บทที่ 3

อุปกรณ์วิธีการ

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคของพืชตระกูลกะหล่ำ

การแยกเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำ

เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคเน่าดำ สังเกตจากบริเวณขอบใบจะปรากฏแผลสีเหลืองลุกลามเข้ามาในเนื้อใบเป็นรูปตัววี (v-shape) และเส้นใบในบริเวณนี้จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ นำมาล้างน้ำไหล ผึ่งให้แห้ง ฆ่าเชื้อที่ผิวใบด้วยแอลกอฮอร์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นตัดชิ้นพืชตรงบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อปกติและบริเวณที่เป็นโรคเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 3×3 ตารางเซนติเมตร วางในหยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อบนสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยขยี้ชิ้นพืชให้ละเอียด ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แยกเชื้อด้วยการ streak เชื้อบนอาหาร Nutrient Agar (NA) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แยกเชื้อสาเหตุให้บริสุทธิ์โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีสีเหลืองลักษณะกลมนูน ขอบเรียบเยิ้ม ผิวเป็นมัน มา streak plate บนอาหาร NA อีกครั้ง

การแยกเชื้อ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดออลเทอนาเรีย

เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคลักษณะเป็นจุดแผลเนื้อเยื่อตายสีน้ำตาลซ้อนกันเป็นวง มีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบแผล มาแยกเชื้อด้วยวิธีแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation) โดยนำใบบริเวณที่เป็นแผลของโรคมาตรวจภายใต้กล้อง stereoscopic microscope ใช้ loop ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยกลุ่มสปอร์บริเวณแผลลงบน slide ตรวจดูบริเวณที่โคนิเดีย (conidia) มีการกระจายตัวมากที่สุดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100 เท่าจากนั้นใช้ capillary ที่ทำให้บริเวณปลายเป็นปมขนาดเล็ก (knob) แตะเชื้อสาเหตุมา 1 โคนิเดีย ย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร PDA จำนวน 4 จุด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเพิ่มปริมาณเชื้อเพื่อให้ทดสอบต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การแยกเชื้อ *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวฟิวซาเรียม

เก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรคเหี่ยวฟิวซาเรียม โดยอาการจะแสดงจากใบส่วนล่างเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและก้านใบเหี่ยวลู่ลงดิน มาล้างน้ำไหล ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอร์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นบ่มเชื้อในกล่อง moist chamber เมื่อพบการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุ ใช้เข็มเขี่ยฆ่าเชื้อ ย้ายเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Hyphal tip ตัดบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อ *F. oxysporum* ซึ่งสร้างเม็ดสี (pigment) บริเวณใต้จานอาหารเป็นสีม่วง มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ใหม่

การแยกเชื้อ *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคเน่าคอดิน

เก็บต้นกล้าพืชที่แสดงอาการของโรค โดยบริเวณโคนต้นจะพบแผลฉ่ำน้ำ สีซีด พืชที่ถูกเข้าทำลายอาจล้มหรือไม่ล้มก็ได้ นำมาล้างน้ำไหล ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอร์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นบ่มเชื้อในกล่อง moist chamber เมื่อพบการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุ เป็นสีขาวฟู บริเวณแผล ใช้เข็มเขี่ยลนไฟฆ่าเชื้อ ย้ายเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยใช้ cork borer เจาะบริเวณขอบโคโลนี (colony) ใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นเชื้อ (culture disc) ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity)

เตรียมต้นกล้าคะน้า อายุ 1 เดือน ในกระถางเพาะกล้า เพื่อทดสอบความสามารถในการเกิดโรคดังนี้

เชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำ

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรีย (bacterial suspension) ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ฉีดพ่นสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียให้ทั่วบนใบคะน้า คลุมถุงพลาสติก เพื่อรักษาความชื้น บ่มเชื้อเป็นเวลา 1 ถึง 2 สัปดาห์ เมื่อพบอาการให้เอาถุงพลาสติกออก ตรวจบันทึกอาการของโรค

เชื้อ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดออลเทอนาเรีย

หลังจากเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในจานอาหาร 10 มิลลิลิตร ใช้เข็มเขี่ยฆ่าเชื้อขูดบริเวณผิวหน้าอาหาร กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกเส้นใยที่ติดมาออก จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์มานับจำนวนสปอร์ด้วย Haemacytometer ปลูกเชื้อโดยวิธีฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงบนใบกล้าคะน้า คลุมด้วยถุงพลาสติก เพื่อรักษาความชื้น เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นเอาถุงพลาสติกออก ตรวจบันทึกอาการของโรค

เชื้อ *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวฟิวซาเรียม และเชื้อ *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคเน่าคอดิน

หลังจากเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน ย้ายเชื้อมาเลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 200 กรัม เป็นเวลา 7 วัน จึงนำเชื้อที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างมาคลุกดินในอัตรา 20 กรัมต่อดินนึ่งฆ่าเชื้อ 1000 กรัม ย้ายกล้าคะน้าลงปลูก คลุมด้วยถุงพลาสติก เพื่อรักษาความชื้น เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นเอาถุงพลาสติกออก ตรวจบันทึกอาการเกิดโรค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ทำการทดลอง ได้แก่ สารสกัดกานพลู ขมิ้น ชา และพริก สารสกัดกานพลูผลิตจากบริษัท ศรีสำอางค์ จำกัด สารสกัดขมิ้นและพริกสกัดจากองค์การเภสัชกรรม และชา เป็นใบชาแห้งที่บดแบบหยาบ ได้จากโครงการวิจัยของสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว) โดยมีการเตรียมสารสกัดดังนี้

สารสกัดกานพลู อยู่ในรูปของเหลว สามารถละลายได้ดีในน้ำ การเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ดูดสารสกัดปริมาตร 3 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 97 มิลลิลิตร เขย่าให้น้ำมันกานพลูแตกตัวเข้ากับน้ำ

สารสกัดพริก เนื้อสารมีสีแดงเข้มลักษณะหนืด การเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ชั่งสารน้ำหนัก 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายจนเข้ากัน

สารสกัดขมิ้น เนื้อสารมีสีเหลืองลักษณะหนืด ไม่สามารถละลายในน้ำได้ การเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ชั่งสารน้ำหนัก 3 กรัม ละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร คนให้ละลายจนเข้ากัน พักไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป จากนั้นค่อยๆ เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วกรองเอาน้ำมันออกด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman no.1)

ชา อยู่ในรูปของใบชาแห้งบดแบบหยาบ เตรียมสารสกัดด้วยการชั่งใบชาน้ำหนัก 50 กรัม แช่ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคั้นเอาน้ำด้วยผ้าขาวบาง จะได้น้ำคั้นจากใบชาแห้งบด การเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ดูดสารสกัดปริมาตร 3 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 97 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

เก็บรักษาสารสกัดที่เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ให้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที และควรเขย่าทุกครั้งก่อนนำมาใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การทดสอบผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชตระกูลกะหล่ำในสภาพห้องปฏิบัติการ

การทดลองแบ่งเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช และกลุ่มเชื้อราสาเหตุโรคพืช ทดสอบด้วยวิธี soaking method โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และลดความเข้มข้นลงทุกๆ 2 เท่า (two-fold dilution) คือ 3 1.5 0.75 0.38 0.19 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น จนกระทั่งพบช่วงความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ และคำนวนหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ

จากนั้นนำช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมาหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ทดสอบด้วยวิธี soaking method โดยลดความเข้มข้นภายในช่วงความเข้มข้นที่คัดเลือกลงทุกๆ 4 เท่า (four-fold dilution) และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด ทดสอบกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ จนกระทั่งได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เท่ากับหรือมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ดัดแปลงตามวิธีการของ Moreira *et al.* (2005) และ Bajpai *et al.* (2006)

กลุ่มที่ 1 เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

ทดสอบด้วยวิธีการนับโคโลนี (Colony Counting Method) โดยแช่สารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรีย ที่ความเข้มข้น 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้ว spread plate บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ จากนั้นตรวจนับจำนวน colony ของเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนสารสกัด คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ และคัดเลือกช่วงความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ จากนั้นหาค่า MIC ด้วยการแช่สารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียในสารสกัดด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีชุดควบคุม - จำนวนโคโลนีชุดทดสอบ}}{\text{จำนวนโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่มที่ 2 เชื้อราสาเหตุโรคพืช

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การคัดเลือกสารสกัดจากพืชสมุนไพรและการหาค่า MIC

นำชิ้นเชื้อ (culture disc) ของเชื้อ *Alternaria brassicicola*, *Fusarium oxysporum* และ *Pythium aphanidermatum* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน 5 วัน และ 3 วัน ตามลำดับ นำ culture disc ขนาด 3 มิลลิเมตร ของเชื้อแต่ละชนิด แช่ในสารสกัดจากพืชสมุนไพรกานพลู ขมิ้น ชา และพริก เป็นเวลา 10 นาที จึงย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด ทดสอบกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ตรวจวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเชื้อ *A. brassicicola* ทุก 3 5 7 10 และ 15 วัน เชื้อ *F. oxysporum* ทุก 2 3 4 และ 5 วัน และเชื้อ *P. aphanidermatum* ที่ 1 2 และ 3 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนสารสกัด คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ คัดเลือกช่วงความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด และนำช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมาหาค่า MIC ด้วยการแช่ culture disc ของเชื้อราในสารสกัดด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ} = \frac{\text{ขนาดโคโลนีชุดควบคุม} - \text{ขนาดโคโลนีชุดทดสอบ}}{\text{ขนาดโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบเลี้ยงเชื้อสาเหตุบนอาหารผสมสารสกัดจากพืชสมุนไพร (Poisonous Agar)

เมื่อได้ค่า MIC ของสารสกัดแต่ละชนิดในขั้นตอนที่ 1 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุรวมถึงความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นกับเส้นใยหรือสปอร์ จึงนำสารสกัดที่คัดเลือกได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MIC ผสมในอาหาร PDA วาง culture disc ของเชื้อบริเวณกลางจานอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด ตรวจวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเชื้อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนสารสกัด คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ บันทึกภาพและลักษณะการเจริญของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนที่ 3 การทดสอบผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อความงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุ

ทดสอบด้วยวิธีแช่สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อสาเหตุในสารสกัดจากพืชสมุนไพรระดับความเข้มข้นที่ค่า MIC เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยดบนอาหาร WA ในชุด slide culture ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดความงอกของสปอร์ และลักษณะการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนสารสกัด คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งความงอกของสปอร์

5. การทดสอบความเป็นพิษ (phytotoxic) ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบนต้นกล้าพืชตระกูลกะหล่ำ

เมื่อคัดเลือกสารสกัดจากพืชสมุนไพรและได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้เท่ากับหรือมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (MIC) แล้ว นำสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นสูงสุดตามค่า MIC มาทดสอบความเป็นพิษกับพืช โดยแบ่งเป็นกรรมวิธีการพ่นสำหรับเชื้อที่อยู่ในอากาศ และราดบริเวณโคนต้นกล้าสำหรับเชื้อที่อาศัยอยู่ในดิน ใช้พืชตระกูลกะหล่ำที่มีอายุ 1 เดือน สังเกตอาการไหม้ที่ปรากฏบนใบและต้นพืช หากไม่ปรากฏอาการใดๆ บนต้นกล้า จัดว่าสารสกัดชนิดนั้นไม่แสดงความเป็นพิษต่อพืช สามารถนำไปใช้ทดสอบในสภาพโรงเรือนได้

6. การทดสอบผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรความเข้มข้นสูงสุดที่มีต่อความงอกของเมล็ด

หลังจากทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดแต่ละชนิดต่อต้นพืชแล้ว นำสารสกัดที่ไม่แสดงความเป็นพิษที่ความเข้มข้นสูงสุดตามค่า MIC มาทดสอบผลที่มีต่อความงอกของเมล็ด โดยแช่เมล็ดคะน้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย Clorox 1% เป็นเวลา 3 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นแช่ในสารสกัดแต่ละชนิดความเข้มข้นสูงสุดตามค่า MIC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผึ่งเมล็ดให้แห้งโดยวางบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อ จากนั้นเพาะบนกระดาษชื้น (blotter method) ทำกรรมวิธีละ 100 เมล็ด ตรวจดูเปอร์เซ็นต์ความงอกและลักษณะการงอกเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

7. การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรในการควบคุมการเกิดโรคบนต้นกล้าคะน้า

หลังจากที่ได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เท่ากับหรือมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (MIC) แล้ว นำสารสกัดความเข้มข้นที่ค่าดังกล่าวมาทดสอบเพื่อดูผลของสารสกัดต่อการควบคุมการเกิดโรคบนต้นกล้าคะน้า โดยนำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย Clorox 1% เป็นเวลา 3 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นแช่ในสารแขวนลอยของเชื้อสาเหตุแต่ละชนิดที่ผสมกับสารสกัดความเข้มข้นที่ค่า MIC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพาะเมล็ดคะน้าบนดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ รดน้ำตามปกติ ตรวจนับจำนวนต้นกล้าที่แสดงอาการของโรคเน่าดำ โรคใบจุดออลเทอนาเรีย โรคเหี่ยวฟิวซาเรียม และโรคเน่าคอดิน เมื่อต้นกล้าอายุ 7 ถึง 14 วัน

8. การเปรียบเทียบสารเคมีควบคุมโรคพืชและสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการควบคุมเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตระกูลกะหล่ำในสภาพห้องปฏิบัติการ

8.1 การทดสอบเลี้ยงเชื้อสาเหตุบนอาหารผสมสารเคมีควบคุมโรคพืช

สารเคมีควบคุมโรคพืชที่ใช้ในการทดลองมี 4 ชนิด ได้แก่ copper oxychloride (Cupravit), iprodione (Rovral), carbendazim (Carbenzin 50) และ metalaxyl+mancozeb (Ridomil Gold) ทดสอบกับเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris, A. brassicicola, F. oxysporum* และ *P. aphanidermatum* ตามลำดับ ใช้ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำ

ชื่อสามัญ	ชื่อการค้า	สารออกฤทธิ์
1. copper oxychloride	Cupravit	dicopper chloride trihydroxide 84% WP
2. iprodione	Rovral	3-(3,5-dichlorophenyl)-N-isopropyl-2,4-dioxo-imidazolidine-1-carboxamide 75% WG
3. carbendazim	Carbenzin 50	mythyl benzimidazole-2-ylcarbamate 50% WP
4. metalaxyl+mancozeb	Ridomil Gold	methyl N-(2-methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-DL-alaninate 8% manganese ethylenebis (dithiocarbrmate) polymeric complex with zinc salt 64% total 72% WP

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อัตราแนะนำและวิธีการคำนวณสารเคมีควบคุมโรคพืชแต่ละชนิดแสดงในภาคผนวก นำ stock solution ของสารเคมีควบคุมโรคพืชแต่ละชนิดผสมในอาหาร PDA และ NA ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าให้เข้ากันแล้วจึงเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ

นำสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียของเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* เข้มข้น 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มา spread plate บนจานอาหาร NA ผสมสารคอปเปอร์ ออกซิคลอไรด์ (copper oxychloride) ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนสารเคมีควบคุมโรคพืช และคำนวนเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ

หลังจากเลี้ยงเชื้อ *A. brassicicola, F. oxysporum* และ *P. aphanidermatum* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 5 และ 3 วัน นำ culture disc ขนาด 3 มิลลิเมตร ของเชื้อแต่ละชนิด ย้ายเลี้ยงบนอาหาร PDA ผสมสารไอโพรไดโอน (iprodione) คาร์เบนดาซิม (carbendazim) และเมทาแลกซิลผสมแมนโคเซ็บ (metalaxyl+mancozeb) ตามลำดับ ตรวจวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเชื้อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนสารเคมีควบคุมโรคพืช และคำนวนหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ

8.2 การทดสอบเลี้ยงเชื้อสาเหตุบนอาหารผสมสารสกัดจากพืชสมุนไพร

สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่คัดเลือกได้จากกรรมวิธีที่ 3 จะถูกนำมาผสมกับอาหาร PDA และ NA ที่เตรียมแบบลดน้ำ (ภาคผนวก) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ค่า MIC ของสารสกัดแต่ละชนิด เขย่าให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วจึงเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรามาเลี้ยงบนจานอาหารผสมสารสกัดตามวิธีการข้างต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. การทดสอบศักยภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการควบคุมโรคพืชตระกูลกะหล่ำเปรียบเทียบสารเคมีควบคุมโรคพืชในสภาพโรงเรือน

จากผลการทดสอบในสภาพห้องปฏิบัติการ นำสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่คัดเลือกว่ามีศักยภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชตระกูลกะหล่ำแต่ละชนิด ความเข้มข้นที่ค่า MIC มาทดสอบศักยภาพในการควบคุมโรคในระดับแปลงปลูก เปรียบเทียบกับสารเคมีควบคุมโรคพืช โดยเตรียมต้นกล้าพืชตระกูลกะหล่ำอายุ 3 สัปดาห์ ปลูกเชื้อด้วยวิธีการดังนี้

ปลูกเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* และ *A. brassicicola* โดยการพ่นสารแขวนลอยของเชื้อลงบนใบพืช คลุมแปลงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ความชื้น จากนั้นจึงพ่นสารสกัดและสารเคมีควบคุมโรคพืช สังเกตอาการของโรคทุกวัน พ่นสารซ้ำในวันที่ 3 หลังจากพ่นครั้งแรก และพ่นอีกเมื่อพบว่าอาการของโรคเริ่มลุกลาม

ปลูกเชื้อ *F. oxysporum* และ *P. aphanidermatum* โดยเลี้ยงเชื้อบนเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อเจริญ โรยบริเวณร่องตรงกลางระหว่างต้นกล้าในแปลง กลบดินและรดน้ำให้ชุ่ม บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงราดสารสกัดและสารเคมีควบคุมโรคพืช ในปริมาตรที่เท่ากัน สังเกตอาการของโรคทุกวัน ราดสารซ้ำในวันที่ 3 หลังจากราดครั้งแรกและราดอีกเมื่อพบว่าอาการของโรคเริ่มลุกลาม

ตรวจบันทึกอาการของโรค วัดดัชนีการเกิดโรค เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลาย และจำนวนต้นที่เป็นโรค เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเปรียบเทียบกับสารเคมีควบคุมโรคพืช วางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD)

ดัชนีการเกิดโรคแบ่งเป็น 5 ระดับ ได้แก่ (เกษม, 2532)

0 = ไม่เกิดโรค 1 = พื้นที่ใบถูกเข้าทำลาย 1-25 เปอร์เซ็นต์

2 = พื้นที่ใบถูกเข้าทำลาย 26-50 เปอร์เซ็นต์ 3 = พื้นที่ใบถูกเข้าทำลาย 51-75 เปอร์เซ็นต์

4 = พื้นที่ใบถูกเข้าทำลาย 76-100 เปอร์เซ็นต์

$$\% \text{ ดัชนีการเข้าทำลาย} = \frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่ม}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของการเป็นโรค}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved