เทคนิคการเก็บรักษารา *Colletotrichum* spp.

Preservation Technique for *Colletotrichum* spp.

ธารทิพย ภาสบุตร อภิรัชต์ สมฤทธิ์
ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี พรพิมล อธิปัญญาคม
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเทคนิคการเก็บรักษารา *Colletotrichum* spp. ระหว่างเดือนตุลาคม 2551 ถึงเดือนกันยายน 2552 โดยทำการเก็บรักษารา *Colletotrichum gloeosporioides* และรา *C. capsici* รวมทั้งหมด 10 ไอโซเลท ด้วยวิธีการต่างๆ 4 วิธีคือ การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรอง การเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ สภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาในสภาพแห้งสุญญากาศและการเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจล หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 4 6 และ 8 เดือน นำราที่เก็บรักษาไว้มาตรวจความมีชีวิต การปนเปื้อน การสร้างโคนิเดีย และความสามารถของราในการทำให้พืชเกิดโรค พบว่า การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรอง และการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ สภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ดี รา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* สามารถคงความมีชีวิตอยู่ได้ สร้างโคนิเดียได้ดี และพบการปนเปื้อนน้อย จากการทดสอบความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรคพบว่ารา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ทุกไอโซเลทที่นำมาปลูกเชื้อสามารถทำให้พืชเป็นโรคได้

รหัสการทดลอง 09-02-49-02-01-07-02-51

คำนำ

การศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาราสาเหตุโรคพืชหรือราที่มีประโยชน์ทางการเกษตร มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการเก็บรักษาให้รามีชีวิตรอดอยู่ได้เป็นระยะเวลายาวนาน สามารถนำกลับมาใช้ได้ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย โดยยังคงความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์มีหลายวิธี แต่มีหลักการสำคัญ คือ การหยุดหรือลดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยควบคุมปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญ เช่น การจำกัด อากาศ อุณหภูมิ สารอาหารและน้ำ การเก็บรักษาจุลินทรีย์แต่ละวิธีต้องทำให้เชื้อยังมีชีวิตรอดอยู่มากที่สุด คงลักษณะเดิมมากที่สุด และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม การเก็บรักษารามีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของรา ที่นิยมปฏิบัติกันมีดังนี้ การเก็บโดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การเก็บภายใต้น้ำมันแร่หรือน้ำมันพาราฟิน การเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ การเก็บในสภาพแห้งเช่น เก็บในดิน เก็บในซิลิกาเจล เก็บบนกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ การเก็บในสภาพเย็นยิ่งยวด (cryopreservation) เช่น เก็บในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิ -156 องศาเซลเซียส หรือเก็บในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส การเก็บในสภาพแห้งสุญญากาศ (freeze-dry) (Smith and Onion, 1994)

ราสกุล *Colletotrichum* จัดเป็นราที่มีความสำคัญเพราะสามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิด สามารถเข้าทำลายได้เกือบทุกส่วนของพืช ตั้งแต่ต้นกล้า ใบ ก้านใบ ลำต้น ดอก ผล และมีพืชอาศัยกว้าง(วิรัช และคณะ, 2528) ราสกุล *Colletotrichum* มีหลายชนิด (species) เช่น *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนส (anthracnose) ของกุยช่าย พริก หอมหัวใหญ่หอมแดง มะม่วง องุ่น มะละกอ *C. capsici* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของ พริก ฝ้าย มะเขือยาว ปอกระเจา มะเขือเทศ *C. acutatum* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของสตรอเบอรี่ *C. circinans* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสหรือโรคใบเน่าของหอมหัวใหญ่ หอมแดง หอมแบ่ง กุยช่าย และ *C. falcatum* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของข้าวฟ่าง เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาวิธีการเก็บรักษารา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคพืชดังกล่าวจึงเป็นสิ่งจำเป็น ทั้งนี้เพื่อให้ทราบวิธีการเก็บรักษาที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม สามารถเก็บรักษาให้มีชีวิตรอดอยู่ได้เป็นระยะเวลายาวนาน สามารถนำกลับมาใช้ได้โดยยังคงความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อน เพื่อการนำไปศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *Colletotrichum* spp. ศึกษาคุณสมบัติต่างๆ เพิ่มเติม หรือศึกษาความสามารถในการก่อโรค ความรุนแรงของโรคและการทดสอบการป้องกันกำจัด นอกจากนี้การศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาราในครั้งนี้ยังทำให้ได้สายพันธุ์รา *Colletotrichum* spp. ไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อประโยชน์ในด้านเป็นแหล่งข้อมูลและ

แหล่งให้บริการสายพันธุ์ราแก่ นิสิต นักศึกษาจากสถาบันต่างๆ 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. ซิลิกาเจล (silica gel เกรด 40 ขนาด 6-12 mesh)
4. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส
5. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส
6. เครื่อง Freeze Dryer
7. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง กล้องถ่ายภาพและอุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการ

1. **การเลี้ยงราให้บริสุทธิ์โดยการทำสปอร์เดี่ยว** (Single spore technique)

เขี่ยกลุ่มโคนิเดียของราลงในหลอดแก้วที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้โคนิเดียกระจายตัวในน้ำ ตรวจสอบความหนาแน่นของสปอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ห่วงลวด (loop) ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคนิเดียแขวนลอยมาวางบนแผ่นแก้วสไลด์ ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (X100) ให้มีจำนวนโคนิเดียประมาณ 10 โคนิเดียต่อพื้นที่การมองเห็น (10 โคนิเดียต่อ low-power (X100) microscope field) หลังจากนั้นใช้ห่วงลวดที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในโคนิเดียแขวนลอยที่ทำไว้ นำมาลากเส้นลงบนผิวหน้าอาหาร WA บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตรวจการงอกของโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ โดยตรวจดูจากด้านใต้จานอาหาร เมื่อพบว่าโคนิเดียมีเส้นใยงอกออกมาและอยู่ห่างจากโคนิเดียอื่นๆ จึงใช้ปากกาเขียนแก้วทำจุดเครื่องหมายไว้ที่จานอาหาร จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเล็กที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วเจาะชิ้นวุ้นตรงตำแหน่งที่ทำเครื่องหมายไว้ ใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ใต้แสงฟลูออเรสเซนต์และแสง NUV ที่ตั้งเวลาเปิดแสง 12 ชั่วโมงสลับกับปิดแสง 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำ

ราที่ได้ไปศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อจำแนกชนิด (species) ตามเอกสารและวิธีการของ Sutton (1980) และ วิรัช (2528)

2. **การเก็บรักษารา** *Colletotrichum* spp.

การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ

เตรียมกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ โดยตัดกระดาษกรอง Whatman เบอร์1 ให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 2 x 0.5 เซ็นติเมตร ใส่กระดาษที่ตัดแล้วลงในจานแก้ว (Petri dish) หุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นเตรียม micro tubes โดยนำ micro tubes ใส่ในบิกเกอร์ที่รองด้วยกระดาษทิชชู ปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ ห่อด้วยถุงพลาสติกอีกชั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ เป็นเวลา 20 นาที

เลี้ยงรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่ต้องการเก็บรักษาบนอาหาร PDA เมื่อราอายุ 7 วัน ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยชิ้นวุ้นที่มีราเจริญอยู่ไปวางตรงกลางจานอาหาร PCA จากนั้นใช้ปากคีบ (forcep) ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วชิ้นคีบกระดาษกรองวางรอบๆชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่ ประมาณ 8 -10 ชิ้น นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไปไว้ใต้แสงหลอด NUV ที่ตั้งเวลาเปิดแสง 12 ชั่วโมง สลับกับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันหรือจนพบว่า ราสร้างเส้นใยคลุมชิ้นกระดาษกรองและมีการสร้างกลุ่มโคนิเดียบนกระดาษกรอง ใช้ปากคีบที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วลอกเฉพาะชิ้นกระดาษกรองที่มีราปกคลุมไปวางในจานแก้วเปล่าที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาจานแก้ว นำไปวางไว้ในโถดูดความชื้น (desiccators) ปล่อยให้กระดาษกรองแห้งเป็นเวลาประมาณ 2 วัน เมื่อกระดาษกรองแห้งสนิทแล้วใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบกระดาษกรองใส่ลงในหลอด micro tubes นำไปเก็บรักษาในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบการมีชีวิตและการสร้างโคนิเดียหลังทำการเก็บรักษา ทุก 2 4 6 และ8 เดือน โดยใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบกระดาษกรองย้ายจากหลอด micro tubes ที่เก็บรักษาไว้ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ

การเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ สภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

เตรียมกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ใส่ขวดแก้วขวดละ 4 มิลลิลิตร ปิดฝา แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้งที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยปลายเส้นใยของรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* บริสุทธิ์อายุ 7 วัน ที่เจริญอยู่บนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ วางลงในจานอาหาร PCA จากนั้น

นำไปไว้ใต้แสงฟลูออเรสเซนต์และแสง NUV ที่ตั้งเวลาเปิดแสง 12 ชั่วโมง สลับกับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หรือจนพบว่าราสร้างกลุ่มโคนิเดีย นำราที่เลี้ยงไว้มาเจาะเป็นชิ้นด้วย cork borer No.2 ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นย้ายชิ้นวุ้นที่เจาะแล้วใส่ลงใน cryotube ใส่กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้ลงใน cryotube จนท่วมชิ้นวุ้น นำไปเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบการมีชีวิตและการสร้างโคนิเดียหลังทำการเก็บรักษา ทุก 2 4 6 และ8 เดือน โดยนำหลอด cryotube ที่เก็บรักษาไว้ออกจากตู้แช่แข็ง ใช้ปากคีบจับหลอดแช่ในน้ำอุ่น 37± 2 องศาเซลเซียส แกว่งให้น้ำแข็งในหลอดละลายอย่างรวดเร็ว ใช้สำลีจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ดหลอด เปิดฝาหลอด 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 แล้วห่อด้วยกระดาษฟอยล์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

การเตรียม Suspending medium

Suspending medium หมายถึง ของเหลวที่ใช้ผสมกับเซลล์หรือโคนิเดียของจุลินทรีย์ก่อนนำไปเข้ากระบวนการทำให้แห้งในสภาพสุญญากาศ มีคุณสมบัติที่ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์หรือโคนิเดียแตกสลาย และของเหลวนั้นสามารถละลายกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ง่าย ในการศึกษานี้ใช้ 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 จากนั้นนำมาแชในน้ำเย็นทันที วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีซ้ำอีกครั้ง

ขั้นตอนการเก็บรักษา เลี้ยงราในหลอดอาหารวุ้นเอียง PCA ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์และแสง NUV ที่ตั้งเวลาเปิดแสง 12 ชั่วโมง สลับกับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 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 โดยใช้ตะไบเลื่อยกรีดรอบหลอด ampoule ที่เก็บรักษาไว้ให้เป็นรอย โดยกรีดบริเวณกึ่งกลางสำลี ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เช็ดตรงรอยกรีด ใช้ผ้าขาวบางหุ้มสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วหุ้มตรงรอยกรีดแล้วหักปลายหลอด เติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว PDB ลงในหลอด หลอดละประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 นาที ใช้ปิเปตดูดเชื้อขึ้นลงให้อาหารและเชื้อผสมกันดี ย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ

การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจล

นำเม็ดซิลิกาเจลใส่ขวดฝาเกลียวประมาณ 1/3 ของขวด นำเข้าตู้อบความร้อน (oven) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง

ละลาย skim milk 7 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียวขวดละ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นทันที วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ซ้ำอีกครั้ง ใช้ปิเปตนึ่งฆ่าเชื้อดูดสารละลายนม 3-5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดอาหารเอียงที่เลี้ยงรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* ใช้เข็มเขี่ยทำให้โคนิเดียหลุดกระจายออกมาอยู่ใน skim milk อย่างสม่ำเสมอ เอียงและเขย่าขวดให้เม็ดซิลิกาเจลกระจาย จากนั้นดูดสารแขวนลอยโคนิเดีย 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดซิลิกาเจลเขย่าขวดทันทีเพื่อให้สารแขวนลอยโคนิเดียกระจายทั่วเม็ดซิลิกาเจลวางขวดใน ice bath ทันทีเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อป้องกันความร้อนที่จะเกิดขึ้นในระหว่างที่เม็ดซิลิกาเจลดูดซับสารแขวนลอยโคนิเดียเข้าไป เก็บขวดเม็ดซิลิกาเจลที่ปิดฝาแน่นหนาแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

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

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2550

สิ้นสุด กันยายน 2553

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกรา *Colletotrichum* spp. จากพืชที่เป็นโรคและการเลี้ยงราให้บริสุทธิ์โดยการทำสปอร์เดี่ยว

ได้รา *Colletotrichum* spp. บริสุทธิ์เพื่อใช้ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษา 10 ไอโซเลท เป็นรา *C. gloeosporioides* 5 ไอโซเลท *C. capsici* 5 ไอโซเลท (Sutton, 1980; วิรัช 2528)

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

ทำการเก็บรักษารา *C. gloeosporioides* 5 ไอโซเลท และ *C. capsici* 5 ไอโซเลท รวม 10 ไอโซเลท ด้วยวิธีการเก็บรักษา 4 วิธี คือ การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรอง การเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ สภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาในสภาพแห้งสุญญากาศ และการเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจล จากนั้นตรวจสอบการมีชีวิตและการสร้างโคนิเดียหลังทำการเก็บรักษาทุก 2 4 6 และ 8 เดือน ผลที่ได้เป็นดังนี้

การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรอง

ผลการตรวจความมีชีวิตและการสร้างโคนิเดีย ของรา *C. gloeosporioides* หมายเลข DOAC1176 DOAC1793 DOAC1796 DOAC1800 DOAC1903 และรา *C. capsici* หมายเลข DOAC1206 DOAC1208 DOAC1511 DOAC1537 DOAC1569 หลังจากเก็บรักษาไว้ในสภาพแห้งบนกระดาษกรองเป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วตรวจวัดการเจริญของเส้นใย พบว่า มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 8.40 7.04 6.74 7.32 7.09 7.56 9.00 6.29 5.21และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ การวัดการเจริญของเส้นใยหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 4 เดือน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 7.24 7.59 5.43 7.55 5.00 7.39 9.00 4.66 5.00 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ การตรวจการเจริญของเส้นใย หลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 6 เดือน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 6.24 7.30 3.77 6.70 6.29 7.14 9.00 3.70 3.74 และ 0.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ การวัดการเจริญของเส้นใยหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 8 เดือน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 9.00 9.00 7.67 9.00 8.80 9.00 8.38 7.19 7.01 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ พบการสร้างกลุ่มโคนิเดียบนอาหารเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 -10 วัน (ตารางที่ 1)

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

การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรองเป็นหนึ่งในหลายวิธีที่ใช้เก็บรักษาราสาเหตุโรคพืช เป็นวิธีที่ง่าย ขั้นตอนวิธีการทำไม่ยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายน้อยและสะดวกต่อการนำกลับมาใช้งาน จากการศึกษาในครั้งนี้ รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่เก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 8 เดือน ยังคงความมีชีวิต สามารถสร้างโคนิเดียได้และพบการปนเปื้อนน้อย การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรอง แต่ละขั้นตอนในการปฏิบัติงานต้องทำอย่างรวดเร็วในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) และกระดาษกรองที่มีราเจริญอยู่ต้องแห้งสนิทก่อนนำไปเก็บรักษา เพราะจะมีผลต่อการมีชีวิตและการปนเปื้อนของเชื้อ 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)

การเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ สภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ผลการตรวจความมีชีวิตและการสร้างโคนิเดีย ของรา *C. gloeosporioides* หมายเลข DOAC1176 DOAC1793 DOAC1796 DOAC1800 DOAC1903 และรา *C. capsici* หมายเลข DOAC1206 DOAC1208 DOAC1511 DOAC1537 DOAC1569 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 9 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)

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

การเก็บรักษาในสภาพแห้งสุญญากาศหรือการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง

ผลการตรวจความมีชีวิตและการสร้างโคนิเดีย ของรา *C. gloeosporioides* หมายเลข DOAC1176 DOAC1793 DOAC1796 DOAC1800 DOAC1903 และรา *C. capsici* หมายเลข DOAC1206 DOAC1208 DOAC1511 DOAC1537 DOAC1569 หลังจากเก็บรักษาไว้ในสภาพแห้งสุญญากาศเป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วตรวจวัดการเจริญของเส้นใย พบว่า ราหมายเลข DOAC1176 DOAC1208 DOAC1793 DOAC1796 DOAC1800 DOAC1903 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 8.70 6.83 4.25 6.66 6.45 และ9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ ส่วนราหมายเลข DOAC1206 DOAC1511 DOAC1537 DOAC1569 หลังจากเก็บรักษาไว้ในสภาพแห้งสุญญากาศเป็นระยะเวลา 2 เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน ไม่สามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญ หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน ราหมายเลข DOAC1176 DOAC1208 DOAC1796 DOAC1800 DOAC1903 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 7.88 5.47 5.51 5.12 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ ส่วนราหมายเลข DOAC1206 DOAC1511 DOAC1537 DOAC1569 DOAC1793 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญ หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน ราหมายเลข DOAC1176 DOAC1208 DOAC1793 DOAC1796 DOAC1800 DOAC1903 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 6.09 3.95 9.00 3.53 3.75 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ ส่วนราหมายเลข DOAC1206 DOAC1511 DOAC1537 DOAC1569 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญ หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 8 เดือน ราหมายเลข DOAC1176 DOAC1208 DOAC1796 DOAC1800 DOAC1903 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 9.00 9.00 6.58 6.73 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ ส่วนราหมายเลข DOAC1206 DOAC1511 DOAC1537 DOAC1569 DOAC1793 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญ ราที่เจริญบนอาหาร PDA ทุกไอโซเลทเริ่มพบการสร้างกลุ่มโคนิเดียบนอาหารเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 -10 วัน (ตารางที่ 3)

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

การเก็บรักษาราในสภาพแห้งสุญญากาศหรือการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เป็นการทำให้น้ำระเหยไปจากสารแขวนลอยโคนิเดียของราที่เยือกแข็งแล้วในสภาพสุญญากาศ น้ำในเซลล์จะถูกดึงออกโดยการระเหิด โคนิเดียของราจะยังมีชีวิตอยู่ในสภาพแห้งและแข็ง การเก็บรักษาราวิธีนี้มีต้นทุนวัสดุอุปกรณ์สูง ขั้นตอนยุ่งยากซับซ้อนและต้องการผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญ แต่ข้อดี

ของวิธีนี้ก็คือ ไม่ต้องพะวงเรื่องการเปลี่ยนอาหาร เหมาะสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจำนวนมาก ประหยัดเนื้อที่ในการเก็บ สามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์ให้มีชีวิตรอดอยู่ได้นาน มีการปนเปื้อนน้อย เหมาะสมกับจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น รา แบคทีเรีย และยีสต์ (Malik, 1992) โดยเฉพาะราที่สร้างสปอร์จำนวนมาก เช่น *Aspergillus Penicillium Trichoderma Colletotrichum Fusarium* (พัฒนา, 2547) แต่จากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อนำรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่เก็บรักษาไว้ในสภาพแห้งสุญญากาศเป็นเวลา 2 4 6 และ 8 เดือนออกมาเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่ามีบางไอโซเลทที่ไม่คงความมีชีวิต ทั้งนี้อาจเกิดจากหลอด ampoule ไม่อยู่ในสภาพสุญญากาศขณะทำการเก็บรักษา เพราะลนปิดหลอด ampoule แล้วมีรอยรั่ว ผู้ทำการทดลองไม่ได้นำหลอด ampoule ไปทดสอบความเป็นสุญญากาศภายในหลอด โดยใช้ High Frequency Spark Tester ที่กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา ก่อนเก็บรักษา เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ราไม่สามารถคงความมีชีวิตอยู่ได้

การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจล

ผลการตรวจความมีชีวิต การสร้างโคนิเดีย ของรา *C. gloeosporioides* หมายเลข DOAC1176 DOAC1793 DOAC1796 DOAC1800 DOAC1903 และรา *C. capsici* หมายเลข DOAC1206 DOAC1208 DOAC1511 DOAC1537 DOAC1569 หลังจากเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจลเป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยการวัดการเจริญของเส้นใยเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* หมายเลข DOAC1176 DOAC1208 DOAC1793 DOAC1796 DOAC1800 DOAC1903 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 7.13 5.47 9.00 4.25 5.02 และ 9.00 เซ็นติเมตร ตามลำดับ ส่วนราหมายเลข DOAC1206 DOAC1511 DOAC1537 DOAC1569 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญ การวัดการเจริญของเส้นใยหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่า รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* หมายเลข DOAC1793 DOAC1903 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 2.48 และ 4.48 เซ็นติเมตร ตามลำดับ ส่วนราหมายเลข DOAC1176 DOAC1206 DOAC1208 DOAC1511 DOAC1537 DOAC1569 DOAC1796 DOAC1800 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญ การวัดการเจริญของเส้นใยรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* หมายเลข DOAC1208 DOAC1511 DOAC1903 หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 4.78 7.40 และ 8.78 เซ็นติเมตร ตามลำดับ ส่วนราหมายเลข DOAC1176 DOAC1206 DOAC1537 DOAC1569 DOAC1793 DOAC1796 DOAC1800 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญ (ตารางที่ 4)

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

จากการเก็บรักษาราในสภาพแห้งบนซิลิกาเจลครั้งนี้ พบว่า หลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 8 เดือน รา *C. gloeosporioides* และ รา *C. capsici* คงความมีชีวิตอยู่น้อย ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Smith และ Onions (1983) ที่รายงานไว้ว่า วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ในสภาพแห้งบนซิลิกาเจลสามารถเก็บรักษาราที่สร้างสปอร์ให้คงความมีชีวิตอยู่ได้นาน 8-11 ปี ขั้นตอนการทำง่าย มีค่าใช้จ่ายน้อย สะดวกในการนำกลับมาใช้ และไม่ต้องการเครื่องมือราคาแพง ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก ปริมาณสปอร์ของราที่นำมาเก็บรักษาน้อยเกินไป สารแขวนลอยโคนิเดียกระจายไม่ทั่วเม็ดซิลิกาเจล วางขวดใน ice bath ช้าเกินไป และเก็บขวดเม็ดซิลิกาเจลที่ปิดฝาแน่นหนาแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจจะเป็นอุณหภูมิที่สูงเกินไปสำหรับการเก็บรักษาขวดเม็ดซิลิกาเจล

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาเทคนิคการเก็บรักษารา *Colletotrichum* spp. ระหว่างเดือนตุลาคม 2551 ถึงเดือนกันยายน 2552 โดยทำการเก็บรักษารา *Colletotrichum gloeosporioides* และรา *C. capsici* รวมทั้งหมด 10 ไอโซเลท ด้วยวิธีการต่างๆ 4 วิธีคือ การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรอง การเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ สภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาในสภาพแห้งสุญญากาศ (freeze-drying) และการเก็บรักษาในสภาพแห้งบน silica gel หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 2 4 6 และ 8 เดือน นำราที่เก็บรักษาไว้มาตรวจความมีชีวิต การปนเปื้อน การสร้างโคนิเดีย และความสามารถของราในการทำให้พืชเกิดโรค พบว่า การเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรอง และการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ สภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ดี รา *C. gloeosporioides* และรา *C. capsici* สามารถคงความมีชีวิตอยู่ได้ สร้างโคนิเดียได้ดี พบการปนเปื้อนน้อย และจากการทดสอบความสามารถในการทำให้พืชเกิดโรคพบว่า รา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ทุกไอโซเลทที่นำมาปลูกเชื้อสามารถทำให้พริกเป็นโรคได้

เอกสารอ้างอิง

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

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

สุวลักษณ์ ชัยชูโชติ และประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน. 2545. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรม และเห็ดหูหนู. หน้า 8-9. *ใน* เอกสารสรุปผลการดำเนินงาน ประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ปี 2545. วันที่ 16-18 กันยายน 2545. ณ โรงแรมภูพิมานรีสอร์ท จ.นครราชสีมา.

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, pp. 75-99. Cambridge University Press, UK.

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.

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเส้นใย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยของเส้นใยราอายุ 7 วัน หลังการเก็บรักษาในสภาพแห้งบนกระดาษกรองเป็นเวลา 2 4 6 และ 8 เดือน

DOAC	เก็บรักษา 2 เดือน		เก็บรักษา 4 เดือน		เก็บรักษา 6 เดือน		เก็บรักษา 8 เดือน	
	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต
1176	8.40	100	7.24	90	6.24	100	9.00	100
1206	7.04	100	7.59	100	7.30	100	9.00	100
1208	6.74	100	5.43	100	3.77	100	7.67	100
1511	7.32	100	7.55	100	6.70	100	9.00	100
1537	7.09	100	5.00	80	6.29	100	8.80	100
1569	7.56	100	7.39	100	7.14	100	9.00	100
1793	9.00	100	9.00	100	9.00	100	8.38	100
1796	6.29	100	4.66	90	3.70	100	7.19	100
1800	5.21	100	5.00	100	3.74	100	7.01	100
1903	9.00	100	9.00	100	0.00	0	9.00	100

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเส้นใย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยของเส้นใยราอายุ 7 วัน หลังการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ สภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 6 และ 8 เดือน

	เก็บรักษา 2 เดือน		เก็บรักษา 4 เดือน		เก็บรักษา 6 เดือน		เก็บรักษา 8 เดือน	
DOAC	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต
1176	9.00	100	6.56	80	6.45	100	9.00	100
1206	8.03	100	8.36	100	6.99	100	7.96	100
1208	6.90	100	5.49	100	3.46	100	5.00	100
1511	8.21	100	8.10	100	6.70	100	7.96	80
1537	6.54	100	4.04	100	5.91	100	7.17	80
1569	7.27	100	6.54	100	6.78	100	7.85	100
1793	9.00	100	9.00	100	9.00	100	9.00	100
1796	6.17	100	5.26	90	3.43	100	4.96	100
1800	6.05	100	4.80	100	3.41	100	5.16	100
1903	9.00	100	9.00	100	9.00	100	9.00	100

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเส้นใย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยของเส้นใยราอายุ 7 วัน หลังการเก็บรักษาในสภาพแห้งสุญญากาศ เป็นเวลา 2 4 6 และ 8 เดือน

DOAC	เก็บรักษา 2 เดือน		เก็บรักษา 4 เดือน		เก็บรักษา 6 เดือน		เก็บรักษา 8 เดือน	
	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต
1176	8.70	100	7.88	100	6.09	100	9.00	100
1206	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0
1208	6.83	100	5.47	100	3.95	100	9.00	100
1511	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0
1537	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0
1569	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0
1793	4.25	80	0.00	0	9.00	80	0.00	0
1796	6.66	100	5.51	100	3.53	100	6.58	100
1800	6.45	100	5.12	100	3.75	100	6.73	100
1903	9.00	100	9.00	100	9.00	100	9.00	100

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเส้นใย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยของเส้นใยราอายุ 7 วัน หลังการเก็บรักษาในสภาพแห้งบนซิลิกาเจล เป็นเวลา 2 4 6 และ 8 เดือน

DOAC	เก็บรักษา 2 เดือน		เก็บรักษา 4 เดือน		เก็บรักษา 6 เดือน		เก็บรักษา 8 เดือน	
	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต	Ø โคโลนีเฉลี่ย (ซม.)	% มีชีวิต
1176	7.13	100	0.00	0	0.00	0	0.00	0
1206	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0
1208	5.47	90	0.00	0	4.78	60	0.00	0
1511	0.00	0	0.00	0	7.40	40	0.00	0
1537	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0
1569	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0
1793	9.00	100	2.48	40	0.00	0	0.00	0
1796	4.25	60	0.00	0	0.00	0	0.00	0
1800	5.02	100	0.00	0	0.00	0	0.00	0
1903	9.00	100	4.48	60	8.78	40	0.00	0