การอนุรักษ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช: ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

Conservation of Plant Pathogens Microorganisms: Preservation Technique for *Colletotrichum* spp.

ธารทิพย ภาสบุตร อภิรัชต์ สมฤทธิ์ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี พรพิมล อธิปัญญาคม
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเทคนิคการเก็บรักษารา *Colletotrichum* spp. โดยทำการเก็บรักษารา *Colletotrichum* spp. ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ได้แก่รา *C. gloeosporioides* 5 ไอโซเลท และรา *C. capsici* 5 ไอโซเลท ด้วยวิธีการเก็บรักษา 6 วิธี คือ การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรอง การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจล การเก็บรักษาในน้ำมันพาราฟิน การเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาในสภาพแห้งสุญญากาศ เมื่อครบระยะการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 4 6 และ 8 เดือน นำราที่เก็บรักษาไว้มาตรวจความมีชีวิต การปนเปื้อน การสร้างโคนิเดียและความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรค พบว่า วิธีการเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรองและการเก็บรักษาใน กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ดีที่สุดสำหรับรา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* 10 ไอโซเลทที่นำมาเก็บรักษา ราสามารถคงความมีชีวิตอยู่ได้ สร้างโคนิเดียได้ดี พบการปนเปื้อนน้อยที่สุด และจากการทดสอบความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรค พบว่ารา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ทุกไอโซเลทที่นำมาปลูกเชื้อยังสามารถทำให้พืชเกิดโรคได้ รองลงมาคือ การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ การเก็บรักษาในสภาพแห้งสุญญากาศ การเก็บรักษาในน้ำมันพาราฟินและการเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจล ตามลำดับ

รหัสการทดลอง 09-02-49-02-01-07-02-51

คำนำ

ราสกุล *Colletotrichum* จัดเป็นราสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญ เพราะสามารถก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) กับพืชหลายชนิด สามารถเข้าทำลายได้เกือบทุกส่วนของพืช ตั้งแต่ต้นกล้า ใบ ก้านใบ ลำต้น ดอก ผล และมีพืชอาศัยกว้าง (วิรัช และคณะ, ๒๕๒๘) ราสกุล *Colletotrichum* มีหลายชนิด (species) ที่สำคัญได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* ราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสหรือโรคกุ้งแห้งของพริก พริกเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ทำรายได้ให้เกษตรกรผู้ปลูกอย่างมากและมีการส่งออกไปขายยังต่างประเทศ แต่ในการปลูกพริกเกษตรกรมักประสบปัญหาการระบาดของโรค ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นเนื่องจากต้องเสียค่าใช้จ่ายในการป้องกันกำจัดโรคเป็นจำนวนมาก

การศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชหรือราที่มีประโยชน์ทางการเกษตร เพื่อให้ทราบวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม วัตถุประสงค์ก็เพื่อเก็บรักษาให้รามีชีวิตรอดอยู่ได้เป็นระยะเวลายาวนาน สามารถนำกลับมาใช้ได้ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย โดยยังคงความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น เพื่อที่จะทำการศึกษาเชื้อราเหล่านั้นเพิ่มเติมได้โดยไม่ต้องออกไปเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อใหม่อยู่เสมอ วิธีการเก็บรักษาเชื้อรามีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของรา แต่มีหลักการสำคัญคือ การหยุดหรือลดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยควบคุมปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญเช่น การจำกัดอากาศ อุณหภูมิ สารอาหารและน้ำ การเก็บรักษาแต่ละวิธีต้องทำให้เชื้อยังมีชีวิตรอดอยู่มากที่สุด คงลักษณะเดิมมากที่สุด และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม การเก็บรักษาเชื้อราที่นิยมได้แก่ การเก็บโดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การเก็บภายใต้น้ำมันแร่หรือน้ำมันพาราฟิน การเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ การเก็บในสภาพแห้งเช่น เก็บในดิน เก็บในซิลิกาเจล เก็บบนกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ การเก็บในสภาพเย็นยิ่งยวด และการเก็บในสภาพแห้งสุญญากาศ เป็นต้น (Smith and Onion, 1994)

ดังนั้นการศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาราในสกุล *Colletotrichum* เช่น *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ให้มีชีวิตรอดอยู่ได้เป็นระยะเวลายาวนานโดยยังคงความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนจึงเป็นสิ่งจำเป็น วัตถุประสงค์เพื่อให้สามารถนำกลับมาศึกษาวิจัยใหม่ได้ เช่น การนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา ศึกษาความสามารถในการก่อโรคและความรุนแรงของโรค รวมทั้งการนำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เป็นต้น นอกจากนี้การศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาราในครั้งนี้ยังทำให้ได้สายพันธุ์รา เก็บไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อประโยชน์ในการเป็นแหล่งให้บริการสายพันธุ์ราแก่ นิสิตนักศึกษา หน่วยวิจัยของส่วนราชการอื่นๆ รวมทั้งบริษัทเอกชน

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ราสกุล *Colletotrichum* spp.
2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา WA (Water Agar) PDA (Potato Dextrose Agar) PCA (Potato Carrot Agar) PDB (Potato Dextrose Broth)
3. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง กล้องถ่ายภาพและอุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ
4. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส
5. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส
6. ซิลิกาเจล (silica gel เกรด 40 ขนาด 6-12 mesh)
7. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส
8. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส
9. เครื่อง Freeze Dryer

วิธีการ

1. **การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรค**

เก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่เป็นโรคแอนแทรคโนสจากแหล่งปลูกในประเทศไทย บันทึกข้อมูลของสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง และศึกษาลักษณะอาการของโรค

2. **การแยกรา *Colletotrichum* spp. ออกจากพืชที่เป็นโรค**

2.1 วิธีการเพาะเชื้อในที่ชื้น (Moist chamber method)

นำชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรควางบนกระดาษกรองที่ชุ่มน้ำในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เมื่อราสร้างกลุ่มโคนิเดียแล้ว เขี่ยกลุ่มโคนิเดียจากชิ้นส่วนพืชนำไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการทำสปอร์เดี่ยว

2.2 วิธีการตัดเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Tissue transplanting method)

ตัดชิ้นส่วนพืชระหว่างส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติให้มี ขนาด 3 x 3 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อบริเวณผิวของชิ้นส่วนพืชด้วยคลอรอกซ์ (Clorox) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที วางชิ้นส่วนพืชลงบนอาหาร WA ในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปไว้ใต้แสงฟลูออเรสเซนต์และแสง NUV (Near Ultraviolet) ที่ตั้งเวลาเปิดแสง 12 ชั่วโมงสลับกับปิดแสง 12 ชั่วโมง ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เมื่อเส้นใยเจริญออกมาตัดปลายเส้นใยย้ายไปเลี้ยงในจานอาหาร PDA แล้วนำไปไว้ใต้แสงฟลูออเรสเซนต์และแสง NUV ที่ตั้งเวลาเปิดแสง 12 ชั่วโมงสลับกับปิดแสง ชั่วโมง ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน เป็นเวลา 7 วันหรือจนกระทั่ง

ราสร้างกลุ่มโคนิเดีย จากนั้นนำมาเขี่ยกลุ่มโคนิเดียออกจากอาหารเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยการทำสปอร์เดี่ยว

3. การเลี้ยงราให้บริสุทธิ์โดยการทำสปอร์เดี่ยว (Single spore technique)

เขี่ยกลุ่มโคนิเดียของรา ลงในหลอดแก้วที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้โคนิเดียกระจายตัวในน้ำ ตรวจสอบความหนาแน่นของสปอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ห่วงลวด (loop) ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคนิเดียแขวนลอยมาวางบนแผ่นแก้วสไลด์ ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (100X) ให้มีจำนวนโคนิเดีย 10 โคนิเดียต่อพื้นที่การมองเห็น (10 โคนิเดียต่อ low-power 100 X microscope field) หลังจากนั้นใช้ห่วงลวดที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในโคนิเดียแขวนลอยที่ทำไว้ นำมาลากเส้นลงบนผิวหน้าอาหาร WA บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตรวจการงอกของโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ โดยตรวจดูจากด้านใต้จานอาหาร เมื่อพบว่าโคนิเดียมีเส้นใยงอกออกมาและอยู่ห่างจากโคนิเดียอื่นๆ ใช้ปากกาเขียนแก้วทำจุดเครื่องหมายไว้ที่จานอาหาร จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเล็กที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วเจาะชิ้นวุ้นตรงตำแหน่งที่ทำเครื่องหมายไว้ ใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ใต้แสงฟลูออเรสเซนต์และแสง NUV ที่ตั้งเวลาเปิดแสง 12 ชั่วโมงสลับกับปิดแสง 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4. การเก็บรักษารา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici*

การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ

เตรียมกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ โดยตัดกระดาษกรอง เบอร์ 1 ให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 2 x 0.5 เซ็นติเมตร ใส่กระดาษที่ตัดแล้วลงในจานแก้ว (Petri dish) หุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นเตรียม micro tubes โดยนำ micro tubes ใส่ในบิกเกอร์ที่รองด้วยกระดาษทิชชู ปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ ห่อด้วยถุงพลาสติกอีกชั้น นำกระดาษกรอง และ micro tubes ที่เตรียมไว้ไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

เลี้ยงรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่ต้องการเก็บรักษาบนอาหาร PDA เมื่อราอายุ 7 วัน ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยชิ้นวุ้นที่มีราเจริญอยู่ไปวางตรงกลางจานอาหาร PCA จากนั้นใช้ปากคีบ (forceps) ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วชิ้นคีบกระดาษกรองวางรอบๆชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่ 8-10 ชิ้น นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไปไว้ใต้แสง ฟลูออเรสเซนต์และหลอด NUV ที่ตั้งเวลาเปิดแสง 12 ชั่วโมงสลับกับปิดแสง 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันหรือจนพบว่าราสร้างเส้นใยคลุมชิ้นกระดาษกรองและมีการสร้างกลุ่มโคนิเดียบนกระดาษกรอง ใช้ ปากคีบที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วลอกเฉพาะชิ้นกระดาษกรองที่มีราปกคลุมไปวางในจานแก้วเปล่าที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาจานแก้วนำไปวางไว้ในโถดูดความชื้น (desiccators) ปล่อยให้กระดาษกรองแห้งเป็นเวลาประมาณ 2 วัน เมื่อ

กระดาษกรองแห้งสนิทแล้วใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบกระดาษกรองใส่ลงในหลอด micro tubes นำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบการมีชีวิตและการสร้างโคนิเดียหลังทำการเก็บรักษา ทุก 2 4 6 และ 8 เดือน โดยใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบกระดาษกรองย้ายจากหลอด micro tubes ที่เก็บรักษาไว้ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ

การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

เตรียมน้ำกลั่นใส่ขวดแก้วมีฝาปิด (vial) ให้ได้ปริมาตร 1/3 ของขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เสร็จแล้วเอาออกจากหม้อนึ่งวางทิ้งไว้ 1 วัน แล้วนำมา นึ่งซ้ำอีก 1 ครั้ง นำราที่เลี้ยงไว้มาเจาะเป็นชิ้นด้วย cork borer No.2 ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นย้ายชิ้นวุ้นที่เจาะแล้วใส่ ลงในขวดแก้วที่เตรียมไว้ ปิดฝา แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบการมีชีวิตและการสร้างโคนิเดียทุก 3 เดือนหลังทำการเก็บรักษา โดยนำชิ้นวุ้นออกจากน้ำกลั่นมาวางบนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำชิ้นวุ้นไปวางบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ตรวจดูการเจริญของรา

การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจล

นำเม็ดซิลิกาเจลใส่ขวดฝาเกลียวประมาณ 1/3 ของขวด นำเข้าตู้อบความร้อน (oven) ที่อุณหภูมิ 70 องศา-เซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง

ละลาย skim milk 7 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียวขวดละ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำมาแชในน้ำเย็นทันทีวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีซ้ำอีกครั้ง ใช้ปิเปตนึ่งฆ่าเชื้อดูดสารละลายนม 3-5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารเอียงที่เลี้ยงรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ใช้เข็มเขี่ยทำให้โคนิเดียหลุดกระจายออกมาอยู่ใน skim milk อย่างสม่ำเสมอ เอียงและเขย่าขวดให้เม็ดซิลิกาเจลกระจาย จากนั้นดูดสารแขวนลอยโคนิเดีย 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดซิลิกาเจลเขย่าขวดทันที เพื่อให้สารแขวนลอยโคนิเดียกระจายทั่วเม็ดซิลิกาเจลวางขวดใน ice bath ทันทีเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อป้องกันความร้อนที่จะเกิดขึ้นในระหว่างที่เม็ด ซิลิกาเจลดูดซับสารแขวนลอยโคนิเดียเข้าไป เก็บขวดเม็ดซิลิกาเจลที่ปิดฝาแน่นหนาแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบการมีชีวิตและการสร้างโคนิเดียหลังทำการเก็บรักษา ทุก 2 4 6 และ8 เดือน โดยนำเม็ดซิลิกาเจลที่เก็บรักษาไว้ นำชิ้นวุ้นไปวางบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ตรวจดูการเจริญของรา

การเก็บรักษาในน้ำมันพาราฟิน (Under mineral oil)

เตรียมหลอดอาหารวุ้นเอียง PCA โดยเทอาหารที่ต้องการลงในหลอดแก้ว (tube) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำไปวางเอียงระหว่างที่รอให้อาหารเย็น อาหารวุ้นที่อยู่ในหลอดแก้วจะแข็งอยู่ในลักษณะเอียง จากนั้นย้ายรามาวางบนผิวหน้าอาหารที่เอียงไว้ แล้วนำหลอดไปวางไว้ใต้แสงฟลูออเรสเซนต์และแสง NUV ที่ตั้งเวลาเปิดแสง 12 ชั่วโมง สลับกับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หรือจนพบว่าราสร้างกลุ่มโคนิเดีย เทน้ำมันพาราฟินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที 2 ครั้ง ลงในหลอดอาหาร โดยให้ระดับน้ำมันสูงกว่าผิวหน้าของเชื้อ 1 เซนติเมตร ใช้เทปพลาสติกหุ้มสำลีที่ปิดปากหลอด แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบการมีชีวิตและการสร้างโคนิเดียทุก 3 เดือนหลังทำการเก็บรักษา โดยตัดชิ้นวุ้นออกมาวางบนกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อซับน้ำมันพาราฟิน จากนั้นนำชิ้นวุ้นไปวางบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ตรวจดูการเจริญของรา

การเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ สภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

เตรียมกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ใส่ขวดแก้วขวดละ 4 มิลลิลิตร ปิดฝา แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดปลายเส้นใยของรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* บริสุทธิ์อายุ 7 วัน ที่เจริญอยู่บนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ วางลงในจานอาหาร PCA จากนั้นนำไปไว้ใต้แสงฟลูออเรสเซนต์และแสง NUV ที่ตั้งเวลาเปิดแสง 12 ชั่วโมง สลับกับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หรือจนพบว่าราสร้างกลุ่มโคนิเดีย นำราที่เลี้ยงไว้มาเจาะเป็นชิ้นด้วย cork borer No.2 ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นย้ายชิ้นวุ้นที่เจาะแล้วใส่ลงใน cryotube เทกลี-เซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้ลงใน cryotube จนท่วมชิ้นวุ้น นำไปเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบการมีชีวิตและการสร้างโคนิเดียหลังทำการเก็บรักษา ทุก 2 4 6 และ8 เดือน โดยนำหลอด cryotube ที่เก็บรักษาไว้ออกจากตู้แช่แข็ง ใช้ปากคีบจับหลอดแช่ในน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียส แกว่งให้น้ำแข็งในหลอดละลายอย่างรวดเร็ว ใช้สำลีจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ดหลอดเปิดฝาหลอด นำชิ้นวุ้นออกมาวางบนกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำชิ้นวุ้นไปวางบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ตรวจดูการเจริญของรา

การเก็บรักษาในสภาพแห้งสุญญากาศหรือการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying)

เตรียมหลอด ampoule สำหรับเก็บเชื้อ โดยนำหลอดใหม่มาแช่กรด HCL 2 เปอร์เซ็นต์ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง จากนั้นแช่หลอดด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ 1 คืน นำหลอดขึ้นมาผึ่งให้แห้ง แล้วอบด้วย hot air oven เตรียมแผ่นป้ายกระดาษเขียนข้อมูลของราใส่ลงในหลอด ปิดจุกสำลี แล้ว

ห่อด้วยกระดาษฟอยล์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

เตรียม Suspending medium

Suspending medium หมายถึง ของเหลวที่ใช้ผสมกับเซลล์หรือโคนิเดียของจุลินทรีย์ ก่อนนำไปเข้ากระบวนการทำให้แห้งในสภาพสุญญากาศ มีคุณสมบัติที่ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์หรือ โคนิเดียแตกสลาย และของเหลวนั้นสามารถละลายกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ง่าย ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ skim milk 10 เปอร์เซ็นต์ ทำโดย ชั่ง skim milk 10 กรัม ละลายในน้ำอุ่น 90 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำ skim milk ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียวขวดละ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นทันที วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีซ้ำอีกครั้ง

ขั้นตอนการเก็บรักษา เลี้ยงราในหลอดอาหารวุ้นเอียง PCA ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์และแสง NUV ที่ตั้งเวลาเปิดแสง 12 ชั่วโมง สลับกับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หรือจนพบว่าราสร้างกลุ่มโคนิเดีย นำ skim milk 10 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้มาเทผสมกับราที่เลี้ยงไว้ในหลอดอาหารวุ้นเอียง ทำให้โคนิเดียหลุดกระจายออกมาอยู่ใน skim milk อย่างสม่ำเสมอ ย้ายสารแขวนลอยโคนิเดียที่ได้ใส่ในหลอด ampoule ที่เตรียมไว้ หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร โดยไม่ให้มีการเปื้อนที่ข้างหลอดและไม่ให้มีฟองอากาศ นำหลอด ampoule ไปเข้าเครื่อง Freeze dryer ในระยะ primary dry เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหลอด ampoule มาอุดจุกสำลี จากนั้นทำการคอดหลอด ampoule (constriction) ให้รอยคอดห่างจากจุกสำลีประมาณ 1 เซ็นติเมตร แล้วนำเข้าเครื่อง Freeze dryer ในระยะ secondary dry เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใช้ไฟลนปิดหลอด ampoule บริเวณรอยคอด ขณะอยู่ในสภาพสุญญากาศ นำ ampoule เชื้อที่ได้มาทดสอบความเป็นสุญญากาศภายในหลอดโดยใช้ High Frequency Spark Tester จากนั้นจึงนำหลอดที่เป็นสุญญากาศไปเก็บรักษาไว้ในตู้มืดที่ควบคุมอุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบการมีชีวิตหลังทำการเก็บรักษา 2 4 6 และ8 เดือน โดยใช้ตะไบเลื่อยกรีดรอบๆ หลอด ampoule ให้เป็นรอย ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เช็ดตรงรอยกรีด ใช้ผ้าขาวบางหุ้มสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วหุ้มตรงรอยกรีด แล้วหักปลายหลอด จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (PDB) ลงในหลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 นาที ใช้ปิเปตดูดสารละลายเชื้อขึ้นลง ให้อาหารและเชื้อผสมกันดี แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ

ระยะเวลาดำเนินการ

ระยะเวลา เริ่มต้น เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2550
สิ้นสุด เดือน กันยายน พ.ศ. 2553

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกรา *Colletotrichum* spp. จากพืชที่เป็นโรคและการเลี้ยงราให้บริสุทธิ์โดยการทำสปอร์เดี่ยว

การทดลองครั้งนี้เลือกเก็บเฉพาะพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนส เนื่องจากโรคแอนแทรคโนสพริกเป็นโรคที่มีความสำคัญที่มีผลต่อการส่งออกพริกไปยังต่างประเทศ และยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกมากเกี่ยวกับการป้องกันกำจัดราสาเหตุโรค

ผลการแยกเชื้อได้รา *Colletotrichum* spp. บริสุทธิ์เพื่อใช้ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษา 10 ไอโซเลท เป็นรา *C. gloeosporioides* 5 ไอโซเลท *C. capsici* 5 ไอโซเลท จำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตามเอกสารและวิธีการของ Sutton (1980) และ วิรัช (2528)

การเก็บรักษารา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici*

ทำการเก็บรักษารา *C. gloeosporioides* 5 ไอโซเลท และ *C. capsici* 5 ไอโซเลท ด้วยวิธีการเก็บรักษา 6 วิธี คือ การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรอง การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจล การเก็บรักษาในน้ำมันพาราฟิน การเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ สภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาในสภาพแห้งสุญญากาศ จากนั้นตรวจความมีชีวิตและการสร้างโคนิเดีย (วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีจาก 10 ซ้ำ) หลังทำการเก็บรักษาทุก 2 4 6 และ 8 เดือน ผลที่ได้เป็นดังนี้

การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรอง

ผลการตรวจความมีชีวิตและการสร้างโคนิเดีย ของรา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* หลังจากเก็บรักษาไว้ในสภาพแห้งบนกระดาษกรองที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วตรวจวัดการเจริญของเส้นใย พบว่ามีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 8.40 7.04 6.74 7.32 7.09 7.56 9.00 6.29 5.21 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 4 เดือน ตรวจวัดการเจริญของเส้นใย พบว่ามีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 7.24 7.59 5.43 7.55 5.00 7.39 9.00 4.66 5.00 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 6 เดือน ตรวจวัดการเจริญของเส้นใย พบว่ามีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 9.00 9.00 7.67 9.00 8.80 9.00 8.38 7.19 7.01 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 8 เดือน ตรวจวัดการเจริญของเส้นใยพบมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 6.24 7.30 3.77 6.70 6.29 7.14 9.00 3.70 และ 3.74 เซ็นติเมตร ตามลำดับ พบการสร้างกลุ่มโคนิเดียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 -10 วัน พบรา 1 ไอโซเลทที่วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีไม่ได้เนื่องจากพบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย

จากการปลูกเชื้อลงบนพริกเพื่อดูความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรค พบว่า รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ทุกไอโซเลทที่นำมาปลูกเชื้อสามารถทำให้พริกเป็นโรคได้

การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรองเป็นหนึ่งในหลายวิธีที่ใช้เก็บรักษาราสาเหตุโรคพืช เป็นวิธีที่ง่าย ขั้นตอนวิธีการทำไม่ยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายน้อยและสะดวกต่อการนำกลับมา ใช้งาน จากการศึกษาในครั้งนี้ รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่เก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 8 เดือน ยังคงความมีชีวิต สามารถสร้างโคนิเดียได้และพบการปนเปื้อนน้อย การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรอง แต่ละขั้นตอนในการปฏิบัติงานต้องทำอย่างรวดเร็วในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) และกระดาษกรองที่มีราเจริญอยู่ต้องแห้งสนิท ก่อนนำไปเก็บรักษา เพราะจะมีผลต่อการมีชีวิตและการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น วิธีการเก็บรักษาราในสภาพแห้งบนกระดาษกรองนี้มีรายงานการใช้กับรา *Marasmiellus inoderma* สาเหตุโรคลำต้นเน่า (basal rot) ของกล้วยไม้ออนซิเดียม รา *Ganoderma* sp. สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มประดับ รา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยว (wilt disease) ของประดู่บ้านพบว่า รา *M. inoderma* คงความมีชีวิต 75 เปอร์เซ็นต์ หลังการเก็บรักษาเป็นเวลานาน 2 ปี รา *Ganoderma* sp. คงความมีชีวิต 81 เปอร์เซ็นต์ หลังการเก็บรักษาเป็นเวลานาน 5 เดือน รา *F. oxysporum* คงความมีชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ หลังการเก็บรักษาเป็นเวลานาน 4 ปี (Fong *et al*., 2000)

การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

ผลการตรวจความมีชีวิตและการสร้างโคนิเดียของรา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* เมื่อนำออกมาเลี้ยงบนอาหาร PDA หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน รา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* เส้นใยเจริญได้ดี มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 9.12 8.84 7.21 7.24 7.84 6.49 9.06 9.20 และ 9.20 เซนติเมตร ตามลำดับ พบการสร้างกลุ่มโคนิเดียบนอาหารเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 - 10 วัน หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน รา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* จำนวน 8 ไอ- โซเลท เส้นใยเจริญได้ดี เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะเวลา 7 วัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 9.20 5.81 9.20 6.91 5.24 6.95 7.51 และ 6.05 ตามลำดับ พบการสร้างกลุ่มโคนิเดียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 -10 วัน มีรา *C. gloeosporioides* 2 ไอโซเลท วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีไม่ได้เนื่องจากพบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน รา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* จำนวน 8 ไอโซเลท เส้นใยเจริญได้ดี เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 8.57 9.20 4.18 5.42 5.85 9.20 8.28 และ 9.20 ตามลำดับ พบการสร้างกลุ่มโคนิเดียเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 - 10 วัน มีรา *C. gloeosporioides* 1 ไอโซเลท วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีไม่ได้เนื่องจากพบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 8 เดือน รา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* จำนวน 8 ไอโซเลท เส้นใยเจริญได้ดี เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 8.57 8.20

5.18 5.42 5.85 8.20 8.28 และ 7.50 ตามลำดับ พบการสร้างกลุ่มโคนิเดียเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 - 10 วัน มีรา *C. gloeosporioides* 2 ไอโซเลท วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีไม่ได้เนื่องจากพบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย

จากการปลูกเชื้อลงบนพริกเพื่อดูความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรค พบว่า รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ทุกไอโซเลทที่นำมาปลูกเชื้อสามารถทำให้พริกเป็นโรคได้

การเก็บรักษารา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบว่าเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก ต้นทุนต่ำ แต่ต้องมีการดูแลเติมน้ำอย่างสม่ำเสมอเนื่องจากมีการระเหยของน้ำ การระเหยของน้ำทำให้เส้นใยบางส่วนแห้งและไม่เจริญ เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียและราอื่นบ้างแต่แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้ การเก็บรักษาราในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อส่วนใหญ่เป็นวิธีที่ใช้เก็บรารักษาสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* (พัฒนา, 2547) และใช้เก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรมและเห็ดหูหนู ซึ่งพบว่าสามารถเก็บรักษาเชื้อเห็ดได้เป็นเวลา 24 เดือน (สุวลักษณ์และประไพศรี, 2545)

การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจล

ผลการตรวจความมีชีวิตและการสร้างโคนิเดียของรา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* หลังจากเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจลเป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยการวัดการเจริญของเส้นใยเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* จำนวน 6 ไอโซเลท มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 7.13 5.47 9.00 4.25 5.02 และ 9.00 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* จำนวน 4 ไอโซเลท วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญ การวัดการเจริญของเส้นใยหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่า รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* จำนวน 2 ไอโซเลท มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 2.48 และ 4.48 เซ็นติเมตร ตามลำดับ รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* จำนวน 8 ไอโซเลท วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญ การวัดการเจริญของเส้นใยรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่า รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* จำนวน 3 ไอโซเลท มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 4.78 7.40 และ 8.78 เซ็นติเมตร ตามลำดับ รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* จำนวน 7 ไอโซเลท วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญ

จากการปลูกเชื้อลงบนพริกเพื่อดูความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรค พบว่า รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ทุกไอโซเลทที่นำมาปลูกเชื้อสามารถทำให้พริกเป็นโรคได้

จากการเก็บรักษารา ในสภาพแห้งบนซิลิกาเจลในการทดลองครั้งนี้ พบว่าหลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 8 เดือน รา *C. gloeosporioides* และ รา *C. capsici* คงความมีชีวิตอยู่น้อย ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณสปอร์ของราที่นำมาเก็บรักษาน้อยเกินไป สารแขวนลอยโคนิเดียกระจายไม่ทั่วเม็ดซิลิกาเจล วางขวดใน ice bath ช้าเกินไป และเก็บรักษาไว้ในที่ที่อุณหภูมิไม่

เหมาะสม ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Smith และ Onions (1983) ที่รายงานไว้ว่า วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ในสภาพแห้งบนซิลิกาเจล สามารถเก็บรักษาราที่สร้างสปอร์ให้คงความมีชีวิตอยู่ได้นาน 8-11 ปี ขั้นตอนการทำง่าย มีค่าใช้จ่ายน้อย สะดวกในการนำกลับมาใช้และไม่ต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ที่มีราคาแพง

การเก็บรักษาในน้ำมันพาราฟิน

ผลการตรวจการเจริญของเส้นใยและการสร้างกลุ่มโคนิเดียของรา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* เมื่อนำออกมาเลี้ยงบนอาหาร PDA หลังการเก็บรักษาในน้ำมันพาราฟินเป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าเส้นใยเจริญได้ดีเมื่อ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 7.98 7.07 8.65 6.13 5.91 5.68 9.11 7.57 8.67 และ 7.15 เซ็นติเมตร ตามลำดับ พบการสร้างกลุ่มโคนิเดียบนอาหารเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 -10 วัน หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าราจำนวน 9 ไอโซเลท เส้นใยเจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เฉลี่ย 9.20 8.28 8.57 9.20 8.75 9.20 8.28 และ 8.65 เซ็นติเมตร ตามลำดับ พบการสร้างกลุ่มโคนิเดียบนอาหารเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 -10 วัน พบรา *C. gloeosporioides* 1 ไอโซเลท ที่วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เพราะเชื้อไม่เจริญ หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่า มีราจำนวน 5 ไอโซเลทที่เส้นใยเจริญดี เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 9.20 8.28 9.20 8.28 และ 8.26 เซ็นติเมตร ตามลำดับ พบการสร้างกลุ่มโคนิเดียบนอาหารเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 -10 วัน รา *C. gloeosporioides* จำนวน 3 ไอโซเลท รา *C. capsici* 2 ไอโซเลท วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เพราะเชื้อไม่เจริญ หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 8 เดือน พบว่ามีราจำนวน 3 ไอโซเลท เมื่อนำออกมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 6.36 6.34 4.34 เซ็นติเมตร ตามลำดับ ไม่พบการสร้างกลุ่มโคนิเดียบนอาหารเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 -10 วัน รา *C. gloeosporioides* จำนวน 3 ไอโซเลท รา *C. capsici* จำนวน 4 ไอโซเลท ที่วัดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่ได้เพราะเชื้อไม่เจริญ

จากการปลูกเชื้อลงบนพริกเพื่อดูความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรค พบว่า รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ทุกไอโซเลทที่นำมาปลูกเชื้อสามารถทำให้พริกเป็นโรคได้

วิธีการเก็บรักษาในน้ำมันพาราฟินเป็นวิธีที่เหมาะสมในสภาพอากาศร้อนชื้น เพราะน้ำมันพาราฟินช่วยป้องกันไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง ป้องกันการเข้าทำลายของไร อุปกรณ์หรือสารเคมีที่ใช้ราคาไม่แพง และสามารถปฏิบัติงานได้ง่าย แต่การเก็บรักษาวิธีนี้ใช้ได้ดีกับการเก็บเชื้อราจำนวนน้อยๆ เพราะ แต่จากการศึกษาครั้งนี้เมื่อนำรา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* ที่เก็บรักษาในน้ำมันพาราฟินออกมาเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่ามีการปนเปื้อนแบคทีเรียและราชนิดอื่น ซึ่งการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นอาจเป็นเพราะความผิดพลาดระหว่างทำการย้ายชิ้นวุ้นเพราะต้องย้ายชิ้นวุ้นที่อยู่ในน้ำมันพาราฟินมาวางบนกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อซับน้ำมันให้แห้งก่อนนำไปวางบนอาหาร PDA ถ้าตู้เขี่ยเชื้อหรือกระดาษกรองไม่สะอาดพอก็อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนได้

การเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ สภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ผลการตรวจความมีชีวิตและการสร้างโคนิเดีย ของรา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* หลังจากเก็บรักษาไว้ในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ สภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วตรวจวัดการเจริญของเส้นใย พบว่า มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 9.00 8.03 6.90 8.21 6.54 7.27 9.00 6.17 6.05 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ การวัดการเจริญของเส้นใยรา หลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 4 เดือน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 6.56 8.36 5.49 8.10 4.14 6.54 9.00 5.26 4.80 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ การตรวจการเจริญของเส้นใย หลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 6 เดือน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 6.45 6.99 3.46 6.70 5.91 6.78 9.00 3.43 3.41 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ การวัดการเจริญของเส้นใยหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 8 เดือน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 9.00 7.96 5.00 7.96 7.17 7.85 9.00 4.96 5.16 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ ทุกไอโซเลทเริ่มพบการสร้างกลุ่มโคนิเดียบนอาหารเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 -10 วัน (ตารางที่ 2)

จากการปลูกเชื้อลงบนพริกเพื่อดูความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรค พบว่ารา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ทุกไอโซเลทที่นำมาปลูกเชื้อสามารถทำให้พริกเป็นโรคได้

การเก็บรักษาในสภาพแห้งสุญญากาศหรือการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง

ผลการตรวจความมีชีวิตและการสร้างโคนิเดีย ของรา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* หมายเลข หลังจากเก็บรักษาไว้ในสภาพแห้งสุญญากาศเป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วตรวจวัดการเจริญของเส้นใย พบว่ารา *C. gloeosporioides* 5 ไอโซเลทและรา *C. capsici* 1 ไอโซเลท มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 8.70 6.83 4.25 6.66 6.45 และ9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ พบรา *C. capsici* 4 ไอโซเลท ไม่สามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญ หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน พบรา *C. gloeosporioides* 4 ไอโซเลทและ *C. capsici* 1 ไอโซเลท มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 7.88 5.47 5.51 5.12 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ พบรา *C. capsici* 4 ไอโซเลท *C. gloeosporioides* 1 ไอโซเลท วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญ หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่ารา *C. gloeosporioides* 5 ไอโซเลท *C. capsici* 1 ไอโซเลท มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 6.09 3.95 9.00 3.53 3.75 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ พบรา *C. capsici* 4 ไอโซเลท วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญ หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 8 เดือน รา *C. gloeosporioides* 4 ไอโซเลท รา *C. capsici* 1 ไอโซเลท มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 9.00 9.00 6.58 6.73 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ พบรา *C. gloeosporioides* 1 ไอโซ

เลท *C. capsici* 4 ไอโซเลท วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เนื่องจากเชื้อ ไม่เจริญ ราที่เจริญบนอาหาร PDA ทุกไอโซเลทเริ่มพบการสร้างกลุ่มโคนิเดียบนอาหารเมื่อเลี้ยงบนอาหารเป็นระยะเวลา 8 -10 วัน

จากการปลูกเชื้อลงบนพริกเพื่อดูความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรค พบว่า รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ทุกไอโซเลทที่นำมาปลูกเชื้อสามารถทำให้พริกเป็นโรคได้

การเก็บรักษาราในสภาพแห้งสุญญากาศหรือการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เป็นการทำให้น้ำระเหยไปจากสารแขวนลอยโคนิเดียของราที่เยือกแข็งแล้วในสภาพสุญญากาศ น้ำในเซลล์จะถูกดึงออกโดยการระเหิด โคนิเดียของราจะยังมีชีวิตอยู่ในสภาพแห้งและแข็ง การเก็บรักษาราวิธีนี้มีต้นทุนวัสดุอุปกรณ์สูง ขั้นตอนยุ่งยากซับซ้อนและต้องการผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญ แต่ข้อดีของวิธีนี้ก็คือ ไม่ต้องพะวงเรื่องการเปลี่ยนอาหาร เหมาะสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจำนวนมาก ประหยัดเนื้อที่ในการเก็บ สามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์ให้มีชีวิตรอดอยู่ได้นาน มีการปนเปื้อนน้อย เหมาะสมกับจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น รา แบคทีเรีย และยีสต์ (Malik, 1992) โดยเฉพาะราที่สร้างสปอร์จำนวนมาก เช่น *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. *Trichoderma* spp. *Colletotrichum* spp. *Fusarium* spp. (พัฒนา, 2547) แต่จากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อนำรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่เก็บรักษาไว้ในสภาพแห้งสุญญากาศเป็นเวลา 2 4 6 และ 8 เดือนออกมาเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่ามีบางไอโซเลทที่ไม่สามารถคงความมีชีวิตอยู่ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากรา *C. capsici* มีผนังเซลล์บางกว่ารา *C. gloeosporioides* จึงไม่สามารถทนต่อกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งได้ หรือหลอด ampoule ที่ใช้เก็บรักษาเชื้อราไม่อยู่ในสภาพสุญญากาศขณะทำการเก็บรักษา อาจเนื่องจากมีรอยรั่วเกิดขึ้นขณะลนปิดหลอด ampoule ทำให้หลอดและไม่ได้นำหลอด ampoule ไปทดสอบความเป็นสุญญากาศภายในหลอดโดยใช้ High Frequency Spark Tester ก่อนทำการเก็บรักษา

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาเทคนิคการเก็บรักษารา *Colletotrichum* spp. โดยทำการเก็บรักษารา *Colletotrichum gloeosporioides* และรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก รวมทั้งหมด 10 ไอโซเลท ด้วยวิธีการต่างๆ 6 วิธีคือ การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรอง การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจล การเก็บรักษาในน้ำมันพาราฟิน การเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาในสภาพแห้งสุญญากาศ เมื่อครบระยะการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 4 6 และ 8 เดือน นำราที่เก็บรักษาไว้มาตรวจความมีชีวิต การปนเปื้อน การสร้างโคนิเดียและความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรค พบว่า วิธีการเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรองและการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ดีที่สุดสำหรับรา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* 10 ไอโซเลทที่นำมาเก็บรักษา ราสามารถคงความมีชีวิตอยู่ได้ สร้างโคนิเดียได้ดี พบการปนเปื้อนน้อยที่สุด และจากการทดสอบความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรคพบว่ารา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ทุกไอโซเลทที่นำมาปลูกเชื้อยังสามารถทำให้พืชเกิดโรคได้ รองลงมาคือ การเก็บรักษาในน้ำ

กลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ การเก็บรักษาในสภาพแห้งสุญญากาศ การเก็บรักษาในน้ำมันพาราฟินและการเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจล ตามลำดับ ซึ่งในการเก็บรักษาราสาเหตุโรคพืชไม่มีวิธีใดวิธีเดียวที่เหมาะสมกับราสาเหตุโรคพืชทุกชนิด ในการเก็บรักษาจึงควรคำนึงถึงชนิดของราที่จะเก็บ วัตถุประสงค์ในการเก็บ ความพร้อมของเครื่องมือและอุปกรณ์รวมทั้งบุคลากรที่มีความชำนาญ และสิ่งสำคัญ คืองบประมาณที่ใช้ในการเก็บรักษา

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากการทดลองสามารถนำวิธีการไปปรับใช้เพื่อทำการเก็บรักษาสายพันธุ์ราสาเหตุโรคพืชสกุลอื่น สำหรับเก็บไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อประโยชน์ในการเป็นแหล่งเก็บรักษาและให้บริการสายพันธุ์ราแก่ นิสิต นักศึกษา หน่วยวิจัยของส่วนราชการอื่นๆ รวมทั้งบริษัทเอกชน

เอกสารอ้างอิง

พัฒนา สนธิรัตน. 2547. จุลินทรีย์และการเก็บรักษา. วารสารวิชาการเกษตร. 22: 80 – 89.

วิรัช ชูบำรุง, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และพัฒนา สนธิรัตน. 2528. *Colletotrichum* spp. ในประเทศไทย. *ใน* รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2528 กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. หน้า 128 - 140.

สุวลักษณ์ ชัยชูโชติ และประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน. 2545. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรมและเห็ดหูหนู. *ใน* เอกสารสรุปผลการดำเนินงาน ประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ปี 2545 วันที่ 16-18 กันยายน 2545 ณ โรงแรมภูพิมานรีสอร์ท จังหวัดนครราชสีมา. หน้า 8 - 9.

Fong, Y.K., S. Anuar, H.P. Lim, F.Y. Tham and F.R. Sanderson. 2000. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. Mycologist 14(3):128-131

Malik, K.A. 1992. Freeze-drying of microorganisms using a simple apparatus. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8:76-79

Smith, D. 1988. Culture and Preservation. *In* Filamentous Fungi, Living Resource Biotechnology, ed. D.L.Hawksworth and B.E. Kirsop, Cambridge University Press, UK. pp. 75-99.

Smith, D. and Onions, A.H.S. 1983. A Comparision of some preservation techniques for fungi. Transactions of the British Mycological Society. 81:535-540

Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. CMI. Kew Surrey, England. 695 p.