บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์

1.1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
1.2 หลอดทดลอง
1.3 ที่วางหลอดทดลอง
1.4 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 150 มิลลิลิตร
1.5 กระบอกตวง
1.6 บีกเกอร์
1.7 cork borer
1.8 ตะกียงแอลกอฮอล์
1.9 ช้อนตักสาร
1.10 ปากคีบ
1.11 นาฬิกาจับเวลา
1.12 เข็มเขี่ยเชื้อ
1.13 ห่วงถ่ายเชื้อ
1.14 สำลี
1.15 Paraffin film
1.16 กระดาษทิชชู
1.17 กระดาษกรอง Whatman No.1
1.18 กระดาษฟาง
1.19 สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์
1.20 hemacytometer
1.21 ถุงพลาสติก
1.22 ยางรัด
1.23 ไม้บรรทัด
1.24 มีดโกน
1.25 ผ้าขาวบาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.26 ปากกาเขียนแก้ว

1.27 stage micrometer

1.28 ocular micrometer

1.29 กรรไกร

1.30 กระถางพลาสติกดำ

1.31 ถาดหลุมเพาะกล้า

2. เครื่องมือ

2.1 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound micrometer) ยี่ห้อ Olympus

2.2 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo micrometer) ยี่ห้อ Olympus

2.3 เตาแก๊ส

2.4 ตู้ถ่ายเชื้อ

2.5 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ยี่ห้อ A11 American รุ่น 25X

2.6 เครื่องชั่งละเอียด (4 ตำแหน่ง) ยี่ห้อ A&D

2.7 ตู้อบ (hot air oven) ยี่ห้อ WTB binder

2.8 ตู้ไมโครเวฟ ยี่ห้อ Sharp

3. วัสดุ

3.1 มันฝรั่ง

3.2 เมล็ดมะเขือเทศ

3.3 ดินปลูก ตราไม้งาม

4. ตัวอย่างพืช

4.1 ต้นมะเขือเทศ จาก อ. เมือง อ. สารภี อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ อ.เมือง จ. ลำพูน และ อ. เทิง จ. เชียงราย

4.2 ต้นพริก จาก อ. เมือง อ. สารภี อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ อ.เมือง จ. ลำพูน และ อ. เทิง จ. เชียงราย

4.3 ต้นมะเขือพวง จาก อ. สารภี อ. แม่ริม อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ อ.เมือง จ. ลำพูน และ อ. เทิง จ. เชียงราย

5. สารเคมี

5.1 สารเคมีที่ใช้ในการแยกเชื้อรา

5.1.1 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10% (sodium hypochlorite, NaOCl) ชื่อการค้า Clorox 10%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.1.2 แอลกอฮอล์ 95% (ethanol 95%)

5.1.3 น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

5.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.2.1 Malt extract (Difco)

5.2.2 Rose bengal (Fluka)

5.2.3 Yeast extract (Difco)

5.2.4 Chloramphenical

5.2.5 Dextrose

6. อาหารที่ใช้สำหรับการแยกและเลี้ยงเชื้อรา

6.1 Potato dextrose agar (PDA)

6.2 Rose bengal agar (RBA)

วิธีการทดลอง

1. การแยกและจำแนกชนิดเชื้อราเอนโดไฟต์

1.1 การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization)

ทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวของส่วน กิ่ง ใบ และก้านใบ ของต้นมะเขือเทศ พริก และมะเขือพวง เพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. คัดเลือกต้นที่ไม่เป็นโรคมาล้างน้ำให้สะอาดก่อนทำการแยกเชื้อ
2. ตัดส่วนกิ่ง ใบ และก้านใบ ของพืชทั้ง 3 ชนิดขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที
3. แช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5% เป็นเวลา 1, 3 และ 5 นาที
4. แช่ในแอลกอฮอล์ 95% อีกครั้ง เป็นเวลา 30 วินาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษทิชชู่ที่ฆ่าเชื้อแล้ว
5. นำไปวางบนอาหาร rose bengal agar (RBA)
6. ตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากแต่ละชิ้นส่วนของพืช ที่เวลาและความเข้มข้นที่ต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 การเก็บตัวอย่างพืชและการแยกเชื้อ

สุ่มเก็บตัวอย่างต้นมะเขือเทศ พริก และมะเขือพวง ในเขต อ. เมือง อ. สารภี อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ อ.เมือง จ. ลำพูน และ อ. เทิง จ. เชียงราย นำมาทำการคัดเลือกและฆ่าเชื้อที่ผิวตามขั้นตอนในข้อ 1.1 โดยได้ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมสำหรับส่วนต่างๆของพืชทั้ง 3 ชนิด คือ ที่ความเข้มข้น 1 % เป็นเวลา 1 นาที นับจำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อเจริญออกมา เพื่อคำนวณหาค่า Isolate prevalence (Bussaban *et al.*, 2001) ดังสูตร

$$\text{Isolate prevalence} = \frac{\text{จำนวนของชิ้นพืชที่มีเอนโดไฟต์เจริญ}}{\text{จำนวนของชิ้นพืชที่วางทดสอบ}} \times 100$$

จากนั้นตัดบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราที่เจริญออกมาวางลงบนอาหาร PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และsub culture ไว้ในอาหารวุ้นเอียง (slant agar) ที่มีอาหาร PDA อยู่ เพื่อนำไปใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป

1.3 การจำแนกชนิดเชื้อราเอนโดไฟต์

1. ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โดยสังเกตลักษณะการเจริญ สีของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA
2. ตรวจดูลักษณะรูปร่าง สี ขนาด และโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้น
3. เปรียบเทียบลักษณะต่างๆ โดยจำแนกชนิดของเชื้อราในระดับ genus โดยใช้ key อธิบายใน Dematiaceous Hyphomycetes (Ellis, 1971), More Dematiaceous Hyphomycetes (Ellis, 1976), The Coelomycetes (Sutton, 1980) และ Illustrated Genera of Ascomycetes vol 2. (Handlin, 1998) เป็นต้น

2. การแยกเชื้อรา *Alternaria solani* สาเหตุโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ

นำใบมะเขือเทศที่แสดงอาการใบไหม้ มาล้างให้สะอาด ตัดส่วนที่เป็นโรคติดกับเนื้อเยื่อส่วนที่ดี แช่ใน Clorox 10% นาน 2–3 นาที จากนั้นนำไปวางบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อราเจริญนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เก็บไว้ใน PDA slant เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Alternaria solani*

นำเชื้อราเอนโดไฟต์ที่จำแนกแต่ละชนิดแล้วมาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *A. solani* ทำการทดสอบโดยวิธี Dual Culture โดยวางเชื้อราสาเหตุกับเชื้อราเอนโดไฟต์บนอาหาร PDA วางห่างกัน 5 เซนติเมตร โดยวางเชื้อราที่เจริญช้าก่อน แล้วจึงวางเชื้อที่เจริญเร็วในเวลาถัดมา วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยเชื้อราเอนโดไฟต์แต่ละชนิด ทำการทดลอง 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลโดยวัดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุด้านที่ติดกับเชื้อราเอนโดไฟต์ในชุดทดสอบ และวัดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อเชื้อรา *A. solani* (ภาพที่ 1)

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (Percent Inhibition of Radial Growth: PIRG)

$$PIRG = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria solani* ในชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria solani* ในชุดทดสอบ

นำค่าที่ได้มาประเมินความสามารถในการยับยั้งได้ดังนี้ (เกษม, 2532)

>75% = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก

61-75% = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง

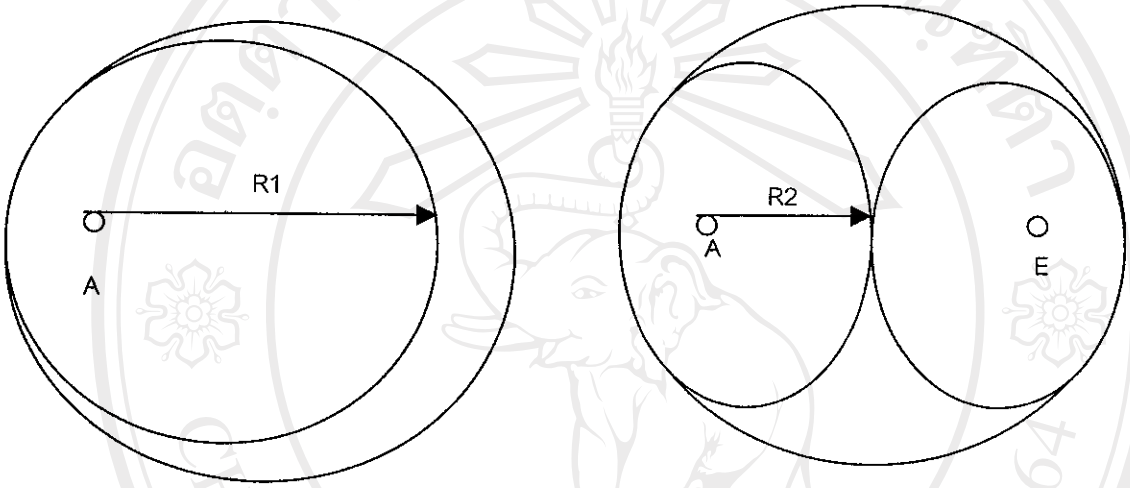
51-60% = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง

<51% = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

4. การตรวจหาเชื้อรา *Alternaria solani* บนเมล็ดมะเขือเทศและความงอก

นำเมล็ดมะเขือเทศมาทำการตรวจหาเชื้อรา *A. solani* ที่ติดมากับเมล็ดโดยใช้เมล็ดมะเขือเทศพันธุ์ VF 413 นำมาตรวจสอบโดยวิธี Blotter Method โดยใช้กระดาษฟางจำนวน 2 แผ่นซ้อนกับกระดาษกรอง Whatman No. 1 จำนวน 1 แผ่นวางซ้อนกัน จุ่มในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ววางลงในจานอาหาร ทำทั้งหมด 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด โดยวางจานละ 25 เมล็ด บ่มไว้ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูเชื้อรา *A. solani* ที่เจริญขึ้นบนเมล็ดและตรวจหาเปอร์เซ็นต์ความงอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ชุดควบคุม ชุดทดสอบ

A = เชื้อราสาเหตุ *Alternaria solani*

E = เชื้อราเอนโดไฟต์ (endophyte)

R1 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria solani* ในชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria solani* ในชุดทดสอบ

ภาพที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Alternaria solani* โดยวิธี Dual Culture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การทดสอบผลของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ

5.1 การเตรียม suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์

เอนโดไฟต์ที่ใช้มี 4 ชนิด ได้แก่ *Fusarium* sp. No. 158, *Xylaria* sp. No. 381, *Xylaria* sp. No. 393 และ *Virgaria* sp. No. 467 เตรียม suspension โดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเทลงในจานอาหาร 10 มิลลิลิตร ใช้ loop ขูดเส้นใยกรองด้วยผ้าขาวบาง ปรับ suspension ให้ได้ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/ มิลลิลิตร

5.2 การทดสอบผลของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการงอกของเมล็ด

นำเมล็ดมะเขือเทศที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วมาแช่ใน suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่เตรียมได้จากข้อ 5.1 โดยแบ่งเป็น 5 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 แช่ด้วย *Fusarium* sp. No. 158

กรรมวิธีที่ 2 แช่ด้วย *Xylaria* sp. No. 381

กรรมวิธีที่ 3 แช่ด้วย *Xylaria* sp. No. 393

กรรมวิธีที่ 4 แช่ด้วย *Virgaria* sp. No. 467

กรรมวิธีที่ 5 แช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

โดยแช่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผึ่งให้แห้ง แบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ชุด โดยชุดแรกนำไปวางบนกระดาษชื้นในจานอาหาร กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด โดยวางจานละ 25 เมล็ด ส่วนชุดที่ 2 นำไปเพาะในถาดหลุมเพาะกล้ากรรมวิธีละ 100 เมล็ด กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ เพื่อตรวจดูว่าเอนโดไฟต์มีผลต่อการงอกของเมล็ดหรือไม่ และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป หลังจากเพาะแล้ว 7 วัน ตรวจดู หาเปอร์เซ็นต์ความงอก และดูว่าต้นที่เจริญขึ้นมานั้นมีความผิดปกติหรือไม่

6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศในโรงเรือน

6.1 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคโดยการแช่เมล็ด

นำต้นกล้าที่ได้จากการแช่เมล็ดในข้อ 5.2 ทั้ง 5 กรรมวิธี มาย้ายปลูกลงในกระถางพลาสติก เมื่อต้นมะเขือเทศมีอายุได้ประมาณ 25 วัน โดยปลูกกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 กระถาง ซึ่งการทดลองนี้แบ่งเป็น 10 กรรมวิธี ได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 1 แช่ด้วย *Fusarium* sp. No. 158 + พ่นเชื้อรา *A. solani*
กรรมวิธีที่ 2 แช่ด้วย *Xylaria* sp. No. 381 + พ่นเชื้อรา *A. solani*
กรรมวิธีที่ 3 แช่ด้วย *Xylaria* sp. No. 393 + พ่นเชื้อรา *A. solani*
กรรมวิธีที่ 4 แช่ด้วย *Virgaria* sp. No. 467 + พ่นเชื้อรา *A. solani*
กรรมวิธีที่ 5 แช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม) + พ่นเชื้อรา *A. solani*
กรรมวิธีที่ 6 แช่ด้วย *Fusarium* sp. No. 158 + พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ
กรรมวิธีที่ 7 แช่ด้วย *Xylaria* sp. No. 381 + พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ
กรรมวิธีที่ 8 แช่ด้วย *Xylaria* sp. No. 393 + พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ
กรรมวิธีที่ 9 แช่ด้วย *Virgaria* sp. No. 467 + พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ
กรรมวิธีที่ 10 แช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม) + พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

6.1.1 การชักนำให้ *Alternaria solani* สร้างสปอร์และการเตรียม suspension

นำเชื้อ *A. solani* นำมาขูดเส้นใยที่ผิวอาหารด้วยปลายสไลด์แก้ว จากนั้นนำไปล้างเอาเส้นใยที่ค้างอยู่ออก (Dhingra and Sinclair, 1995) แล้วนำมาวางคว่ำซ้อนกัน ในสภาพห้องปฏิบัติการ หลังจากนั้น 2 วัน ตรวจดูการสร้างสปอร์ เตรียม suspension โดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเทลงในจานอาหาร 10 มิลลิลิตร ใช้ loop ขูดเส้นใยกรองด้วยผ้าขาวบาง ปรับ suspension ให้ได้ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/ มิลลิลิตร

6.1.2 การปลูกเชื้อสาเหตุ

ปลูกเชื้อโดยใช้ suspension ของเชื้อรา *A. solani* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/ มิลลิลิตร โดยปลูกเชื้อ 2 สัปดาห์หลังจากการย้ายปลูก ทำการพ่นลงบนต้นพืชโดยใช้ที่ฉีดพ่นละอองฝอยด้วยมือ (Foggy) โดยฉีดห่างต้นประมาณ 1 ฟุต ให้ทั่วทั้งต้น ใช้ถุงพลาสติกคลุมเพื่อรักษาความชื้น ทิ้งไว้ 2 วันจึงเปิดถุงออก บันทึกผลการทดลอง โดยสังเกตอาการของโรคและประเมินความรุนแรงของโรค ที่ 7 วัน หลังการปลูกเชื้อ

6.1.3 การประเมินความรุนแรงของโรค

ใช้เกณฑ์การประเมินโรคโดยอ้างอิงจากสืบศักดิ์ (2540) โดยแบ่งความรุนแรงของโรคเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระดับ 0 ต้นมะเขือเทศไม่มีอาการใบจุดเลย

ระดับ 1 ต้นมะเขือเทศมีอาการใบจุด 1 – 25% ของพื้นที่ใบที่สุ่ม

ระดับ 2 ต้นมะเขือเทศมีอาการใบจุด 26 – 50% ของพื้นที่ใบที่สุ่ม

ระดับ 3 ต้นมะเขือเทศมีอาการใบจุด 51 – 75% ของพื้นที่ใบที่สุ่ม

ระดับ 4 ต้นมะเขือเทศมีอาการใบจุด 76 – 100% ของพื้นที่ใบที่สุ่ม

นำผลที่ได้จากการประเมินมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ใบเป็นโรคและเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลาย มีสูตรดังนี้ คือ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ใบเป็นโรค} = \frac{\text{จำนวนใบที่เป็นโรค}}{\text{จำนวนใบทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลาย} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่ม}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของการเป็นโรค}}$$

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

6.2 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคโดยการฉีดพ่น

นำเมล็ดมะเขือเทศที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วปลูกในถาดหลุมเพาะกล้า จากนั้นย้ายปลูกลงในกระถางพลาสติกดำเมื่อต้นมะเขือเทศมีอายุได้ 25 วัน โดยปลูกกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 กระถาง การทดลองแบ่งเป็น 10 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วย *Fusarium* sp. No. 158 + พ่นเชื้อรา *A. solani*

กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วย *Xylaria* sp. No. 381 + พ่นเชื้อรา *A. solani*

กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วย *Xylaria* sp. No. 393 + พ่นเชื้อรา *A. solani*

กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วย *Virgaria* sp. No. 467 + พ่นเชื้อรา *A. solani*

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม) + พ่นเชื้อรา *A. solani*

กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วย *Fusarium* sp. No. 158 + พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วย *Xylaria* sp. No. 381 + พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย *Xylaria* sp. No. 393 + พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

กรรมวิธีที่ 9 พ่นด้วย *Virgaria* sp. No. 467 + พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

กรรมวิธีที่ 10 พ่นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม) + พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใช้ suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/ มิลลิลิตร พ่นเอนโดไฟต์ทุกๆ 7วัน โดยใช้ Foggy พ่นให้ทั่วทั้งต้น ใช้ถุงพลาสติกคลุมทิ้งไว้ 2 วันจึงเปิดถุงออก พ่นเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อย้ายปลูกได้ 2 สัปดาห์ จึงปลูกเชื้อ *A. solani* ตาม หลังจากนั้น 7 วันตรวจดูอาการของโรคและประเมินความรุนแรงของโรคตามข้อ 6.1.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved