บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ดำเนินการทดลองที่ โรงเพาะชำภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2545 – เมษายน พ.ศ. 2546 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง คือ (1) การศึกษาวิธีการปลูกเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในถั่วลิสง และ (2) การศึกษาอิทธิพลของสภาพน้ำท่วมขังต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ในถั่วลิสง

การทดลองที่ 1 ศึกษาวิธีการปลูกเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในถั่วลิสง

ปลูกถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ที่ใส่ดินร่วนปนทรายที่ได้ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยความร้อน นาน 3 ชั่วโมง ปลูกถั่วลิสงจำนวน 2 ต้นต่อกระถาง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ทำการปลูกเชื้อราด้วยสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *A. flavus* ที่ความเข้มข้น $1x10^7$ spore/ml ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่

1. ผสมสารแขวนลอยสปอร์ลงดินก่อนปลูก
2. เทสารแขวนลอยสปอร์ลงดินในระยะดอกบาน 50 % ของทั้งหมด
3. ฉีดพ่นทางดอกด้วยสารแขวนลอยสปอร์ในระยะดอกบาน 50 % ของทั้งหมด
4. ไม่มีการปลูกเชื้อรา

และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเข็มถั่วลิสง เพื่อตรวจหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา ตั้งแต่ระยะเข็มเริ่มแทงลงดิน (50 วันหลังปลูก) จนพัฒนาไปเป็นฝัก จำนวน 5 ระยะ ซึ่งในแต่ละระยะการพัฒนาของเข็มจะแบ่งตามขนาดของเข็ม (ภาพ 1)

วิธีการดูแลรักษา คือ หลังปลูก 15 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 (N-P-K) ในอัตรา 1.10 กรัมต่อกระถาง กำจัดวัชพืชด้วยมือ และหลังจากต้นถั่วลิสงเจริญเติบโตได้ประมาณ 30 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 (N-P-K) ในอัตรา 1.10 กรัมต่อกระถาง สำหรับการป้องกันโรคและแมลง ปฏิบัติตามความจำเป็นและเหมาะสม เมื่อพบว่ามีแมลงหรือโรคระบาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 1 ระยะการพัฒนาของเข็มถั่วลิสง 5 ระยะ โดยแบ่งตามขนาดของเข็มถั่วลิสง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกข้อมูล

1. ตรวจหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราบนเข็ม ทั้ง 5 ระยะการพัฒนา โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราบนเข็มที่ผ่านการฆ่าเชื้อราที่ผิวนอกของเข็มด้วย Clorox 10% กับเข็มที่ผ่านการล้างผิวนอกของเข็มด้วยน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว
2. ตรวจหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราที่ส่วนต่างๆของฝักสดหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ ฝักสด (pod) เปลือก (shell) และ เมล็ด (seed)

การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension)

นำเชื้อรา *A. flavus* บริสุทธิ์มาเพิ่มปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเฉพาะ (M3S1B medium) (Griffin and Garren, 1974) เมื่อเชื้อราเจริญอายุได้ 7 วัน เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 ml ลงบนผิวหน้าอาหาร ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเกลี่ยผิวหน้าอาหารเพื่อให้สปอร์หลุดออกมา กรองผ่านผ้าขาวบาง ซ้อนทับ 2 ชั้น เทใส่บีกเกอร์ ขนาด 500 ml เติมสารจับใบ Tween 20% จำนวน 1 หยด เพื่อให้สปอร์ของเชื้อราสามารถเข้ากับน้ำได้ดี จะได้สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* จากนั้นปรับความเข้มข้นให้ได้ $1x10^7$ spore/ml ด้วย Haemacytometer

การตรวจหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *Aspergillus flavus*

การตรวจหาการติดเชื้อรา *A. flavus* ใช้วิธีเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเฉพาะ M3S1B โดยนำส่วนของเข็ม และส่วนต่างๆของฝัก ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย Clorox 10 % นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง แล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร M3S1B บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน หลังจากนั้นตรวจนับโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* ที่เจริญอยู่บนเข็ม และส่วนต่างๆของฝัก แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *A. flavus* บนเข็มระยะต่างๆ และข้อมูลของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราในส่วนต่างๆของฝักและเมล็ด นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของสิ่งทดลองด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 ศึกษาอิทธิพลของสภาพน้ำท่วมขังต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในถั่วลิสง

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2545 - มีนาคม พ.ศ. 2546 โดยปลูกถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 เซนติเมตร ไม่เจาะรู ในดินร่วนปนทรายที่ได้ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยความร้อน นาน 3 ชั่วโมง บรรจุดินประมาณ 20 กิโลกรัมต่อกระถางจนเกือบเต็ม ปลูกถั่วลิสงจำนวน 2 ต้นต่อกระถาง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ เมื่อถั่วลิสงมีอายุประมาณ 30 – 35 วันหลังปลูก ทำการปลูกเชื้อราด้วยสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *A. flavus* ที่ความเข้มข้น 1x 10^7 spore/ml ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงในดิน ด้วยกรรมวิธีเทลงบนผิวหน้าดิน และเมื่อถั่วลิสงอายุ 45 วัน (ดอกบานประมาณ 50% ของทั้งหมด) เริ่มมีการให้ได้รับระดับน้ำที่แตกต่างกันด้วยกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้คือ

1. ให้น้ำขังนาน 1 วัน
2. ให้น้ำขังนาน 2 วัน
3. ให้น้ำขังนาน 3 วัน
4. ให้น้ำขังนาน 4 วัน
5. ให้น้ำในระดับที่เพียงพอแก่พืช (ให้น้ำปกติ)
6. งดการให้น้ำจนถั่วลิสงแสดงอาการขาดน้ำ

ในสภาพน้ำท่วมขัง ใส่น้ำท่วมขังเหนือผิวหน้าดินประมาณ 5 เซนติเมตร หลังจากมีการให้น้ำขังตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว จึงระบายน้ำออกจากกระถาง ปล่อยไว้จนผิวดินแห้ง หลังจากนั้นจะควบคุมการให้น้ำในทุกกรรมวิธีการทดลองให้อยู่ในระดับที่เพียงพอแก่พืช (โดยจะรดน้ำทุกๆ 2 วัน จนกระทั่งเก็บเกี่ยว) และหลังปลูก 15 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 (N-P-K) อัตรา 1.42 กรัมต่อกระถาง และเมื่อต้นถั่วลิสงมีอายุได้ 30 วันใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 ในอัตรา 1.42 กรัมต่อกระถาง การป้องกันโรคและแมลงนั้นปฏิบัติตามความจำเป็นและความเหมาะสม เมื่อพบว่ามีแมลงหรือโรคระบาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกข้อมูล

1. ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินในกระถาง จำนวน 10 กรัมต่อกระถาง นำดินที่สุ่มเก็บได้ไปตรวจหาปริมาณเชื้อรา *A. flavus* และแบคทีเรีย (total bacteria) ตั้งแต่ถั่วลิสงอายุ 45 วันหลังปลูก (ก่อนเริ่มให้ระดับน้ำที่แตกต่างกัน) จนถึงระยะเก็บเกี่ยวถั่วลิสง
2. สุ่มเก็บตัวอย่างเข็มถั่วลิสง เมื่อถั่วลิสงอายุประมาณ 55 วันหลังปลูก หรือหลังได้รับระดับน้ำด้วยกรรมวิธีต่างๆ เพื่อตรวจหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *A. flavus* บนเข็มถั่วลิสง
3. เมื่อถึงระยะสุกแก่ สุ่มเก็บตัวอย่างฝักถั่วลิสง เพื่อตรวจหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *A. flavus* ในส่วนต่างๆของฝักสด ได้แก่ ฝักสด (pod) เปลือก (shell) และ เมล็ด (seed)
4. และแบ่งตัวอย่างฝักบางส่วนมาชั่งหาน้ำหนักเมล็ด (กรัมต่อเมล็ด)

การตรวจหาประชากรของเชื้อราและแบคทีเรียในดิน

วิธีการตรวจหาปริมาณเชื้อในดิน กระทำโดยสุ่มตัวอย่างดินจากกระถางที่ปลูกถั่วลิสง แล้วมาทำการแยกเชื้อและตรวจนับปริมาณโคโลนีด้วยวิธีการ Soil dilution technique โดยนำดินประมาณ 10 กรัม มาเจือจางด้วยน้ำ sterile 90 ml แล้วปั่นนาน 2 นาที เพื่อให้ดินอยู่ในสภาพ suspension อย่างสมบูรณ์ แล้วดูดเอา soil suspension 10 ml ทำให้เจือจางในน้ำ sterile นำ soil suspension ที่เจือจางเหมาะสมใส่ลงในอาหาร M3S1B สูตรเฉพาะของเชื้อรา *A. flavus* และ nutrient agar สำหรับเชื้อแบคทีเรีย บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ปล่อยให้จุลินทรีย์เจริญและนับจำนวนโคโลนีที่เจริญขึ้นในอาหารนั้น

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราในส่วนต่างๆของเข็ม ฝัก เปลือก และเมล็ด ตลอดจนข้อมูลปริมาณเชื้อรา *A. flavus* และแบคทีเรียที่อยู่ในดิน และน้ำหนักเมล็ด นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของสิ่งทดลองด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved