บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

1. การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105

นำเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และเชื้อราอื่นๆ ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1999)

สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาจำนวนหนึ่ง นำไปเพาะบนกระดาษชื้น โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จำนวน 1 แผ่น วางบนกระดาษฟางขนาดเท่ากันจำนวน 3 แผ่น นำไปจุ่มน้ำกลั่นให้ชุ่ม แล้ววางบนจานเลี้ยงเชื้อ (Petri-dish) (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร) นำเมล็ดข้าววางในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ จำนวน 20 เมล็ด/ 1 จานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด นำเมล็ดที่เพาะนี้ไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm2^{\circ}C$) เป็นเวลานาน 7 วัน จากนั้นนำมาตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดภายใต้กล้อง Stereo microscope ทำการจำแนกชนิดของเชื้อราแต่ละชนิดภายใต้กล้อง Compound microscope

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Fusarium moniliforme*

ทำการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *F. moniliforme* โดยการปลูกเชื้อบนเมล็ด (seed inoculation) ด้วยสารแขวนลอย สปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *F. moniliforme* ที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยเลี้ยงเชื้อ *F. moniliforme* บริสุทธิ์ บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน เท น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรลงไปในจานอาหาร แล้วใช้แผ่นสไลด์ที่ลนไฟฆ่าเชื้อขูดสปอร์ที่เจริญบนอาหารมากรองด้วยผ้าขาวบางพับ 2 ชั้น ที่รองรับด้วยบีกเกอร์ แล้วนำไปนับจำนวนเส้นใยด้วย haemacytometer โดยปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้อยู่ในช่วงประมาณ $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ spores/ml. เมื่อได้ความเข้มข้นตามต้องการแล้ว นำเมล็ดข้าวมาแช่ใน 0.1% sodium hyperchlorite นาน 2-3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำเมล็ดที่ได้ไปแช่ในสปอร์แขวนลอยที่เตรียมไว้โดยแช่เมล็ดไว้นานประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดมาซับด้วยกระดาษกรองที่สะอาดแล้วผึ่งให้แห้งนาน 12 ชั่วโมง แบ่งเมล็ดออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำเมล็ดไปเพาะบนกระดาษชื้นและส่วนที่สองนำไปเพาะในดินฆ่าเชื้อ โดยเพาะเมล็ดชนิดละ 400 เมล็ด ซึ่งแบ่งเป็น 4 ซ้ำ ๆ 100 เมล็ด ตรวจผลเปอร์เซ็นต์ความงอก การติดเชื้อของเมล็ดและต้นกล้าผิดปกติจากการเพาะบนกระดาษชื้น เปอร์เซ็นต์ความงอกในแปลงและต้นกล้าผิดปกติจากการเพาะในดินอบฆ่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทดสอบเบื้องต้นในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราต่าง ๆ ต่อเชื้อรา *Fusarium moniliforme*

3.1 การแยกหาเชื้อราปฏิปักษ์จากเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105

นำเมล็ดข้าวมาทำการแยกเชื้อราที่เจริญอยู่บนเมล็ด โดยวางเมล็ดบนกระดาษชื้น จำนวน 20 เมล็ด/1 จานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด นำเมล็ดที่เพาะนี้ไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2°C) เป็นเวลานาน 7 วัน จากนั้นนำมาตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดภายใต้กล้อง Stereo microscope ทำการจำแนกชนิดของเชื้อราแต่ละชนิดภายใต้กล้อง Compound microscope จากนั้นจึงนำเชื้อราที่แยกได้แต่ละชนิดมาเก็บบนอาหาร PDA slant

3.2 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* บนอาหาร PDA โดยวิธี dual culture

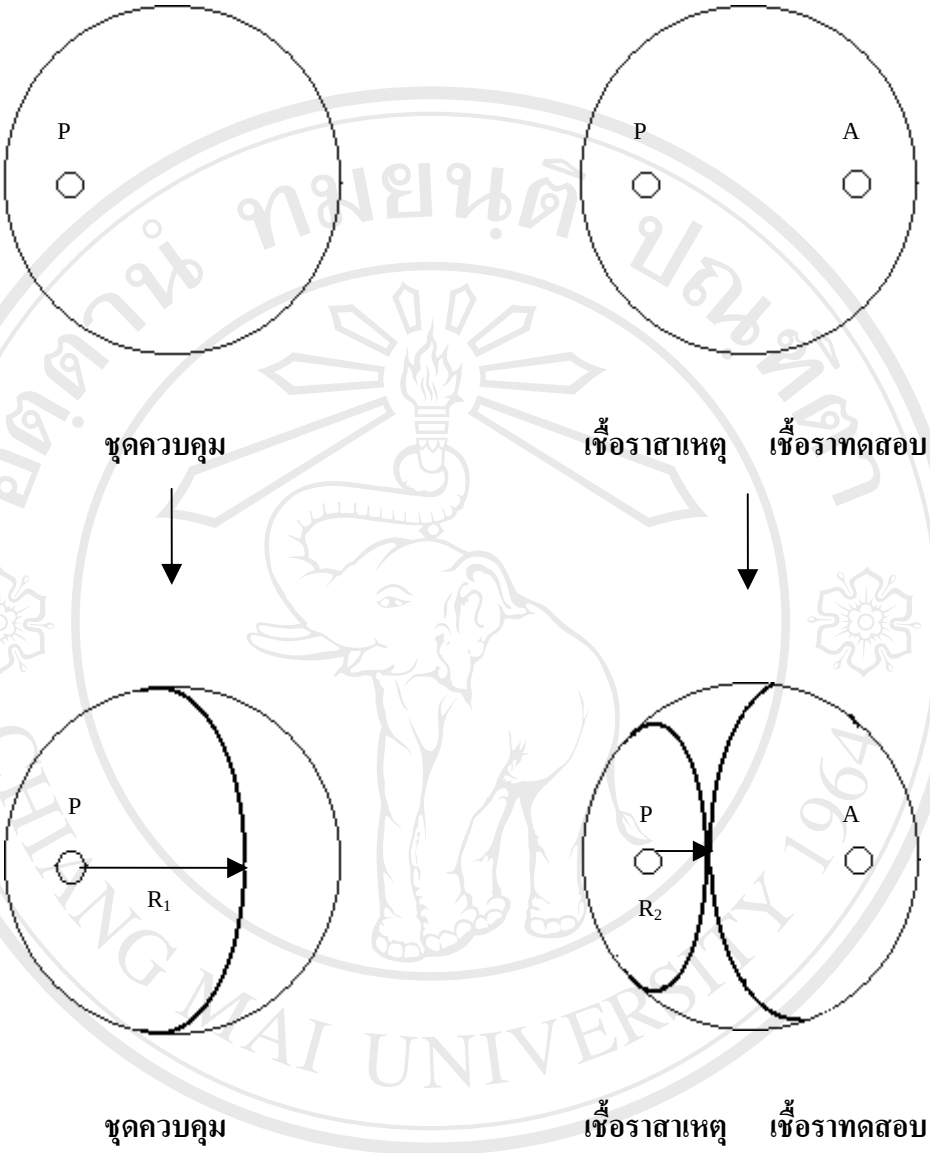
นำเชื้อรา *F. moniliforme* และเชื้อราจาก stock culture มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณบนอาหาร PDA จากนั้นจึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบนอก โคโลนีของเชื้อรา *F. moniliforme* แล้วนำไปวางลงในจานอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบของจานอาหาร 2 เซนติเมตร จากนั้นจึงวางเชื้อราทดสอบลงไปอีกด้านหนึ่งของจานอาหาร ให้ห่างจากขอบของจานอาหาร 2 เซนติเมตร โดยทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ จากนั้นจึงนำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บันทึกการเจริญของเชื้อราสาเหตุ โดยวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุด้านที่เจริญไปทางเชื้อราทดสอบ และวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุจากชุดควบคุม (ภาพ 3) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรัศมีการเจริญ (Percent inhibition rate growth หรือ PIRG) ของเชื้อสาเหตุจากสูตร

$$PIRG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} x\,100$$

โดย R_1 คือ รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุในจานชุดควบคุม

R_2 คือ รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุด้านที่เจริญไปทางเชื้อราทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



P = เชื้อราสาเหตุ

A = เชื้อราทดสอบ

R_1 = รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุในจานชุดควบคุม

R_2 = รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุด้านที่เจริญไปทางเชื้อราทดสอบ

ภาพ 3 การวางเชื้อราทดสอบและรัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยวิธี dual culture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

> 75%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (very high antagonists activity)
61 – 75%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง (high antagonists activity)
51 – 60%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (moderate antagonists activity)
< 50%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ (low antagonists activity)

3.3 การศึกษาผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการเข้าทำลายเมล็ด ความงอกเมล็ด และเปอร์เซ็นต์การเกิด โรคถอดฝักดาบโดยการเพาะบนกระดาษชื้นและในดินอบฆ่าเชื้อ

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.2 มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหาร PDA จากนั้นนำมาทำ spore suspension วัดความเข้มข้นโดยใช้ haemacytometer ให้ได้ความเข้มข้น 10^6-10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำ spore suspension ของเชื้อรา *F. moniliforme* ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับ spore suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์แต่ละชนิดปริมาตรเท่ากัน นำเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิที่ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ 0.1% sodium hyperchlorite นาน 5 นาที ผึ่งเมล็ดให้แห้ง แล้วนำเมล็ดไปแช่ใน spore suspension ของเชื้อรา *F. moniliforme* ที่ผสมกับเชื้อราปฏิปักษ์แต่ละชนิดนาน 2 ชั่วโมง ผึ่งเมล็ดให้แห้ง จากนั้นแบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วน นำเมล็ดพันธุ์ที่เตรียมไว้แต่ละส่วนไปเพาะบนกระดาษชื้นและเพาะในดินฆ่าเชื้อ กรรมวิธีละ 400 เมล็ด ตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *F. moniliforme* บนเมล็ดที่เพาะบนกระดาษชื้น ความงอกของเมล็ดในจานทดลอง และความงอกในแปลง ต้นกล้าผิดปกติ ความยาวลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง จากการเพาะเมล็ดในดินอบฆ่าเชื้อ 28 วัน

กรรมวิธีในการทดลองที่ 3.3

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อ)
กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อ)
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อ + เชื้อราที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด ลำดับที่ 1
กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อ + เชื้อราที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด ลำดับที่ 2
กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อ + เชื้อราที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด ลำดับที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยต่อการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และผลต่อความงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้า

4.1 ศึกษาผลต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* บนอาหาร PDA ผสมน้ำมันหอมระเหย

นำน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิดคือ กานพลู (clove) และอบเชย (cinnamon) มาผสมกับอาหาร PDA โดยใช้ micropipette ดูดน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดปริมาตร 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครลิตร ผสมในอาหาร PDA ปริมาตร 100มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 ppm ส่วนน้ำมันหอมระเหย อีก 3 ชนิดคือ เจอร์ราเนียม (geranium) ลาเวนเดอร์ (lavender) มาร์จอแรม (marjoram) ใช้ micropipette ดูดน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดปริมาตร 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 ไมโครลิตร ผสมในอาหาร PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 500, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500 และ 5,000 ppm เทส่วนผสมลงในจานอาหาร จานละ 20 มิลลิลิตร โดยทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ แล้วย้ายชิ้นวุ้นของเชื้อรา *F. moniliforme* ลงตรงกลางจานอาหาร บันทึกผลขนาดโคโลนีของเชื้อราอายุ 10 วันของทุกซ้ำ นำผลที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้สูตร

$$\text{การยับยั้ง (\%)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดทดลอง}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

จากนั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแต่ละซ้ำ นำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Completely Random Design

4.2 การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อการงอก การเจริญเติบโต การเกิดโรคในระยะต้นกล้า

นำน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดไปทำ suspension โดยใช้ความเข้มข้นจากการทดลองที่ 4.1นำ suspension ของน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมกับ spore suspension ของเชื้อรา *F. moniliforme* ปริมาตรเท่ากัน นำเมล็ดข้าวไปแช่ใน suspension นาน 2 ชั่วโมง แล้วผึ่งเมล็ดให้แห้ง แบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน ส่วนที่ 1 นำไปเพาะบนกระดาษชื้น กรรมวิธีละ 400 เมล็ด จากนั้นทำการตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *F. moniliforme* บนเมล็ดที่เพาะบนกระดาษชื้น ความงอกของเมล็ดในจานทดลอง และในส่วนที่ 2 ทำการตรวจหาความงอกโผล่พ้นดิน ต้นกล้าปกติ ความยาวลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งจากการเพาะเมล็ดในดินอบฆ่าเชื้อ 28 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีในการทดลองที่ 4.2

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อ)

กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อ)

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อ + น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่ำสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด ลำดับที่ 1

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อ + น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่ำสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด ลำดับที่ 2

กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อ + น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่ำสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด ลำดับที่ 3

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายไคโตซานต่อการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และผลต่อความงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้า

5.1 การศึกษาผลต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคถอดฝักดาบ บนอาหาร PDA ผสมสารละลายไคโตซาน

นำไคโตซานจากบริษัท กรีนพลาน่า จำกัด ความเข้มข้น 3 % ใช้ pipette ดูดสารละลายไคโตซานปริมาตร 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0, 22.5 และ 25.0 มิลลิลิตร ผสมในอาหาร PDA ปริมาตร 147.5, 145.0, 142.5, 140.0, 137.5, 135.0, 132.5, 130.0, 127.5 และ 125.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะได้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500 และ 5,000 ppm เทส่วนผสมลงในจานอาหาร จานละ 20 มิลลิลิตร โดยทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ แล้วย้ายชิ้นวุ้นของเชื้อรา *F. moniliforme* วางลงตรงกลางจานอาหารโดยทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ บันทึกผลขนาดโคโลนีของเชื้อราอายุ 10 วันของทุกซ้ำ นำผลที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้สูตร

$$\text{การยับยั้ง (\%)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดทดลอง}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

จากนั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแต่ละซ้ำ นำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี Completely Random Design

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การศึกษาผลต่อการงอก การเจริญเติบโต การเกิดโรคในระยะต้นกล้า

นำสารละลายไคโตซานไปทำ suspension โดยใช้ความเข้มข้นจากการทดลองที่ 5.1 นำ suspension ของไคโตซานปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมกับ spore suspension ของเชื้อรา *F. moniliforme* ปริมาตรเท่ากัน นำเมล็ดข้าวไปแช่ใน suspension นาน 2 ชั่วโมง แล้วผึ่งเมล็ดให้แห้ง แบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน ส่วนแรกนำไปเพาะบนกระดาษชื้น กรรมวิธีละ 400 เมล็ด จากนั้นทำการตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *F. moniliforme* บนเมล็ดที่เพาะบนกระดาษชื้น ความงอกของเมล็ดในจานทดลอง และในส่วนที่ 2 ทำการตรวจหาความงอกในแปลง ต้นกล้าผิดปกติ ความยาวลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งจากการเพาะเมล็ดในดินอบฆ่าเชื้อ 28 วัน

กรรมวิธีในการทดลองที่ 5.2

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อ)
กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อ)
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อ + ไคโตซานที่ความเข้มข้นต่ำสุด
โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด ลำดับที่ 1

6. การตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีทางชีวเคมี

นำเมล็ดข้าวมาแช่ในน้ำมันหอมระเหยจากพืช 3 ชนิด และไคโตซานโดยใช้ความเข้มข้นจากการทดลองที่ 4.1 และ 5.1 ตามลำดับ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นผึ่งเมล็ดไว้ 1 คืน จึงนำมาทดสอบโดยวิธี biochemical test for seed viability แบ่งเมล็ดเป็น 2 ชุด ชุดแรกตรวจบันทึกผลโดยการแกะเปลือกออก จากนั้นนำเมล็ดมาแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปแช่ในสารละลาย 2,3,5-triphenyl tetrazolium cloride ที่ pH 6.5-7.5 เข้มข้น 0.1 % เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45 °C จากนั้นนำมาแช่ในน้ำกลั่นแล้วทำการตรวจปันทึกผล ส่วนที่ 2 เก็บเมล็ดไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน แล้วตรวจบันทึกผลเช่นเดียวกัน นำผลของทั้ง 2 ชุดมาเปรียบเทียบกัน วิธีการตรวจบันทึกผล ดูการติดสีย้อม 2/3 ส่วนของ embryo โดยเมื่อเมล็ดมีชีวิตจะติดสีย้อมเป็นสีแดงบริเวณของ embryo

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved