บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกและจำแนกชนิดของแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์

1.1 การเก็บตัวอย่างพืช (sample collection)

สุ่มเก็บตัวอย่างต้นข้าวพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ หอมมะลิ105 กข6 ข้าวเหนียวสันป่าตอง สุพรรณบุรี 60 ปทุมธานี 1 ข้าวเหนียวอุบล 1 เหมยนอง ข้าวเหนียวข้าว ข้าวไร่ขาวเม็ดมอญ KMST จากสถานีวิจัยการเกษตรเขตชลประทาน แปลงปลูกข้าวของเกษตรกรเขตอำเภอสะเมิง อำเภอสันป่าตอง อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ และแปลงปลูกพืชภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 15 ตัวอย่างๆ ละ 5 ซ้ำ โดยเลือกเก็บเฉพาะต้นที่ปกติ (ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลง หรือแสดงอาการของโรค)

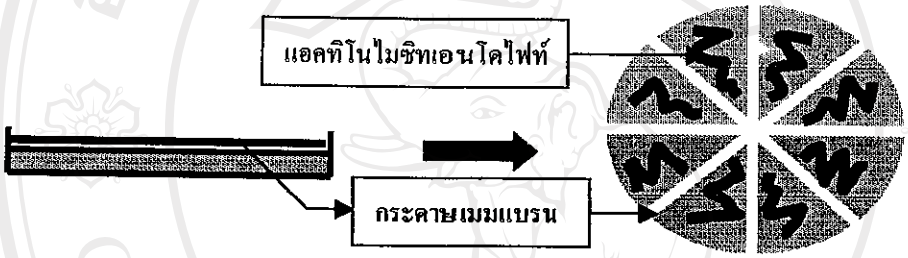
1.2 การฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) และการแยกเชื้อ (isolation) (Shimizu *et al*., 2000)

1. นำตัวอย่างใบ ลำต้น และรากของต้นข้าวมาล้างให้สะอาด แล้วแช่ในน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผึ่งลมให้แห้ง
2. ใช้กรรไกรตัดใบ ลำต้น และรากของต้นข้าวเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร
3. นำชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และสุดท้ายในน้ำผสม Heritage (อัตราส่วนน้ำ 1000 มิลลิลิตรต่อ heritage 3 กรัม) เป็นเวลา 1 นาที
4. ซับน้ำให้แห้งโดยนำชิ้นพืชวางบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
5. วางชิ้นพืชในจานอาหาร IMA-2 ที่ผสมสารแอนติไบโอติก คือ amphotericin B, riphampin - viccillin และ heritage จำนวน 15 ชิ้น ต่อ 1 จานอาหาร
6. บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และการเก็บเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ (Shimizu *et al.*, 2000)

ใช้เข็มเขี่ยๆ เชื้อเอนโดไฟต์ที่คาดว่าจะเป็นเชื้อแอคทิโนไมซิทที่เจริญขึ้นมาบนชิ้นพืช มาขีดลงบนอาหาร IMA-2 โดยที่ผิวหน้าของอาหารวางแผ่นเซลลูโลส (cellulose membrane filters) ที่มีขนาดรูเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร (ภาพที่ 1) จากนั้นนำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3- 5 วัน เมื่อเปิดแผ่นเซลลูโลสออก หากเชื้อจุลินทรีย์นั้นเป็นเชื้อแอคทิโนไมซิทจะพบเชื้อนั้นเจริญรอดผ่านแผ่นเมมแบรนมาที่ผิวอาหารได้ จากนั้นจึงเก็บเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ที่ได้เป็น stock culture โดยเก็บเชื้อในหลอดอาหาร IMA-2 บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3- 5 วัน แล้วเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



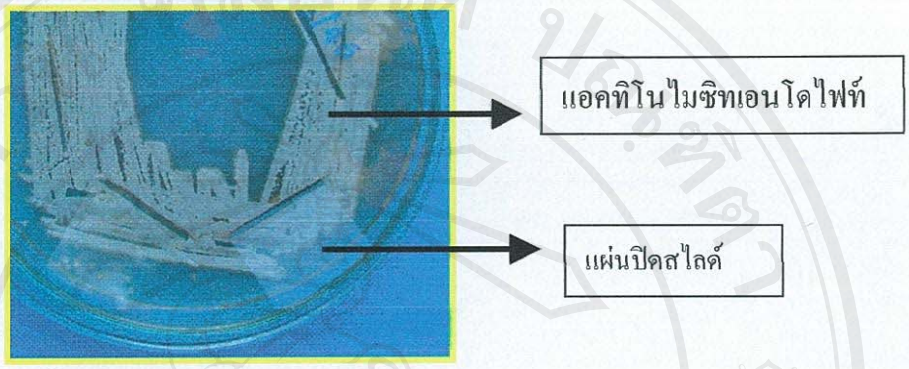
ภาพที่ 1 การขีดลงบนอาหาร IMA-2 ที่ผิวหน้าของอาหารวางแผ่นเซลลูโลส (cellulose membrane filters)

1.4 การจำแนกชนิดของแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Williums *et al.*, 1989)

นำเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ที่แยกได้มาเลี้ยงให้ได้โคโลนีแยกเดี่ยว ๆ บนอาหาร IMA-2 โดยวิธี streak plate แล้วปักแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่มีรอย streak ทำมุมประมาณ 45 องศากับผิวหน้าอาหาร (ภาพที่ 2) จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 -7 วัน สังเกตลักษณะโคโลนีโดยดูสีของ aerial mycelium, substrate mycelium และโครงสร้างอื่น ๆ ที่เชื้อสร้างขึ้น จากนั้นนำแผ่นปิดสไลด์ที่มีเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์เจริญติดอยู่ไปวางบนแผ่นสไลด์ที่หยดด้วย lactophenol ผสม cotton blue ตรวจดูลักษณะของ mycelium และการสร้างสปอร์ที่เชื้อสร้างขึ้นที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยเปรียบเทียบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
(Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะต่างๆ ตามเอกสารของ Miyadoh (1997) และ Stanley *et al.* (1989) เพื่อจำแนกชนิดเบื้องต้น



ภาพที่ 2 การทำ slide culture เพื่อตรวจลักษณะเส้นใยและการสร้างสปอร์ของราแป้ง

1.5 การตั้งชื่อไอโซเลทของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ที่แยกได้

นำเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของต้นข้าวมาตั้งชื่อไอโซเลท โดยตั้งตามอักษรชื่อสายพันธ์ของต้นข้าวเป็นภาษาอังกฤษ ดังต่อไปนี้

ข้าวพันธุ์เหมยนอง	ทำการตั้งชื่อไอโซเลทโดยใช้อักษร	MN
ข้าวพันธุ์ KMST	ทำการตั้งชื่อไอโซเลทโดยใช้อักษร	KMST
ข้าวพันธุ์ข้าวเหนียวขาว	ทำการตั้งชื่อไอโซเลทโดยใช้อักษร	WSR
ข้าวพันธุ์ข้าวเหนียวสันป่าตอง	ทำการตั้งชื่อไอโซเลทโดยใช้อักษร	SPT
ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105	ทำการตั้งชื่อไอโซเลทโดยใช้อักษร	WM

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

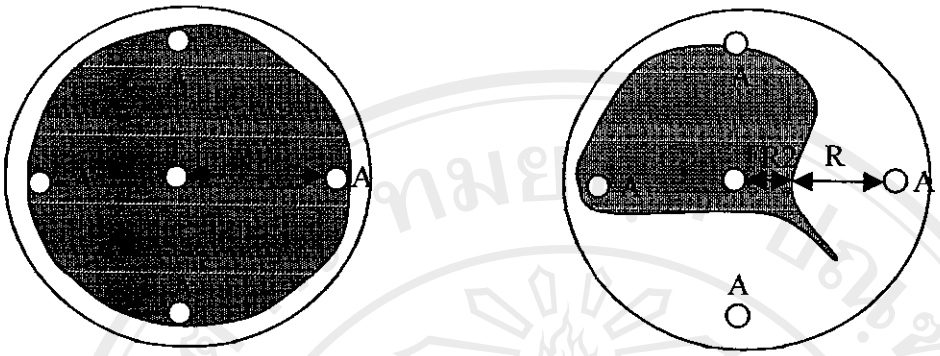
2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (ดัดแปลงจากวิธีการของ Shimizu *et al.*, 2000)

นำแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นข้าวมาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชชนิดต่างๆ ได้แก่

1. เชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว
2. เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของส้ม
3. เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* สาเหตุโรครากเน่าของพืชตระกูลแตง
4. เชื้อรา *Phytophthora infestans* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริก
5. เชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคกาบใบไหม้ของข้าว

ทำการทดสอบโดยวิธีการ Dual Culture โดยวางเชื้อราสาเหตุโรคตรงกลางและวางเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 แต่ละด้าน โดยวางห่างกัน 2 เซนติเมตร (ภาพที่ 3)ในการวางจะทำการวางเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ก่อนเป็นเวลา 3 วันเพื่อให้เชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์เจริญเป็นโคโลนีที่สมบูรณ์และสร้างสาร antibiotic แล้วจึงวางเชื้อราสาเหตุโรคตามวางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) โดย 4 ซ้ำ ในการทดสอบเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์แต่ละชนิด และในชุดควบคุมทำการวางเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกว่าเชื้อราที่ใช้ทดสอบในกลุ่มควบคุมจะเจริญเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อสังเกตุบันทึกผลการเจริญของเชื้อราสาเหตุ โดยวัดขนาดความกว้างระหว่างขอบของโคโลนีเชื้อราสาเหตุกับขอบโคโลนีของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ชุดควบคุม ชุดทดสอบ

ภาพที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชและเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Dual Culture (A = Endophytic Actinomycetes, F = plant pathogenic fungi, R = clear zone)

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth: PIRG)

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

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

> 75 เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก
61-75 เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
51-60 เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
< 50 เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์

ในการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์นั้นทำการทดสอบเฉพาะเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ที่ให้ผลในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวดีที่สุด 3 ไอโซเลท คือ MN2 KMST3 และ WM105

3.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์บนอาหาร IMA-2 จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆกันได้แก่ 30, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์และทำการเปรียบเทียบระหว่างอุณหภูมิ

3.2 การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ (pH) ที่เหมาะสมกับการเจริญ (Shimizu *et al.*, 2000)

เลี้ยงเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว GY medium (ภาคผนวก ก) ในหลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร โดยอาหารเหลวแต่ละหลอดมีค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ กันตั้งแต่ pH4 ถึง 9 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 - 5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์และทำการเปรียบเทียบระหว่างอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ

3.3 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (ยุพเรศ, 2542)

เตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ก) จากนั้นถ่ายเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารนั้น โดยวิธี spot inoculation นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อครบกำหนด นำสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ก) มาเทบนอาหารเพื่อเป็นการย้อมสี เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเททิ้ง วัดขนาดรัศมีของวงใสที่เกิดขึ้นบริเวณรอบๆเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้

3.4 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (ยุพเรศ, 2542)

เตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก ก) จากนั้นถ่ายเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารนั้น โดยวิธี spot inoculation นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อครบกำหนด นำสารละลาย Congo red 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (ภาคผนวก ก) มาเทบนอาหารเพื่อเป็นการย้อมสี เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเททิ้ง จากนั้นล้างด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 กรัมโมล จนสามารถเห็นวงใส วัดขนาดรัศมีของ วงใสที่เกิดขึ้นบริเวณรอบๆเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM, scanning electron microscope)

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์บนอาหาร IMA-2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์มีการเจริญเติบโตเต็มที่และสร้างสปอร์ที่สมบูรณ์ จากนั้นนำเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ส่งไปที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อทำการเตรียมตัวอย่างสำหรับการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดังนี้

1. ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อแอคทิโนไมซิทเจริญอยู่ ขนาดประมาณ 5 x 5 มิลลิเมตร จำนวน 3 - 4 ชิ้นต่อเชื้อตัวอย่าง
2. ทำการรักษาสภาพ (fixing) โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ของ specimen โดยแช่ใน Glutaraldyhyde 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เจือจางด้วย 0.1 M phosphate buffer
3. ล้างออกด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7.2
4. ทำการรักษาสภาพ (fixing) อีกครั้งโดยการแช่ในสารละลาย Osmium tetroxide 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เจือจางด้วย 0.1 M phosphate buffer
5. ล้างออกด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7.2
6. ทำการไล่น้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยการแทนที่น้ำด้วยแอลกอฮอล์
7. ทำให้แห้ง (drying) ด้วยการรม specimen ด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
8. เคลือบด้วยอนุภาคทองหนา 30 นาโนเมตร

นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL รุ่น JSM-840A) พร้องทั้งบันทึกภาพลักษณะของเชื้อแอคทิโนไมซิท คือ ลักษณะสปอร์และรูปแบบการสร้างสปอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การทดสอบผลของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ต่อการเจริญของกล้าข้าวในโรงเรือน

5.1 การเตรียมดินปลูก

เตรียมดินปลูก โดยการนำดินมาบรรจุถุงแล้วนำไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นบรรจุลงในกระบะขนาด 10x12x4.5 นิ้ว โดยบรรจุดินประมาณครึ่งกระบะ จากนั้นราดน้ำให้ชุ่ม เพื่อนำเมล็ดมาปลูกต่อไป

5.2 การเตรียม suspension ของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์

เตรียม suspension ของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ เชื้อที่ให้ผลในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวดีที่สุดซึ่งได้แก่ เชื้อ MN2 เลี้ยงเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ ในอาหารเหลว IMA-2 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 - 5 วัน จากนั้นเก็บเซลล์ของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ โดยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ปรับความเข้มข้น suspension ของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ ที่ใช้ทดสอบให้ได้ปริมาณมากกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5.3 การเตรียมเมล็ดปลูก

เมล็ดข้าวที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 จากสถานีวิจัยการเกษตรเขตชลประทาน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาแช่ลงใน suspension ของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ โดยทำการแช่ไว้นาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปปลูก

5.4 การทดสอบผลของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ต่อการงอกของเมล็ดข้าว

นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วมาทดสอบตามกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เมล็ดปลูกเชื้อด้วยเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ MN2

กรรมวิธีที่ 2 เมล็ดปลูกเชื้อด้วย spore suspension ของเชื้อ *Pyricularia oryzae*

กรรมวิธีที่ 3 เมล็ดปลูกเชื้อด้วยเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ MN2 และ spore suspension ของเชื้อ *Pyricularia oryzae*

กรรมวิธีที่ 4 ชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำเมล็ดทั้ง 4 กรรมวิธี มาวางเพาะบนกระดาษชื้นในจานอาหาร โดยทำการทดสอบ 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด หลังจากนั้น 7 วัน ทำการวัดผลโดยตรวจจากเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดข้าว เพื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ปลูกด้วยเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

5.5 การทดสอบผลของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ต่อการเจริญของต้นกล้าในโรงเรือน

นำเมล็ดข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ (ข้อ 5.4 กรรมวิธีที่ 1) ปลูกลงในกระบะบรรจุดิน (ข้อ 5.1) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ชุดควบคุมหรือ control ซึ่งเมล็ดไม่ได้ปลูกด้วยเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ และ กลุ่มที่ 2 เมล็ดข้าวปลูกเชื้อด้วยแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ (MN2)

ทำการทดลองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 500 เมล็ด ดูแลรดน้ำเป็นประจำทุกวัน ประเมินโดยเก็บกล้าข้าวมาชั่งน้ำหนัก โดยทำการชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง การเก็บตัวอย่างกล้าข้าวมาชั่งน้ำหนักนั้นทำโดยเก็บกล้าข้าวกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 100 ต้น โดยเก็บกล้าข้าวแล้วมาล้างทำความสะอาดเพื่อชะล้างเอาเศษดินออก จากนั้นผึ่งให้แห้งประมาณ 30 นาที จึงทำการชั่งน้ำหนักสด สำหรับน้ำหนักแห้ง นำกล้าข้าวที่ผ่านการชั่งน้ำหนักสดมาอบให้แห้งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 7 - 10 วัน หรือจนกระทั่งน้ำหนักแห้งของกล้าข้าวคงที่ จึงทำการบันทึกผล สำหรับการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการชั่งน้ำหนักนั้นจะเริ่มทำครั้งแรกเมื่อข้าวอายุได้ 14 วัน จากนั้นเก็บผลครั้งต่อไปเมื่อกล้าข้าวมีอายุได้ 21 และ 28 วัน ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง และนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวในระยะต้นกล้าในโรงเรือน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhang and Watson, 1997)

6.1 การเตรียม Suspension ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าว (*Pyricularia oryzae*) เตรียมโดยเลี้ยงบนอาหาร Rice Polish Agar (RPA) (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนต์ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 10—14 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อราสาเหตุโรคเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มากดบริเวณเส้นใยที่อยู่ภายในจานอาหารให้แบนราบลงไป บ่มเชื้อต่ออีกประมาณ 7 วัน เช็คการสร้างสปอร์ของเชื้อโดยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในการทำ Spore suspension ให้นำน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตรมาใส่ในแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แผ่นสไลด์ขูดเส้นใย บริเวณผิวหน้าของอาหาร นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกเส้นใยออก ปรับ spore suspension ให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

6.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวในระยะต้นกล้าในโรงเรือน

นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเรียบร้อยแล้วมาปลูกลงในกระบะบรรจุดิน (ข้อ 5.1) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เมล็ดข้าวปลูกเชื้อด้วยแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ (MN2) แล้วทำการฉีดพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

กลุ่มที่ 2 เมล็ดข้าวปลูกเชื้อด้วยแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ (MN2) แต่ไม่ทำการฉีดพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

กลุ่มที่ 3 เมล็ดไม่ถูกปลูกเชื้อด้วยแอคทิโนไมซิทเอนโดไฟท์ (MN2) จากนั้นนำมาฉีดพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

กลุ่มที่ 4 ชุดควบคุมหรือ control (เมล็ดไม่ได้ปลูกด้วยเชื้อ และไม่ทำการฉีดพ่นด้วย spore suspension ของ *Pyricularia oryzae*)

การปลูกข้าวทำการปลูกกระบะละ 100 ต้น ในแต่ละกลุ่มปลูก 3 กระบะ (3 ซ้ำ) เมื่อข้าวอายุได้ 14 วัน ทำการปลูกเชื้อด้วย suspension ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าว โดยการฉีดพ่นเชื้อลงไปบริเวณใบข้าว หลังจากนั้น 7 วัน ตรวจสอบหาเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคโดยตรวจดูเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบที่ถูกทำลาย โดยทดลองสุ่มการตรวจโรคของต้นข้าวในแต่ละกระบะๆ ละ 30 ต้น วางแผนการทดลองแบบ CRD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved