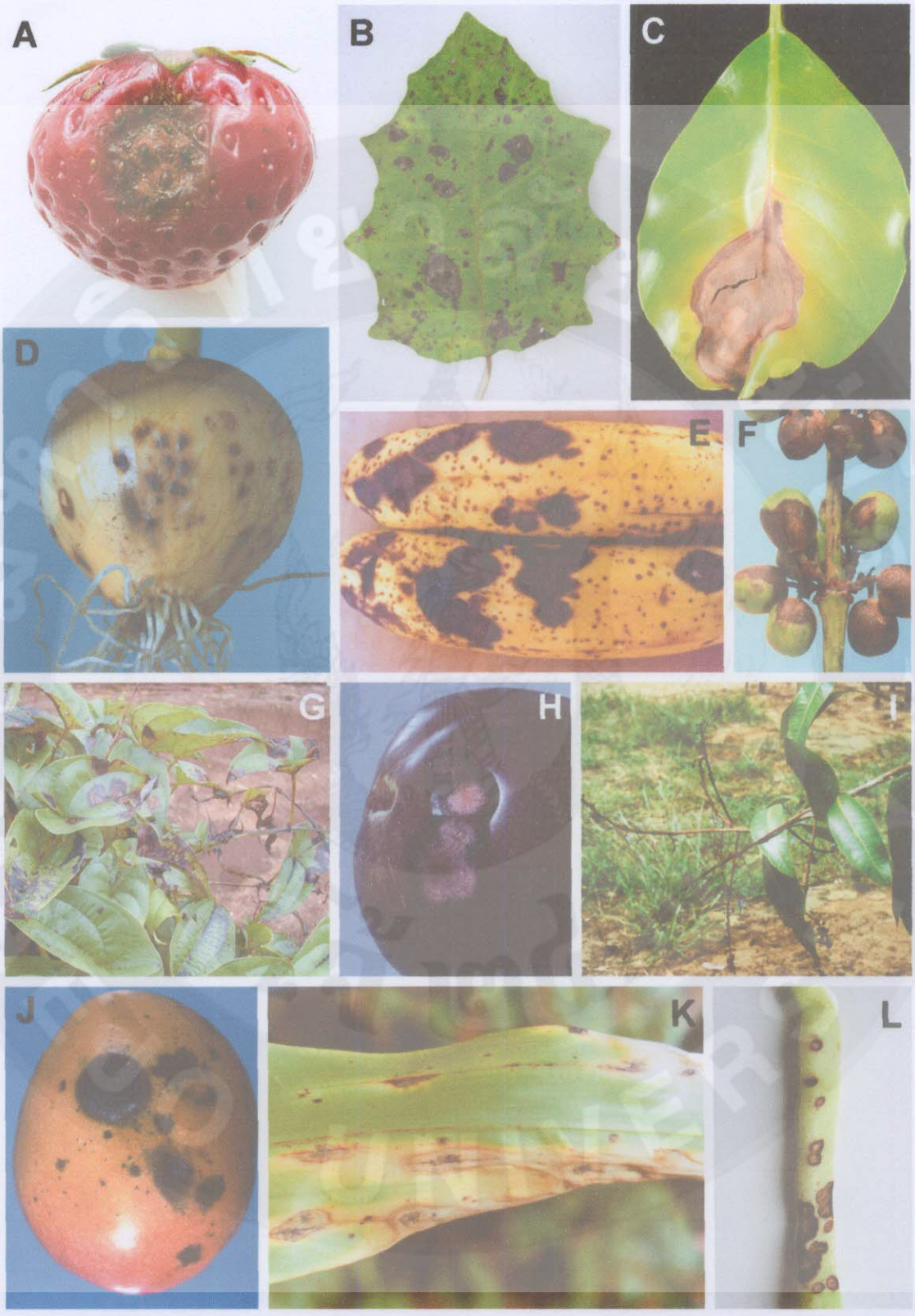
ของโลหะ โดยเฉพาะเหล็ก แมงกานีส ทองแดง จะทำให้เกิดการสลายตัวเร็วยิ่งขึ้น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีปฏิกิริยาการสลายตัวดังนี้

$$2\ H_2O_2\ (aq) \longrightarrow 2H_2\ O(l) + O_2\ (g)$$

ประโยชน์โดยทั่วไปสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะอยู่ในรูปสารละลายความเข้มข้นตั้งแต่ 3 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ มักใช้เป็นสารฟอกสีในอาหาร สารทำความสะอาด น้ำยาฆ่าเชื้อ ใช้ฆ่าเชื้อโรคบนผิวหนัง ใช้ล้างภาพสีน้ำมันเก่า ๆ ให้สดใสขึ้น ทำน้ำยาบ้วนปาก และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงขับเคลื่อนจรวด ในการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ล้างแผล จะใช้ในฐานะยาที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้ออ่อน ๆ เฉพาะที่ เช่น บาดแผลเล็ก ๆ แต่อาจเกิดผลข้างเคียงจากความเป็นพิษ (Cytotoxic) ซึ่งรบกวนการสมานแผล ทำให้แผลแสบ และระคายเคือง เนื่องจากสารไฮโดรเจนเปอร์เป็นสารออกซิไดซ์ที่แรง โดยมีสมบัติสามารถฟอกสี และฆ่าเชื้อโรคได้ดี ดังนั้นจึงนิยมนำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ตัวอย่างเช่น นำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นส่วนผสมในการผลิตน้ำยากัดสีผม ย้อมสีผม ยาสีฟัน อุตาสหกรรมฟอกหนัง เพื่อฟอกสี หรือนำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นส่วนผสมหลักในน้ำยาล้างแผลเพื่อฆ่าเชื้อโรค (ศิริวรรณ และคณะ, 2557) ศศิลภัส และคณะ (2557) ได้ศึกษาประสิทธิผลของไอสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หลังจากการอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศของห้องผ่าตัด ปัจจุบันมีการใช้การอบฆ่าเชื้อด้วยไอของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นการฆ่าเชื้อเชิงรุกสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อราต่าง ๆ รวมถึงสปอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกทั้งกระบวนการอบฆ่าเชื้อด้วยไอของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ใช้เวลาไม่นานและจะสลายตัวเหลือแต่น้ำกับออกซิเจนซึ่งจะไม่เหลือสิ่งตกค้างในสิ่งแวดล้อมจึงไม่มีปัญหาการระคายเคืองและไม่มีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็ง ปัจจุบันจึงมีการใช้วิธีการอบฆ่าเชื้อด้วยไอของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในห้องผลิตยา ห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อ ห้องไอซียู ห้องผ่าตัด สุรัตน์ และคณะ (2557) ได้รายงานว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิด *Bacillus cereus* ได้ Edward (1980) ได้รายงานว่าสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่ำร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในนมพาสเจอไรซ์ ผลการทดลองพบว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้ทั้งหมดและโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่พบได้

2.3 ความสำคัญและปัญหาของโรคแอนแทรคโนส

โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose disease) หรือโรคกุ้งแห้ง เป็นโรคที่มีการระบาดอย่างแพร่ในหลายพื้นที่ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทย ซึ่งมีเชื้อสาเหตุโรคจากกลุ่มของเชื้อราที่อยู่ในสกุล *Colletotrichum* ssp. เป็นโรคที่มีการระบาดในวงกว้างและสร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจของประเทศได้หลายชนิดด้วยกัน เช่น ธัญพืช ถั่ว ไม้ผล และพืชผัก (Than *et al.*, 2008) (ภาพที่ 2.4) ซึ่งพริก (*Capsicum* spp.) เป็นพืชที่อยู่ในกลุ่มของพืชผักที่มีคุณค่าและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย และมีพื้นที่ปลูกมากที่สุดในเขตทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมาคือภาคเหนือของประเทศไทย โดยขึ้นอยู่กับพันธุ์ของพริกที่ใช้ปลูก (สุชีลา, 2557) โดยพบว่าพริกเป็นพืชผักเศรษฐกิจที่สำคัญของจังหวัดที่ตั้งในเขตของภาคเหนือตอนบน ที่มีแหล่งผลิตที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แพร่ และน่าน ซึ่งเกษตรกรมีการปลูกทั้งพริกชี้ฟ้าและพริกขี้หนูผลใหญ่ เนื่องจากปริมาณและคุณภาพผลผลิตพริกขึ้นกับสภาพพื้นที่ที่ปลูก พันธุ์พริก และสภาพอากาศของพื้นที่ จึงทำให้การปลูกพริกในภาคเหนือตอนบนมักประสบปัญหาผลผลิตเสียหาย และผลผลิตด้อยคุณภาพ เนื่องจากมีสภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการระบาดของโรคและแมลง ส่งผลทำให้ผลผลิตพริกต่อพื้นที่มีจำนวนลดลง ส่งผลทำให้เกษตรกรขายพริกได้ในราคาต่ำ และผู้รวบรวมผลผลิตพริกยังไม่สามารถรวบรวมได้ตามปริมาณที่ต้องการ โดยเฉพาะปริมาณของพริกที่ใช้ในการแปรรูป ซึ่งโรงงานแปรรูปได้กำหนดคุณภาพของพริกที่จะรับซื้อ (นิพัฒน์ และคณะ, 2556) โดยผลผลิตของพริกที่ปลูกในประเทศไทยได้รับความเสียหายจากการระบาดของโรคแอนแทรคโนสมากถึง 80% (Montri *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามโรคแอนแทรคโนสในพริกมีเชื้อราสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคอย่างน้อย 4 ชนิดด้วยกัน ซึ่งเป็นเชื้อราที่อยู่ในสกุล *Colletotrichum* ssp. ประกอบด้วยเชื้อราชนิด *C. gloeosporioides, C. acutatum, C. capsici* และ *C. coccodes* โดยมีรายงานว่ามีเชื้อโรคชนิดหลักจำนวน 2 ชนิด คือ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่ทำความเสียหายให้กับพริกที่ปลูกในประเทศไทยเป็นจำนวนมากที่สุด (Pakdeevaraporn *et al.*, 2005)



ภาพที่ 2.4 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสที่ทำความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจ

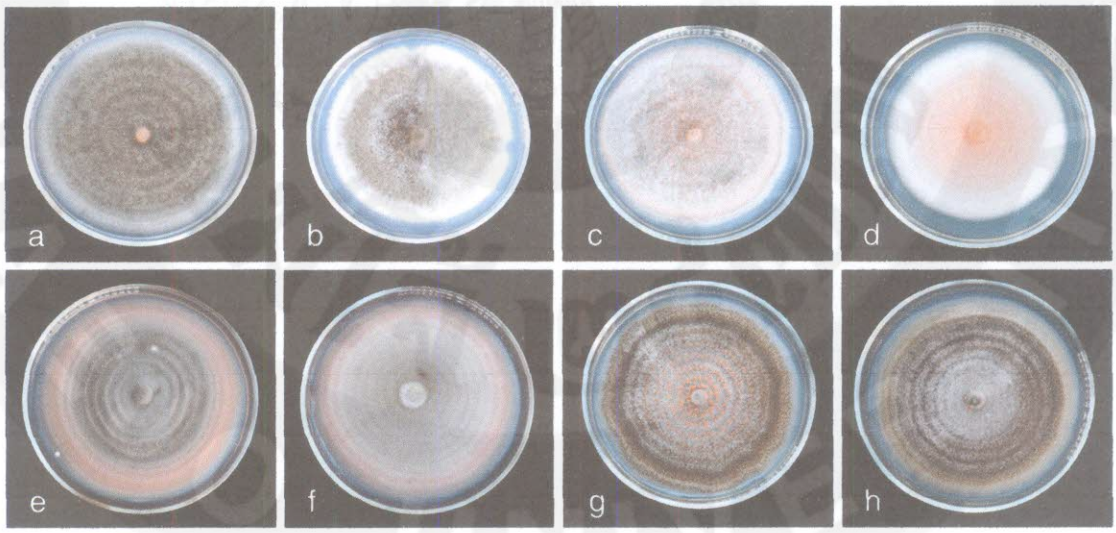
ที่มาภาพ Cannon et al., (2012) Studies in Micology 73, 181–213.

2.4 ระบบการจัดจำแนกเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส

ในระบบการจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่อยู่ในสกุล *Colletotrichum* ssp. ที่ก่อโรคในพืชนั้น ตามหลักของอนุกรมวิธานทางเชื้อราจากบทความวิจัยของ Than *et al.* (2008) สามารถจำแนกเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพืชโดยมีรายละเอียดดังนี้

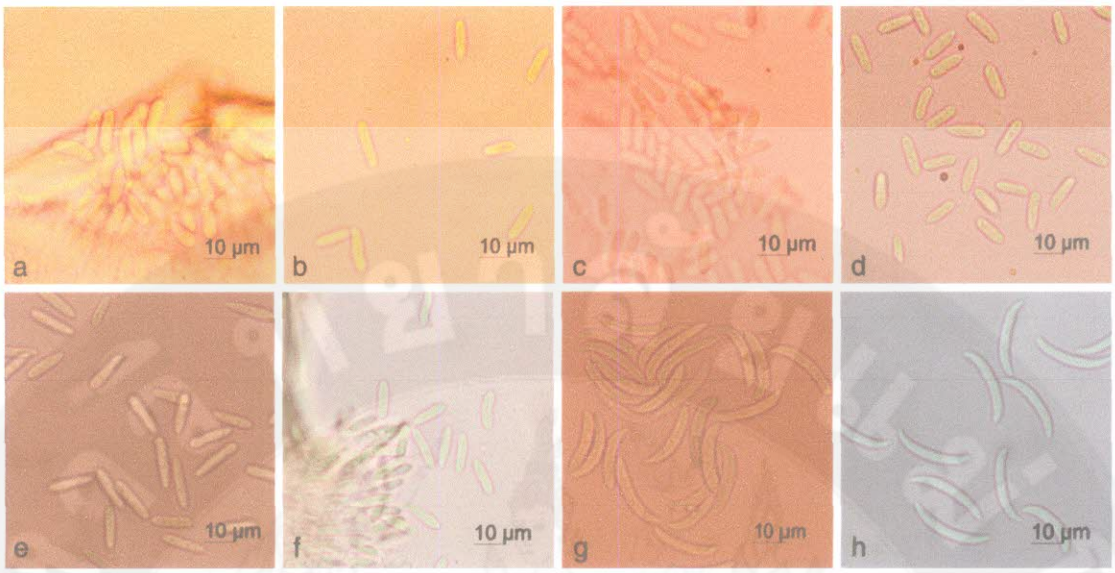
Kingdom Fungi
Phylum Ascomycota
Class Sordariomycetes
Order Phyllachorales
Family Phyllachoraceae
Genus *Colletotrichum*

โดยพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในจีนัส *Colletotrichum* จำนวน 4 ชนิด คือ *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. acutatum* และ *C. capsici* มีลักษณะดังภาพ ที่ 2.5 และ 2.6



ภาพที่ 2.5 ลักษณะของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกในจีนัส *Colletotrichum* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *C. gloeosporioides* (a และ b) *C. siamense* (c และ d) *C. acutatum* (e และ f) *C. capsici* (g และ h)

ที่มาภาพ; Suwannarat et al., (2017), Mycologia Progress, 16, 677–686.



ภาพที่ 2.6 ลักษณะของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกในจีนัส *Colletotrichum* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *C. gloeosporioides* (a และ b) *C. siamense* (c และ d) *C. acutatum* (e และ f) *C. capsici* (g และ h)

ที่มาภาพ; Suwannarat et al., (2017), Mycologia Progress, 16, 677-686.

2.5 กลไกการเข้าทำลายพริกของเชื้อราสาเหตุ

การเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก สามารถเข้าทำลายและสร้างความเสียหายให้กับพริกทั้งที่ปลูกในสภาพแปลงและระยะหลังการเก็บเกี่ยว นอกจากนี้เชื้อสาเหตุยังสามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะของการเติบโตของต้นพริก โดยอาการของโรคโดยทั่วไปจะมีลักษณะเป็นแผลจุด (spot) และแห้งตาย (blight) จากนั้นแผลจะขยายใหญ่ขึ้นและมีจุดสีดำเล็ก เรียงซ้อนเป็นวง ภายในจะมีของเหลวสีส้มหรือสีดำ ที่มีโคนิเดียของเชื้อสาเหตุโรคอยู่เป็นจำนวนมาก อาการของโรคแอนแทรคโนสเมื่อเชื้อสาเหตุเข้าทำลายใบ จะส่งผลให้เกิดอาการใบร่วงและเกิดการแห้งตายของใบยอดลงมา (die-back) ถ้าเชื้อเข้าทำลายในระยะผลอ่อน เนื้อเยื่อของผลในบริเวณที่ติดเชื้อจะหยุดการเจริญ แต่เนื้อเยื่อในบริเวณอื่นจะเจริญต่อไป ส่งผลให้ผลของพริกมีลักษณะโค้งงอ จึงทำให้เรียกโรคที่มีลักษณะแบบนี้ว่า โรคกุ้งแห้ง ขณะเดียวกันยังพบว่าเชื้อสาเหตุโรคจะแสดงอาการของโรคในผลพริกที่แก่จัดและมีสีแดงมากกว่าในผลพริกที่มีสีเขียว เนื่องจากพริกที่มีสีเขียวจะสามารถสังเคราะห์ capsicannol ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ phytoalexin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของโคนิเดียและเส้นใยของเชื้อราได้ ในขณะที่พริกที่แก่จัดที่มีสีแดงนั้น ความสามารถในการสังเคราะห์สารดังกล่าวจะลดลงและมี

ปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค ส่งผลทำให้เกิดการแสดงอาการของโรคที่รุนแรง นอกจากนี้เชื้อสาเหตุโรคชนิด *C. capsici* สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ 2 ทาง คือ (1) การเจริญของเชื้อสาเหตุโรคมีการเจริญไปตามแกนกลางของผลสู่รก (placenta) โดยเชื้อสาเหตุจะติดอยู่บริเวณเนื้อเยื่อเปิดของเมล็ด และการเจริญของเชื้อสาเหตุจากบริเวณที่ติดเชื้อกระจายเข้าสู่เปลือกของเมล็ด (seed coat) และ (2) การเจริญของเชื้อราอยู่ที่ผิวของเอนโดสเปิร์ม (endosperm) โดยเมล็ดที่ติดเชื้อสาเหตุโรคจะยับยั้งการงอกของเมล็ด และส่งผลให้อัตราการงอกของเมล็ดต่ำลง (ปัทมวรรณ, 2556 และ ทิวาพร, 2556) ลักษณะอาการของพริกที่ติดโรคแอนแทรคโนส แสดงในภาพที่ 2.7 และ 2.8

ภาพที่ 2.7 อาการของโรคแอนแทรคโนสที่ก่อโรคบนผลพริกสีเขียวและสีแดงที่เกิดขึ้นในแปลง

ที่มาภาพ: http://picdb.thaimisc.com/s/sanguanmaejo25/837-101.jpg

http://www.oknation.net/blog/home/album_data/46/40046/album/34799/images/310987.jpg

ภาพที่ 2.8 อาการของโรคแอนแทรคโนสที่ก่อโรคบนผลพริกสีแดงหลังการปลูกเชื้อ

ที่มาภาพ; Suwannarat et al., (2017), Mycologia Progress, 16, 677-686.

โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) หรือที่ชาวบ้าน เรียกว่าโรคกุ้งแห้งเป็นโรคที่สำคัญที่สุดโรคหนึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลพริกในแปลงปลูก และภายหลังเก็บเกี่ยวแล้วในระหว่างการขนส่งหรือการวางตลาด (บุญญวดี, 2540) โดยเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส

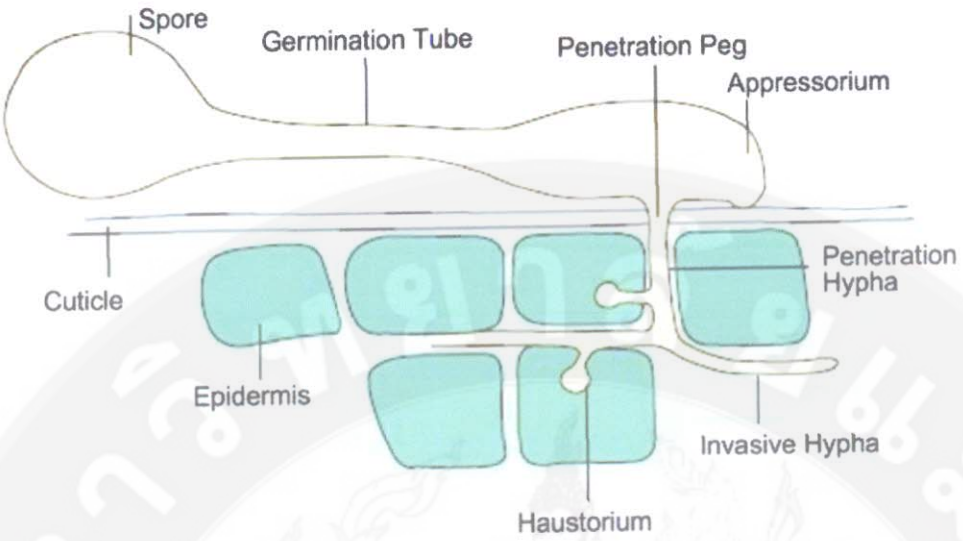
สามารถเจริญเติบโตได้ดีและเข้าทำลายพริกได้มากในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 28-32 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 95 เปอร์เซนต์ขึ้นไป หากมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการพัฒนาของโรค เช่น การมีน้ำค้างหรือฝนตกติดต่อกันหลายวันและผลพริกกำลังเจริญเติบโต จะทำให้เชื้อโรคเกิดการพัฒนาของอาการโรคอย่างรวดเร็ว ทำให้ผลพริกจะร่วงก่อนสุกหรือก่อนแก่เต็มที่หรืออาจเน่าทั้งผล ทำให้ได้ผลผลิตลดลงและมีคุณภาพต่ำ (ศักดิ์, 2537) โดยเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ จากการสร้างสปอร์บนก้านสั้นภายใน fruiting body ที่มีลักษณะเป็นรูปถ้วย (acervulus) โดยจะมองเห็นเป็นจุดดำเรียงซ้อนกัน เป็นวงบนแผล เมื่อสปอร์แก่จะดันเปลือกด้านบน fruiting body ให้แตกแล้วหลุดออกมาข้างนอก และเกิดการปลิวแพร่กระจายไปตามลม น้ำที่ สาดกระเซ็น แมลง เครื่องมือด้านเกษตรกรรม และสิ่งเคลื่อนไหวทุกชนิดที่ไปสัมผัส (ศักดิ์, 2537) เมื่อสปอร์ตกลงบนชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ดอก ก้านดอก ลำต้น และผล หากมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค สปอร์ของเชื้อราจะเกิดการงอกของ germ tube และมีการพัฒนาของโครงสร้างอะเพลสโซเรียม (appressorium) ในการเข้าทำลายพืชโดยตรง หลังจากนั้นเชื้อราจะเพิ่มปริมาณขยายพันธุ์ภายในชั้นของผนังเซลล์ (epidermal cell wall) เป็นสาเหตุทำให้เนื่อเยื่อพืชเกิดการตาย และแสดงอาการของโรค ในระยะเดียวกันนี้เชื้อราจะมีการสร้างสปอร์จำนวนมาก ในชั้นขอเพิเดอมิส (epidermis) ส่งผลทำให้ผิวพืชเกิดรอยแตกและมี acervulus ปรากฏขึ้น อย่างไรก็ตามหากเชื้อราอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เชื้อราจะงอก germ tube และสร้าง อะเพลสโซเรียมเกาะติดผิวพืชไว้จนกว่าสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการแสดงออกของโรค ทำให้เกิดกระบวนการเข้าทำลายพืชต่อไป (ปริฉัตร, 2549)

2.6 การแพร่ระบาดและวงชีวิตของเชื้อโรค

ปัจจัยของสภาพภาพแวดล้อมที่เหมาะต่อการระบาดของเชื้อสาเหตุโรค โดยทั่วไปแล้วเชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยการปลิวไปตามกระแสลม หรือแมลง หรือการชะล้างจากฝนของเชื้อสาเหตุจากต้นพริกที่เป็นโรค ถูกส่งต่อไปยังต้นพริกที่ไม่เป็นโรค เมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการก่อโรคได้ดีคือ อุณหภูมิที่อยู่ในช่วงระหว่าง 28-32 °C และมีความชื้นสัมพัทธ์สูงมากกว่าร้อยละ 95 โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนนั้น ซึ่งเป็นช่วงที่ทำให้เชื้อสาเหตุโรคสามารถเจริญและแพร่ระบาดได้ดีที่สุด (ทิวาพร, 2556) โดยในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกถ้ามีโรคแอนแทรคโนสระบาดในระยะผลแก่ใกล้เก็บเกี่ยวอาจมีเชื้อราสาเหตุโรคติดไปกับเมล็พันธุ์ โดยติดที่บริเวณเปลือกหุ้ม (seed coat) ของเมล็ด ซึ่งเชื้อที่ติดไปกับเมล็ดพันธุ์นั้นเชื้อราสาเหตุโรคสามารถอยู่บนเมล็ดพันธุ์ได้นานประมาณ 9 เดือน ทำให้โรคสามารถระบาด

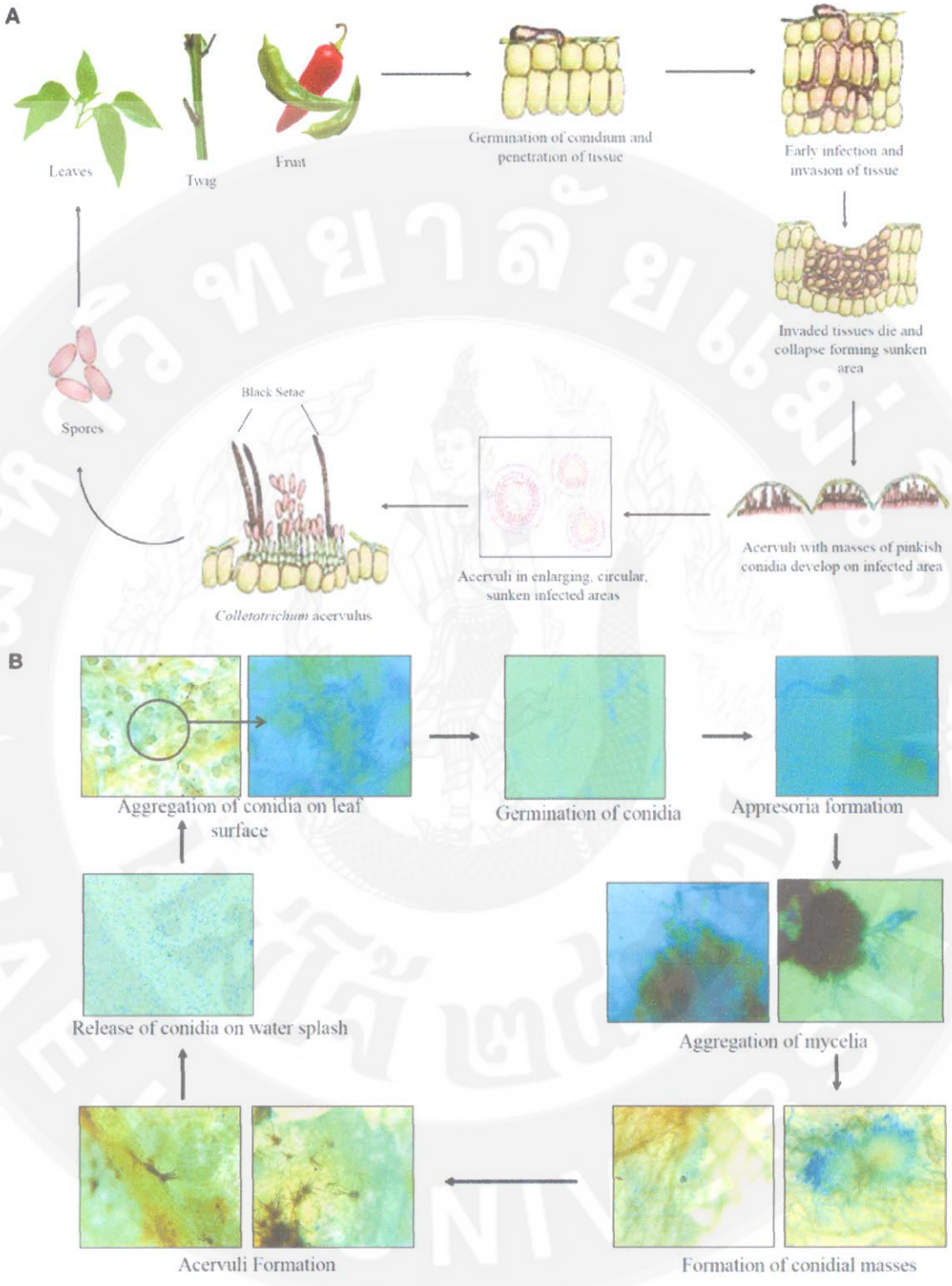
ไปได้ไกล และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ที่มีเชื้อติดอยู่ไปปลูก ทำให้มีโอกาสเกิดการระบาดของเชื้อโรคในแปลงจะค่อนข้างสูงและเชื้อยังสามารถอยู่บนเศษซากพืชที่เป็นโรคได้นานถึง 3 ปี อีกด้วย

ลักษณะทั่วไปและการเข้าทำลายของเชื้อราชนิด *C. gloeosporioides* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสกับพืชได้หลายชนิดด้วยกัน โครงสร้างของเส้นใยเชื้อราจะมีผนังกั้นตามขวาง (septate hypha) แบ่งเซลล์เป็นห้อง ๆ จัดเป็นลักษณะทั่วไปของราชั้นสูง มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยการสร้างโคนิเดีย (conidia) ใน fruiting body แบบ acervulus อยู่ภายใต้ชั้นผิว (epidermis) ของพืช เมื่อแก่โคนิเดียจะดันชั้นของเอพิเดอมิสของพืชให้แตกออก จากนั้นโคนิเดียจะถูกปล่อยออกมาเป็นกลุ่ม (conidial mass) ที่มีลักษณะเป็นสีครีม สีส้มอ่อน หรือสี ชมพูอ่อน ไม่สร้าง setae ลักษณะ conidium เป็นเดี่ยว มีรูปร่างยาวรีคล้ายรูปไข่หัวท้ายมน ไม่มีสี ผนังบาง เมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม มีความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 95 – 97% อุณหภูมิช่วง 20 – 30 $^{\circ}$ C โคนิเดียสามารถงอกได้ (Jeffries and Koomen, 1992) เชื้อราชนิด *C. gloeosporioides* สามารถแพร่กระจาย โดยการอาศัยลม น้ำฝน หรือแมลง เมื่อโคนิเดียตกลงบนผิวพืชจะมีเมือกเหนียวช่วยยึดเกาะกับผิวพืช เส้นใยเริ่มงอกภายใน 2 ชั่วโมง จากนั้นในชั่วโมงที่ 6 – 9 จะเริ่มเกิดการสร้างอะเพลสโซเรียม (Kuo, 1999) โครงสร้างนี้อาจคงลักษณะนี้อยู่จนถึงระยะที่ผลผลิตสุกจึงเป็นระยะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้จากนั้นจึงจะมีการงอกของส่วน infection peg เพื่อแทงเข้าสู่ชั้นผิวโดยเอนไซม์ cutinase ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายคิวติเคิล (cuticle) บริเวณผิวของผลพริก สร้างโครงสร้างที่ใช้ในการดูดซึมอาหารจากพืช (haustorium) ที่มีความลึกประมาณ 2 – 3 ชั้นผิว ภาพที่ 2.9 และภาพวงจรชีวิตของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก ดังภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.9 กลไกการเข้าทำลายของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

ที่มาภาพ Meng et al., 2009, BMC Microbiology, 9 (Suppl 1): S7



ภาพที่ 2.10 วงจรชีวิตของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

ที่มาภาพ Saxena et al. (2016) Front. Microbiol. 7; 1527.

2.6 การป้องกันกำจัดโรค

เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides* **มีพืชอาศัยหลายชนิด** มีการแพร่ระบาดของโรคเป็นวงกว้าง และสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนและทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช ทั้งก่อนการเก็บเกี่ยวและระหว่างหรือหลังการเก็บเกี่ยว โดยการเข้าทำลายของเชื้อราชนิด *C. gloeosporioides* สามารถแฝงตัวกับผลผลิตทางการเกษตร แต่ยังไม่แสดงอาการของโรคโดยการเจริญของโครงสร้างอะเพลสโซเรียม (appressorium) คงลักษณะนี้จนถึงระยะที่ผลผลิตสุกจึงจะแสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส พืชอาศัยแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทั้งแหล่งกำเนิด สภาพภูมิประเทศ สภาพอากาศ ดังนั้นการป้องกันและกำจัดต้องเลือกใช้ให้เหมาะสม กับสถานการณ์การระบาดของโรค (มูลนิธิโครงการหลวง, 2552)

2.6.1 การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (Integrated pest management; IPM) มี 3 หลักการ ดังนี้ (1) การป้องกัน เริ่มจากการเตรียมสถานที่ปลูก เลือกปลูกพืชในพื้นที่ และภูมิอากาศที่ เหมาะสมแก่พืช ปลูกพืชหมุนเวียนเพื่อลดปัญหาการสะสมของเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืชในดิน ลด การสูญเสียความสมดุลของธาตุอาหารกำจัดเชื้อโรค ปรับความเป็นกรด ด่าง ปรับโครงสร้างของ ดินก่อนปลูกใช้พันธุ์ต้านทานตรงกับความต้องการของตลาด ปลูกพืชเสริมระหว่างต้นระหว่างแถว เพื่อให้ร่มเงา หรือปลูกเพื่อล่อโรคหรือแมลงที่มีการระบาด เช่น ปลูกกระเพราล่อแมลงวันผลไม้ กำจัดวัชพืชและทำความสะอาดแปลงปลูกให้แสงแดดส่องถึง กำจัดต้นพันธุ์หรือกิ่งพันธุ์ที่เป็นโรค ไม่ให้แพร่ระบาด (2) การสังเกตและเฝ้าระวังการทำลายของเชื้อโรคและแมลง ตรวจดูระยะการเจริญเติบโต การรบกวนของวัชพืช (3) การจัดการเมื่อพบการระบาดเพื่อลดความรุนแรงของโรคหรือความเสียหายจากการ ทำลายของแมลง

2.6.2 วิธีการเขตกรรม (Cultural control) เป็นการดูแลบริเวณพื้นที่เพาะปลูกจัดระยะห่าง ระหว่างแถว ระหว่างต้น การไถพรวน การเลือกชนิดหรือพันธุ์พืช การกำจัดวัชพืช การให้น้ำ ปุ๋ย การตัดตกแต่งกิ่งการทำกับดักแมลง หรือการปลูกพืชคลุมดิน เพื่อให้วัชพืช หรือแมลงศัตรูพืชลด น้อยลง แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงขนาดพื้นที่เพาะปลูกความเหมาะสม คุ้มค่ากับเวลาหรือค่าใช้จ่ายการ กระทบกระเทือนต่อต้นพืช

2.6.3 การใช้สารเคมี (Chemical control) เป็นการจัดการเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคในปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน เช่นการใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัดฆ่าเชื้อรา (fungicide) เช่น การใช้สารเคมีในกลุ่ม เบนซิมิดาโซล (benzimidazole) ในการควบคุมโรค ซึ่งวิธีนี้ส่งผลเสียคือการตกค้างของสารเคมีในสภาพแวดล้อม การดื้อต่อสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดโรค ตลอดจนสารตกค้างในผลผลิตของพริกที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค การควบคุมศัตรูพืชโดยใช้สารเคมี มีการใช้สารเคมีอย่าง

แพร่หลาย ส่งผลกระทบต่อร่างกายเกษตรกรผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม การป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยสารเคมี ปัจจุบันสำหรับประเทศไทยนั้นมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชสูงมาก ประเทศนึ่งในเอเชียตะวันออก เฉียงใต้และมีการขึ้นทะเบียนการค้าสารเคมีกับกรมวิชาการเกษตรมากที่สุดในเอเชีย (วิฑูรย์, 2553) การป้องกันและกำจัดโรคพืชด้วยสารเคมีป้องกันและกำจัดเชื้อรา เป็นวิธีที่เกษตรกรส่วนใหญ่นิยม ใช้การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชแต่ละครั้งพบว่าสามารถใช้ประโยชน์ได้เพียง 25% ที่เหลือ 75% จะ แพร่กระจายสะสมในดิน น้ำ และอากาศ (ศุภมาศ, 2545) ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เกิดความ เสมื่อมโทรมของทรัพยากรธรรมชาติ การดื้อยาของเชื้อรา การใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืช สารป้องกันกำจัดเชื้อรา เป็นสารเคมีที่มีความสามารถฆ่าและกำจัดเชื้อได้รวมไปถึง ราที่เจริญบนเสื้อผ้า ใยสังเคราะห์และเชื้อราก่อโรคในคน การจัดสารเคมีกำจัดเชื้อราแบ่งตาม บทบาทของสารและฤทธิ์ ของสารต่อเชื้อราแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ 1. สารป้องกันและคุ้มครองพืชกับสารรักษาโรคพืช มีการใช้สารเคมีกลุ่มนี้ก่อนมีการระบาดของโรคเพื่อไม่ให้เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ตัวอย่างสารเคมีในกลุ่มนี้ เช่น 8-quinolinol นอกจากนี้ยังมีการใช้สารในกลุ่มสารป้องกันและคุ้มครองพืช ตามสารออกฤทธิ์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 สารออกฤทธิ์แบบสัมผัส (contact) เป็นสารเคมีสามารถกำจัดเชื้อราโดยตรงทั้งก่อนและ หลังการเข้าทำลายของเชื้อราและสารออกฤทธิ์แบบตกค้าง (residual) เป็นสารเคมีที่ต้องมีการใช้ ป้องกันพืชก่อนเชื้อราเข้าทำลาย เช่น captan และ zineb กลุ่มที่ 2 สารป้องกันและคุ้มครองพืช กับสารกำจัดโรคพืช เป็นสารเคมีที่กำจัดเชื้อราเฉพาะ บริเวณที่มีการเข้าทำลายของเชื้อรา ตัวอย่างเช่น สารอนินทรีย์ของปรอท นอกจากนี้ยังพบว่าสารชนิดดูดซึม หมายถึงสารเคมีที่ดูดซึมเข้าไปในระบบพืช แล้วมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ต่อไประยะหนึ่ง เช่น benomyl และ carbendazim สารประกอบกลุ่มแคปแทนและอนุพันธุ์หรือไดคาร์บอกซิไมด์สารในกลุ่มนี้ได้แก่ captan folpet และ captafol สารเคมีในกลุ่มนี้สามารถยับยั้งการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน และขบวนการเมตะบอลิซึม ทำให้สปอร์หรือเส้นใยไม่สามารถเจริญเติบโตได้

2.6.4 การใช้พันธุ์ต้านทาน เป็นการป้องกันที่มีการใช้พริกพันธุ์ต้านทานโรค (resistant cultivar) และเป็นอีกวิธีการที่มีประสิทธิภาพและใช้แก้ปัญหาในระยะยาว แต่ในขณะเดียวกันการพัฒนาสายพันธุ์พริกให้ต้านทานโรคและมีผลลิตสูงใช้ระยะเวลาที่ยาวนานและมีวิธีการที่ยุ่งยากและซับซ้อน ตลอดจนมีความซับซ้อนของกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคและความเสถียรของลักษณะต้านทานของพริกพันธุ์ต้านทาน (สุชีลา, 2557) Phialathounheuane และคณะ (2555) ได้ศึกษาการทดสอบเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในการก่อโรคในพริกพันธุ์ต่างๆ พบว่าพริกพันธุ์ต่างๆ มีระดับการต้านทานที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถ

แบ่งออกเป็นพริกกลุ่มต้านทานมาก ต้านทานปานกลาง พันธุ์อ่อนแอ และพันธุ์อ่อนแอมาก ขณะเดียวกันมีรายงานว่าระดับความต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนสในพริกแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน โดยพริกพันธุ์ที่มีผลสีแดงจะมีการแสดงความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสมากกว่าพริกพันธุ์ที่มีผลสีเขียว ยกเว้นในพริกพันธุ์บางช้าง ซึ่งมีอิทธิพลของอายุผลพริกเป็นปัจจัยร่วมด้วย (ฤทัยชนก, 2549)

2.6.5 การควบคุมด้วยชีววิธี (Biological control) การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีเป็นวิธีที่นำมาใช้เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีโดยนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาควบคุมโรคและแมลง ศัตรูพืช รวมไปถึงแมลงที่มีคุณสมบัติเป็นตัวห้ำ (predator) และตัวเบียน (parasite) การควบคุมโรคด้วยชีววิธี เป็นอีกวิธีการที่มีการศึกษาข้อมูลเป็นอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสของพริก ตัวอย่างเช่น การใช้เชื้อราจากมูลสัตว์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริก (สันทนา และคณะ, 2559) การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) ในกลุ่ม *Bacillus* ssp. (ปัทมวรรณ, 2556 และทิวาพร, 2556) การใช้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มยีสต์ (yeast) (อรุณ และจุรีมาศ, 2552) ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส อย่างไรก็ตามการควบคุมด้วยชีววิธีอาจมีข้อเสียคือ มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและซับซ้อนในการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้มีประสิทธิภาพที่คงเดิม และยังต้องอาศัยแรงงานคนในการฉีดพ่นเชื้อในแปลงปลูก (ทิวาพร, 2556, ดาราวดี, 2558) สุภัค (2558) ได้ศึกษาการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ในรูปแบบผงแป้งในการต้านเชื้อรา *C. acutatum* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก พบว่าเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* ที่แยกได้ทั้งหมดสามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ได้รับเชื้อก่อโรคเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ อรุณ และจุรีมาศ (2552) รายงานว่าเชื้อยีสต์ที่เป็นปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ในผลพริกชี้ฟ้าแดง (*C. annuum* L. var. acuminatum Fingerh.) ที่ เกิดจากเชื้อราชนิด *C. gloeosporioides* ในการใช้เชื้อที่เป็นปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชนั้นมีหลากหลายรูปแบบ เช่น กระบวนการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis และการทำลายเชื้อโรค) เป็นการยับยั้งหรือ การทำลายจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง ด้วยสารที่สร้างขึ้นมาเพื่อต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์สารที่สร้าง ขึ้นมาดังกล่าวนั้นอาจจะซึมผ่านเข้าสู่เซลล์และความเป็นพิษของสารเคมีนั้นจะมีผลต่อการยับยั้ง จุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง สารดังกล่าวนี้อาจเรียกโดยทั่วไปว่าสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ขบวนการทำลายเชื้อโรค (lysis) มี 2 รูปแบบ คือ กระบวนการทำลายเชื้อโรคภายใน (endolysis) ทำให้เกิดการแตกสลายภายใน ส่วนโปรโตพลาสของเซลล์ และกระบวนการทำลายเชื้อโรคภายนอก (exolysis) ทำให้เกิดการแตกสลายของเยื่อ หุ้มเซลล์และผนังเซลล์ทำให้ของเหลวภายในเซลล์ไหลออกมา ในสภาวะของการแข่งขันซึ่ง

กันและกัน (competiton) ของเชื้อจำนวน 2 ชนิดที่เกิดการแก่งแย่งปัจจัยในการดำรงชีพ หรือการพยายามของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด หรือมากกว่าในการที่จะได้รับอาหารที่ต้องการจากวัสดุรองรับ (substrate) ที่เฉพาะเจาะจง ภายใต้สภาพหรือเงื่อนไขที่เฉพาะเจาะจง ซึ่งมีอยู่ในวัสดุรองรับนั้นโดยเฉพาะเมื่ออาหารนั้นไม่ เพียงพอหรือขาดแคลนต่อจุลินทรีย์ทั้งสองจะเกิดการแข่งขันกัน ส่วนมากมักจะเป็นในแง่ของ อาหารหรือ คาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน และปัจจัยการเจริญเติบโตอื่น ๆ และในสภาวะที่เชื้อปฏิปักษ์กับเชื้อโรคนั้นอยู่ในรูปแบบของกระบวนการของปรสิต (paratism) หมายถึงจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งทำหน้าที่เป็นปรสิตในจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ขอบเขตทั้ง 3 ชนิดในกระบวนการของจุลินทรีย์ที่ต่อต้าน (antagonism) นั้นยังไม่มีความกระจ่างชัดนัก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียอาจทำให้เส้นใยเชื้อราเกิดการตายอย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการแข่งขันซึ่งกันและกัน (competition) ในวัสดุรองรับผ่านกระบวนการทำลายเชื้อโรคที่เกิดขึ้นภายใน (endolysis) เซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคด้วย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้มีวิธีการดำเนินการศึกษาอยู่หลายขั้นตอนและมีสารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือที่เกี่ยวข้อง ตามลำดับดังนี้ (ตารางที่ 3.1-3.3)

3.1 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และครุภัณฑ์

ตารางที่ 3.1 สารเคมี เกรด และยี่ห้อที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	สารเคมี	เกรดและยี่ห้อ
1.	โซเดียมไนเตรพัสไซด์ (Sodiium nitroprusside)	AR grade, Sigma Aldrish
2.	โซเดียมไนไตร์ท (Sodium nitrite)	AR grade, Sigma Aldrish
3.	สารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide)	AR grade, Merck
4.	อาหารเลี้ยงเชื้อรา (Potato Dextrose Broth)	Lab grade, Himedia
5.	ซิงค์ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต (Zingsulphate heptahydrate)	AR grade, RCI Labscan
6.	ผงวุ้น (Agar powder)	Bacteriological grade, Himedia
7.	99% เอทานอล (Ethanol)	AR grade, Merk
8.	ไบโอติน (Biotin)	
9.	โซเดียม ซิเตรท (Citric acid anhydrous)	AR grade, RCI Labscan
10	โซเดียม โมลิบเดรต (Sodium molibdrate)	AR grade, Merck
11.	กรดโรคลอริก (Hydrocloric acid)	AR grade, RCI Labscan
12.	กรดบอริก (Boric acid)	AR grade, RCI Labscan
13.	แอมโมเนียมไนเตรท (Ammonium nitrate)	Commercial grade
14.	แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium ferrous(II)Sulfate hexahydate)	AR grade, RCI Labscan
15.	คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper Sulphate)	AR grade, Ajex Finech Chem

ตารางที่ 3.1 สารเคมี เกรด และยี่ห้อที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

ลำดับที่	สารเคมี	เกรดและยี่ห้อ
16.	แมกนีเซียมซัลเฟต (Maganesssulphate monohydrate)	AR grade, RCI Labscan
17.	(Potassium dihydrogenphosphate)	AR grade, RCI Labscan
18.	(Sodium potassium tartrate)	AR grade, RCI Labscan
19.	แคลเซียมคลอไรด์ (Callcium Cloride)	AR grade, RCI Labscan
20.	ซูโครส (Sucrose)	AR grade, RCI Labscan
21.	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate Buffer Saline; PBS)	AR grade, Amresco
22.	โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)	AR grade, Merck
23.	กลีเซอรอล (Glycerol)	AR grade, Fisher Chemical
24.	ออสเมียม เตตระออกไซด์ (Osmium tetra oxide)	Electron Microscopy Science
25.	พาราฟอร์มอลดีไฮด์ (Paraformaldehyde)	Lab grade, TED Pella, Inc.
26.	กลูตารอลดีไฮด์ (Glutaraldehyde)	Lab grade, Sigma Aldrish
27.	เฮกซะเมทิลไดไซลาเลน (Hexamethyldisilazane)	AR grade, Sigma Aldrish
28.	น้ำกลั่น (Distilled water)	Purity, บริษัท เพียวเมาน์เทน จำกัด

ตารางที่ 3.2 วัสดุอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์

ลำดับที่	วัสดุอุปกรณ์
1.	บีกเกอร์ (Beaker)
2.	ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
3.	กระบอกตวง (Cylinder)
4.	ขวดดูแรน (Laboratory Bottle)
5.	จานเพาะเชื้อ (Petri Dish) แบบแก้ว
6.	จานเพาะเชื้อ (Petri Dish) แบบพลาสติก
7.	บีกเกอร์พลาสติก (Beaker plastic)
8.	แลควางหลอดทดลอง
9.	หลอดเซนติฟิวพลาสติก (Centrifuge Tube) ขนาด 15 และ 30 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3.2 วัสดุอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ (ต่อ)

ลำดับที่	วัสดุอุปกรณ์
10.	พาราฟิล์ม (Parafilm M)
10.	อุปกรณ์ที่ใช้นับจำนวนเซลล์ (Haemacytometer)
11.	กล่องพลาสติก (Plastic Box)
12.	กระดาษทิชชูและกระดาษเอนกประสงค์
13.	เยื่อกรอง Meri Cloth
14.	ตะเกียงแอลกอฮอล์
15.	ทิพดูดสารละลาย
16.	ปากกาเขียนหลอดทดลอง
17.	กระบอกสแตนเลสใส่เพลต
18.	ถุงมือดีโพส ขนาด S M และ L
19.	พลาสเจอร์ปิเปต
20.	กล่องแช่แข็งสารเคมี
21.	หลอดเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
22.	กล่องใส่ตัวอย่าง
23.	เทปคาร์บอน
24.	กล่องช่แข็งสารเคมี

ตารางที่ 3.3 ครุภัณฑ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

ลำดับที่	ครุภัณฑ์	รุ่นและยี่ห้อ
1.	ตู้เขี่ยเชื้อหรือตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow)	รุ่น 749120V, TKA. Teknolabo
2.	หม้อนึ่งความดัน (Autocave)	รุ่น Stero clave 55, TKA. Teknolabo
3.	ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	รุ่น ULE 500, Memmert
4.	เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance)	รุ่น AZ-214, Sartorious
5.	เครื่องเซนตริฟิวส์ (Centrifuges)	รุ่น 320 R, Hettich Universal
6.	ไมโครปิเปต (Micropipettes, Autopipettes)	รุ่น Acura 825, Socorex
7.	เครื่องวัดค่าพีเอช (pH Meter)	รุ่น Laqua twin pH 22, Horiba Sciencetific

ตารางที่ 3.3 ครุภัณฑ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ (ต่อ)

ลำดับที่	ครุภัณฑ์	รุ่นและยี่ห้อ
8.	กล้องจุลทรรศน์พร้อมชุดถ่ายภาพ	รุ่น CX31RTSF, Olympus
9.	เครื่องเขย่าแนวระนาบ (Orbital shaker)	รุ่น Orbital shaker, Hangzhou Miu Instrument
10.	เครื่องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microsocopy)	รุ่น JSM-5410LV, JEOL
11.	เครื่องกวนสารละลาย	รุ่น HTS-1003, Labmart
12.	เครื่องเซนติฟิวส์ขนาดเล็ก	Minispin, Eppendorf
13	เครื่องผสมสาร	V-1 plus, Biosan

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 การสำรวจและและเก็บตัวอย่างผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนสในแปลงปลูกของเกษตรกร

ทำการสำรวจการแพร่ระบาดและการเกิดโรคแอนแทรคโนส ในแปลงปลูกพริกของเกษตรกรในพื้นที่อำเภอหนองม่วงไข่ จังหวัดแพร่ และเก็บตัวอย่างผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนสมาทำการทดลองในลำดับถัดไป

3.2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา

3.2.2.1 การเตรียมอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงเชื้อราชนิด Potato Dextrose Agar (PDA) ปริมาตร 1 ลิตร ทำโดยการชั่งสาร Potato Dextrose Broth จำนวน 24 กรัม และเติมผงวุ้น (Agar powder) จำนวน 15 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิประมาณ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำ เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเทใส่จานเพาะเชื้อ

3.2.2.2 การเตรียมอาหารแขวนลอย VM (Volgel's media) โดยการชั่งสารโซเดียมซิเตรท (Na_3 citrate) จำนวน 2.5 กรัม สารโพแทสเซียมฟอสเฟส ($KHPO_4$) จำนวน 5 กรัม แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) จำนวน 2 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($Mg_4.7H_2O$) จำนวน 0.4 กรัม สารละลาย ไบโอติน (Biotin) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารธาตุอาหาร (Trace Element) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร น้ำตาลซูโครส (sucrose) จำนวน 15 กรัม และสารแคลเซียมคลอไรด์

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

($CaCl_2.H_2O$) จำนวน 0.2 กรัม นำสารทั้งหมดละลายในน้ำตามลำดับและปรับปริมาตรอาหารให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร แล้วแบ่งใสขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำ เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งอาหารไว้ให้เย็น ก่อนตัดชิ้นส่วนเชื้อราที่เลี้ยงอยู่บนอาหาร PDA มาเลี้ยงในอาหารเหลว

3.2.3 การศึกษาลักษณะอาการของโรคและการแยกเชื้อ

3.2.3.1 การศึกษาลักษณะอาการของโรค

ทำการเก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนสจากแปลงปลูกของเกษตรกรในเขตพื้นที่อำเภอหนองม่วงไข่ จังหวัดแพร่ มาทำการศึกษาลักษณะอาการของโรค โดยทำการสังเกตและตรวจดูลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก ณ ห้องปฏิบัติการโรคพืช อาคารกิตติพงษ์ วุฒิจำนงค์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ

3.2.3.2 การตรวจเชื้อและการแยกเชื้อ

นำผลพริกที่แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนสตามข้อ 3.2.3.1 มาทำการตรวจเชื้อสาเหตุของโรคด้วยวิธี free hand section แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ (compound microscope) จากนั้นนำผลพริกที่แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนสมาทำการแยกเชื้อโดยวิธี Tissue transplanting method โดยการใช้ใบมีดที่คมและสะอาดตัดเนื้อเยื่อผลพริกที่แสดงอาการของโรค โดยทำการตัดบริเวณที่ติดกับเนื้อเยื่อปกติที่ไม่เป็นโรค ทำการตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 5×5 มิลลิเมตรแล้วนำชิ้นส่วนไปทำการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ (Clorox 5% (v/v)) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปล้างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 3 รอบ และซับชิ้นเนื้อเยื่อให้แห้งแล้วนำชิ้นส่วนพืชไปวางบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ในจานเพาะเชื้อในตู้ถ่ายเชื้อที่ปลอดเชื้อ แล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-10 วัน เมื่อเชื้อเจริญออกมาจากชิ้นพืชใช้เข็มเขี่ยลนไฟให้ปลอดเชื้อตัดเอาปลายเส้นใยที่เจริญออกมาในแต่ละชิ้นไปเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง โดยเลือกเอาไอโซเลท (isolate) ที่เจริญดีเก็บเป็น stock culture เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.4 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity) ของเชื้อราชนิด *C. gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพริก

หลังจากเลี้ยงเชื้อราสาเหตุของโรคบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ทำการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) โดยเทน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ถูเบาๆ ที่บริเวณผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides* ให้ทั่ว กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกเส้นใยที่ติดมาออก แล้วนำมาตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยสไลด์ Hemocytometer โดยปรับระดับความเข้มข้นของสปอร์เชื้อราให้ได้ประมาณ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปปลูกเชื้อราสาเหตุของโรคโดยวิธีการฉีดพ่นสารแขวนลอยของสปอร์บนผลพริกที่เก็บไว้ในกล่องพลาสติกใส เพื่อรักษาความชื้นเป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นเปิดฝากล่องออก ตรวจบันทึกอาการของโรคที่แสดงบนผลพริกเพื่อประเมินการเกิดโรค

3.2.5 การทดสอบผลของสารว่องไวปฏิกิริยาต่อการยับยั้งและการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

การเตรียมสปอร์เชื้อราและการทดสอบผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการงอกของสปอร์และการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกนั้น โดยทำการเก็บสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides.* ที่เลี้ยงในอาหารแขวนลอยชนิด VM เป็นเวลาประมาณ 4 ถึง 5 วัน แล้วนำสปอร์มากรองด้วยแผ่นเยื่อ merricoth จำนวน 2 ชั้น ลงในหลอดเซนติฟิวส์ขนาดปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนสปอร์ของเชื้อด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำมาเทอาหารแขวนลอยทิ้งให้เหลือเพียงตะกอนของสปอร์เชื้อรา จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีกหนึ่งครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที อีกครั้ง เทน้ำกลั่นทิ้งเหลือเพียงตะกอนของสปอร์เชื้อรา นำสปอร์เชื้อรามาเจือจาง (dilute) ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อหรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% หรือสารละลาย 1X ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนในอัตราส่วน 1:100 จากนั้นทำการนับจำนวนสปอร์เชื้อราก่อโรคด้วยวิธีฮีมาโตไซโตมิเตอร์ (Heamatocytometer) เพื่อนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราก่อโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X จากนั้นนำมาคำนวณในการเจือจางสปอร์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยทำการเจือจางสปอร์เชื้อราด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ หรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% หรือสารละลาย 1X ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน จากนั้นทำการเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับ คือ 0.5, 1, 5, 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ (รายละเอียดภาคผนวก ก.) และทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคในสารละลายที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ในส่วนของการศึกษาผลของสารว่องไวปฏิกิริยาในกลุ่มของไนโตรเจนประกอบด้วยสารละลายโซเดียมไนไตร์ทและโซเดียมไนโตรปรัสไซด์นั้น ทำโดยวิธีเดียวกันแต่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อ

โรคในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์และโซเดียมไนไตรท์ ซึ่งเป็นสารที่ใช้เป็นแหล่งผลิตสารไนตริกออกไซด์ โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ น้ำกลั่น และ 1X ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน เป็นตัวละลายสปอร์เชื้อราก่อโรคที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 20, 50 และ 100 มิลลิโมลลาร์ และทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาในการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคในสารละลายที่ว่องไวปฏิกิริยาแล้ว ทำการทดสอบหาผลของสารละลายที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังกล่าวต่ออัตราการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก โดยการเกลี่ยสารละลายสปอร์บนอาหารแข็ง PDA โดยการนำสารละลายสปอร์เชื้อราหลังจากที่บ่มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โซเดียมไนโตรปรัสไซด์ และโซเดียมไนไตร์ท ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันดังกล่าวในเบื้องต้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง PDA และทำการเกลี่ยบนผิวอาหาร PDA ให้กระจายทั่วผิวอาหาร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และทำการนับจำนวนสปอร์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อรา ดังนี้

$$\text{ค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อรา} = \frac{\text{จำนวนการงอกของสปอร์ของชุดทดลอง X 100}}{\text{จำนวนสปอร์ที่งอกของชุดควบคุม}}$$

ในส่วนของการทดสอบการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกนั้น ทำโดยการนำสารละลายสปอร์เชื้อราก่อโรคที่บ่มในสารละลายดังกล่าวข้างต้นจนครบเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนผิวอาหารแข็ง PDA ทิ้งไว้จนหยดสปอร์แห้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง และทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก นานเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบหาอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา ดังนี้

$$\text{ค่าความความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา} = \frac{\text{ขนาดของโคโลนีเส้นใยเชื้อราชุดทดลอง}}{\text{ขนาดของโคโลนีเส้นใยเชื้อราชุดควบคุม}}$$

3.2.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกหลังได้รับสารว่องไวปฏิกิริยา

ทำการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก หลังได้รับสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์และโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลังการเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (168 ชั่วโมง) จากนั้นบันทึกผลการและสรุปผลการทดลอง

3.2.7 การทดสอบผลของสารว่องไวปฏิกิริยาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกในผลพริก

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ทดสอบโดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ซึ่งได้ผลมาจากการทดสอบในงานทดลองที่ใช้อาหารแข็ง PDA มาทดสอบในการก่อโรคในผลพริกหนุ่ม โดยการคัดเลือกผลพริกที่ได้ซื้อจากแปลงของเกษตรกร ณ อำเภอหนองม่วงไข่ จังหวัดแพร่ โดยการที่จะเลือกผลพริกที่มีความสมบูรณ์ไม่มีการติดโรค และมีขนาดของผลที่ใกล้เคียงกันมาใช้ในการทดลอง โดยได้ทำการทดลองจำนวน 2 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีการที่ 1 การบ่มเชื้อราในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก่อนนำไปปลูกเชื้อในผลพริก มีวิธีการดังนี้

1) ทำการเก็บสปอร์เชื้อราก่อโรคที่เลี้ยงในอาหารแขวนลอยเป็นเวลา 4 – 5 วัน นับจำนวนสปอร์ และเจือจางสปอร์ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร (spore/ml)

2) จากนั้นทำการเตรียมกล่องพลาสติกที่มีกระดาษทิชชูรองพื้นจำนวน 2 ชั้น และสำลีที่สะอาดจำนวน 2 ก้อน โดยวางไว้ที่มุมกล่องพลาสติก

3) ทำการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในกระดาษทิชชูและสำลีจนเปียกชุ่ม เพื่อควบคุมอุณหภูมิและความชื้นภายในกล่อง

4) ทำการคัดขนาดผลพริกให้มีความสม่ำเสมอกัน ทำความสะอาดด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ และทำแผลด้วยเข็มหมุดจำนวน 9 แผล ที่มีความลึกของแผลประมาณ 2 มิลลิเมตร (mm)

5) ทำการปลูกสปอร์เชื้อราที่ผ่านการบ่มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ลงบนแผลของผลพริก

ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ต่อผลหลังจากนั้นปิดฝากล่องพลาสติกและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และควบคุมความชื้นให้อยู่ในระหว่าง 80-90 เปอร์เซ็นต์

6) ตรวจเช็คเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรค โดยการวัดขนาดของแผลและจดบันทึกผลการทดลองทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

วิธีการที่ 2 การปลูกเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสและฉีดพ่นด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

1) ทำการเก็บสปอร์เชื้อราก่อโรคที่เลี้ยงในอาหารแขวนลอยเป็นเวลา 4-5 วัน และทำการเจือจางสปอร์ให้ได้ความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร

2) จากนั้นเตรียมกล่องพลาสติกโดยใส่กระดาษทิชชูรองพื้นจำนวน 2 แผ่น และสำลีที่สะอาดจำนวน 2 ก้อนที่มุมกล่องพลาสติก จากนั้นทำการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในกระดาษทิชชูและสำลีจนเปียกชุ่ม เพื่อควบคุมอุณหภูมิและความชื้นภายในกล่อง

3) ทำการคัดขนาดของผลพริกให้มีความสม่ำเสมอกัน ทำความสะอาด และทำแผลด้วยเข็มหมุดจำนวน 9 แผล ที่มีความลึกของแผลประมาณ 2 มิลลิเมตร

4) ทำการปลูกเชื้อลงบนผลพริก โดยการนำสารละลายสปอร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผลของผลพริก หลังจากนั้นปิดฝากล่องพลาสติก และบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พร้อมกับควบคุมความชื้นภายในกล่องพลาสติกให้อยู่ระหว่าง 80-90 เปอร์เซ็นต์

5) เตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ใส่ลงในขวดที่จะใช้ฉีดพ่น ทำการฉีดพ่นสารละลายให้กระจายทั่วบนผลพริกที่เรียงอยู่ภายในกล่องพลาสติก จนครบวันที่ 7 ของการปลูกเชื้อ

6) จากนั้นทำการตรวจเช็คเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและ ความรุนแรงของโรค โดยการวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้น และจดบันทึกผลการทดลองทุกวัน

7) ทำการถ่ายรูปผลการทดสอบสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทั้ง 2 กรรมวิธี เพื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของโรคจากขนาดของบาดแผลที่เกิดขึ้นบนผลพริก และนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรค ด้วยวิธีการดังนี้

การหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค มาจากการนับจำนวนผลพริกที่แสดงอาการเป็นโรค

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} \frac{\text{จำนวนผลที่เป็นโรค}}{\text{จำนวนผลทั้งหมด}} \times 100$$

การวัดความรุนแรงของโรค จากการวัดขนาดของแผลที่เกิดบนผลพริก

$$\text{ขนาดของแผล (มิลลิเมตร)} = \frac{\text{ความกว้าง} + \text{ความยาว}}{2}$$

8) วัดอุณหภูมิและความชื้นภายในกล่องพลาสติกด้วยเครื่อง Humidity/Temperature Meter ทุกวันๆ วันละ 2 ครั้ง

3.2.8 การทดสอบการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกหลังได้รับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโซเดียมไนไตร์ท

ในการทดลองขั้นนี้เป็นการศึกษาการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของสปอร์เชื้อรา หลังสปอร์ได้รับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโซเดียมไนไตร์ท ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ดี การทดสอบในขั้นตอนนี้มีวิธีการดังนี้

1) ทำการเก็บสปอร์เชื้อราที่เลี้ยงในอาหารแขวนลอยเป็นเวลา 4–5 วัน โดยนำไปกรองด้วยแผ่นเยื่อ merricoth จำนวน 2 ชั้น ในหลอดขนาดปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2) นำสปอร์ที่กรองแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นเทอาหารทิ้งเติมน้ำกลั่นเพื่อล้างสปอร์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดิมอีกจำนวน 1 รอบ

3) ทำการเทน้ำกลั่นทิ้ง แล้วทำการละลายสปอร์ด้วยน้ำกลั่นและทำการนับสปอร์เชื้อราก่อโรคด้วยวิธีฮีมาโตไซโตมิเตอร์ และละลายสปอร์ที่ได้มาคำนวณแล้วทำการเจือจางให้ได้ความเข้ม 6×10^{5} สปอร์ต่อมิลลิลิตร

4) ทำการเตรียมความเข้มข้นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นที่ 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ในน้ำกลั่น จากนั้นทำการบ่มสปอร์ในสารละลายทั้งสองดังกล่าว เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง

5) เมื่อครบเวลาทำการดูดสารละลายสปอร์ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ไปหยดลงบนแผ่นปิดสไลด์ (cover slip) ที่รองด้วยกระดาษทิชชูที่ชุ่มน้ำในจานเพาะเชื้อ

6) ทำการเลี้ยงสปอร์เชื้อราไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปศึกษาโดยการสังเกตุและนับจำนวนโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของสปอร์เชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์และถ่ายภาพ

7) นำข้อมูลการนับจำนวนของสปอร์ที่เกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียม โดยการเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียม

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียม} = \frac{\text{จำนวนการเกิดอะเพลสโซเรียมของชุดทดลอง X 100}}{\text{จำนวนการเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของชุดควบคุม}}$$

3.2.9 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อรา

ในการทดลองขั้นตอนนี้ทำการศึกษาผลของสารว่องไวปฏิกิริยาต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก โดยการนำสปอร์ที่ผ่านการบ่มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์และโซเดียมไนไตร์ท ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม และทำการบ่มสปอร์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในการเก็บเอาตะกอนของสปอร์เชื้อราก่อโรค โดยการนำสารละลายสปอร์เชื้อราที่ผ่านการบ่มครบเวลาแล้วไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการล้างสปอร์เชื้อราด้วยสารละลาย 1x PBS เป็นจำนวน 2 ครั้ง และนำสปอร์เชื้อราไปหยุดกิจกรรมของเซลล์ด้วยน้ำยาหยุดกระบวนการในขั้นที่ 1 (Primary Fixation) ที่ประกอบด้วยสารละลาย 2% พาราฟอร์มอลดีไฮด์ 2% กลูตารอลดีไฮด์ 1% ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน และน้ำกลั่น เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อครบเวลาแล้วทำการล้างสปอร์เชื้อราด้วยสารละลาย 1x PBS เป็นจำนวน 2 ครั้ง และทำการเติมสารละลายหยุดกระบวนการในขั้นที่ 2 (Secondary Fixation) ที่ประกอบด้วยสารละลาย 1% ออสเมียมเตรตระออกไซด์ 1% ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน และน้ำกลั่น เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการล้างสปอร์เชื้อราด้วยสารละลาย 1x PBS อีกจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำสปอร์เชื้อราก่อโรคไปดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 30, 50, 70, 80, 90 และ 100% ตามลำดับ ในช่วงระหว่างของการดึงน้ำออกจากเซลล์ของสปอร์เชื้อรานั้น มีข้อควรระวังเซลล์ของสปอร์เชื้อราจะต้องไม่แห้ง จากนั้นเติมสารเฮกซะเมทธิลไดไซลาเลนเป็นเวลา 15 นาที เติมสารเฮกซะเมทธิลไดไซลาเลน (Hexamethydisalane) อีกครั้งและดูดสปอร์ลงบนเทปคาร์บอนแล้วปล่อยให้สปอร์เชื้อราแห้ง

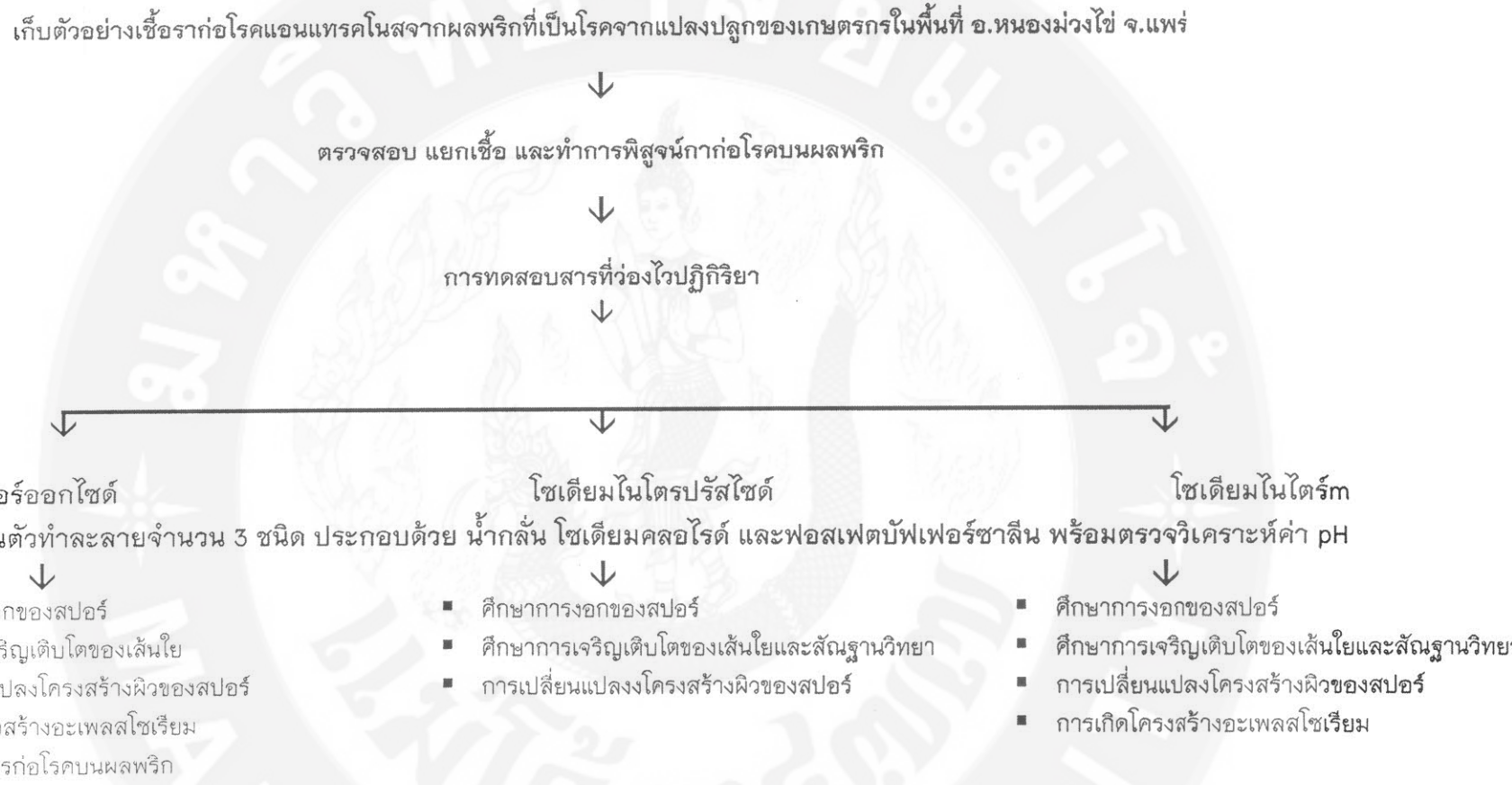
นำสปอร์ไปเคลือบด้วยทองคำ และส่องลักษณะการเปลี่ยนแปลงของผิวสปอร์เชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy) รุ่น JSM-5410LV ยี่ห้อ JEOL พร้อมกับบันทึกภาพ และวิเคราะห์ผลการทดลองที่เกิดขึ้น

3.2.10 การศึกษาค่าพีเอชของสารว่องไวปฏิกิริยาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ในการศึกษาค่าพีเอชของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โซเดียมไนโตรปรัสไซด์ และโซเดียมไนไตร์ท ทำได้โดยการเตรียมสารละลายทั้ง 3 ชนิดในความเข้มข้นต่างๆ โดยในการทดลองขั้นนี้ใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม จากนั้นทำการวัดค่าพีเอชของสารละลายทั้ง 3 ชนิด ด้วยเครื่องวัดพีเอช รุ่น Laqua twin pH 22, Horiba Sciencetific จากนั้นบันทึกผลการทดลอง คำนวณหาค่าเฉลี่ย และนำข้อมูลมาสร้างกราฟ โดยทำการทดลองอย่างน้อยจำนวน 3 ซ้ำในแต่ชุดทดลอง

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการทำการทดลองนั้น วางแผนการทดลองแบบ 6 x 3 Factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำต่อชุดทดลอง โดยมีปัจจัยความเข้มข้นของสารละลายที่แตกต่างกันจำนวน 6 ความเข้มข้น และการละลายสารว่องไวปฏิกิริยาจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ และสารละลายโซเดียมไนไตร์ท และในแต่ละชุดของการทดลองทำจำนวน 3 ครั้ง ในส่วนของการวิเคราะห์ข้อมูลทำโดยนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทุกชุดข้อมูลมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม Sirichai ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% และในบางชุดข้อมูลทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Student t test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.95 และ 99.99 % (* = $p \leq 0.05$ และ ** = $p \leq 0.01$)



ภาพที่ 3.1 แผนผังสรุปวิธีการทำการทดลอง

บทที่ 4
ผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของสารว่องไวต่อปฏิกิริยาต่อการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1 สำรวจพริกที่เป็นโรคจากแปลงปลูกพริกของเกษตรกรใน อำเภอหนองม่วงไข่ จังหวัด แพร่ และลักษณะอาการของโรค

จากการสำรวจผลพริกที่เป็นแอนแทรคโนสในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกร ในอำเภอหนองม่วงไข่ จังหวัดแพร่ ซึ่งเป็นพื้นที่ปลูกพริกรายใหญ่ในพื้นที่จังหวัดแพร่ พบว่าผลพริกที่แก่จัด หรือเริ่มสุก แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส มีลักษณะอาการรอยช้ำเป็นแอ่งลึกลงไปเล็กน้อย มีแผลกลมรี สีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม ขนาดของแผลแตกต่างกันบางผลอาจมีแผลใหญ่ยาวถึงสองในสามส่วนของผลพริก พบโครงสร้างของเชื้อราที่เรียกว่า acervulus 2 ลักษณะคือ มีลักษณะเป็นจุดเล็กๆ สีดำเรียงซ้อนกันเป็นวง และกลุ่ม acervulus สีส้มบนแผล ลักษณะอาการที่พบรุนแรงคือ ผลพริกจะโค้งงอ บิดเบี้ยวคล้ายกุ้งแห้ง ภาพที่ 4.1

ภาพที่ 4.1 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก ที่เก็บตัวอย่างมาจากแปลงปลูกของเกษตรกร ในพื้นที่อำเภอหนองม่วงไข่ จังหวัดแพร่

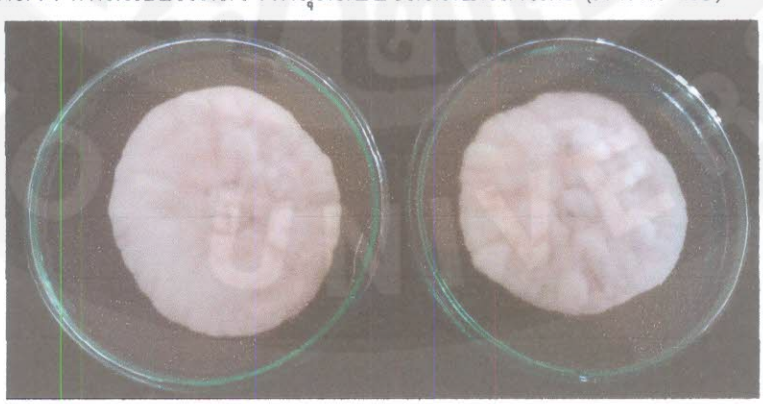
4.2 การตรวจเชื้อและการแยกเชื้อโรคแอนแทรคโนส

จากการศึกษาลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสจากผลพริกพบอาการของโรคคือผลพริกมีลักษณะเป็นแผลกลมรี และบริเวณแผลยุบตัวลงเป็นแอ่งแผลมีลักษณะสีเหลืองส้ม

อยู่ในบริเวณแผลของผลพริก และแผลค่อนข้างแฉะ เมื่อทำการตรวจดูเชื้อราก่อโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10X พบเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่มีสปอร์เซลล์เดียว สีใส รูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) และไม่พบ setae (ภาพที่ 4.2)

ภาพที่ 4.2 ลักษณะสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกชนิด *C. gloeosporioides* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X

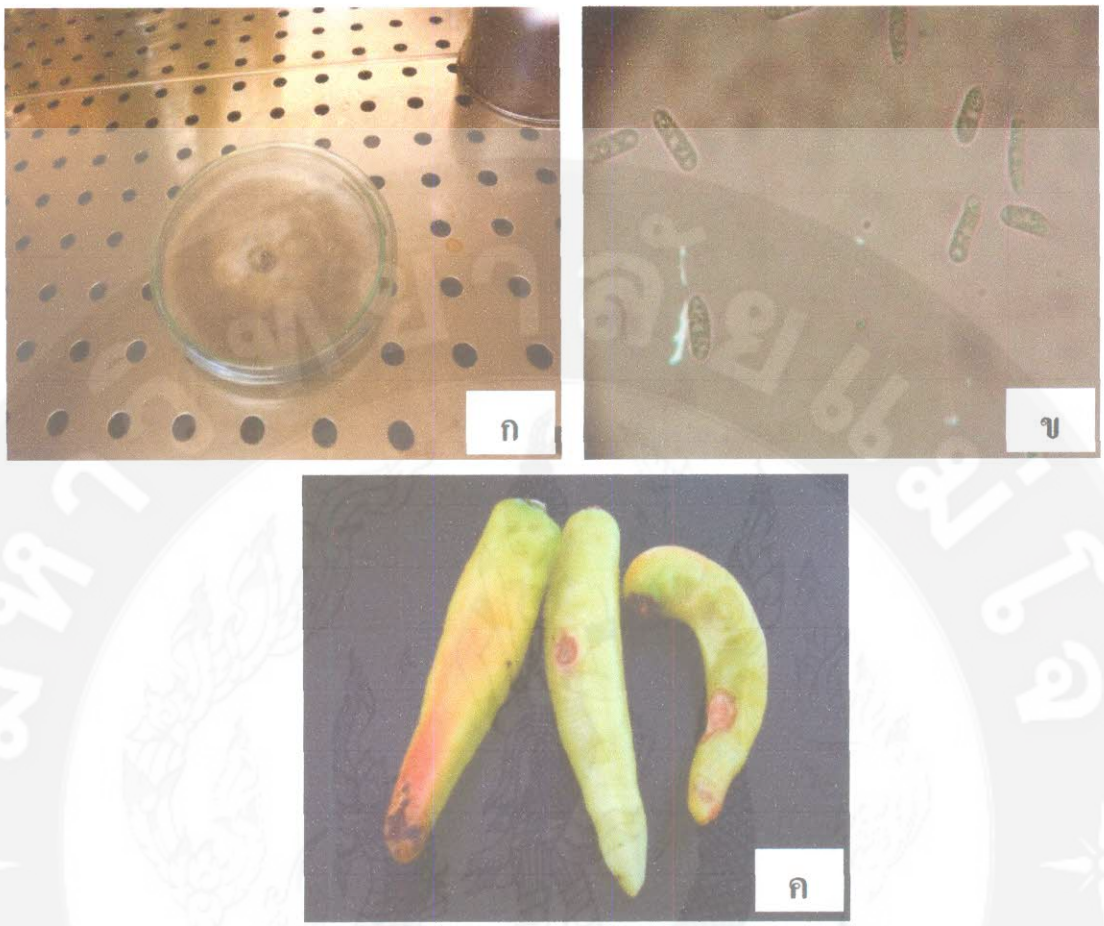
เมื่อแยกเชื้อราสาเหตุโรคให้บริสุทธิ์และเลี้ยงเชื้อราก่อโรคบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7-10 วัน เชื้อจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 9 เซนติเมตร โคโลนีมีสีขาวฟู ตรงกลางโคโลนีมีสีเทา หลังจากนั้นเชื้อเริ่มสร้างกลุ่มสปอร์สีส้มบนโคโลนี (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 โคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA ภายหลังการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5 วัน

4.3 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity) ของเชื้อราชนิด *C. gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพริก

เมื่อพิสูจน์โรคแอนแทรคโนสบนผลพริก โดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราบนผลพริก และทำการบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน พบว่าผลพริกในระยะเริ่มแรกจะแสดงอาการเกิดจุดฉ่ำน้ำขึ้นในบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อรา โดยที่ผิวของผลพริกจะเกิดลักษณะเป็นรอยบุ๋มเล็กน้อย และมีอาการฉ่ำน้ำเกิดเป็นรูปวงกลมหรือวงรี นอกจากนี้ยังเกิดลักษณะเป็นแผลกลมรีที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่อยู่ที่ประมาณ 1-2 เซนติเมตรเนื้อเยื่อของผลพริกในบริเวณแผลเกิดการยุบตัวลงเป็นแอ่ง เมื่อเริ่มเกิดใหม่ๆ แผลจะมีลักษณะเป็นสีเหลืองส้ม และมี acervulus ที่มีลักษณะเป็นสีเหลืองส้มเรียงซ้อนกันเป็นวงๆ อยู่ในบริเวณแผลที่เกิดขึ้นบนผลพริก และแผลมีลักษณะค่อนข้างแฉะ หลังจากนั้นแผลจะกลายเป็นสีน้ำตาลดำ (ภาพที่ 4.4) ซึ่งได้เก็บเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสพริก เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 4.4 ลักษณะของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides* และการพิสูจน์โรคบนผลพริก

ก. โคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากผลพริกที่ติดโรคแอนแทรคโนสที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน

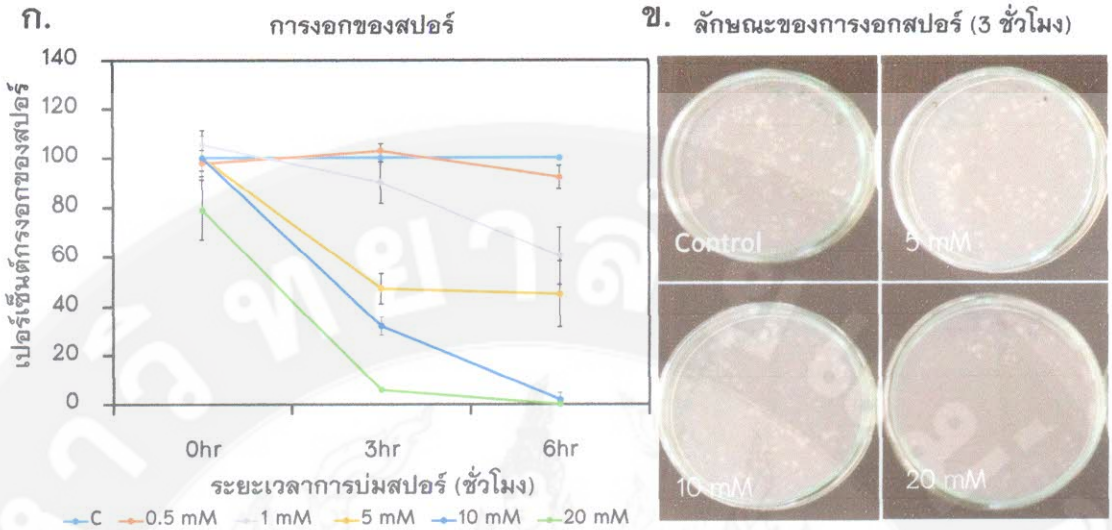
ข. ลักษณะของสปอร์ของเชื้อรา *C.gloeosporioides* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X

ค. ลักษณะแผลเป็นที่มีลักษณะเป็นรูปวงกลมหรือวงรี มีสีเหลืองส้มเรียงซ้อนกันเป็นวง ๆ อยู่ในบริเวณแผลของพริกหลังจากการพิสูจน์โรค

4.4 ผลของสารว่องไวปฏิกิริยากลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก

4.4.1 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก

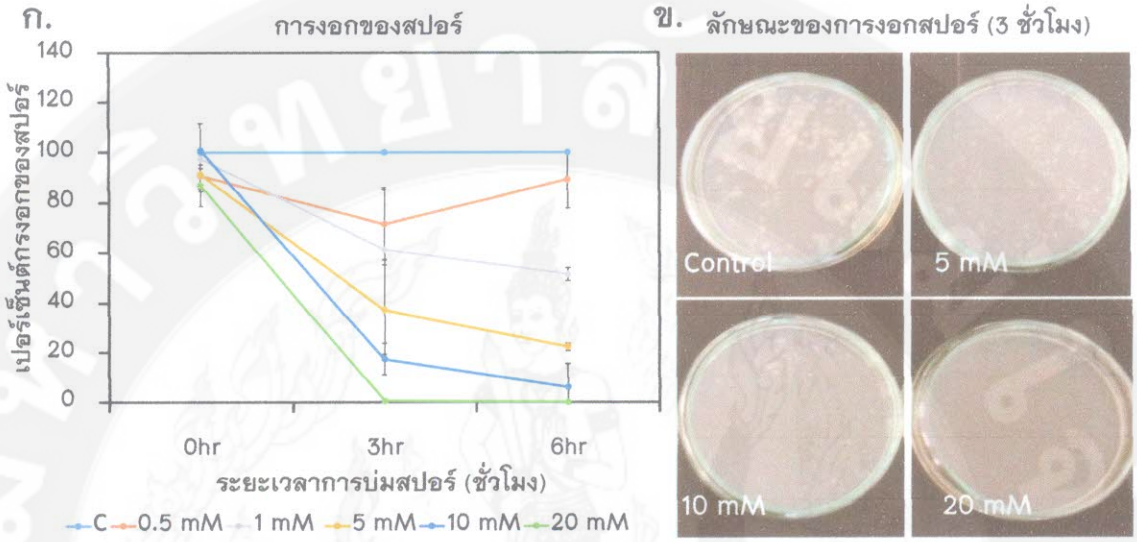
จากการทดลองที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0.5, 1, 5, 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายจำนวน 3 ชนิด ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตซาลีน และน้ำกลั่น โดยทำการบ่มสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราลดลง โดยสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เตรียมในตัวทำละลายน้ำกลั่น พบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ทำการบ่มเป็นเวลา 0 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และระยะเวลาการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์อกไซด์ 20 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 5.93 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 102.73, 89.94, 47.36 และ 32.22 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และในการบ่มสปอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์อกไซด์ 20 มิลลิโมลาร์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ เปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 92.06, 60.51, 45.12 และ 1.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงมากที่สุดระยะเวลาการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง โดยให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 20 มิลลิโมลาร์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงมากที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ของการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา (ภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.5 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายในตัวทำลายน้ำกลั่นต่อการงอกสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก
ก. เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides*
ข. ลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA ที่ทำการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สังเกตหลัง 48 ชั่วโมง

ผลของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เตรียมในตัวทำละลายโซเดียมคลอไรด์ ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรานั้น พบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ทำการบ่มเป็นเวลา 0 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และระยะเวลาการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 0.46 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ เปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 71.53, 61.28, 37.26 และ 17.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและ 6 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ เปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 89.08, 51.42, 22.33 และ 6.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงมากที่สุดระยะเวลาการบ่มเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 20 มิลลิโมลาร์ พบว่าเปอร์เซ็นต์

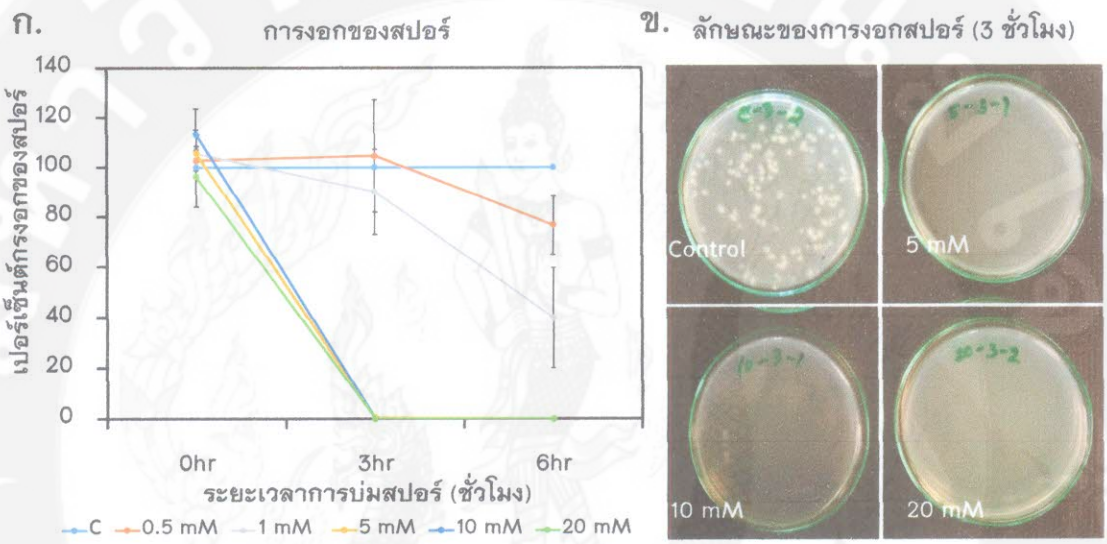
การงอกของสปอร์ลดลงมากที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ของการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา (ภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.6 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายในตัวทำลายโซเดียมคลอไรด์ต่อการงอกสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก
ก. เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides*
ข. ลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA ที่ทำการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สังเกตหลัง 48 ชั่วโมง

ผลของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เตรียมในตัวทำละลาย บัฟเฟอร์ฟอสเฟตซาลีน โดยผลการทดสอบพบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ทำการบ่มเป็นเวลา 0 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และระยะเวลาการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาระดับความเข้มข้น 1 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ เปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 90.03 และ 104.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่การบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาระดับความเข้มข้น 1 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ เปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 39.83 และ 76.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า

เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงมากที่สุดที่ระยะเวลาการบ่มเป็น 3 และ 6 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 5, 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงมากที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ของการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายในตัวทำลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนต่อการงอกสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส
ก. เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides*
ข. ลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA ที่ทำการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สังเกตหลัง 48 ชั่วโมง

จากการทดสอบสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก หลังจากทำการบ่มสปอร์เชื้อราไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าตัวทำละลายที่นำมาทดสอบทั้ง 3 ชนิด ให้ผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสารละลายโซเดียมคลอไรด์และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 57.75 และ 63.03 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือน้ำกลั่น เท่ากับ 69.99 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้นที่ 20 มิลลิโมลาร์ สามารถ

ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 29.83 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และชั่วโมงที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 41.95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ดังนั้น เมื่อความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้น ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสลดลง และตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด คือ สารละลายโซเดียมคลอไรด์และบัฟเฟอร์ฟอสเฟตซาลีน ที่มีความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.1 ผลของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกบนอาหาร PDA ที่มีระยะการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สิ่งทดลอง	ค่าเฉลี่ยการงอกของสปอร์เชื้อรา (%)
ตัวทำละลาย	
น้ำกลั่น	69.9908[a]
โซเดียมคลอไรด์	57.7532[b]
บัฟเฟอร์ฟอสเฟตซาลีน	63.0301[b]
ความเข้มข้นของ H_2O_2	
Control	100.00[a]
0.5 mM	82.6297[b]
1 mM	77.8849[b]
5 mM	49.9081[c]
10 mM	41.2944[c]
20 mM	29.8311[d]
ชั่วโมงที่บ่ม H_2O_2	
0	96.7557[a]
3	52.0615[b]
6	41.9569[c]
Interaction	
สารละลาย x ความเข้มข้น H_2O_2	**
สารละลาย x ชั่วโมง	**
ความเข้มข้น H_2O_2 x ชั่วโมง	**
สารละลาย x ความเข้มข้น H_2O_2 x ชั่วโมง	Ns
GRAND MEAN	63.59
CV	21.33%

หมายเหตุ

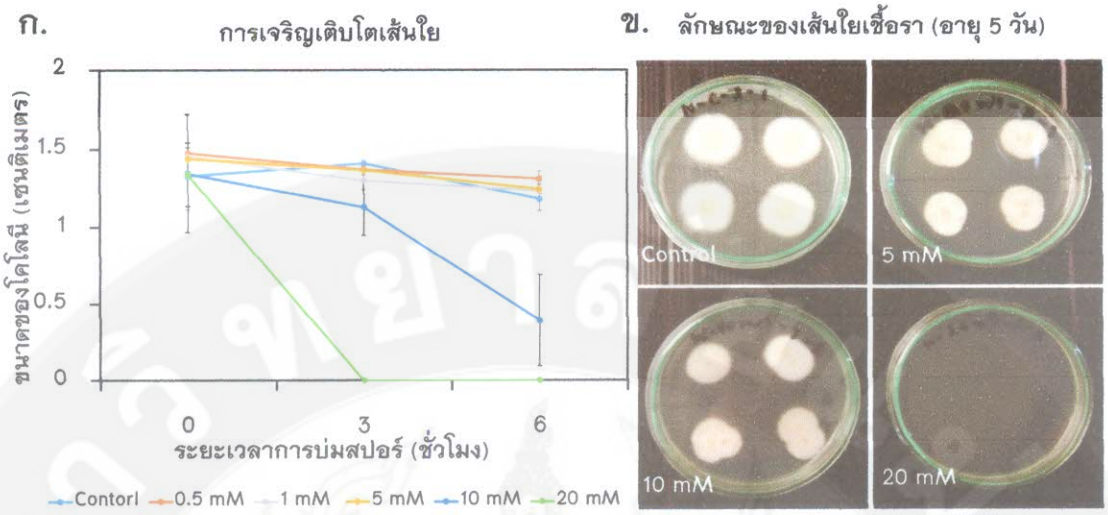
ns หมายถึง ค่าที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

a, b, c, d หมายถึง ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.4.2 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

จากการทดลองการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0.5, 1, 5, 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายจำนวน 3 ชนิด ประกอบด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน และน้ำกลั่น โดยทำการบ่มสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกลดลง โดยที่สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เตรียมในตัวทำละลายน้ำกลั่น ผลการทดสอบพบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ทำการบ่มเป็นเวลา 0 ชั่วโมง ให้ผลการยับยั้งและการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และระยะเวลาการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีการยับยั้งและการเจริญเติบโตของเส้นใยลดลงสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นที่ 20 มิลลิโมลาร์ มีการเจริญของเส้นใยเชื้อราเท่ากับ 0 เซนติเมตร รองลงมาระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ การเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1.30, 1.29, 1.36 และ 1.12 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้น้อยที่สุด โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 1.40 เซนติเมตร และระยะการบ่มที่ 6 ชั่วโมง มีการยับยั้งและการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีการยับยั้งและการเจริญของเส้นใยลดลงสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ไม่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา รองลงมาระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีการเจริญของเส้นใยเชื้อราเท่ากับ 0.39 เซนติเมตรและที่ระดับความเข้มข้น 5, 1 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ มีมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา เท่ากับ 1.24, 1.23 และ 1.30 เซนติเมตร ตามลำดับ พบว่าการยับยั้งและการเจริญของเส้นใยเชื้อราลดลงมากที่สุดระยะเวลาการบ่มสปอร์ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้การยับยั้งและการเจริญของเส้นใยเชื้อก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พบว่าเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4.8)



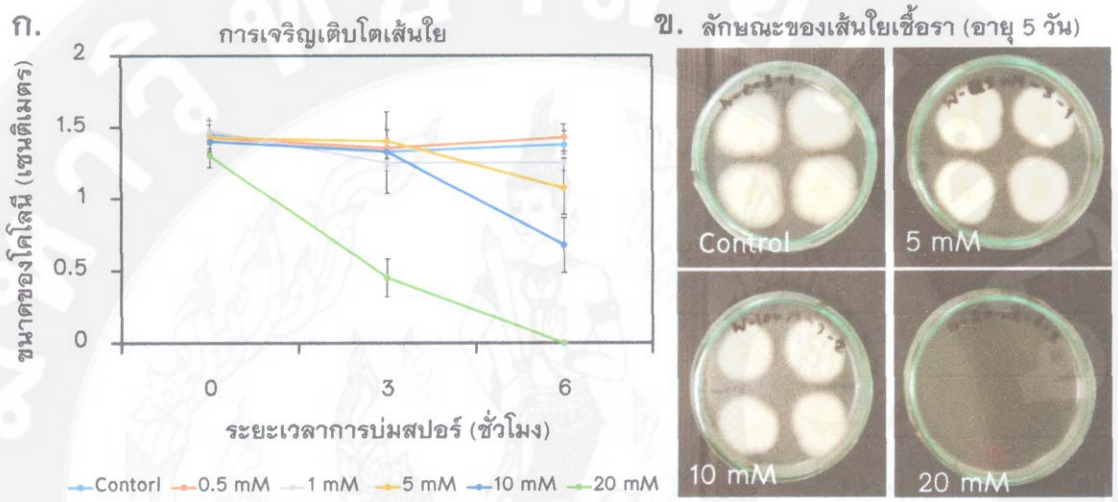
ภาพที่ 4.8 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่เตรียมในตัวทำละลายน้ำกลั่น

ก. ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides*

ข. ลักษณะของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA สังเกตในชั่วโมงการเจริญเติบโตที่ 120 ชั่วโมง

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เตรียมในตัวทำละลายโซเดียมคลอไรด์ ผลการทดสอบพบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ทำการบ่มสปอร์เป็นเวลา 0 ชั่วโมง ทำให้การยับยั้งและการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และระยะเวลาการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีการยับยั้งและการเจริญเติบโตของเส้นใยลดลงสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มีการเจริญของเส้นใยเชื้อราเท่ากับ 0.45 เซนติเมตร รองลงมาระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุม การยับยั้งและการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1.35, 1.25, 1.40, 1.32 และ 1.30 เซนติเมตร ตามลำดับ และที่การบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีการยับยั้งและการเจริญเติบโตของเส้นใยลดลงสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ไม่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรค รองลงมาที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุม การยับยั้งและการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1.40, 1.25, 1.00, 0.60 และ 1.30 เซนติเมตร ตามลำดับ พบว่าการยับยั้งและการเจริญของเส้นใยเชื้อราลดลงมาก

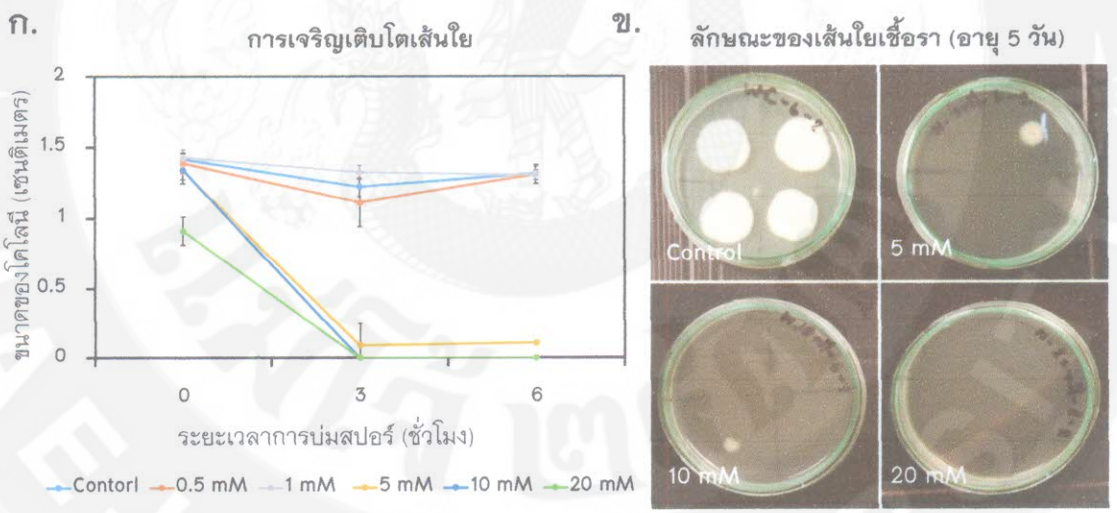
ที่สุดระยะเวลาการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้การยับยั้งและการเจริญของเส้นใยเชื้อก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 20 มิลลิโมลาร์ พบว่าไม่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่เตรียมในตัวทำละลายโซเดียมคลอไรด์
ก. ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides*
ข. ลักษณะของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA สังเกตในชั่วโมงการเจริญเติบโตที่ 120 ชั่วโมง

ผลของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เตรียมในตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน พบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ทำการบ่มสปอร์เป็นเวลา 0 ชั่วโมง ให้ผลการยับยั้งและการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และระยะเวลาในการบ่มสปอร์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีผลต่อการยับยั้งและการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราลดลงสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ ไม่มีการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรครองลงมาระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ มีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.09 เซนติเมตร และระดับความเข้มข้น 0.5, 1 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุม มีการยับยั้งและการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราเท่ากับ 1.11, 1.32

และ 1.20 เซนติเมตร ตามลำดับ และ 6 ชั่วโมง ให้ขนาดของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีการยับยั้งและการเจริญเติบโตของเส้นใยลดลงสูงสุดที่การใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ ไม่มีการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรค รองลงมาคือระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.10 เซนติเมตร ในส่วนของความเข้มข้นที่ 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุม พบว่าสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แสดงผลการยับยั้งและการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 1.31, 1.30 และ 1.31 เซนติเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการยับยั้งและการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคลดลงมากที่สุดระยะเวลาการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้การยับยั้งและการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุดโดยไม่มีการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4.10)



ภาพที่ 4.10 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่เตรียมในตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน
ก. ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides*
ข. ลักษณะของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA สังเกตในชั่วโมงการเจริญเติบโตที่ 120 ชั่วโมง

จากการทดลองผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของพริก หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าสารละลายที่นำมาทดสอบทั้ง 3 ชนิด ให้ผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุด โดยมีค่าขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.85 เซนติเมตร และรองลงมาคือน้ำกลั่น และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1.09 และ 1.16 เซนติเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา โดยมีค่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.44 เซนติเมตร ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และชั่วโมงที่บ่มสปอร์ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุดที่ 6 ชั่วโมง โดยมีค่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.83 เซนติเมตร ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้น ทำให้การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราลดลง ซึ่งในตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ที่มีความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.2 ผลของสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา บนอาหาร PDA ด้วยวิธี หยดสปอร์บนอาหาร PDA ที่ 120 ชั่วโมง

สิ่งทดลอง	ค่าเฉลี่ยรัศมีเชื้อรา (เซนติเมตร)
ตัวทำละลาย	
น้ำกลั่น	1.0923[a]
โซเดียมคลอไรด์	1.1625[a]
บัฟเฟอร์ฟอสเฟตซา	0.8594[b]
ความเข้มข้นของ H_2O_2	
Control	1.3415[a]
0.5 mM	1.2783[a]
1 mM	1.3240[a]
5 mM	1.0420[b]
10 mM	0.8014[c]
20 mM	0.4413[d]
ชั่วโมงที่บ่ม H_2O_2	
0	1.3483[a]
3	0.9275[b]
6	0.8385[c]
Interaction	
สารละลาย x ความเข้มข้น H_2O_2	**
สารละลาย x ชั่วโมง	**
ความเข้มข้น H_2O_2 x ชั่วโมง	**
สารละลาย x ความเข้มข้น H_2O_2 x ชั่วโมง	**
GRAND MEAN	1.04
CV	15.29%

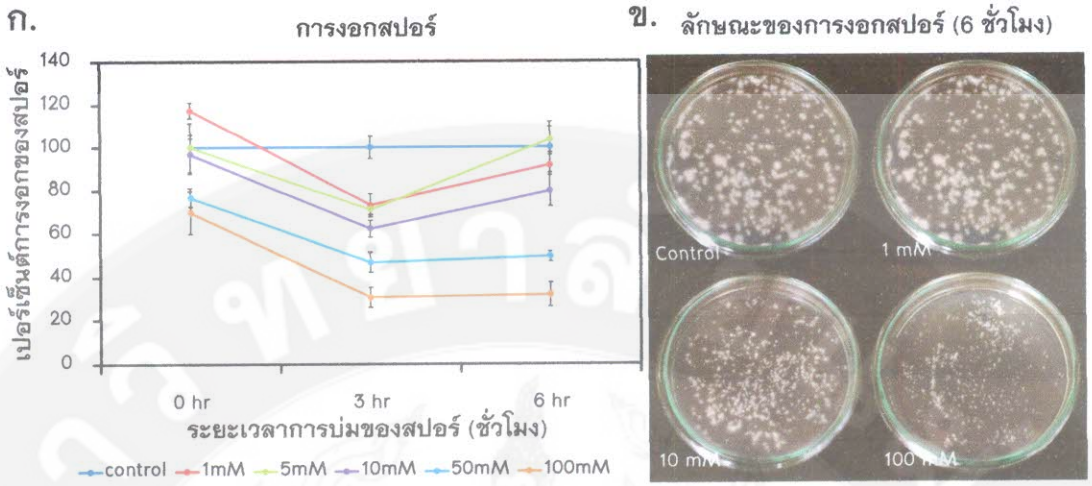
หมายเหตุ

** หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

a, b, c, d หมายถึง ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต

4.4.3 ผลของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

จากการทดลองที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของพริกในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายสารละลายโซเดียมคลอไรด์ โดยทำการบ่มสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของพริกในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคลดลง โดยสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่เตรียมในสารละลายโซเดียมคลอไรด์นั้น ทำให้การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกที่แช่ในสารสารโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร PDA นั้น มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ 100 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราเท่ากับ 39.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยน้อยที่สุด รองลงมาคือระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ 50, 1, 10 และ 5 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราบนอาหาร PDA เท่ากับ 58.77, 74.38, 78.06 และ 84.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีอัตราการงอกของสปอร์เชื้อราเท่ากับ 100.00 เปอร์เซ็นต์ และในชั่วโมงการบ่มของสปอร์เชื้อราก่อโรคที่แตกต่างกันนั้นพบว่า เปอร์เซนต์การงอกของสปอร์เชื้อรามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ชั่วโมงการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 64.12 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 0 และ 6 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราอยู่ที่ 74.32 และ 78.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไม่มีผลร่วมระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์กับชั่วโมงในการบ่มสารละลาย แต่จากการทดลองพบว่า สารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่ชั่วโมงการบ่มสปอร์เชื้อราที่ 3 และ 6 ชั่วโมงนั้น ให้เปอร์เซ็นการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกลดลงมากที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 34.86 และ 39.07 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.11 และตารางที่ 4.3)



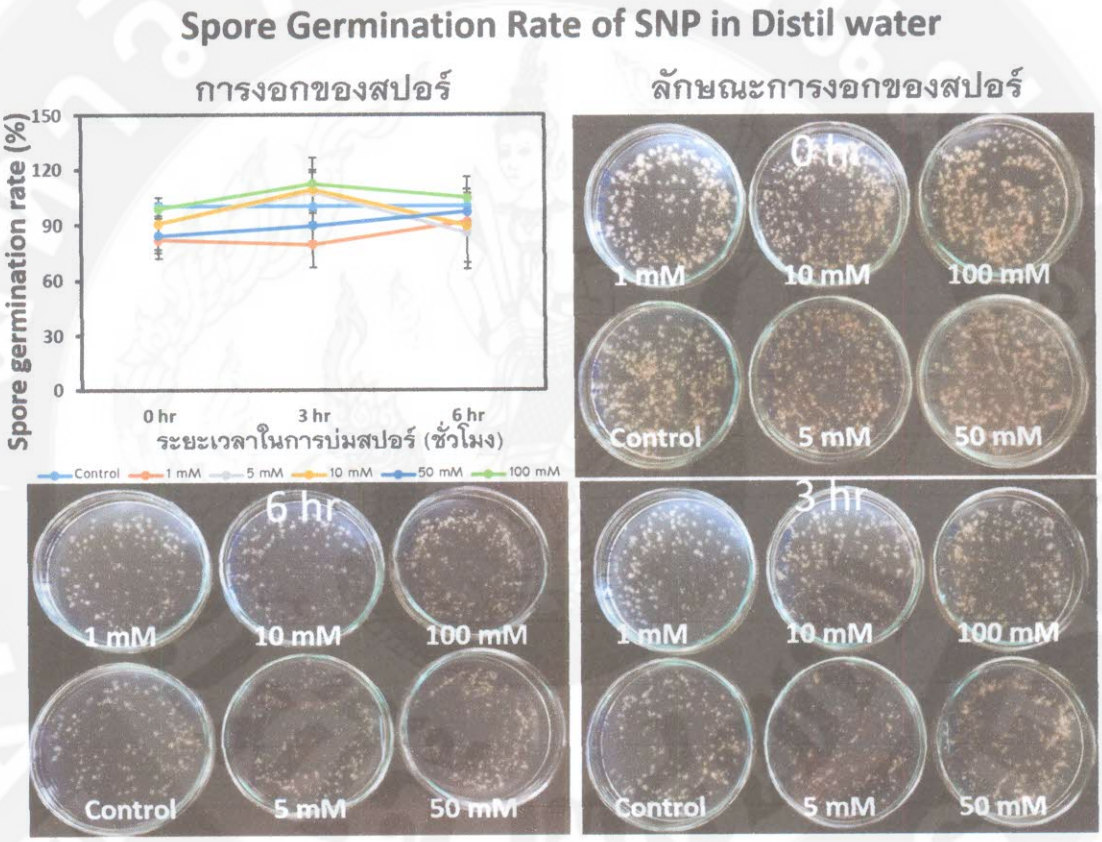
ภาพที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์การงอกและลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในตัวทำละลายสารละลายโซเดียมคลอไรด์

ก. เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคที่ทำการบ่มในสารโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ในการบ่มชั่วโมงที่ 0, 3 และ 6 ชั่วโมง

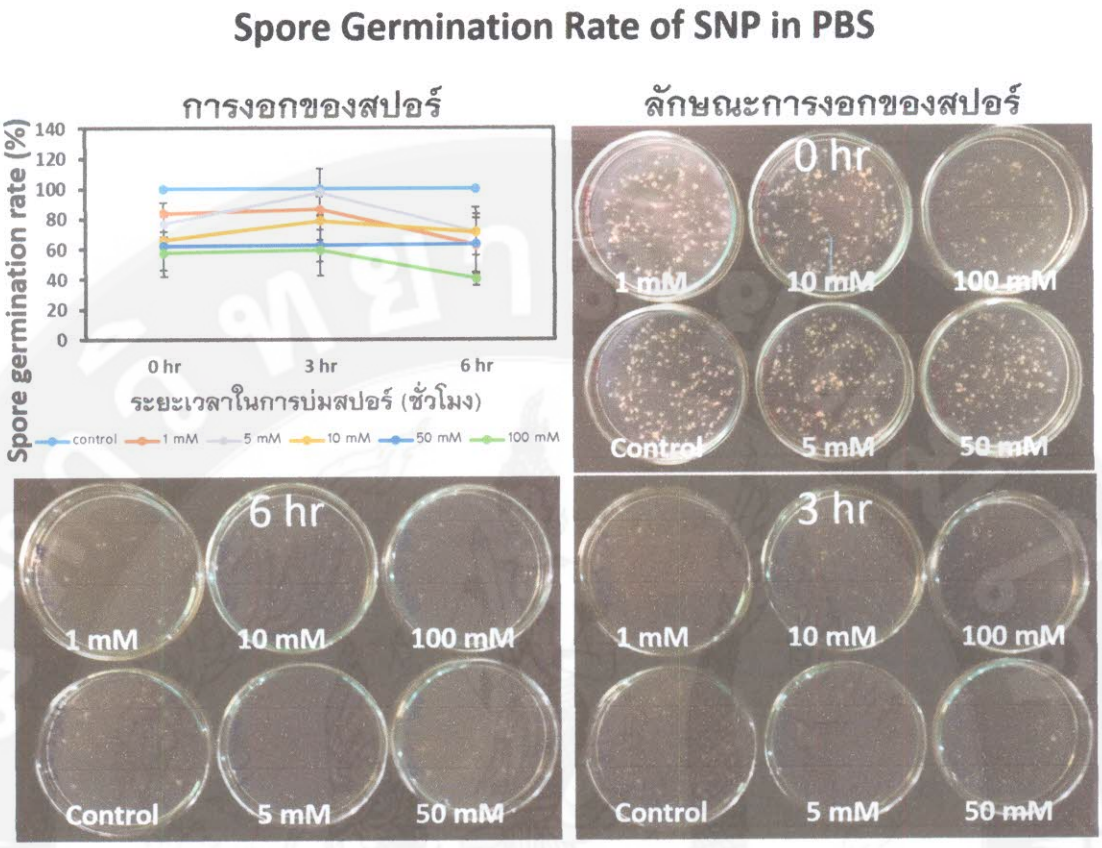
ข. ลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ ในชั่วโมงการบ่มที่ 6 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1, 10 และ 100 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุม

ในส่วนของการศึกษาผลของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น ดังกล่าวข้างต้น โดยการใช้ตัวทำละลายน้ำกลั่นและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน และการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคจากการบ่มสปอร์ในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ ที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายนั้นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมในทุกช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ส่วนเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่ใช้ตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนนั้น พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกลดลงเป็นลำดับเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะความเข้มข้นที่ 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่มีการบ่มสปอร์เป็นเวลา 0 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 59.98 และ 57.39% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อ

โรคแอนแทรคโนสที่บ่มสปอร์ในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนเป็นตัวทำละลายนั้น มีค่าลดลงตั้งแต่ในชั่วโมงการบ่มที่ 0 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 57.39% และลดลงเป็นลำดับที่เพิ่มมากขึ้นในช่วงการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคที่ระยะเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 59.07 และ 40.33% ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.12 และ 4.13



ภาพที่ 4.12 เปอร์เซ็นต์การงอกและลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในตัวทำละลายน้ำกลั่น จากการบ่มสปอร์เป็นระยะเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.13 เปอร์เซ็นต์การงอกและลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน และบ่มสปอร์เป็นระยะเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.3 ผลของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา ก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกบนอาหาร PDA หลังการบ่มสปอร์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สิ่งทดลอง	ค่าเฉลี่ยการงอกของสปอร์เชื้อรา ที่สปอร์บ่มในสารสารโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ (%)			ค่าเฉลี่ย (ความเข้มข้นของสาร)
	0hr	3hr	6hr	
control	100	100	100	100^{a}
1mM	85.53	60.43	77.18	74.38^{bc}
5mM	82.34	63.79	106.56	84.23^{ab}
10mM	71.16	72.7	90.34	78.06^{b}
50mM	63.79	52.94	59.59	58.77^{c}
100mM	43.09	34.86	39.07	39.01^{d}
ค่าเฉลี่ย (ชั่วโมงบ่ม)	74.32^{ab}	64.12^{a}	78.79^{a}	72.41
F-test	ความเข้มข้นของสาร			**
	ชั่วโมงบ่ม			*
	ความเข้มข้นของสาร×ชั่วโมงบ่ม			ns
	C.V. (%)			23.98

หมายเหตุ

** หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

a, b, c, d หมายถึง ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

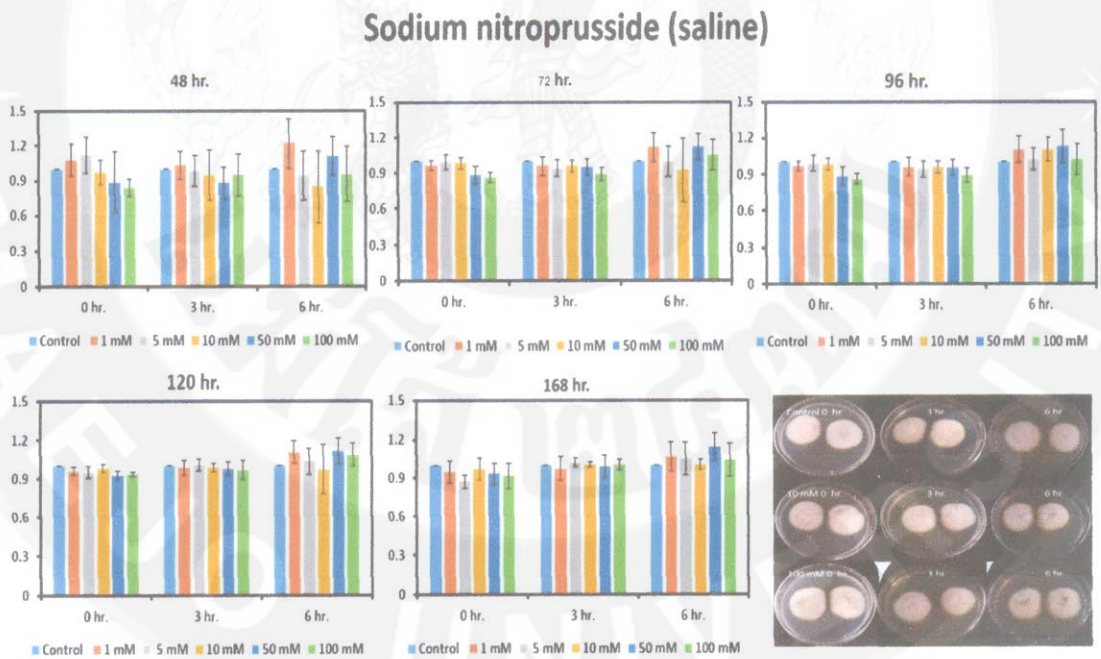
4.4.4 ผลของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของพริก

จากการทดลองศึกษาการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกในสารละลายสารโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายโซเดียมคลอไรด์ โดยทำการบ่มสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยดสปอร์เชื้อราลงบนอาหาร PDA และทำการวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของพริกใน

ชั่วโมงที่ 48, 96 และ 168 เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา ผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของโคโลนีจากการวัดขนาดของโคโลนีเชื้อราก่อโรคในชั่วโมงที่ 48 ที่ทำการบ่มสปอร์ในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นั้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยสารละลายที่ระดับความความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีขนาดโคโลนีของเส้นใยเชื้อราที่น้อยที่สุดเท่ากับ 0.95 เซนติเมตร รองลงมาคือระดับความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 5 มิลลิโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเชื้อราเท่ากับ 0.96, 0.97, 1.10 และ 1.11 เซนติเมตร ตามลำดับ ถ้าทำการเปรียบเทียบในชั่วโมงการบ่มของสปอร์เชื้อราพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยชั่วโมงการบ่มสปอร์ที่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยเชื้อราก่อโรคมีขนาดโคโลนีน้อยที่สุดคือ การบ่มสปอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยขนาดโคโลนีเท่ากับ 0.99 เซนติเมตร รองลงมาคือชั่วโมงการบ่มที่ 3 และ 0 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยของขนาดโคโลนีเชื้อราเท่ากับ 1.00 และ 1.07 เซนติเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ในส่วนของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายและชั่วโมงการบ่มสปอร์เชื้อรานั้น พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะเห็นได้จากจากการบ่มของสปอร์ที่ชั่วโมงและความเข้มข้นของสารละลายที่แตกต่างกัน เช่น การบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ และชั่วโมงที่ 6 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ระยะการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อราก่อโรคที่ 96 ชั่วโมง ส่งผลให้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ 10 มิลลิโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยของขนาดโคโลนีน้อยที่สุดเท่ากับ 0.95 เซนติเมตร รองลงมาคือระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ 50, 1, 5 และ 100 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าเฉลี่ยของขนาดโคโลนีเท่ากับ 0.98, 0.99, 1.05 และ 1.07 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยชั่วโมงการบ่มของสปอร์เชื้อราก่อโรคนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคเป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่ทำให้การเจริญเติบโตเส้นใยน้อยที่สุด มีค่าเฉลี่ยของขนาดโคโลนีเท่ากับ 0.98 เซนติเมตร รองลงมาคือการบ่มที่ 3 และ 0 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของขนาดโคโลนีของเชื้อราก่อโรคเท่ากับ 1.01 และ 1.01 เซนติเมตร ตามลำดับ และความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์และชั่วโมงการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคนั้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.4)

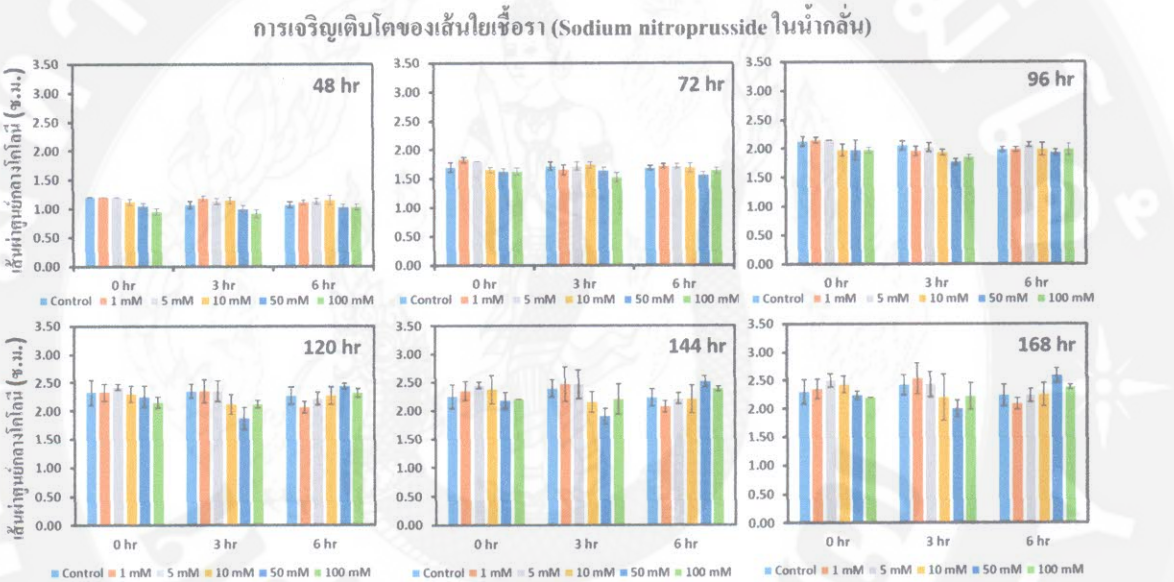
โดยจะเห็นได้ว่าความแตกต่างของขนาดโคโลนีของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกจากชั่วโมงการบ่มสปอร์ที่ 0 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ของชั่วโมงการเจริญเติบโตจากการวัดขนาดของโคโลนีที่อายุ

168 ชั่วโมง พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของขนาดโคโลนีของเส้นใยเชื้อราที่สปอร์บ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นั้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ 100 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าเฉลี่ยของขนาดโคโลนีเชื้อราก่อโรคน้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 0.65 เซนติเมตร รองลงมาคือความเข้มข้น 5, 50, 10 และ 1 มิลลิโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยของขนาดโคโลนีของเส้นใยเชื้อราเท่ากับ 0.71, 0.89, 0.94 และ 1.00 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยชั่วโมงการบ่มของสปอร์เชื้อราก่อโรคในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นั้น ให้ค่าเฉลี่ยของขนาดของโคโลนีเชื้อราก่อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งการบ่มสปอร์เป็นเวลา ที่ 0 ชั่วโมงนั้นทำให้การเจริญเติบโตเส้นใยน้อยที่สุดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.83 เซนติเมตร รองลงมาคือการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคในชั่วโมงที่ 3 และ 6 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของขนาดโคโลนีของเชื้อราก่อโรคเท่ากับ 0.84 และ 0.88 เซนตริเมตร ตามลำดับ ในส่วนของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์และชั่วโมงการบ่มสปอร์ที่แตกต่างกันนั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 4.14 และตารางที่ 4.4)



ภาพที่ 4.14 ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก ที่สปอร์เชื้อราผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในซาลีน และการบ่มเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ในชั่วโมงการเจริญเติบโตที่ 48, 72, 96, 120 และ 168 ชั่วโมง และลักษณะของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก ของการบ่มสปอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในระยะการเจริญเติบโตของวันที่ 7

ในส่วนของการศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรค โดยการบ่มสปอร์ในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ ที่ใช้น้ำกลั่นและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนเป็นตัวทำละลาย พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกหลังการวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราก่อโรคในแต่ละความเข้มข้นมีอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีที่ไม่แตกต่างกันทั้งการบ่มสปอร์ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน นั่นแสดงว่าสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ละลายในตัวทำละลายน้ำกลั่นและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ดังภาพที่ 4.15 และ 4.16



ภาพที่ 4.15 ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก ที่สปอร์เชื้อราผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ที่ละลายในตัวทำละลายน้ำกลั่น และการบ่มเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ในชั่วโมงการเจริญเติบโตที่ 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของเส้นใยหลังสปอร์ผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนโตรพลัสไซด์ในชั่วโมงที่ 48 96 และ 168

ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก (ซม.)												
	ชั่วโมงที่ 48				ชั่วโมงที่ 96				ชั่วโมงที่ 168			
สิ่งทดลอง	0hr	3hr	6hr	ค่าเฉลี่ย	0hr	3hr	6hr	ค่าเฉลี่ย	0hr	3hr	6hr	ค่าเฉลี่ย
1mM	1^{bc}	0.98^{c}	0.88^{c}	0.95	1^{c}	0.98^{cd}	0.98^{cd}	0.99^{bc}	1	1.02	0.99	1^{a}
5mM	1^{bc}	1.03^{abc}	1.29^{a}	1.11	1^{c}	1.02^{ba}	1.13^{a}	1.05^{ab}	0.67	0.7	0.76	0.71^{bc}
10mM	1.08^{abc}	0.97^{c}	0.84^{c}	0.96	0.98^{cd}	0.96^{cd}	0.89^{d}	0.95^{c}	0.95	0.97	0.92	0.94^{bc}
50mM	1.03^{abc}	0.95^{c}	0.95^{c}	0.97	1^{c}	0.98^{cd}	0.95^{cd}	0.98^{bc}	0.65	1.00	1.00	0.89^{ab}
100mM	1.29^{a}	0.93^{c}	$1.07ab^{c}$	1.10	1.10^{ab}	1.10^{ab}	1.02^{bc}	1.07^{a}	0.71	0.5	0.69	0.63^{c}
ค่าเฉลี่ย	1.07	1.00	0.99	1.02	1.01	1.01	0.98	1.00	0.83	0.84	0.88	0.85
F-test	ความเข้มข้นของสาร			ns				**				*
ชั่วโมงบ่ม				ns				ns				ns
ความเข้มข้นของสาร×ชั่วโมงบ่ม				*				*				ns
C.V. (%)				21.61				7.77				40.43

หมายเหตุ ** หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

a, b, c, d หมายถึง ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ น้ำกลั่น ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน และทำการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคมีลักษณะที่ไม่แตกต่างกันมาก โดยมีรายละเอียดดังนี้ โคโลนีของเชื้อราก่อโรคมีลักษณะสีส้มอ่อนไปจนถึงส้มเหลือง ผิวด้านบนของโคโลนีมีขนสีขาวปกคลุม และมีจุดสีดำด้านหลังของโคโลนี (ตารางที่ 4.5–4.7 และภาพที่ 4.17–4.19) และสัณฐานวิทยาของสปอร์เชื้อราที่แช่ในตัวทำละลายน้ำกลั่นและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ก็ให้ลักษณะของสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกับสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราที่สปอร์แช่ในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็นตัวทำละลาย

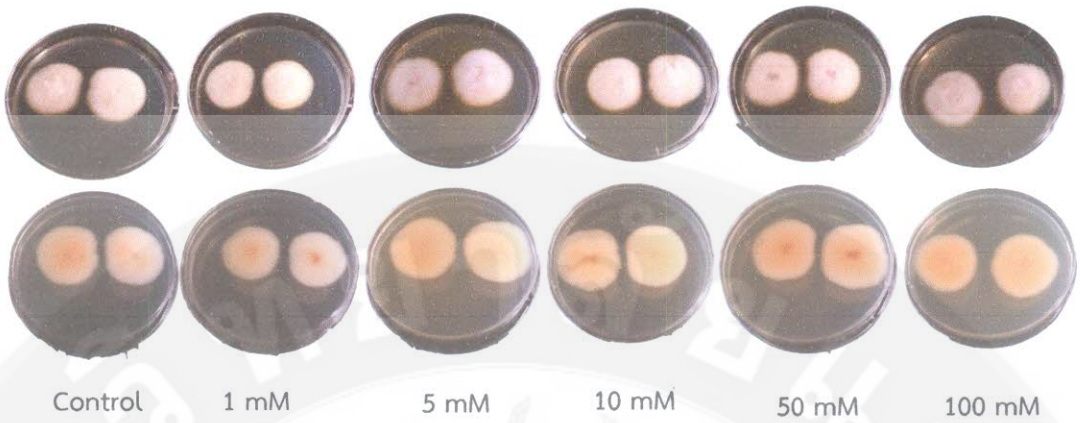
ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 0 ชั่วโมง

ความเข้มข้น	ลักษณะของเชื้อรา
ชุดควบคุม	มีโคโลนีสีส้ม บนโคโลนีมีสีขาวขนปุยนุ่ม มีจุดสปอร์มีสีดำ
1 mM	โคโลนีมีสีส้ม บนโคโลนีมีสีขาวขนปุยนุ่ม จุดสปอร์มีสีดำ
5 mM	โคโลนีมีสีส้ม บนโคโลนีมีสีขาวขนปุยนุ่ม จุดสปอร์มีสีดำ
10 mM	มีโคโลนีสีส้มอ่อนๆ บนโคโลนีมีสีขาวมีขนปุยนุ่ม จุดสปอร์มีสีดำ
50 mM	มีโคโลนีมีสีเหลืองส้ม บนโคโลนีมีสีขาวขนปุยนุ่ม จุดสปอร์มีสีส้มขาวเล็กน้อยปนกับจุดสีดำ
100 mM	มีโคโลนีสีเหลืองส้ม บนโคโลนีมีสีส้มเหลืองปนกับสีขาวขนปุยนุ่ม จุดสปอร์มีสีส้ม

ภาพที่ 4.17 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการแช่ในสารโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 0 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

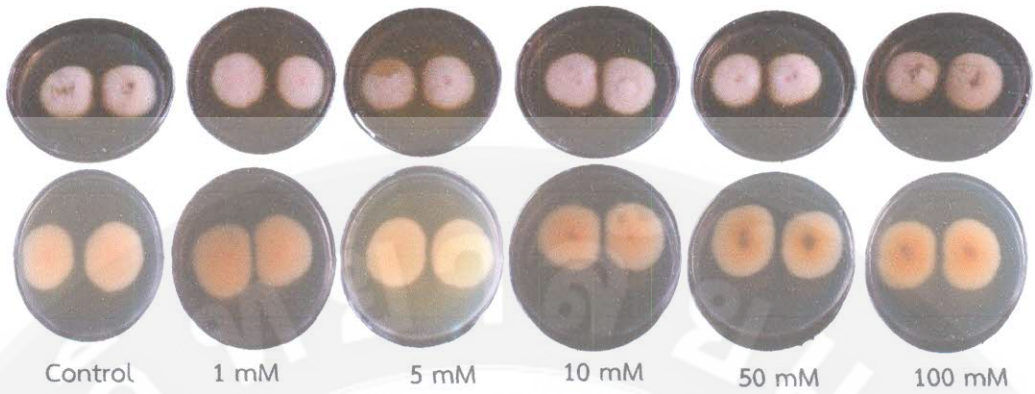
ความเข้มข้น	ลักษณะของเชื้อรา
ชุดควบคุม	มีโคโลนีสีส้ม บนโคโลนีมีสีขาวขนปุยนุ่ม มีจุดสปอร์มีสีดำ
1 mM	มีโคโลนีสีส้ม บนโคโลนีมีสีขาวขนปุยนุ่ม มีจุดสปอร์มีสีดำ
5 mM	มีโคโลนีสีส้ม บนโคโลนีมีสีขาวขนปุยนุ่ม มีจุดสปอร์มีสีดำ
10 mM	มีโคโลนีสีส้มอ่อนๆ บนโคโลนีมีสีขาวขนปุยนุ่ม มีจุดสปอร์มีสีดำ
50 mM	มีโคโลนีสีเหลืองส้ม บนโคโลนีมีสีขาวขนปุยนุ่ม จุดสปอร์มีสีส้มขาวเล็กน้อยปนกับจุดสีดำข้างบน
100 mM	มีโคโลนีมีสีเหลืองส้ม บนโคโลนีมีสีส้มเหลืองปนกับสีขาวขนปุยนุ่ม มีจุดสปอร์มีสีส้ม



ภาพที่ 4.18 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการแช่ในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ความเข้มข้น	ลักษณะของเชื้อรา
ชุดควบคุม	มีโคโลนีสีส้ม บนโคโลนีมีสีขาวขนปุยนุ่ม มีจุดสปอร์มีสีดำ
1 mM	มีโคโลนีสีส้ม บนโคโลนีมีสีขาวขนปุยนุ่ม มีจุดสปอร์มีสีดำ
5 mM	มีโคโลนีสีส้ม บนโคโลนีมีสีขาวขนปุยนุ่ม มีจุดสปอร์มีสีดำ
10 mM	มีโคโลนีสีส้มอ่อนๆ บนโคโลนีมีสีขาวขนปุยนุ่ม มีจุดสปอร์มีสีดำ
50 mM	มีโคโลนีสีเหลืองส้ม บนโคโลนีมีสีขาวมีขนปุยนุ่ม มีจุดสปอร์มีสีส้มขาวเล็กน้อยปนกับจุดสีดำ
100 mM	มีโคโลนีสีเหลืองส้ม ข้างบนโคโลนีมีสีส้มเหลืองปนกับสีขาวขนปุยนุ่ม มีจุดสปอร์มีสีส้ม

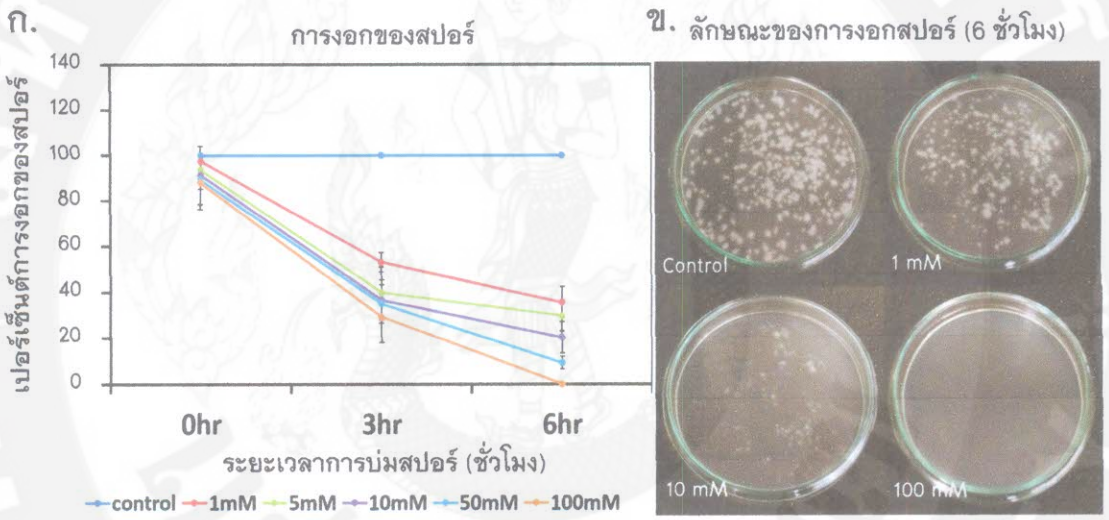


ภาพที่ 4.19 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

4.4.5 ผลของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

จากการทดลองทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ โดยการเตรียมสารดังกล่าวในตัวทำละลายโซเดียมคลอไรด์ ฟอสเฟส บัฟเฟอร์ซาลีน และน้ำกลั่น และการบ่มสปอร์เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง เพื่อทดสอบหาอัตราอัตราการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ผลการทดลองการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็นตัวทำละลายพบว่าอัตราการงอกสปอร์เชื้อราที่ผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนโตรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ท 100 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์งอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคงอกน้อยที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 39.05 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 50, 10, 5 และ 1 มิลลิโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราเท่ากับ 44.51, 49.39, 54.37 และ 61.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของชั่วโมงการบ่มสปอร์ในสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่แตกต่างกันนั้น พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์น้อยที่สุดเท่ากับ 32.41 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการบ่มสปอร์เป็นเวลา 3 และ 0 ชั่วโมง โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เท่ากับ 48.89 และ 93.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทและชั่วโมงการบ่มที่แตกต่างกันมีผลต่อการงอกของสปอร์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทและชั่วโมงการบ่มมีความเกี่ยวข้องกัน เมื่อชั่วโมงการบ่มสปอร์เชื้อราและความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดน้อยลง โดยเฉพาะเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่เพิ่มสูงขึ้น และระยะเวลาในการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ 100 มิลลิโมลาร์นั้น ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์มีค่าเท่ากับ 0.00% เนื่องจากสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกไม่สามารถงอกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ภาพที่ 4.20 และตารางที่ 4.8)



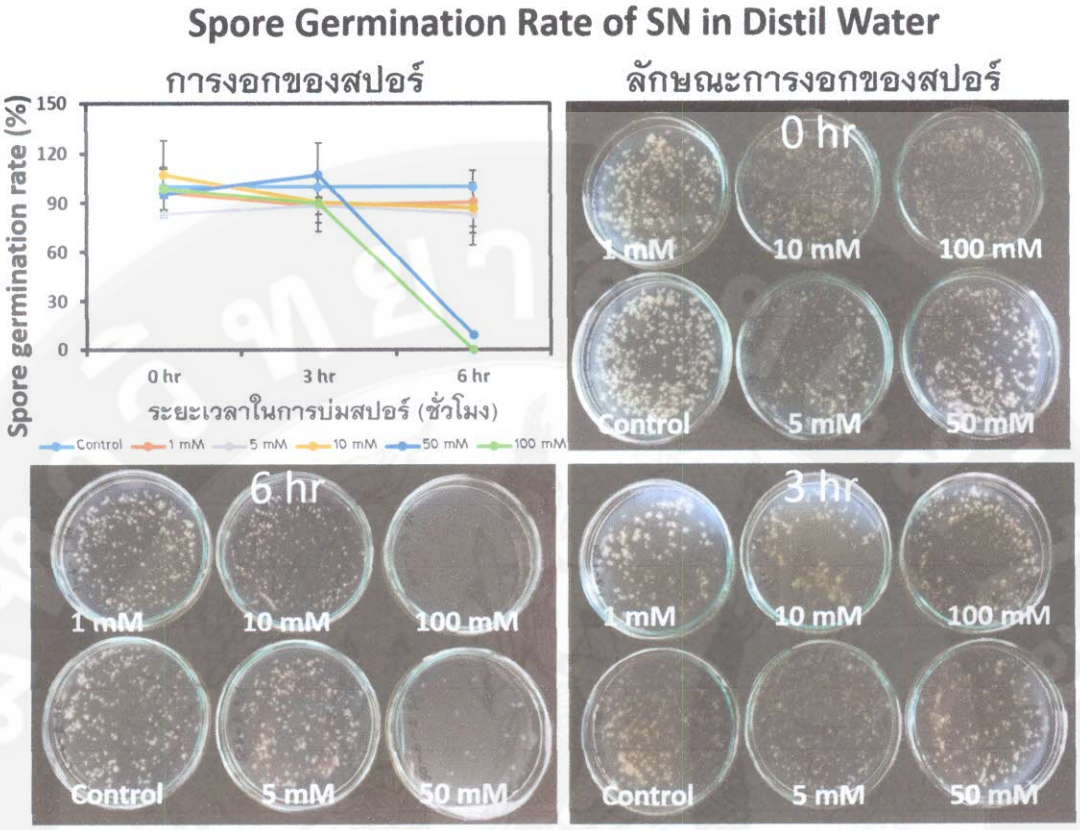
ภาพที่ 4.20 เปอร์เซ็นต์การงอกและลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ที่ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์

ก. เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรค ที่ทำการบ่มสปอร์ในสารละลายโซเดียมไนไตร์ท ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง

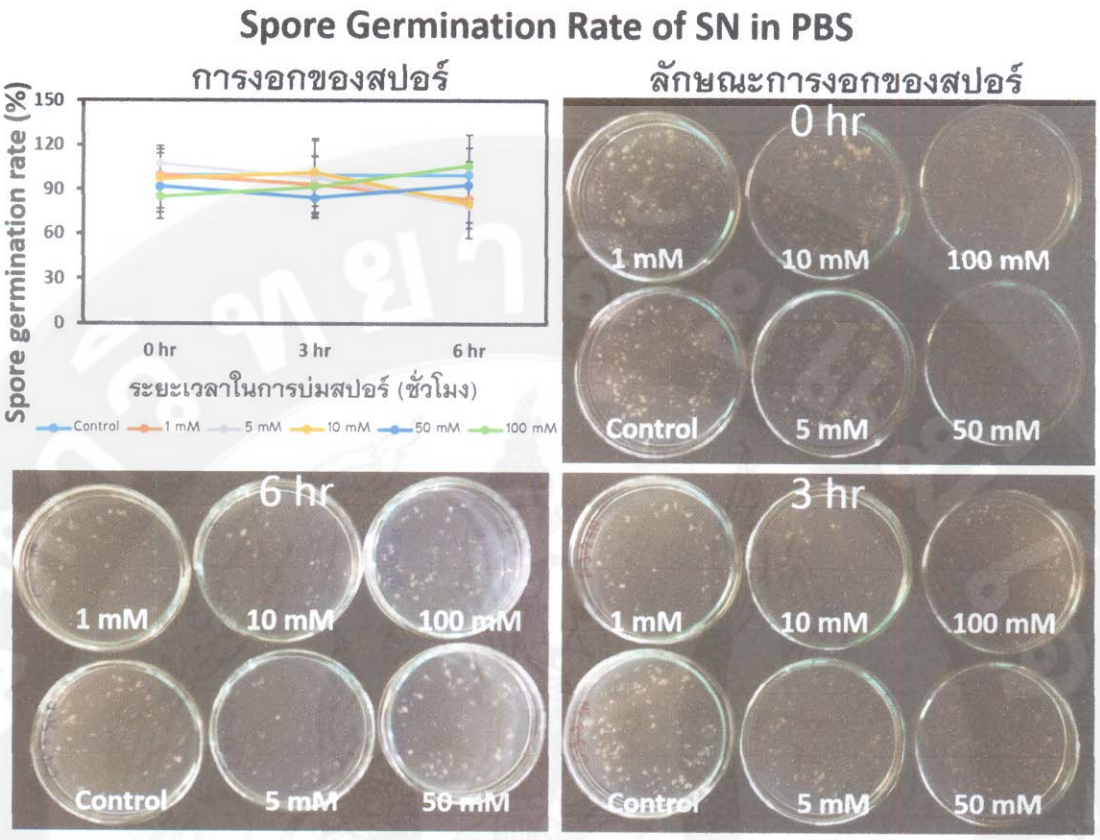
ข. ลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรค ที่สปอร์ผ่านการแช่สารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้นที่ 1, 10, 100 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุม เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ในส่วนของการศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ในสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่เตรียมในตัวทำละลายน้ำกลั่นและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มีระยะการบ่มสปอร์เป็นเวลา 0, 3

และ 6 ชั่วโมง พบว่าสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ละลายในตัวทำละลายน้ำกลั่นนั้น ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคลดลงตามลำดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่เพิ่มสูงขึ้นและระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก โดยเฉพาะการบ่มสปอร์ในสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีอัตราการงอกของสปอร์เชื้อรามีค่าเท่ากับ 9.15 และ 0.00% ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวมีทิศทางเหมือนกับการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็นตัวทำละลาย แต่ในขณะที่การบ่มสปอร์เชื้อราในสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่เตรียมในตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนนั้น พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกที่สปอร์เชื้อราบ่มในสารละลายที่มีความเข้มข้นและระยะเวลาในการบ่มสปอร์ที่แตกต่างกันนั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงและแตกต่างจากชุดควบคุม (ภาพที่ 4.21 และ 4.22) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ระยะเวลาในการบ่มสปอร์มีผลต่ออัตราการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรค และตัวทำละลายที่แตกต่างกันทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของพริกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการละลายสารโซเดียมไนไตร์ทเพื่อให้เกิดการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกมากที่สุดคือ น้ำกลั่นและสารละลายโซเดียมคลอไรด์



ภาพที่ 4.21 เปอร์เซ็นต์การงอกและลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในน้ำกลั่น และลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราบนอาหาร PDA โดยการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นระยะเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.22 เปอร์เซ็นต์การงอกและลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน และลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อราบนอาหาร PDA โดยการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นระยะเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.8 ผลของสารละลายโซเดียมไนไตรท์ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกบนอาหาร PDA หลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สิ่งทดลอง	ค่าเฉลี่ยการงอกของสปอร์เชื้อรา ที่สปอร์บ่มในสารโซเดียมไนไตรท์ (%)			ค่าเฉลี่ย (ความเข้มข้นของสาร)
	0hr	3hr	6hr	
control	100^{a}	100^{a}	100^{a}	100^{a}
1mM	97.44^{a}	52.98^{b}	35.54^{c}	61.99^{b}
5mM	93.75^{a}	39.72^{c}	29.65^{cd}	54.37^{c}
10mM	91.47^{a}	36.56^{c}	20.13^{de}	49.39^{cd}
50mM	89.39^{a}	34.97^{c}	9.16^{ef}	44.51^{de}
100mM	88.02^{a}	29.13^{cd}	0^{f}	39.05^{e}
ค่าเฉลี่ย (ชั่วโมงบ่ม)	93.34^{a}	48.89^{b}	32.41^{c}	58.22
F-test	ความเข้มข้นของสาร			**
	ชั่วโมงบ่ม			**
	ความเข้มข้นของสาร×ชั่วโมงบ่ม			**
	C.V. (%)			12.44

หมายเหตุ

** หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

a, b, c, d หมายถึง ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต

4.4.6 ผลของสารละลายโซเดียมไนไตรท์ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

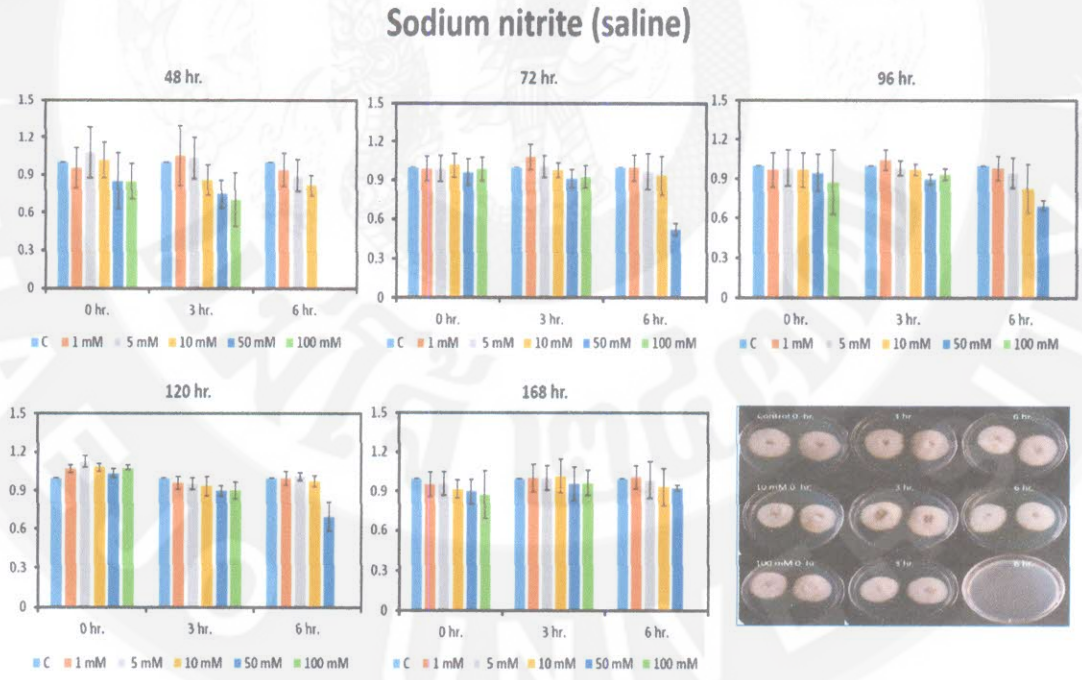
จากการทดลองศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก จากการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกในสารละลายสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ โดยทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง โดยเริ่มบันทึกผลการทดลองจากการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราก่อโรคเพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราในชั่วโมงที่ 48, 96 และ 168 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราก่อโรคในชั่วโมงที่ 48 ที่สปอร์ผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มีความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยเชื้อราที่มีค่าน้อยที่สุด นั้นเกิดจากการบ่มสปอร์เชื้อราในสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.58 เซนติเมตร รองลงมาคือความเข้มข้น 5, 50, 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.63, 0.87, 0.93 และ 0.94 เซนติเมตร ตามลำดับ การบ่มสปอร์เชื้อราในระยะเวลาที่แตกต่างกันส่งผลให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเชื้อรามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยเฉพาะการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำให้เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกเกิดการเจริญเติบโตของเส้นใยน้อยที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของขนาดโคโลนีเท่ากับ 0.53 เซนติเมตร รองลงมาคือการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 3 และ 0 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเชื้อราเฉลี่ยเท่ากับ 0.95 และ 0.96 เซนติเมตร ตามลำดับ ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารละลายโซเดียมไนไตร์ทและชั่วโมงการบ่มสปอร์เชื้อราที่แตกต่างกันนั้น ส่งผลให้ค่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยโคโลนีของเส้นใยเชื้อรามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยเฉพาะการบ่มของสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราในชั่วโมงที่ 96 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ท 100 มิลลิโมลาร์ ให้ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของโคโลนีเส้นใยเชื้อรามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 0.6 เซนติเมตร รองลงมาคือความเข้มข้น 5, 10, 1 และ 50 มิลลิโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยของขนาดโคโลนีเส้นใยเชื้อราอยู่ที่ 0.84, 0.93, 0.96 และ 0.98 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังนั้นการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งชั่วโมงการบ่มสปอร์ที่ทำให้การเจริญเติบโตเส้นใยเชื้อราน้อยที่สุดคือการบ่มสปอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.7 เซนติเมตร รองลงมาคือการบ่มสปอร์เป็นเวลา 3 และ 0 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 0.94 และ 1 เซนติเมตร ตามลำดับ ในส่วนของการหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทและชั่วโมงการบ่มสปอร์ของเชื้อรานั้น พบว่าทำให้ค่าขนาดของโคโลนีเส้นใยเชื้อรามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

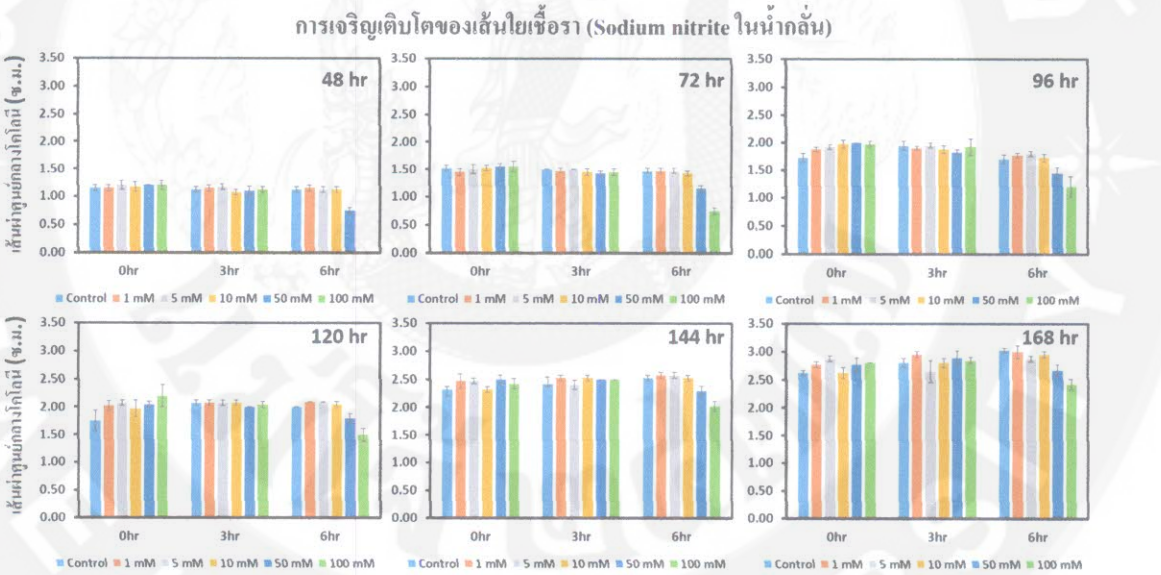
ในชั่วโมงการเจริญเติบโตที่เวลา 168 ชั่วโมง จากการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ 100 มิลลิโมลาร์นั้น ส่งผลต่อสปอร์ของเชื้อราไม่สามารถงอกและเกิดเป็นโคโลนีได้ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทมีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยที่ความเข้มข้นที่ 100 มิลลิโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีน้อยที่สุดเท่ากับ 0.6 เซนตริเมตร

รองลงมาคือความเข้มข้นที่ 10, 50, 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยของขนาโคโลนีของเชื้อรา เท่ากับ 0.81, 0.99, 0.99 และ 1.07 เซนติเมตร ตามลำดับ และในการบ่มสปอร์เชื้อราในชั่วโมงที่แตกต่างกันทำให้การเจริญเติบโตของขนาดโคโลนีเส้นใยเชื้อรามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยชั่วโมงการบ่มที่ทำให้การเจริญเติบโตของโคโลนีเส้นใยเชื้อราน้อยที่สุด คือ การบ่มสปอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.79 เซนติเมตร รองลงมาคือการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 3 และ 0 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.92 และ 0.96 เซนติเมตร ตามลำดับ ในส่วนของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทและชั่วโมงการบ่มสปอร์ในเวลาที่แตกต่างกันนั้น พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยจะเห็นได้จากความแตกต่างของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุดที่การบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ 100 มิลลิโมลาร์ โดยสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสนั้นไม่สามารถเกิดการงอกและเจริญเป็นกลุ่มเส้นใยได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ภาพที่ 4.23 และตารางที่ 4.9)



ภาพที่ 4.23 ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่สปอร์ผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนไตร์ท ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในซาลีน เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ในชั่วโมงการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราที่ 48, 72, 96, 120 และ 168 ชั่วโมง และลักษณะของโคโลนีเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก ของการบ่มสปอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ของอายุการเจริญเติบโตในวันที่ 7

นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่บ่มสปอร์ในสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการใช้น้ำกลั่นและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนเป็นตัวทำละลาย พบว่าการใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของขนาดโคโลนีเชื้อราก่อโรค ที่สปอร์บ่มในสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมงนั้นมีอัตราการเจริญที่ช้ากว่าระดับความเข้มข้นอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีค่าเฉลี่ยของขนาดโคโลนีเท่ากับ 0.79 เซนติเมตร ของชั่วโมงการเจริญเติบโตที่ 72 ในส่วนของอัตราการเติบโตของขนาดโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกที่มีการบ่มสปอร์ในสารละลายโซเดียมไนไตร์ท โดยการใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนเป็นตัวทำละลายนั้น ผลการทดลองพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของขนาดโคโลนีของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกนั้น ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละความเข้มข้นและทุกช่วงเวลาในการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรค ดังภาพที่ 4.24 และ 4.25



ภาพที่ 4.24 ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่สปอร์ผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนไตร์ท ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในน้ำกลั่น เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ในชั่วโมงการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราที่ 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.9 ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของเส้นใยหลังสปอร์ผ่านการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนไตร์ทในชั่วโมงที่ 48 96 และ 168

ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก (ซม.)												
	ชั่วโมงที่ 48				ชั่วโมงที่ 96				ชั่วโมงที่ 168			
สิ่งทดลอง	0	3	6	ค่าเฉลี่ย	0	3	6	ค่าเฉลี่ย	0	3	6hr	ค่าเฉลี่ย
control	0.83^{bcde}	1.08^{a}	0.85^{abcd}	0.92^{a}	1.00^{a}	0.98^{ab}	0.94^{ab}	0.98^{a}	1.00^{ab}	0.96^{ab}	0.9^{ab}	0.95^{ab}
1mM	1.00^{abc}	1.04^{abc}	0.75^{de}	0.93^{a}	1.00^{a}	0.98^{ab}	0.9^{ab}	0.96^{a}	1.00^{ab}	1.00^{ab}	0.96^{ab}	0.99^{ab}
5mM	1.00^{abc}	0.89^{abcd}	0.00^{f}	0.63^{b}	1.00^{a}	0.95^{ab}	0.58^{c}	0.84^{b}	1.00^{ab}	0.99^{ab}	1.21^{a}	1.07^{a}
10mM	0.95^{abcd}	1.02^{abc}	0.85^{abcde}	0.94^{a}	0.97^{ab}	0.96^{ab}	0.87^{ab}	0.93^{a}	0.95^{ab}	0.76^{ab}	0.73^{b}	0.81^{bc}
50mM	1.05ab	0.86^{abcde}	0.70^{e}	0.87a	1.04^{a}	0.97^{ab}	0.94^{ab}	0.98^{a}	1.00^{ab}	1.02^{ab}	0.97^{ab}	0.99^{ab}
100mM	0.94^{abcd}	0.82^{cde}	0.00^{f}	0.58^{b}	0.98^{ab}	0.82^{b}	0.00^{d}	0.6^{a}	1.01^{ab}	0.78^{ab}	0.00^{c}	0.6^{c}
ค่าเฉลี่ย	0.96^{a}	0.95^{a}	0.53^{b}	0.81	1.00^{a}	0.94^{a}	0.70^{b}	0.88^{c}	0.99^{a}	0.92^{ab}	0.79^{b}	0.9
F-test	ความเข้มข้นของสาร			**				**				**
	ชั่วโมงบ่ม			**				**				**
	ความเข้มข้นของสาร×ชั่วโมงบ่ม			**				**				**
	C.V. (%)			20.95				14.3				37.38

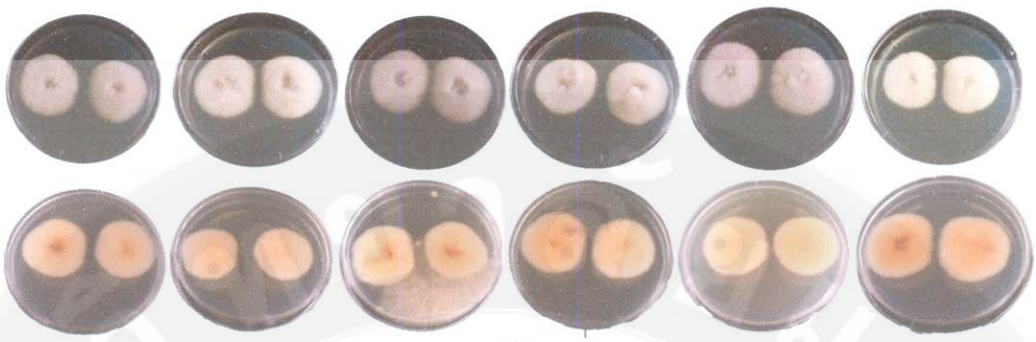
หมายเหตุ ** หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

a, b, c, d, e, f หมายถึง ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก หลังจากสปอร์บ่มด้วยสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ และน้ำกลั่น ในชั่วโมงการบ่มเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่าสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคนั้นมีลักษณะเปลี่ยนไปในการแช่สปอร์เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ 50 มิลลิโมลาร์ ที่ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีมีความช้ากว่าโคโลนีของชุดควบคุมโดยโคโลนีของเชื้อราก่อโรคมีลักษณะเป็นสีส้มเหลือง ผิวบนของโคโลนีมีสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีส้มเข้ม ในขณะที่ชุดควบคุมและความเข้มข้นอื่นๆ มีลักษณะมีโคโลนีสีส้มและสีดำ บนโคโลนี มีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ แสดงในตารางที่ 4.10-4.12 และภาพที่ 4.26-4.28 การบ่มสปอร์ในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนเป็นตัวทำละลาย พบว่าสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคนั้นไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 0 ชั่วโมง

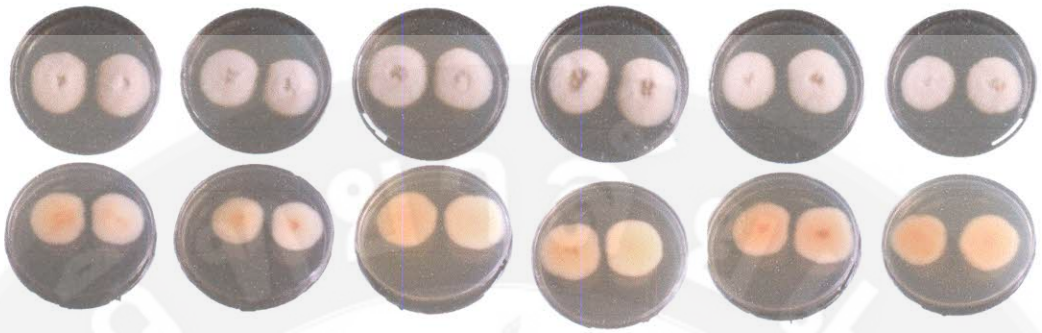
ความเข้มข้น	ลักษณะของเชื้อรา
ชุดควบคุม	มีโคโลนีสีส้ม ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
1 mM	มีโคโลนีสีส้มอ่อน ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
5 mM	มีโคโลนีสีส้มอ่อน ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
10 mM	มีโคโลนีสีส้มอ่อน ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
50 mM	มีโคโลนีสีส้มอ่อน ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
100 mM	โคโลนีสีส้มและสีดำ ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ



ภาพที่ 4.26 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 0 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

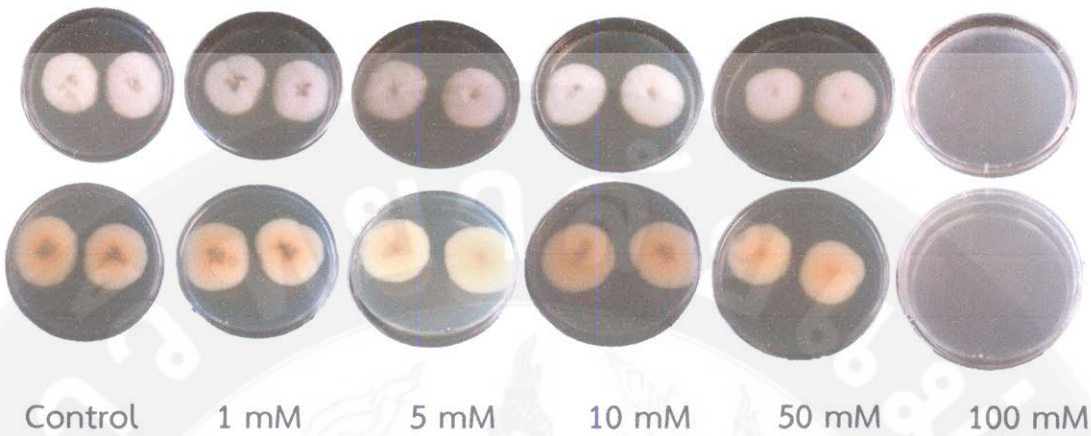
ความเข้มข้น	ลักษณะของเชื้อรา
ชุดควบคุม	มีโคโลนีสีส้ม ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
1 mM	โคโลนีสีส้มขาว ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
5 mM	มีโคโลนีสีส้มอ่อน ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
10 mM	มีโคโลนีสีส้มขาว ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
50 mM	มีโคโลนีสีส้มขาว ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
100 mM	มีโคโลนีสีส้มอ่อน ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ



ภาพที่ 4.27 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ความเข้มข้น	ลักษณะของเชื้อรา
ชุดควบคุม	มีโคโลนีสีส้ม ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
1 mM	โคโลนีสีส้ม ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
5 mM	มีโคโลนีสีส้มอ่อน ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
10 mM	มีโคโลนีสีส้มอ่อน ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
50 mM	มีโคโลนีสีส้มเหลือง ผิวบนโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ
100 mM	ไม่เกิดโคโลนี

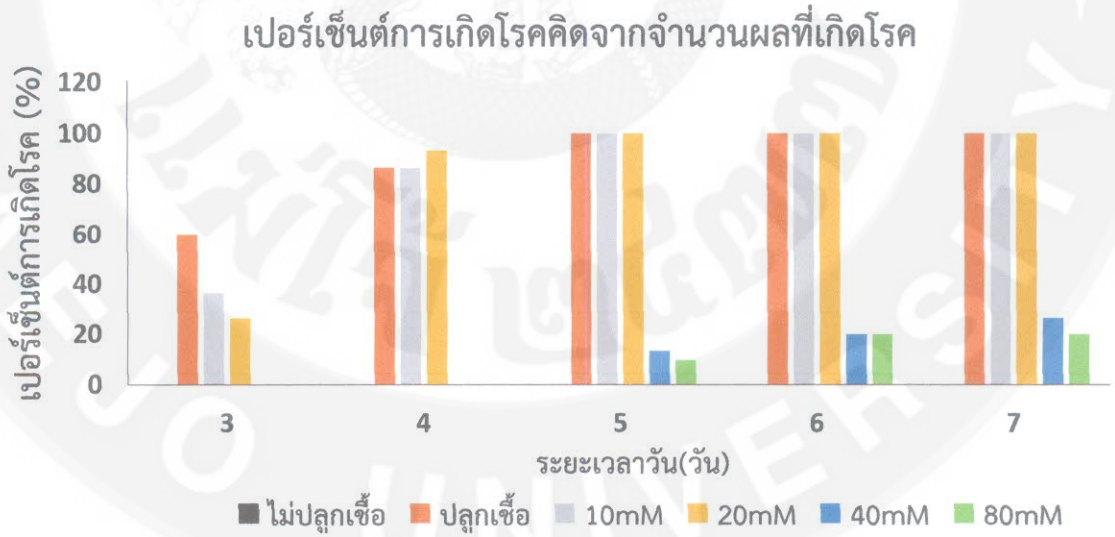


ภาพที่ 4.28 ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

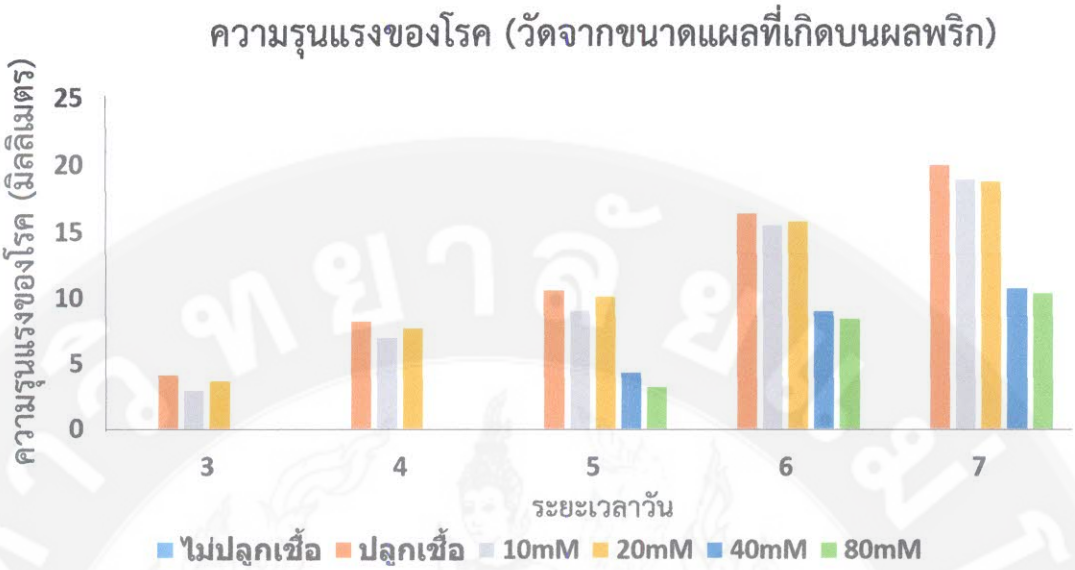
4.5 การทดสอบสารว่องไวปฏิกิริยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกในผลพริก

จากการทดลองผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในน้ำกลั่น เป็นเวลา 7 วัน ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่ก่อโรคในผลพริก มีผลการทดลองดังนี้

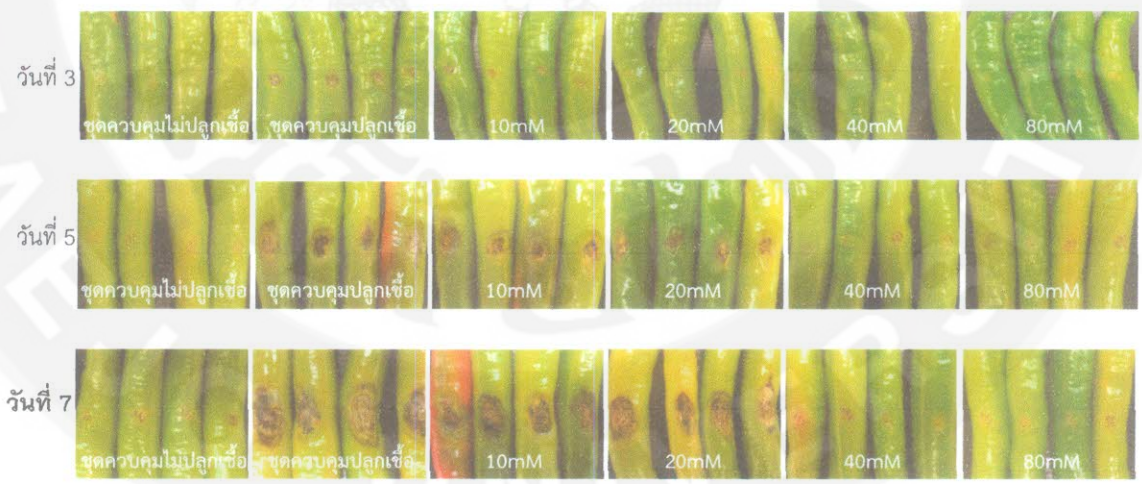
4.5.1 กรรมวิธีที่ 1 จากการนำสปอร์เชื้อราก่อโรคไปบ่มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มาปลูกเชื้อบนผลพริก ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 40 มิลลิโมลาร์ และ 80 มิลลิโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคต่ำสุดในวันที่ 3 หลังการปลูกเชื้อ มีค่าเท่ากับ 0.00 มิลลิเมตร ในวันที่ 5 หลังปลูกเชื้อมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 4.28 และ 5.40 มิลลิเมตร และในวันที่ 7 หลังปลูกเชื้อมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 12.92 และ 11.60 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 4.29 และ 4.30 นอกจากนี้การเกิดลักษณะของแผลที่เกิดโรคจากเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในผลพริก แสดงในภาพที่ 4.31



ภาพที่ 4.29 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่แสดงบนผลพริกหลังการปลูกเชื้อราที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน

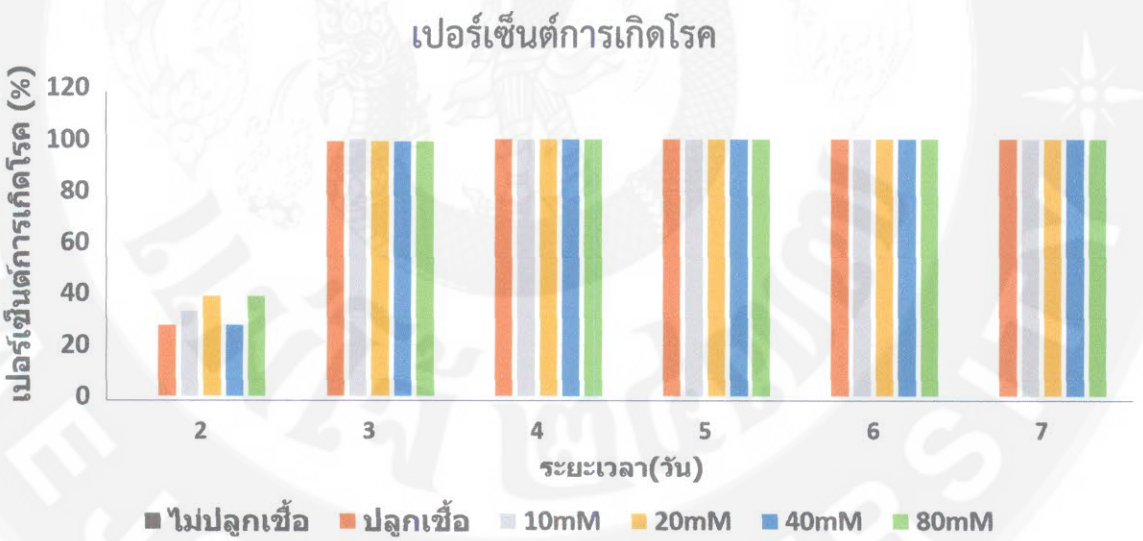


ภาพที่ 4.30 ความรุนแรงของการเกิดโรคของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่แสดงบนผลพริกหลังการปลูกเชื้อราที่สปอร์ผ่านการบ่มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ที่มีระยะของการปลูกเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน

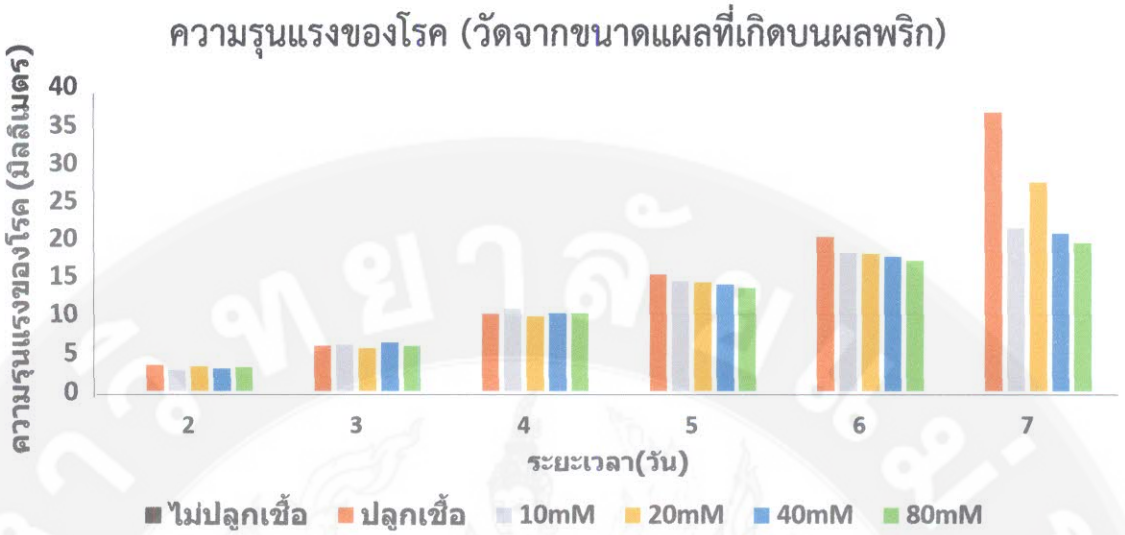


ภาพที่ 4.31 ลักษณะของผลพริกที่ผ่านการปลูกเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส ที่สปอร์ผ่านการบ่มด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ที่มีระยะของการปลูกเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน

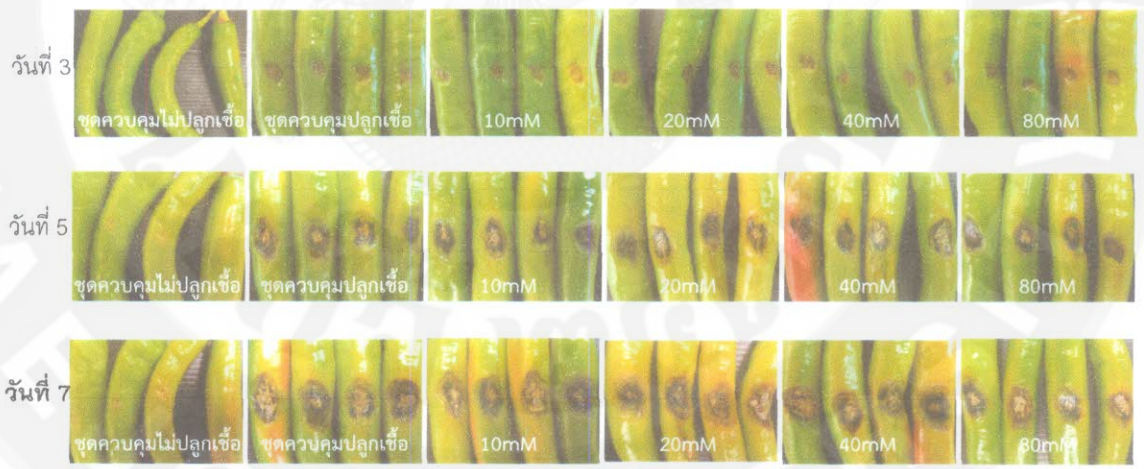
4.5.2 กรรมวิธีที่ 2 จากการทดสอบการปลูกเชื้อราก่อโรคเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำการฉีดพ่นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม เป็นเวลา 7 วัน หลังการปลูกเชื้อ ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นการเกิดโรคในผลพริกที่มีการฉีดพ่นในทุกความเข้มข้นของสารละลายมีการเกิดโรค เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความรุนแรงของโรคพบว่าวันที่ 3 ของการฉีดพ่นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หลังการปลูกเชื้อนั้น มีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนการฉีดพ่นสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในวันที่ 5 หลังการปลูกเชื้อ พบว่าความรุนแรงของโรคจากขนาดของแผลบนผลพริกมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยต่ำสุดอยู่ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 80 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.55 มิลลิเมตร และในวันที่ 7 หลังปลูกเชื้อ พบว่ามีค่าเฉลี่ยของความรุนแรงของโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังภาพที่ 4.32 และ 4.33 และลักษณะของแผลที่เกิดจากเชื้อราก่อโรคที่แสดงบนผลพริก ภาพที่ 4.34



ภาพที่ 4.32 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่แสดงบนผลพริกหลังการปลูกเชื้อรา และฉีดพ่นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.33 ความรุนแรงของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่แสดงบนผลพริกหลังการปลูกเชื้อรา และฉีดพ่นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน

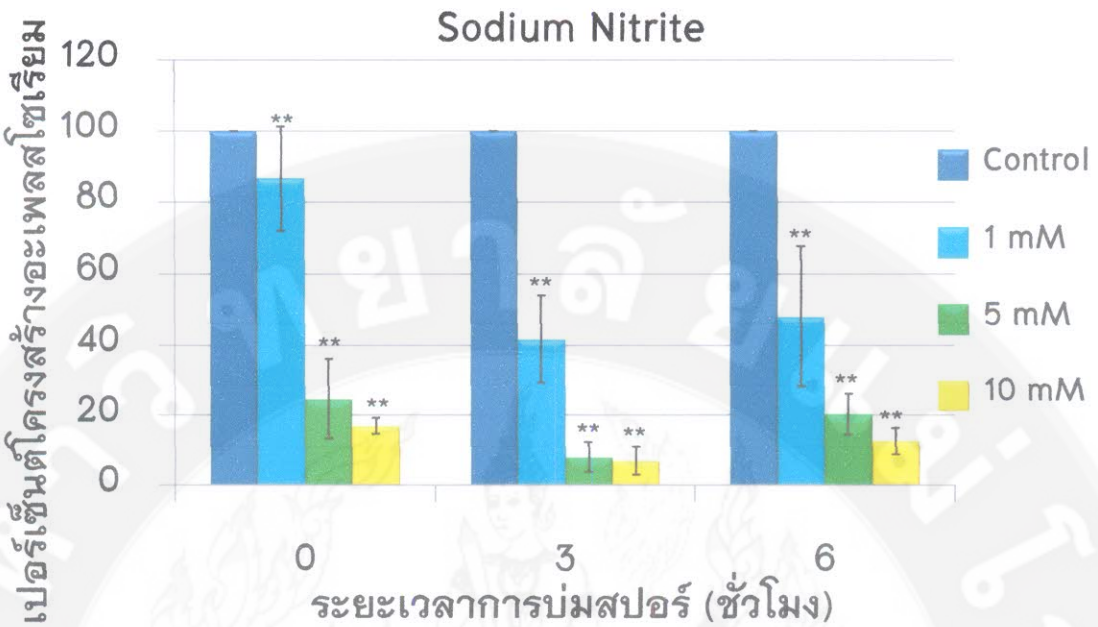


ภาพที่ 4.34 ลักษณะของผลพริกที่เกิดจากเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่แสดงบนผลพริกหลังการปลูกเชื้อรา และฉีดพ่นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน

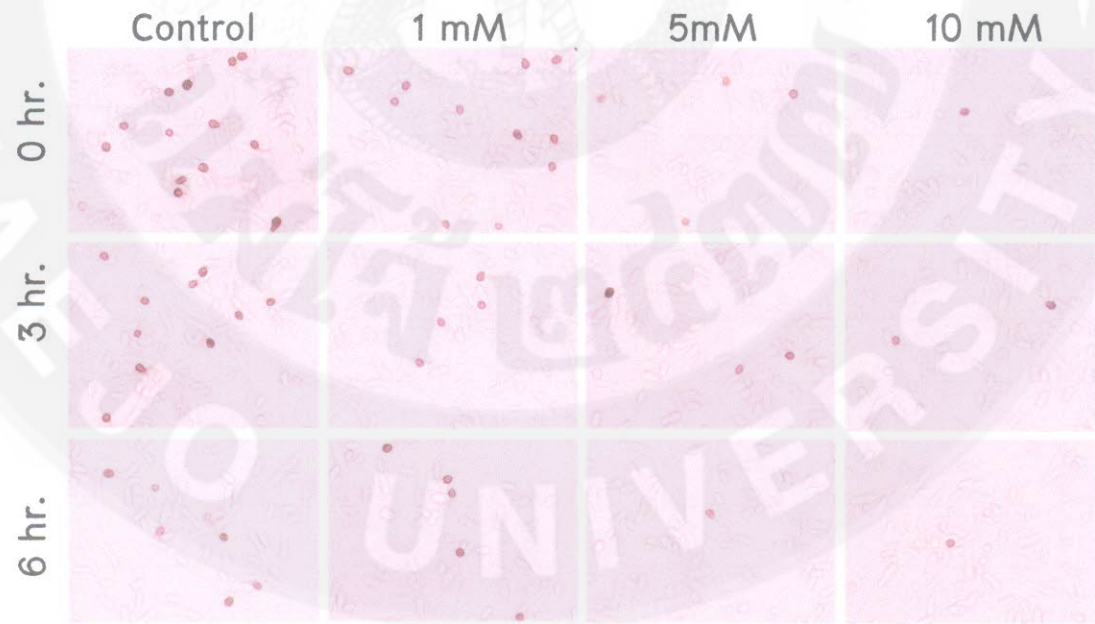
4.6. ผลของสารว่องไวปฏิกิริยาต่อการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก

4.6.1 ผลของสารสารสะลายโซเดียมไนไตรท์ต่อการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

จากการทดลองทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในสารสะลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มขันที่แตกต่างกัน คือ 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม และทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกจากการบ่มสปอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนั้น มีผลการทดลองดังต่อไปนี้ เมื่อทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคในสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มขั้นที่สูงขึ้นจำทำให้สปอร์เชื้อรามีการพัฒนาการเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมที่ลดลง โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ที่ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ของโครงสร้างอะเพลสโซเรียมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคที่ 0 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ดี มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมเท่ากับ 17.01 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนการบ่มสปอร์เชื้อราที่ 3 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ดี มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมเท่ากับ 7.06 เปอร์เซ็นต์ และการบ่มสปอร์เชื้อราที่ 6 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของโครงสร้างอะเพลสโซเรียม ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ดี มีมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมเท่ากับ 11.46 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 4.35 และ 4.36 อย่างไรก็ตามพบว่าระยะเวลาในการบ่มสปอร์นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อจำนวนของสปอร์ที่มีการผลิตโครงสร้างอะเพลสโซเรียม กล่าวคือที่ระยะเวลาในการบ่มสปอร์ที่ 0 ชั่วโมงนั้น จะพบว่าสารสะลายโซเดียมไนไตรท์ผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกนั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



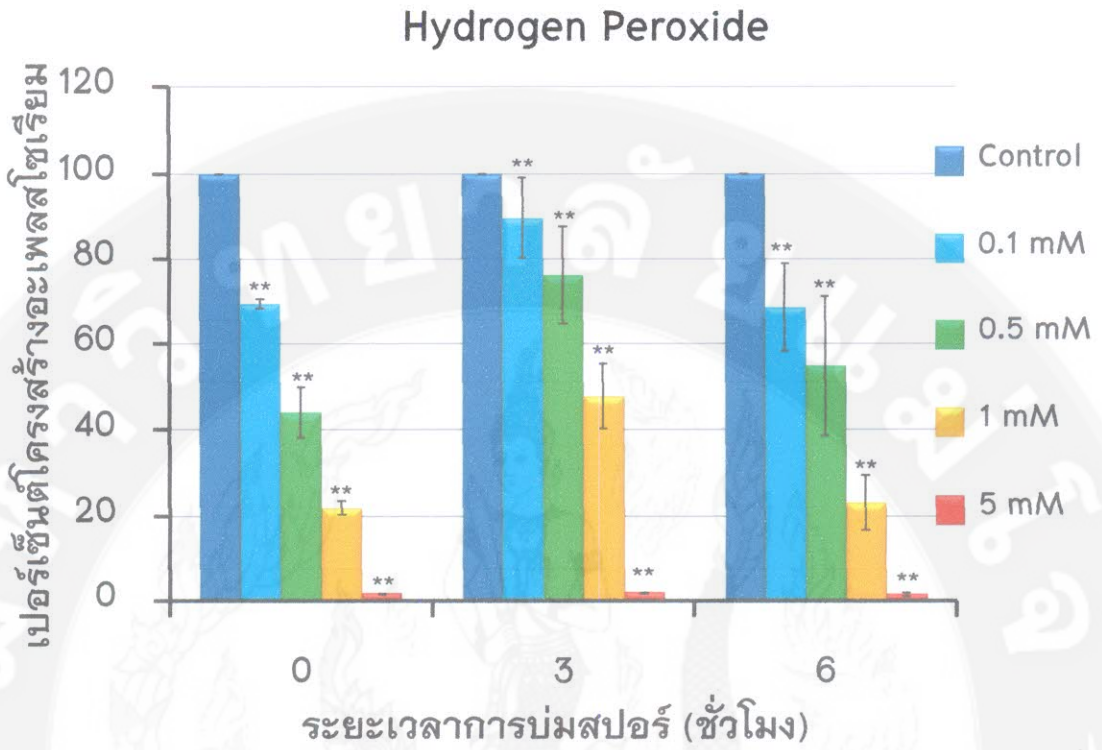
ภาพที่ 4.35 เปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก หลังได้รับสารละลายโซเดียมไนไตร์ท ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง โดยการใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม



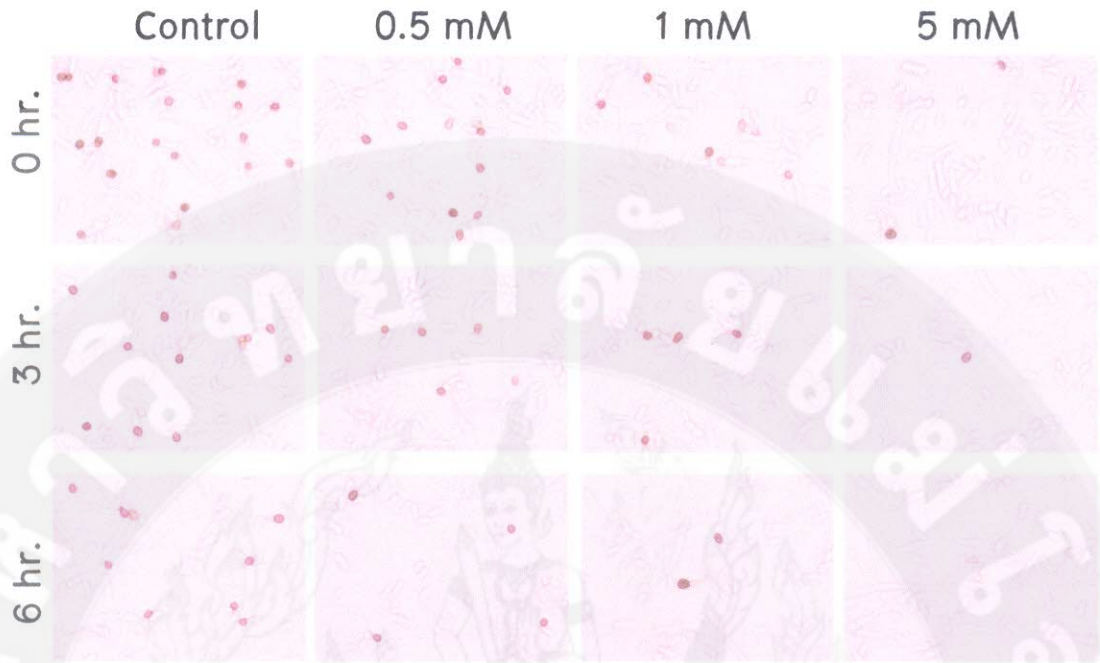
ภาพที่ 4.36 ลักษณะของโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก หลังได้รับสารละลายโซเดียมไนไตร์ท ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 0 3 และ 6 ชั่วโมง โดยการใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

4.6.2 ผลของสารสารสะลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก

จากกการทดลองทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในสารสะลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ และมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม โดยทำการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่าการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกหลังจากการบ่มสปอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนั้น มีผลการทดลองดังต่อไปนี้ โดยการบ่มสปอร์เชื้อราในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นเวลา 0 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ดี มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมเท่ากับ 1.63 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ดี มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมเท่ากับ 1.87 เปอร์เซ็นต์ และการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ดี มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมเท่ากับ 1.53 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 4.37 และ 4.38 อย่างไรก็ตามพบว่าระยะเวลาในการบ่มสปอร์นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อจำนวนของสปอร์ที่มีการผลิตโครงสร้างอะเพลสโซเรียม กล่าวคือที่ระยะเวลาในการบ่มสปอร์ที่ 0 ชั่วโมงนั้น พบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกนั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 4.37 เปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก หลังได้รับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง โดยการใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

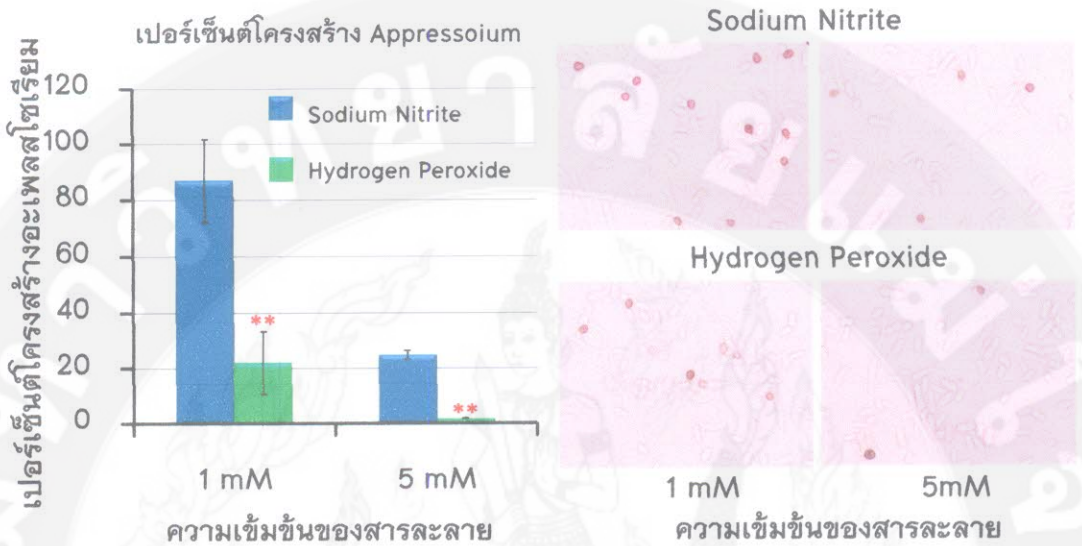


ภาพที่ 4.38 ลักษณะของโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก หลังได้รับสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง โดยการใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

4.6.3 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสารสะลายโซเดียมไนไตรท์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียม

จากกการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสารสะลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ ในระยะเวลาในการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคเป็นเวลาที่ 0 ชั่วโมง พบว่า สปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่บ่มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลยับยั้งต่อการเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมมากกว่าสารละลายโซเดียมไนไตร์ททั้งในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ โดยเฉพาะที่ระดับควมเข้มข้นที่ 5 มิลลิโมลาร์ของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้จำนวนสปอร์ที่ผลิตโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นแสดงว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ดีดว่าสารละลายโซเดียมไนไตร์ท และอาจเป็นไปได้ว่าสารละลาย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนส

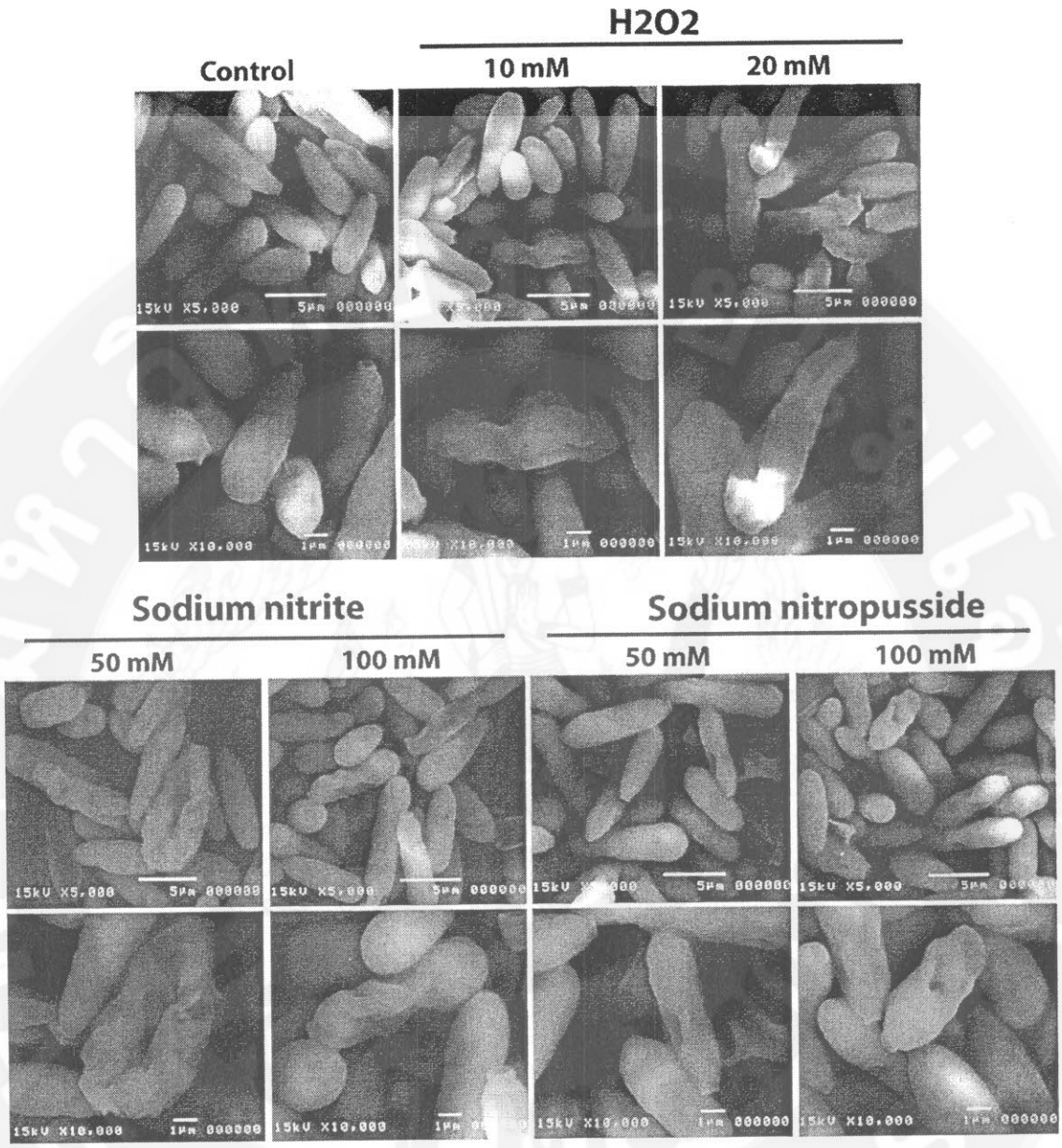
ในพริก โดยวิธีการยับยั้งการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมซึ่งเป็นโครงสร้างหลักที่สำคัญในการก่อโรคในพริกได้ดีอีกด้วย ดังภาพที่ 4.39



ภาพที่ 4.39 การเปรียบเทียบของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารละลายโซเดียมไนไตร์ท ในระดับที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ ในการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของพริกเป็นเวลา 0 ชั่วโมง โดยการใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

4.7 ผลของสารว่องไวปฏิกิริยาต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก

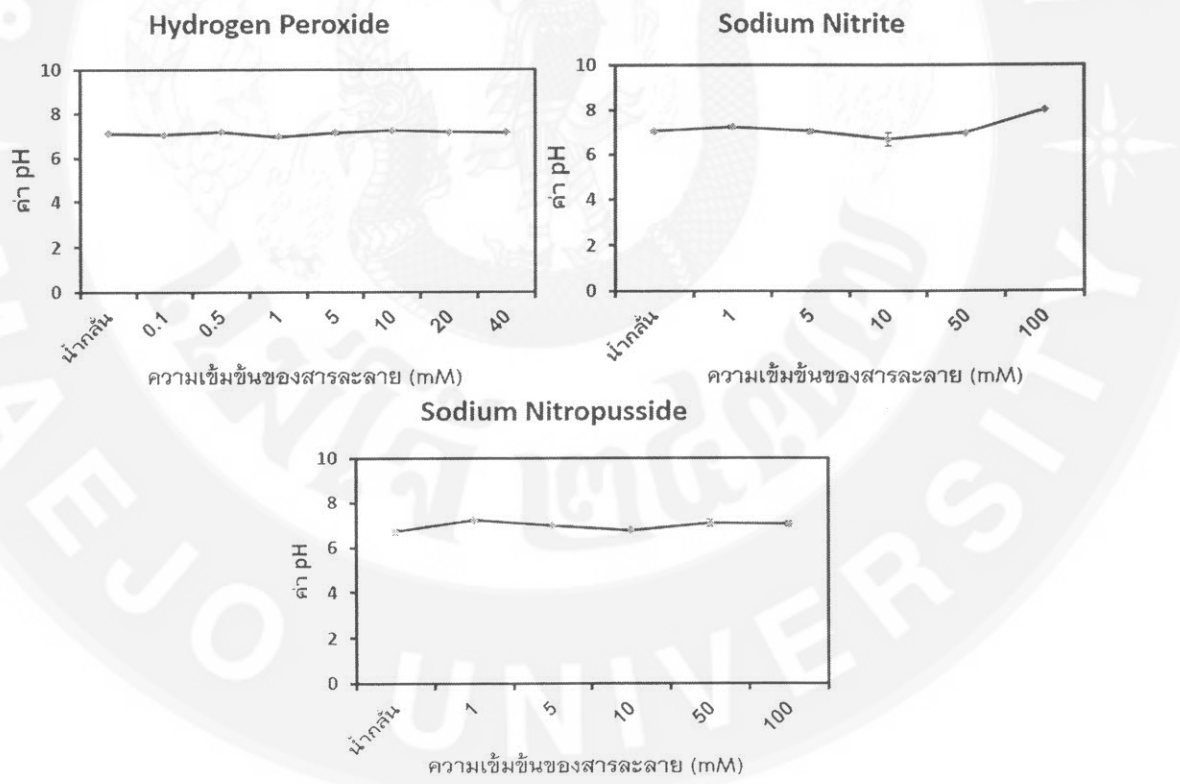
การศึกษาผลของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โซเดียมไนไตร์ท และโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดนั้น พบว่าโครงสร้างลักษณะผิวของสปอร์เชื้อราก่อโรคนั้นถูกทำลายหลังได้รับสารละลายทั้งสามชนิด ซึ่งผิวของสปอร์เชื้อรามีลักษณะขรุขระ และมีลักษณะยุบเป็นรอยบุ๋ม และในบางความเข้มข้นมีลักษณะแบนเรียบ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งสปอร์เชื้อรามีโครงสร้างลักษณะผิวเรียบและไม่มีรอยบุ๋มเกิดขึ้น เมื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของสารทั้งสามชนิดต่อโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อรา พบว่าสปอร์เชื้อราที่บ่มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโซเดียมไนไตร์ทนั้น มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกมากกว่าสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ ดังภาพที่ 4.40



ภาพที่ 4.40 โครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก หลังได้รับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโซเดียมไนไตร์ทและไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ทำการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ถ่ายภาพโดยการใช้กล้องอิเล็กตรอนส่องกราดรุ่น JSM-5410LV ยี่ห้อ JEOL

4.8 ผลการศึกษาค่าพีเอชของสารละลายว่องไวปฏิกิริยาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก

จากการวัดค่าพีเอชของสารว่องไวปฏิกิริยาทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โซเดียมไนโตรปรัสไซด์ และโซเดียมไนไตร์ท พบว่าค่าพีเอชของสารละลายแต่ละชนิดนั้นมีค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มสูงขึ้น โดยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 7.03–7.13 สารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 7.04–7.21 และสารละลายโซเดียมไนไตร์ทมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 7.03–8.01 โดยเพิ่มขึ้นมากที่สุดคือสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.01 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าค่าพีเอชของสารโซเดียมไนไตร์ทอาจมีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของพริก โดยเฉพาะการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมที่ใช้ในการก่อโรคของเชื้อรา ดังภาพที่ 4.41



ภาพที่ 4.41 ค่าพีเอชของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โซเดียมไนโตรปรัสไซด์ และโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่วัดด้วยเครื่องพีเอชรุ่น Laqua twin pH 22, Horiba Sciencetific

บทที่ 5
สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัย สามารถสรุปผลได้ดังนี้

5.1.1 เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกในพื้นที่อำเภอหนองม่วงไข่ จังหวัดแพร่ สามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อราชนิด *C. gloeosporioides* ที่มีสปอร์เซลล์เดียว สีใส รูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) และไม่พบ setae ส่วนโคโลนีมีสีขาวฟู ตรงกลางโคโลนีมีสีเทา หลังจากนั้นเชื้อเริ่มสร้างกลุ่มสปอร์สีส้มบนโคโลนี การก่อโรคในผลพริกในระยะเริ่มแรกจะแสดงอาการเกิดจุดฉ่ำน้ำขึ้นในบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อรา โดยที่ผิวของผลพริกจะเกิดลักษณะเป็นรอยบุ๋มเล็กน้อย และมีอาการฉ่ำน้ำเกิดเป็นรูปวงกลมหรือวงรี บริเวณแผลเกิดการยุบตัวลงเป็นแอ่ง เมื่อเชื้อเกิดใหม่ๆ แผลจะมีลักษณะเป็นสีเหลืองส้ม และมี acervulus ที่มีลักษณะเป็นสีเหลืองส้มเรียงซ้อนกันเป็นวงๆ ในบริเวณแผลที่เกิดขึ้นบนผลพริก และแผลมีลักษณะค่อนข้างแฉะ และจะกลายเป็นสีน้ำตาล

5.1.2 ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เพิ่มสูงขึ้น สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้มากขึ้น โดยเฉพาะการละลายในสารฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกได้ดีกว่าการละลายในตัวทำละลายน้ำกลั่น และโซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับ โดยพบว่าความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคเป็นเวลา 6 ชั่วโมง สามารถยับยังการงอกของสปอร์และการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ดีที่สุด โดยการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้น ตัวทำละลาย และระยะเวลาในการบ่มสปอร์ในสารละลาย

5.1.3 สารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์และโซเดียมไนไตร์ทที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นสามารถที่จะยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ โดยการใช้ตัวทำละลายน้ำกลั่นนั้นพบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และบ่มสปอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในขณะที่การใช้ตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนนั้น สารสารละลายโซเดียมไนไตร์ทไม่มีผลต่อการลดลงของเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกับสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ละลายในน้ำกลั่น แต่การ

ใช้ตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มสูงขึ้น

5.1.4 สัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสนั้นนั้นมีการเปลี่ยนเล็กน้อยที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ 50 มิลลิโมลาร์ ที่ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราที่ช้ากว่าชุดควบคุมโดยมีลักษณะมีโคโลนีสีส้มเหลือง ผิวบนโคโลนีมีสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีส้มเข้ม ในขณะที่ชุดควบคุมและความเข้มข้นอื่น ๆ มีลักษณะมีโคโลนีสีส้มและสีดำ บนผิวโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ ซึ่งในขณะที่สารละลายโซเดียมในไตรปรัสไซด์ให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคที่ไม่แตกต่างกัน

5.1.5 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ที่ใช้กรรมวิธีการแช่สปอร์เชื้อราในสารละลายก่อนการปลูกเชื้อให้ประสิทธิภาพในการลดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อและความรุนแรงของโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีการฉีดพ่นสารละลายหลังการปลูกเชื้อราก่อโรคบนผลพริก

5.1.6 เมื่อความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโซเดียมไนไตร์ทเพิ่มสูงขึ้น สามารถที่จะยับยั้งการเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ โดยระดับความเข้มข้นที่ 10 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้สปอร์ของเชื้อราก่อโรคมีการผลิตโครงสร้างอะเพลสโซเรียมลดลงเท่ากับ 12.61 และ 0.00% ตามลำดับ โดยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกนั้นได้ดีกว่าสารละลายโซเดียมไนไตร์ทในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน คือ 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ โดยระยะเวลาในการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคไม่มีผลต่อการผลิตโครงสร้างอะเพลสโซเรียม

5.1.7 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกหลังได้รับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โซเดียมไนไตร์ท และโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ ทำให้ผิวของสปอร์มีลักษณะขรุขระ และมีลักษณะยุบเป็นรอยบุ๋ม โดยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโซเดียมไนไตร์ทมีประสิทธิภาพในการทำลายโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกได้มากกว่าสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์

5.1.8 ค่าพีเอชของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มสูงขึ้น โดยมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 7.03–7.21 ส่วนสารละลายโซเดียมไนไตร์ท พบว่ามีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยโดยเฉพาะเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นที่ 100 มิลลิโมลาร์ คือ มีค่าพีเอชเท่ากับ 8.01

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างและระบุเชื้อสาเหตุโรคบนผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนสพริกในพื้นที่อำเภอหนองม่วงไข่ จังหวัดแพร่ พบว่าเป็นเชื้อราชนิด *C. gloeosporioides* ที่มีลักษณะเด่น คือ มีสปอร์เซลล์เดียว ลักษณะสีใส มีรูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) และไม่พบ setae ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อราที่ก่อโรคแอนแทรคโนสชนิดนี้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราชนิด *C. gloeosporioides* ก่อให้เกิดแผลที่มีลักษณะกลมรี และบริเวณแผลยุบตัวลงเป็นแอ่งแผลมีลักษณะสีเหลืองส้มอยู่ในบริเวณแผลของผลพริก และแผลค่อนข้างแฉะ เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA ทำให้โคโลนีมีสีขาวฟู และตรงกลางโคโลนีมีสีเทา โดยทั่วไปแล้วเชื้อราชนิดนี้จะสร้างกลุ่มสปอร์สีส้มบนโคโลนีที่มีลักษณะเป็นสีครีม สีส้มอ่อน หรือสี ชมพูอ่อน ไม่สร้าง setae ลักษณะโคนิเดียเป็นเดี่ยว มีรูปร่างยาวรีคล้ายรูปไข่หัวท้ายมน ไม่มีสี ผนังบาง (Jeffries and Koomen, 1992) โดยการพิสูจน์โรคบนผลพริกในระยะเริ่มแรกจะแสดงอาการเกิดจุดฉ่ำน้ำขึ้นในบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อรา โดยที่ผิวของผลพริกจะเกิดลักษณะเป็นรอยบุ๋มเล็กน้อย และมีอาการฉ่ำน้ำเกิดเป็นรูปวงกลมหรือวงรี จากนั้นแผลกลมรีที่มีขยายขนาดค่อนข้างใหญ่ ทำให้เนื้อเยื่อของผลพริกในบริเวณแผลเกิดการยุบตัวลงเป็นแอ่ง เมื่อเริ่มเกิดใหม่ๆ แผลจะมีลักษณะเป็นสีเหลืองส้ม และมี acervulus ที่มีลักษณะเป็นสีเหลืองส้มเรียงซ้อนกันเป็นวงๆ อยู่ในบริเวณแผลที่เกิดขึ้นบนผลพริก และแผลมีลักษณะค่อนข้างแฉะ หลังจากนั้นแผลจะกลายเป็นสีน้ำตาลดำ ซึ่งเป็นลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อราชนิด *C. gloeosporioides* ซึ่งเชื้อราชนิดนี้ชอบอากาศร้อนชื้น ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคได้ดี โดยเฉพาะอุณหภูมิที่อยู่ในช่วงระหว่าง 28-32 °C และมีความชื้นสัมพัทธ์สูงมากกว่าร้อยละ 95 และพบในช่วงฤดูฝน ซึ่งเป็นช่วงที่ทำให้เชื้อสาเหตุโรคสามารถเจริญและแพร่ระบาดได้ดีที่สุด (ทิวาพร, 2556) โดยในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกถ้ามีโรคแอนแทรคโนสระบาดในระยะผลแก่ใกล้เก็บเกี่ยวอาจมีเชื้อราสาเหตุโรคติดไปกับเมล็ดพันธุ์ โดยติดที่บริเวณเปลือกหุ้ม (seed coat) ของเมล็ด ซึ่งเชื้อที่ติดไปกับเมล็ดพันธุ์นั้น

จากการศึกษาบทบาทของสารว่องไวปฏิกิริยาในกลุ่มของออกซิเจนต่อการเจริญและพัฒนาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก โดยการทดสอบใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการยับยั้งและการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยละลายสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในตัวทำละลายที่แตกต่างกันจำนวน 3 ชนิด คือ น้ำกลั่น บัฟเฟอร์ฟอสเฟตซาลีน และโซเดียมคลอไรด์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เพิ่มสูงขึ้น สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้มากขึ้น โดยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เตรียมในตัวทำละลายบัฟเฟอร์

ฟอสเฟตซาลีน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกได้ดีกว่าการละลายในตัวทำละลายน้ำกลั่น และโซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 20 มิลลิโมลาร์ และการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคเป็นเวลา 6 ชั่วโมงนั้น สามารถยับยังการงอกของสปอร์เชื้อราที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคมีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ โดยขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้น ตัวทำละลาย และระยะเวลาในการบ่มสปอร์ในสารละลาย ในส่วนของการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก พบว่าในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เตรียมในตัวทำละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตซาลีน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ดีกว่าน้ำกลั่นและโซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยังการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุด จากการบ่มสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ให้อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสโดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จึงสรุปได้ว่าสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ โดยขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้น ตัวทำละลาย และระยะเวลาในการบ่มสปอร์ในสารละลาย ที่ผ่านมามีรายงานว่าสารละลายที่อยู่ในกลุ่มที่แตกตัวให้โมเลกุลของออกซิเจนอิสระ มีผลต่อการแปรสภาพของเซลล์เชื้อรา (Fungal differentiation)

โดย Scott และ Eaton (2008) กล่าวว่า โดยทั่วไปแล้วภายในเซลล์ของเชื้อรามีเอนไซม์ NADPH oxidases (Noxs) ที่มีหลายชนิดด้วยกัน มีบทบาทสำคัญต่อการแปรสภาพและการเจริญเติบโตของเซลล์เชื้อรา เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้จะผลิตสารอนุมูลอิสระในกลุ่มของออกซิเจน ซึ่งสารเหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญในการเป็นสื่อสัญญาณที่สำคัญในกระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของเชื้อรา เช่น การเติบโตของเส้นใย (hyphae growth) การเจริญและพัฒนาของฟุ๊ตติ้งบอดี้ (Fruiting body development) การงอกของสปอร์ (ascospore germination) และการทำงานร่วมกับวิถีของ MAP Kinase (MAP kinase and ROS interaction) นอกจากนี้แล้วโมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารจำพวกซุปเปอร์ออกไซด์ต่างที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์เชื้อรานั้น จะมีระบบการจำกัดปริมาณที่มีความเหมาะสมภายในเซลล์ ถ้าภายในเซลล์เชื้อราไม่สามารถกำจัดทิ้งได้โดยเอนไซม์ในกลุ่มคะตาเลส จะส่งผลทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย ตลอดจนเกิดการทำลายดีเอ็นเอที่เป็นสารพันธุกรรมภายในเซลล์อีกด้วย (Imlay,

2008, Rhee, 2006) ซึ่งมีรายงานว่าสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นเป็นสารที่จำเป็นต่อกระบวนการต่างๆ ทางชีววิทยาของเชื้อราในช่วงระหว่างการก่อโรคในพืช (Eloy et al., 2015) ดังนั้นจากงานทดลองนี้พบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากภายนอกเซลล์ (exogenuous hydrogen peroxide) ที่สปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้รับนั้น มีปริมาณมากเกินไปที่เซลล์เชื้อราจะสามารถกำจัดทิ้งได้ ส่งผลทำให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์และอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ตัวทำละลายแต่ละชนิดก็มีผลต่อการตายของสปอร์เชื้อราหลังทำงานร่วมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สุรัตน์ และปริยาภรณ์ (2557) รายงานว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ส่งผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* และ *Bacillus cereus* เช่นเดียวกับการทดลองของ Edward (1980) ใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เติมลงในน้ำนมดิบโดยใส่ที่ความเข้มข้น 0.02 ถึง 0.05 เปอร์เซ็นต์ เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของน้ำนม และมีการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 ถึง 0.08 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ที่ในนมพาสเจอไรซ์ ทำให้สามารถลดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ซึ่งมีความสอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้โดยใช้สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นตัวออกซิไดส์ที่รุนแรงและสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ โดยหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl) ภายในโมเลกุลโปรตีนของเซลล์ และในชั้นไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ถูกออกซิไดส์ได้ ทำให้โครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนในเซลล์เปลี่ยนไปจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ และในปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีการขนส่งออกซิเจน ทำให้เกิดสภาพขาดออกซิเจน ส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถเจริญได้นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถรวมตัวกับสารประกอบอื่นเกิดเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ (มูฮัมหมัดริฎวาน, 2557) นอกจากนี้ยังมีสารว่องไวปฏิกิริยาชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มของออกซิเจนที่มีผลต่อการแปรสภาพของเซลล์เชื้อรา เช่น สารอนุมูลอิสระชนิดซุปเปอร์ออกไซด์ที่ส่งผลกระทบในการก่อให้เกิดความเครียดต่อเซลล์เชื้อรา (Papapostolou and Georgiou, 2010) ในส่วนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อราหลังได้รับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซดนั้นพบว่า ผิวของสปอร์เชื้อราเกิดมีลักษณะขรุขระและแบน อาจเกิดเนื่องจากบริเวณผิวของสปอร์เกิดความเสียหายทำให้ส่วนต่าง ๆ ภายในสปอร์ถูกทำลายและสปอร์ตายในที่สุด

นอกจากสารว่องไวปฏิกิริยาในกลุ่มออกซิเจนจะมีผลต่อการแปรสภาพเซลล์ของเชื้อราแล้ว ยังพบว่าสารว่องไวปฏิกิริยาในกลุ่มของไนโตรเจนยังมีรายงานว่ามีผลต่อกระบวนการต่าง

ๆของเชื้อราก่อโรคหลายชนิด เช่น *Asperrgillus*, *Colletotrichum* (Wang and Higgins, 2005, Kunert, 1995) โดยในการทดลองนี้ใช้สารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์และโซเดียมไนไตร์ท เป็นสารตั้งต้นที่ทำหน้าที่ในการแตกตัวให้โมเลกุลของก๊าซไนตริกออกไซด์ ในตัวทำละลายจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ น้ำกลั่น และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์และโซเดียมไนไตรท์ที่เพิ่มขึ้นสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ โดยผลของสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่ระยะเวลาการบ่มของสปอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคน้อยที่สุด ในส่วนของผลการใช้สารละลายโซเดียมไนไตร์ทต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทคโนสพริกพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทเพิ่มขึ้นและการบ่มสปอร์เชื้อราในสารละลายเป็นระยะเวลานานขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราลดลง และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ 100 มิลลิโมลาร์นั้น สปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกไม่สามารถงอกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นสรุปได้ว่าสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์และโซเดียมไนไตร์ทที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกได้ ในส่วนของการศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกพบว่าผลการทดลองนั้นมีแนวโน้มสอดคล้องการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรค โดยเมื่อความเข้มข้นของสารละลายทั้งสองชนิดเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้การอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราลดลง และสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสนั้นนั้นมีการเปลี่ยนเล็กน้อย โดยมีลักษณะมีโคโลนีสีส้มเหลือง ผิวบนโคโลนีมีสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีส้มเข้ม ในขณะที่ชุดควบคุมและความเข้มข้นอื่น ๆ มีลักษณะมีโคโลนีสีส้มและสีดำ บนผิวโคโลนีมีขนสีขาวปุยนุ่ม มีจุดสปอร์สีดำ ซึ่งในขณะที่สารละลายโซเดียมไนไตรปรัสไซด์ให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่ที่ไม่แตกต่างกัน Mur, Carver and Prats (2006) รายงานว่าสารไนตริกออกไซด์มีผลต่อกระบวนการต่าง ๆ ของกลุ่มเชื้อรา เช่น ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ การปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราก่อโรคและพืชอาศัย โดยโมเลกุลของไนตริกออกไซด์นั้นเป็นสารที่ว่องไวปฏิกิริยาเนื่องจากเป็นสารที่ไม่มีคู่อิเล็กตรอนคล้ายกับโมเลกุลของออกซิเจน จึงสามารถเปลี่ยนแปลงรูปได้หลายแบบ บทบาทของสารไนตริกออกไซด์ในกระบวนการทางชีววิทยาของเชื้อ ราพบมีการศึกษา ดังนี้ Wang and Higgins (2005) รายงานว่าโมเลกุลของไนตริกอกไซด์ที่ผลิตได้จากสารเคมีนั้นมีผลต่อการงอกของโคนิเดียของสปอร์เชื้อราชนิด *C. coccode* และไนตริกออกไซด์นั้นมีบทบทสำคัญต่อกระบวนการดังกล่าว จากผลการทดลองพบว่าสารละลายโซเดียมไนไตร์ทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกและเจริญเติบโตของเส้น

ใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ดีกว่าสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ ซึ่งมีรายงานว่าโดยทั่วไปแล้วสารโซเดียมไนไตร์ทสามารถเกิดในรูปของกรดไนตรัส (nitrous acid) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโมเลกุลดังกล่าวสามารถทำงานร่วมกับโมเลกุลของไนไตร์ทออกไซด์เพื่อเข้าทำลายสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก (Kunert, 1995) ขณะเดียวกันพบว่าโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อราเมื่อได้รับสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์และโซเดียมไนไตร์ทนั้น มีลักษณะเกิดผิวขรุขระและยุบเป็นแอ่ง ซึ่งคล้ายคลึงกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวของสปอร์เชื้อราที่ได้รับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นั่นแสดงว่าสารทั้งสองชนิดสามารถที่จะใช้ในการทำลายบริเวณผิวและก่อให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างภายเซลล์ของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ โดยเฉพาะสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ให้ผลรุนแรงกว่า

มากกว่านั้นได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกหนุ่ม จากพริกที่เก็บจากแปลงเกษตรกรที่ปลูกพริกใน อำเภอหนองม่วงไข่ จังหวัดแพร่ โดยได้ศึกษาเปรียบเทียบจำนวน 2 กรรมวิธี คือ การบ่มสปอร์เชื้อราด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก่อนปลูกเชื้อและการปลูกเชื้อบนผลพริกและฉีดพ่นด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะพบว่ากรรมวิธีการบ่มสปอร์ด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และนำไปปลูกเชื้อบนผลพริกนั้น สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคบนผลพริกได้ดีกว่ากรรมวิธีการปลูกเชื้อโรคบนผลพริกและฉีดพ่นด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตามพบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้น สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคของผลพริกได้ดี โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นของเท่ากับ 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ทั้งในวิธีการแช่สปอร์เชื้อราในสารละลายก่อนการปลูกเชื้อและการฉีดพ่นสารละลายหลังการปลูกเชื้อราก่อโรคบนผลพริก มากกว่านั้นพบว่าการแช่สปอร์ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก่อนนำไปปลูกเชื้อบนผลพริกให้ประสิทธิภาพได้ดีที่สุด ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวเป็นไปได้ว่ากรรมวิธีการบ่มสปอร์เชื้อราในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก่อนการนำไปปลูกบนผลพริกมีประสิธิภาพดีกว่าเนื่องจากสปอร์ของเชื้อราได้ถูกทำลายหรือตายแล้วก่อนนำไปปลูกเชื้อบนผลพริก ส่วนการปลูกเชื้อแล้วฉีดพ่นสารนั้นพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งน้อยกว่า อาจเป็นไปได้ว่าสปอร์เชื้อราได้ผ่านกระบวนการงอก การพัฒนาโครงสร้างอะเพรสโซเรียม เพื่อก่อโรคในผลพริกได้สำเร็จแล้ว และการฉีดพ่นสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อาจทำให้สารเข้าทำลายเชื้อราก่อโรคได้ไม่ทั่วบริเวณของแผลที่เชื้อก่อโรคบนผลพริก อย่างไรก็ตามการฉีดพ่นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในบริเวณของผลพริกที่เป็นโรค สามารถควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ โดยการสังเกตได้จากขนาดของแผลบนผลพริกมีขนาดลดลง Hu et al.

(2014) รายงานว่าสารไนตริกออกไซด์ที่ผลิตได้จากสารโซเดียมไนโตรปรัสไซด์สามารถลดขนาดของแผลบนผลมะม่วงที่ผ่านการปลูกเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส

ในกระบวนการเข้าทำลายพริกของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสนั้น โครงสร้างหลักที่เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เชื้อราเกิดการแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อพริก และเข้าทำลายพริกได้สำเร็จ คือโครงสร้างอะเพลสโซเรียม ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการพัฒนาของโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของสปอร์หลังจากกระบวนการงอกได้เกิดสำเร็จแล้ว โดยการศึกษาเปรียบเทียบสารว่องไวปฏิกิริยาจำนวน 2 ชนิด คือ สารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ผสีตโมเลกุลของไนตริกออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ และสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สามารถแตกตัวให้โมเลกุลของออกซิเจนที่ระดับความเข้มข้นที่ 0.1, 0.5, 1 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม โดยทำการบ่มสปอร์เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่าการพัฒนาของโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่ 24 ชั่วโมง เมื่อความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดเพิ่มสูงขึ้น สามารถที่จะยับยั้งการเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ โดยสารละลายโซเดียมไนไตร์ทในระดับความเข้มข้นที่ 1 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ของการบ่มสปอร์เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง มีการผลิตโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม มากกว่านี้พบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับความเข้มข้นที่ 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ของการบ่มสปอร์เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มสูงขึ้น สปอร์ของเชื้อรามีการผลิตโครงสร้างอะเพลสโซเรียมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่สปอร์ไม่สามารถผลิตโครงสร้างอะเพลสโซเรียมได้ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารละลายโซเดียมไนไตร์ทนั้น พบว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกนี้ได้ดีกว่าสารละลายโซเดียมไนไตร์ทในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน คือ 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ มีรายงานว่าสารไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากสารละลายโซเดียมไนไตร์ทนั้นอาจจะมีผลต่อกระบวนการพัฒนาการเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียม ซึ่งพบว่าสารสารไนตริกออกไซด์นั้นมีบทบาทที่สำคัญในช่วงของการพัฒนาโครงสร้างดังกล่าวในเชื้อราชนิด *Blumeria graminis* เพื่อการก่อโรคในพืช (Prats et al., 2008) นอกนี้ยังพบว่าสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกนั้นมีความไวต่อสารละลายทั้งสองชนิดมาก เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การเกิดโครงสร้างอะเพลสโซเรียมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังสปอร์ได้รับสารละลายทั้งสองชนิดดังกล่าว จากการวิจัยที่ผ่านมามีรายงานว่ากระบวนการงอกของสปอร์และการพัฒนา

โครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราในกลุ่มจีนัส *Collettichum* sp. นั้น มีความเกี่ยวข้องกับหลายระบบในระดับโมเลกุล เช่น AMP-Dependent protein kinase (Takano et al., 2001) บางครั้งสารไนตริกออกไซด์มีบทบาทอย่างมากในช่วงระหว่างการเข้าทำลายพืชอาศัยของเชื้อราก่อโรค (Turrion-Gomez and Benito, 2011) โดยทั่วไปแล้วนอกจากสารว่องไวปฏิกิริยาที่มีผลต่อการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบสของสารละลาย แคลเซียม โดยมีรายงานว่าแคลเซียมและแคลโมดูลิน (calmodulin) มีบทบาทสำคัญในการงอกของสปอร์และการพัฒนาโครงสร้างอะเพรสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสชนิด *C. trifolii* ของถั่ว (Warwar and Dickan, 1996) และชนิด *C. gloeosporioides* ของพริก (Kim et al., 1998) มากว่านั้นกลไกการพัฒนาของโครงสร้างอะเพรสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคในกลุ่มแอนแทรคโนสนั้น ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานและการแสดงออกของยีนและโปรตีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง (Perfect et al., 1999)

จากการทดลองวัดค่าพีเอชของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โซเดียมไนไตร์ท และโซเดียมไนโตรปรัสไซด์นั้น พบว่าค่าพีเอชของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มสูงขึ้นโดยมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง เอชอยู่ระหว่าง 7.03-7.21 และสารละลายโซเดียมไนไตร์ทนั้นพบว่ามีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยโดยเฉพาะเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นที่ 100 มิลลิโมลาร์ คือ มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 7.03-8.01 อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในส่วนของการงอกของสปอร์ การเจริญเติบโตของเส้นใย การเกิดโรคบนผลพริก การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวของสปอร์ และการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสพริกนั้น อาจเป็นไปได้ว่าค่าพีเอชอาจจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลักษณะดังกล่าวข้างต้น

5.3 ข้อแสนอแนะ

ในการศึกษาผลของสารว่องไวปฏิกิริยากลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญของสปอร์และเส้นใยเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของพริกนั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยเฉพาะบทบาทของสารดังกล่าวข้างต้นต่อการพัฒนาโครงสร้างอะเพลสโซเรียมของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสให้มีรายละเอียดมากขึ้น เพื่อจะได้เข้าใจกลไกถึงสารในกลุ่มดังกล่าวมีบทบาทอย่างไรบ้าง นอกจากนี้ในการทดสอบการเกิดโรคบนผลพริกควรมีการศึกษาเปรียบเทียบของพริกที่หลากหลายสายพันธุ์มากขึ้น ตลอดจนควรเปรียบเทียบอายุของผลพริกต่อการแสดงความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ควรมีการศึกษาปัจจัยทาง

สภาพแวดล้อมอื่น ๆ ของแปลงเกษตรกรที่มีการระบาดของโรคแอนแทรคโนสพริก เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบในการวางแนวทางการป้องกันและกำจัดโรค

มากกว่านั้นควรมีการศึกษาปริมาณของสารว่องไวปฏิกิริยาทั้งในกลุ่มออกซิเจนและไนโตรเจนที่ผลิตขึ้นในเซลล์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสและพริก ว่ามีปริมาณมากน้อยเพียงใดที่เซลล์เชื้อราก่อโรคและพริก เพื่อให้ทราบปริมาณที่มีความเหมาะสมในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก เพื่อนำไปสู่การควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อราก่อโรคดังกล่าวในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

ดาราวดี วงษ์ชาลี. 2558. **ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* สูตร ENCAPSULATE ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ทิวาพร ศีรษะภูมิ. 2556. **ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นิพัฒน์ สุขวิบูลย์ สุทธินี เจริญคิด สันติ โยธาราษฎร์ กิ่งกาญจน์ เกียรติอนันต์ ศิวพร แสงภัทรเนตร พันธุ์ศักดิ์ แก่นหอม และประนอม ใจอ้าย. 2556. **เทคโนโลยีการผลิตพริกคุณภาพในเขตภาคเหนือตอนบน.** สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 กรมวิชาการเกษตร พิมพ์ที่ หจก. ดาราวรรณการพิมพ์, เชียงใหม่. 76 หน้า.

บุญญาวดี จิระวุฒิ. 2540. **การทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* บนผลพริกและการถ่ายทอดเชื้อจากผลที่เป็นโรคสู่เมล็ดและต้นกล้า.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ปริฉัตร พละพลึง. 2549. **การปรับปรุงพันธุ์สตรอเบอรี่ต้านทานโรคแอนแทรคโนส.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่.

ปัทมวรรณ มณีสุวรรณ. 2556. **การใช้ประโยชน์ของเซลล์คัลเจอร์และสารกรองของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotricchum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มูฮัมหมัดริฎวาน สมานุรัตน์. 2557. **การยับยั้งแบคทีเรียของสารกันเสียชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกทนอุณหภูมิต่ำ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มูลนิธิโครงการหลวง. 2552. <u>**การป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนส.**</u> [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : file:///C:/Users/Admin/Downloads/Fulltext%235_198110%20 (1). (วันที่ค้นข้อมูล : 5 กรกฎาคม 2560).

วิฑูรย์ สิมะโชคดี. 2553. ข่าวประชาสัมพันธ์กระทรวงอุตสาหกรรม. **จุลสารอุตสาหกรรมสัมพันธ์**. 10(106): 3-4.

ฤทัยชนก กิตติวโรดม. 2549. **ระดับความต้านทานโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อ *Colletotricchum spp.* ในพริก 5 พันธุ์.** ปัญหาพิเศษ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน, นครปฐม.

ศศิลภัส เพชรชู เฉลิมชัย ชัยกิตติภรณ์ วิชัย พฤกษ์ธาราธิกุล พิพัฒน์ ลักษมีจรัลกุล วชิระ สิงหะคเชนทร์ ธีระ กลลดาเกรียงไกรคเชนทร์. 2557. **การศึกษาประสิทธิผลไอไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หลังจากการอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศของห้องผ่าตัด** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสุขศาสตร์ อุตสาหกรรมและความปลอดภัย คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศิริวรรณ ตี้ภู่ สุภาวดี อินทพรต ฐานิตา เนกขำ. 2558. **การพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยตรึง.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา. 2545. **ภาวะมลพิษของดินจากการใช้สารเคมี.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. **โรคของผักและการป้องกันกำจัด**. พิมพ์ครั้งที่ 2 ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 198 หน้า.

สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร, 2557. **พริก: นวัตกรรม จากทฤษฎีการปรับปรุงพันธุ์พืชสู่การใช้ประโยชน์.** ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.พิมพ์ที่ หจก. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น. 285 หน้า.

สุภัค มหัทธนพรรค. 2558. **การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสสาเหตุโรคจาก เชื้อ *Colletotrichum* spp. และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพริก.** รายงานการวิจัยการพัฒนาการวิจัยการเกษตรฉบับสมบูรณ์ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน).

สุรัตน์ วังพิกุล และปริยาภรณ์ อิสรานุวัฒน์. 2557. **การคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากอาหารหมักพื้นบ้านไทยประเภทข้าวเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในอาหารหมัก.** สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ.

สันทนา ขวัญมณี สุทิน พรหมพงษ์ อัจฉรา เพิ่ม และ เสาวนิตย์ ชอบบุญ. 2559. การเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราจากมูลสัตว์ต่อเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ST01 สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก. **วารสารวิทยาศาสตร์ มข.** 44(2) 307-317.

อนันต์ สกุลกิม. 2551. อนุมูลอิสระ สารอันตรายต่อสุขภาพและร่างกาย. **ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์**. 8(1). 28-33.

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ และจุรีมาศ วงศ์ศรีรัตน์. 2552. การควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกชี้ฟ้า (*Colletotrichum gloeosporioides*) โดยยีสต์ที่แยกได้จากผักและผลไม้. **ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์**. 9(1): 120-131.

Aguirre J., Rios-Momberg M., Hewitt D., Hansberg W. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends Microbiology**. 13(3): 111-118.

Cannon P.F., Damm U., Johnston P.R., and Weir B.S. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, 73: 181-213.

Cánovas D., Marcos J.F., Marcos A.T. and Strauss J. 2016. Nitric oxide in fungi: is there NO light at the end of the tunnel. **Current Genetics**. 62:513-518.

Desikan R., Cheung M.K., Bright J., Henson D., Hancock J.T., et al. 2004. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signaling in stomatal guard cells. **Journal of Experimental Botany**. 55(395): 205-212.

Edword, G.E. 1980. Acetic acid; In antimicrobial food additives. New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 167-174.

Eloy Y.R.G., Vasconcelos I.M., Barreto A.L.H., Freire-Filho F.R., Oliveira J.T.A. 2015. H_2O_2 plays an important role in the lifestyle of *Colletotrichum gloeosporioides* during interaction with cowpea [Vigna unguiculata (L.) Walp.]. **Fungal Biology**. 119, 747-757.

Graves D.B. **2012.** The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. **Applied Physics.** 45: 263001.

Heller J. and Tudzynki P. 2011. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. **Annual Review Phytopathology**. 49: 369-390.

Hu M. Yang D., Huber D. J., Jiang Y., Li M., Gao Z., Zhang Z. 2014. Reduction of postharvest anthracnose and enhancement of disease resistance in ripening mango fruit by nitric oxide treatment. **Postharvest Biology and Technology**. 92, 115–122.

Imlay J.A. 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual Review Biochemistry**. 77: 755–776.

Jeffries P. and Koomen I. 1992. **Strategies and prospects for biological control of diseases caused by *Colletotrichum***. In: Bailey JA, Jeger MJ, editors. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Wallingford: Commonwealth Mycological Institute; pp. 337–357.

Kim Y.K., LI D., and Kolattukudy P. E. 1998. Induction of Ca^{2+}–Calmodulin signaling by hard–surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. **Journal of Bacteriology**. 180(19), 5144–5150.

Kunert J. 1995. Effect of nitric oxide donors on survival of conidia, germination, and growth of *Aspergillus fumigatus*. **Folia Microbiology**. 40(3): 238–244.

Kuo K.C. 1999. Germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioide*. **Proc. Natl. Sci. Counc.** 23(3), 126–132.

Liu H.Y., Yu X., Cui D.Y., Sun M.H., Sun W.N., et al. 2007. The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. **Cell Research**. 17:638–649.

Liu Y., Ye N., Liu R., Chen M., Zhang J. 2010. H_2O_2 mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. **Journal of Experimental Botany**. 61(11): 2979–2990.

Meng S., Torto–Alalibo T., Chibucos M.C., Tyler B.M. and Dean R.A. 2009. Common processes in pathogenesis by fungal and oomycete plant pathogens, described with Gene Ontology terms. **BMC Microbiology**. 9(Suppl 1): S7.

Montri P., Taylor P.W.J., and Mongkolporn O. 2009. Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the causal agent of chili anthracnose, in Thailand. **Plant Disease.** 93:17–20.

Mur L.A.J., Carver T.L.W., Prats E. 2006. NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant–pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**. 57(3), 489–505.

Nanda A.K., Andrio E., Marino D., Pauly N., Dunand C. 2010. Reactive oxygen species During plant-microorganism early interaction. **Journal of Integration Plant Biology**. 52(2): 195-204.

Pakdeevaraporn P., Wasee S., Taylor P.W.J., Mongkolporn O. 2005. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capcisi* in *Capsicum*. **Plant Breeding**. 124: 206-208.

Papapostotou I., and Georgiou C.D. 2010. Superoxide radical induces sclerotial differentiation in filamentous phytopathogenic fungi: a superoxide dismutase mimetics study. **Microbiology**. 156, 960-966.

Perfect S.E., Hughes H.B., O'Connell R.J. and Green J.R. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**. 27, 186–198.

Phialathounheuane K., เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล อนันต์ หิรัญสาสี และ สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร. 2555. การคัดเลือกพันธุ์พริกต้านทานโรคแอนแทรกโนสในแนวกว้าง. **แก่นเกษตร**, 40, 41-47.

Prats E., Carver T.L.W., Mur L.A.J. 2008. Pathogen-derived nitric oxide influences formation of the appressorium infection structure in the phytopathogenic fungus *Blumeriagraminis*. **Research in Microbiology**. 159: 476-480.

Rhee S.G. 2006. H_2O_2, a necessary evil for cell signaling. **Science**. 312, 1882-1883.

Saxena A., Raghuwanshi R., Gupta V.K. and Singh H.B. 2016. Chilli anthracnose: the epidemiology and management. **Frontiers in Microbiology**, 7; 1527.

Scott B. and Eaton C.J. 2008. Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. **Current Opinion in Microbiology**. 11: 488-493.

Suwannarat S., Steinkellner S, Songkumarn P. and Sangchote S. 2017. Diversity of *Colletotrichum* spp. isolated from chili pepper fruit exhibiting symptoms of anthracnose in Thailand. **Micologia Progress**. 16, 677-686.

Takano, Y., Komeda, K., Kojima, K., Okuno T. 2001. Proper regulation of cyclic AMP-dependent protein kinase is required for growth, conidiation, and appressorium function in the anthracnose fungus Colletotichum lagenarium. **Moleular Plant Microbe Interaction.** 14, 1149-1157.

Than P.P., Prihastuti H., Phoulivong S., Taylor P.W.J., Hyde K.D. 2008. Chili anthracnose disease caused by Colletotrichum species. **Journal of Zhejiang University Science B.** 9(10):764–778.

Torres M.A. 2010. ROS in biotic interaction. **Physiology of Plant.** 138: 414–429.

Turrion-Gomez J.L., Benito E.P. 2011. Flux of nitric oxide between the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* and the host plant. **Molecular Plant Pathology.** 12(6), 606–616.

Wang J., and Higgins V.J. 2005. Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. **Fungal Genetics and Biology.** 42: 284–292.

Warwar V. and Dickan M. B. 1996. Effects of calcium and calmodulin on spore germination and appressorium development in *Colletotrichum trifolii*. **Applied and Environmental Microbilogy.** 62(1), 74–79.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
สูตรและขั้นตอนการเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide: H_2O_2)

1.1 การคำนวนความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30% เปลี่ยนไปเป็นความเข้มข้นในหน่วยโมลาร์

น้ำหนักโมเลกุล (Molecular Weight: MW) ของสาร H_2O_2 = 34.015 กรัม/โมล

จากสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 30%

การคำนวณสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30% เปลี่ยนเป็นหน่วยโมลาร์ (Molar : M) มีวิธีการดังนี้

จากสูตร $$M = \frac{10 \times \% \times \text{density}}{MW}$$

$$= \frac{10 \times 30 \times 1.11}{MW}$$

$$= 9.83\ M$$

1.2 การเตรียม Stock solution ของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในความเข้นข้น 1 M ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$9.83\ M \times V_1 = 1\ M \times 1$ มิลลิลิตร

$$= \frac{1\ M \times 1 \text{ มิลลิลิตร}}{9.83\ M}$$

$$= 0.101 \text{ มิลลิลิตร} \approx 101 \text{ ไมโครลิตร}$$

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 M มาปริมาตร 101 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 899 ไมโครลิตร

1.2.1 การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$1000\ mM \times V_1 = 0.5\ mM \times 5$ มิลลิลิตร

$$V_1 = \frac{0.5\ mM \times 5\ มิลลิลิตร}{1000\ mM}$$

$$= 0.0025\ มิลลิลิตร \approx 2.5\ ไมโครลิตร$$

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จาก Stock solution ความเข้มข้น 1 M มาปริมาตร 2.5 ไมโคลิตร จากนั้นนำมาละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

1.2.2 การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$1000\ mM \times V_1 = 1\ mM \times 5\ มิลลิลิตร$$

$$V_1 = \frac{1\ mM \times 5\ มิลลิลิตร}{1000\ mM}$$

$$= 0.005\ มิลลิลิตร \approx 5.0\ ไมโครลิตร$$

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จาก Stock solution ความเข้มข้น 1 M มาปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

1.2.3 การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ระดับความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$1000\ mM \times V_1 = 5\ mM \times 5\ มิลลิลิตร$$

$$V_1 = \frac{5\ mM \times 5\ มิลลิลิตร}{1000\ mM}$$

$$= 0.025\ มิลลิลิตร \approx 25\ ไมโครลิตร$$

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จาก Stock solution ความเข้มข้น 1 M มาปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

1.2.4 การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$1000\ mM \times V_1 = 10\ mM \times 5$ มิลลิลิตร

$V_1 = \frac{10\ mM \times 5 \text{ มิลลิลิตร}}{1000\ mM}$

$= 0.05$ มิลลิลิตร ≈ 50 ไมโครลิตร

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จาก Stock solution ความเข้มข้น 1 M มาปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาละลายในตัวทำละลาย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

1.2.5 การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 20 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$1000\ mM \times V_1 = 20\ mM \times 5$ มิลลิลิตร

$V_1 = \frac{20\ mM \times 5 \text{ มิลลิลิตร}}{1000\ mM}$

$= 0.1$ มิลลิลิตร ≈ 100 ไมโครลิตร

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จาก Stock solution ที่ระดับความเข้มข้น 1 M มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ (Sodium nitroprusside)

ในการทดลองนี้ใช้สารโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ (Sodium nitroprusside: SNP) เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารไนตริกออกไซด์ โดยสารโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ มีสถานะเป็นของแข็ง มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล (MW) เท่ากับ 297.96 กรัม/โมล

2.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ (1 M SNP)

สารละลาย 1 M ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ใช้ SNP = 297.95 กรัม

สารละลาย 1 M ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใช้ SNP = $\frac{297.95 \text{ กรัม} \times 1 \text{ มิลลิลิตร}}{1000 \text{ มิลลิลิตร}}$

= 0.29795 กรัม

2.2 การเตรียมสารละลาย SNP (0.2 M SNP)

สารละลาย SNP 1 M (1 มิลลิลิตร) ใช้สาร SNP = 0.29795 กรัม

สารละลาย SNP 0.2 M (200 mM) ใช้สาร SNP = $\frac{0.29795 \text{ กรัม} \times 0.2 \text{ M}}{1 \text{ M}}$

= 0.05959 กรัม

ถ้าเตรียมปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร = 0.05959 x 1.5 มิลลิลิตร

= 0.0894 กรัม

เตรียมโดยทำการชั่งสาร SNP ปริมาณ 0.0894 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% หรือน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ละลายสารให้เข้ากัน จะได้สารละลาย SNP ที่มีความเข้มข้น 0.2 M ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร

2.2.1 การเตรียมสารละลาย SNP ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM จาก Stock ที่ระดับความเข้มข้น 0.2M ที่มีสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 1 x 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1300 ไมโครลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$200\text{mM} \times V_1 = 1\text{ mM} \times 1300$ ไมโครลิตร

$V_1 = \frac{1\text{ mM} \times 1300 \text{ ไมโครลิตร}}{200\text{ mM}}$

$V_1 = 6.5$ ไมโครลิตร

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย SNP (Stock ที่ 2) ปริมาตร 6.5 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายสปอร์เชื้อราที่ทำการเจือจางได้ 1x10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 130 ไมโครลิตร และเติมละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 1163.5 ไมโครลิตร

2.2.2 การเตรียมสารละลาย SNP ที่ระดับความเข้มข้น 5 mM จาก Stock ที่ระดับความเข้มข้น 0.2M ที่มีสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 1 x 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1300 ไมโครลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$200mM \times V_1 = 5\ mM \times 1300 \text{ ไมโครลิตร}$$

$$V_1 = \frac{5\ mM \times 1300 \text{ ไมโครลิตร}}{200\ mM}$$

$$V_1 = 32.5 \text{ ไมโครลิตร}$$

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย SNP (Stock ที่ 2) ปริมาตร 32.5 ไมโครลิตร และใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายสปอร์ที่ทำการเจือจางได้ 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 130 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 1137.5 ไมโครลิตร

2.2.3 การเตรียมสารละลาย SNP ที่ระดับความเข้มข้น 10 mM จาก Stock ที่ระดับความเข้มข้น 0.2M ปริมาตร 1300 ไมโครลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$200mM \times V_1 = 10\ mM \times 1300 \text{ ไมโครลิตร}$$

$$V_1 = \frac{10\ mM \times 1300 \text{ ไมโครลิตร}}{200\ mM}$$

$$V_1 = 65 \text{ ไมโครลิตร}$$

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย SNP (Stock ที่ 2) ปริมาตร 65 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสปอร์ที่ทำการเจือจางได้ 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 130 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 1105 ไมโครลิตร

2.2.4 การเตรียมสารละลาย SNP ความเข้มข้น 50 mM จาก Stock ที่ระดับความเข้มข้น 0.2M ที่มีสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1300 ไมโครลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$200mM \times V_1 = 50\ mM \times 1300 \text{ ไมโครลิตร}$$

$$V_1 = \frac{50\ mM \times 1300 \text{ ไมโครลิตร}}{200\ mM}$$

$$V_1 = 325 \text{ ไมโครลิตร}$$

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย SNP (Stock ที่ 2) ปริมาตร 325 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสปอร์ที่ทำการเจือจางได้ 1×10^{6} สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 130 ไมโครลิตร และเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 845 ไมโครลิตร

2.2.5 การเตรียมสารละลาย SNP ความเข้มข้น 100 mM จาก Stock ที่ระดับความเข้มข้น 0.2M ที่มีสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 1×10^{5} สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1300 ไมโครลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$200mM \times V_1 = 1000\ mM \times 1300$ ไมโครลิตร

$V_1 = \frac{100\ mM \times 1300}{200\ mM}$ ไมโครลิตร

$V_1 = 650$ ไมโครลิตร

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย SNP (Stock ที่ 2) ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสปอร์ที่ทำการเจือจางได้ 1×10^{6} สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 130 ไมโครลิตร และเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 650 ไมโครลิตร

3. การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตร์ท (Sodium nitrite)

ในการทดลองนี้ใช้สารโซเดียมไนไตร์ทเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารไนตริกออกไซด์ โดยสารโซเดียมไนไตร์ท มีสถานะเป็นของแข็ง มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล (MW) เท่ากับ 69 กรัม/โมล

3.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตร์ท Stock ที่ 1 (0.2 M โซเดียมไนไตร์ท)

สารละลาย 1 M ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ใช้สารโซเดียมไนไตร์ท เท่ากับ 69 กรัม

สารละลาย 1 M ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ใช้สาร = 69 กรัม

สารละลาย 0.2 M ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ใช้สาร $= \frac{69\ กรัม \times 0.2\ M}{1\ M}$

$= 13.8$ กรัม

สารละลาย 0.2 M ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ใช้สาร = 13.8 กรัม

สารละลาย 0.2 M ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใช้สาร $= \frac{13.8\ กรัม \times 1\ มิลลิลิตร}{1000\ มิลลิลิตร}$

$= 0.0138$ กรัม

เตรียมโดยการชั่งสารโซเดียมไนไตร์ทปริมาณ 0.0138 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายโซเดียมคลอไรด์หรือน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เติมลงในสารโซเดียมไนไตร์ท ผสมให้เข้ากันดี จะได้ Stock ของสารโซเดียมไนไตร์ท ความเข้มข้น 0.2 M ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร (1 มิลลิลิตร)

3.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตร์ทที่ความเข้มข้น 1 mM จาก (Stock ที่ 1) ความเข้มข้น 0.2M ที่มีสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 1 x 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1300 ไมโครลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$200mM \times V_1 = 1\ mM \times 1300$ ไมโครลิตร

$V_1 = \frac{1\ mM \times 1300 \text{ ไมโครลิตร}}{200\ mM}$

$V_1 = 6.5$ ไมโครลิตร

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายโซเดียมไนไตร์ท (Stock ที่ 1) 6.5 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสปอร์ที่ทำการเจือจางได้ 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 130 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 1163.5 ไมโครลิตร

3.2.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตร์ทความเข้มข้น 5 mM จาก Stock ที่ระดับความเข้มข้น 0.2M ที่มีสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 1 x 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1300 ไมโครลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$200mM \times V_1 = 5\ mM \times 1300$ ไมโครลิตร

$V_1 = \frac{5\ mM \times 1300 \text{ ไมโครลิตร}}{200\ mM}$

$V_1 = 32.5$ ไมโครลิตร

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายโซเดียมไนไตร์ท (Stock ที่ 1) ปริมาตร 32.5 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสปอร์ที่ทำการเจือจางได้ 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 130 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 1137.5 ไมโครลิตร

3.2.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตร์ทความเข้มข้น 10 mM จาก Stock ที่ระดับความเข้มข้น 0.2M ที่มีสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 1 x 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1300 ไมโครลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$200mM \times V_1 = 10\ mM \times 1300$ ไมโครลิตร

$V_1 = \frac{10\ mM \times 1300}{200\ mM}$ ไมโครลิตร

$V_1 = 65$ ไมโครลิตร

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายโซเดียมไนไตร์ท (Stock ที่ 1) ปริมาตร 65 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสปอร์ที่ทำการเจือจางได้ 1×10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 130 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 1105 ไมโครลิตร

3.2.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตร์ทความเข้มข้น 50 mM จาก Stock ที่ระดับความเข้มข้น 0.2M ที่มีสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 1 x 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1300 ไมโครลิตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

$200mM \times V_1 = 50\ mM \times 1300$ ไมโครลิตร

$V_1 = \frac{50\ mM \times 1300}{200\ mM}$ ไมโครลิตร

$V_1 = 325$ ไมโครลิตร

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายโซเดียมไนไตร์ท (Stock ที่ 1) ปริมาตร 325 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสปอร์ที่ทำการเจือจางได้ 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 130 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 845 ไมโครลิตร

3.2.4 การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตร์ทความเข้มข้น 100 mM จาก Stock ที่ระดับความเข้มข้น 0.2M ที่มีสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 1 x 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1300 ไมโครลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$200mM \times V_1 = 1000\ mM \times 1300$ ไมโครลิตร

$V_1 = \frac{100\ mM \times 1300}{200\ mM}$ ไมโครลิตร

V_1 = 650 ไมโครลิตร

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายโซเดียมไนไตร์ท (Stock ที่ 1) ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสปอร์ที่ทำการเจือจางได้ 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 130 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 650 ไมโครลิตร

5. การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

ชั่งสารโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 4.25 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ภายใต้ความดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที และนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

6. การเตรียมสารละลาย 1X ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน

นำสารฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนจากบริษัท Amresco มาจำนวน 3 เม็ด ละลายในน้ำปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 300 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ภายใต้ความดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที และนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

7. การเตรียมสารละลายสำหรับการทำ SEM

7.1 การเตรียมสารละลาย Pirmary Fixtion

สารละลาย Primary Fixation ที่ใช้ในการหยุดการทำงานของเซลล์ ประกอบด้วยสารละลาย 2% พาราฟอร์มอลดีไฮด์ 2% กลูตารอลดีไฮด์ 1% ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน และน้ำกลั่น โดยมีวิธีการเตรียมดังนี้

สารเคมี	**ปริมาตร**	
1) 25% Glutaraldehyde	0.8	มิลลิลิตร
2) 16% Paraformaldehyde	1.25	มิลลิลิตร
3) 10X PBS	1	มิลลิลิตร
4) น้ำกลั่น	6.95	มิลลิลิตร
รวม	10	มิลลิลิตร

ทำการปิเปตและผสมสารแต่ละชนิดเข้าด้วยกัน จากนั้นนำเก็บในตู้เย็นเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป และควรเตรียมใหม่ทุกครั้งในแต่ละการทดลอง

7.2 การเตรียมสารละลาย Secondary Fixation

สารละลาย Secondary Fixation ที่ใช้หยุดปฏิกริยาของเซลล์ในขั้นที่ 2 ประกอบด้วยสารละลาย 1% ออสเมียมเตรตระออกไซด์ 1% ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน และน้ำกลั่น มีวิธีการเตรียมดังนี้

สารเคมี	**ปริมาตร**	
1) 4% Osmiumtretraoxide	2	มิลลิลิตร
2) 10X PBS	0.8	มิลลิลิตร
4) น้ำกลั่น	5.2	มิลลิลิตร
รวม	8	มิลลิลิตร

ทำการปิเปตและผสมสารแต่ละชนิดเข้าด้วยกัน จากนั้นนำเก็บในตู้เย็นเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป และควรเตรียมใหม่ทุกครั้งในแต่ละการทดลอง

7.3 การเตรียมสารละลายเอทานอลในการทำ SEM

1) การเตรียมเอทานอล 30% จาก stock ที่มีความเข้มข้น 100% (Absolute ethanol)

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$100\% \times V_1 = 30\% \times 30$ มิลลิลิตร

$$V_1 = \frac{30\% \times 30 \text{ มิลลิลิตร}}{100\%}$$

$V_1 = 9$ มิลลิลิตร

นำสารละลายเอทานอลมา 9 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 21 มิลลิลิตร จะได้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 30% และเก็บไว้ที่ -20 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2) การเตรียมเอทานอล 50% จาก stock ที่มีความเข้มข้น 100% (Absolute ethanol)

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$100\% \times V_1 = 50\% \times 30$ มิลลิลิตร

$$V_1 = \frac{50\% \times 30 \text{ มิลลิลิตร}}{100\%}$$

$V_1 = 15$ มิลลิลิตร

นำสารละลายเอทานอลมา 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร จะได้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 50% และเก็บไว้ที่ -20 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3) การเตรียมเอทานอล 70% จาก stock ที่มีความเข้มข้น 100% (Absolute ethanol)

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$100\% \times V_1 = 70\% \times 30$ มิลลิลิตร

$V_1 = \frac{70\% \times 30 \text{ มิลลิลิตร}}{100\%}$

$V_1 = 21$ มิลลิลิตร

นำสารละลายเอทานอลมา 21 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 70% และเก็บไว้ที่ -20 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4) การเตรียมเอทานอล 80% จาก stock ที่มีความเข้มข้น 100% (Absolute ethanol)

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$100\% \times V_1 = 80\% \times 30$ มิลลิลิตร

$V_1 = \frac{80\% \times 30 \text{ มิลลิลิตร}}{100\%}$

$V_1 = 24$ มิลลิลิตร

นำสารละลายเอทานอลมา 24 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร จะได้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 80% และเก็บไว้ที่ -20 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5) การเตรียมเอทานอล 90% จาก stock ที่มีความเข้มข้น 100% (Absolute ethanol)

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$100\% \times V_1 = 90\% \times 30$ มิลลิลิตร

$V_1 = \frac{90\% \times 30 \text{ มิลลิลิตร}}{100\%}$

$V_1 = 27$ มิลลิลิตร

นำสารละลายเอทานอลมา 27 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร จะได้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 90% และเก็บไว้ที่ -20 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ภาคผนวก ข.
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหารแขวนลอย Vogel media (VM) สำหรับเลี้ยงสปอร์เชื้อรา

ตารางภาคผนวกที่ 1 สูตรการเตรียมอาหารแขวนลอย Vogel media (VM)

ลำดับที่	ชื่อสารเคมี	1 ลิตร
1.	ไตรโซเดียม ซิเตรท (Na_3 citrate)	2.5 กรัม
2.	โพแทสเซียมฟอสเฟต ($KHPO_4$)	5 กรัม
3.	แอมโมเนียม ไนเตรท (NH_4NO_3)	2 กรัม
4.	แมกนีเซียม ซัลเฟต ($Mg_4.7H_2O$)	0.4 กรัม
5.	สารละลายไบโอติน (Biotin Solution)	200 ไมโครลิตร
6.	ธาตุอาหาร (Trace Element)	200 ไมโครลิตร
7.	ซูโครส (Sucrose)	15 กรัม
8.	แคลเซียม คลอไรด์ ($CaCl_2.H_2O$)	0.2 กรัม

การเตรียมอาหารแขวนลอยเลี้ยงเชื้อราปริมาตร 1 ลิตร ทำได้โดยชั่งสารไตรโซเดียม ซิเตรท มาจำนวน 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวนหนึ่ง จากนั้นทำการเติมสารโพแทสเซียม ฟอสเฟต จำนวน 5 กรัม ละลายให้หมด เติมสารแอมโมเนียม ไนเตรท จำนวน 2 กรัม เติมสาร แมกนีเซียม ซัลเฟต จำนวน 0.4 กรัม เติมสารละลายไบโอติน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ เติมธาตุอาหาร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมซูโครส จำนวน 15 กรัม ละลาย สารละลายจนหมด จากนั้นเติมสารแคลเซียม คลอไรด์ จำนวน 0.2 กรัม เป็นสารสุดท้าย ละลายให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร แล้วแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ อุณหภูมิ 121 °C ภายใต้ความดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลง และเก็บในตู้เย็น จนกว่าจะนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อราต่อไป

2. การเตรียมอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

ตารางภาคผนวกที่ 2 สูตรการเตรียมอาหารแข็ง PDA

ลำดับที่	ชื่อสารเคมี	กรัมต่อลิตร
1.	Potato Dextrose Broth	24
2.	Agar powder	15

การเตรียมอาหารแข็ง PDA สำหรับใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา ทำได้โดยการชั่งสาร Potato Dextrose Broth จำนวน 24 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรหนึ่ง จากนั้นทำการเติมผงวุ้น (Agar powder) จำนวน 15 กรัม ละลายขนหมด และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส นำอาหารไปเทในจานเพาะเชื้อ รอจนอาหารแข็งตัวและเก็บในตู้เย็นเพื่อรอการนำไปใช้