บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อราสาเหตุของโรค

ศึกษาลักษณะอาการของแผลจากตัวอย่างที่เก็บมาจาก ตำบลบ่อแก้ว อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ และบันทึกผลจากลักษณะอาการ ทำการแยกเชื้อโดยตรงจากส่วนที่เป็นโรคแอนแทรคโนสและใบไหม้โฟมอฟซิส โดยการตัดชิ้นส่วนของสตรอเบอรี่บริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อที่เป็นโรคและเนื้อเยื่อปกติขนาด 3x3 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อด้วย 1% sodium hyprochloride นาน 3-5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้แห้ง นำมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-28^{o}C) เมื่อเชื้อเจริญจึงตัดปลายเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

2. การแยกเชื้อราปฏิปักษ์จากใบสตรอเบอรี่

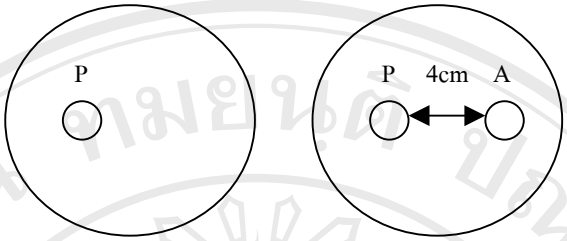
นำใบสตรอเบอรี่ที่เป็นใบปกติแข็งแรงและสมบูรณ์ ไม่มีรอยการเข้าทำลายโดยศัตรูพืชจากอำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ และแปลงพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สปอร์และเส้นใยของเชื้อราชนิดต่างๆ ที่อยู่บนใบสตรอเบอรี่ตกลงในน้ำกลั่นที่แช่ เพื่อใช้เป็น spore suspension นำ spore suspension ที่ได้มา spread plate บนอาหาร PDA ที่ผสมกับ rose bengal เพื่อป้องกันแบคทีเรีย แล้วนำจานอาหารไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อราสร้างสปอร์และเส้นใย เก็บเชื้อราทุกตัวที่เจริญลงบนอาหาร PDA อีกครั้ง แล้วเก็บไว้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Phomopsis obscurans* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสและใบไหม้โฟมอฟซิสของสตรอเบอรี่

นำเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากงานทดลองที่ 2 มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส และเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้โฟมอพซิสของสตรอเบอรี่ โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะบริเวณรอบนอกโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคทั้งสอง และของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้ แล้วย้ายไปวางบนอาหาร PDA ที่อยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้มีระยะห่างกันประมาณ 4 เซนติเมตร แล้วนำจานอาหารดังกล่าวไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อราที่อยู่ในจานอาหารเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ระยะเวลา 14 วัน แล้วทำการจัดแบ่งกลุ่มของเชื้อราที่แยกได้ตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับเชื้อราสาเหตุโรคทั้งสอง



ภาพ 1 การทดสอบวิธี dual culture technique (biculture technique)
P = เชื้อราสาเหตุโรค, A = เชื้อราปฏิปักษ์

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากผิวใบสตรอเบอรี่กับเชื้อ *Colletotrichum* sp. และ *Phomopsis obscurans* ในห้องปฏิบัติการ

คัดเลือกเชื้อราที่ได้ทดสอบคุณสมบัติการเป็นปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติดีที่สุดมา 2 กลุ่ม คือ เชื้อรากลุ่มที่ทำให้เกิด clear zone กับ *Colletotrichum* sp. และ *Phomopsis obscurans* และเชื้อรากลุ่มที่สามารถเจริญปกคลุมโคโลนีของ *Colletotrichum* sp. และ *Phomopsis obscurans* มาศึกษาต่อดังนี้

4.1 ศึกษาผลกระทบของสาร antibiotic หรือ toxin ใน culture filtrate ของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการงอกและสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Phomopsis obscurans*

4.1.1 ทดสอบประสิทธิภาพการงอกของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Phomopsis obscurans* ใน culture filtrate ของเชื้อราปฏิปักษ์ โดยนำเชื้อราปฏิปักษ์ที่เกิดปฏิกิริยา clear zone กับเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Phomopsis obscurans* มาเลี้ยงในอาหารเหลว (potato dextrose broth : PDB) เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นกรองเอาเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราปฏิปักษ์ออกโดยใช้กระดาษกรอง (Whatman No. 1) นับจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคด้วย haemacytometer ใช้สปอร์ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตรปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี culture filtrate ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย เป็นเวลาทุกๆ 1, 3, 5 และ 7 วัน

4.1.2 ทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Phomopsis obscurans* ใน culture filtrate ของเชื้อราปฏิปักษ์ โดยนำเชื้อราปฏิปักษ์ที่เกิดปฏิกิริยา clear zone กับเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Phomopsis obscurans* มาเลี้ยงในอาหารเหลว (potato dextrose broth : PDB) เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นกรองเอาเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราปฏิปักษ์ออกโดยใช้กระดาษกรอง (Whatman No.1) นับจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคด้วย haemacytometer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ใช้สปอร์ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตรปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี culture filtrate ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย เป็นเวลาทุกๆ 1, 3, 5 และ 7 วัน เพื่อคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีความสามารถยับยั้งการงอกและสร้างสปอร์ได้ดีที่สุด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใส่เฉพาะ spore suspension ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Phomopsis obscurans* ในอาหารเหลว (PDB)

4.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อราปฏิปักษ์เจริญคลุมโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Phomopsis obscurans*

นำเชื้อราปฏิปักษ์ที่แสดงปฏิกิริยาเจริญคลุมโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Phomopsis obscurans* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA วัดอัตราการเจริญเติบโต โดยทำการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อราทุกๆ 1, 3, 5, 7, 9 และ 14 วัน เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตดีที่สุด

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากผิวใบพืชกับเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในสภาพโรงเรือน

5.1 ทดสอบประสิทธิภาพโดยทำการฉีดพ่น spore suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลทต่างๆ บนใบสตรอเบอรี่ก่อนทำการฉีดพ่น spore suspension ของ *Colletotrichum* sp. เตรียม spore suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ โดยใช้เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีอายุ 14 วันจำนวน 1 plate/น้ำ 50 มิลลิลิตร ฉีดพ่นบนใบสตรอเบอรี่ที่มีอายุ ประมาณ 60 วัน จากนั้นจึงฉีดพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตรตามลงไปหลังจากมีการฉีดพ่น spore suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ แล้วเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ทำการบันทึกผลทุกๆ 7, 10 และ 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อราปฏิปักษ์และ *Colletotrichum* sp. เพียงอย่างเดียว

5.2 ทดสอบประสิทธิภาพโดยทำการฉีดพ่น spore suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลทต่างๆ บนใบสตรอเบอรี่หลังทำการฉีดพ่น spore suspension ของ *Colletotrichum* sp. เตรียม spore suspension ของ *Colletotrichum* sp. ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ฉีดพ่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร บนใบสตรอเบอรี่ที่มีอายุ ประมาณ 60 วัน จากนั้นจึงฉีดพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรตามลงไปหลังจากมีการฉีดพ่น spore suspension ของ *Colletotrichum* sp. แล้วเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ทำการบันทึกผลทุกๆ 7, 10 และ 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อราปฏิปักษ์และ *Colletotrichum* sp. เพียงอย่างเดียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.3 บันทึกผลและประเมินผล

ประเมินความเสียหายที่เกิดจากโรค โดยแบ่งออกเป็น 2 ค่า คือ

1. การหาปริมาณของโรค (disease intensity) โดยการนับจำนวนใบที่เป็นโรคต่อต้นแล้วนำมาคำนวนเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากจำนวนใบทั้งหมดในแต่ละกรรมวิธี
2. ประเมินพื้นที่ใบที่ถูกเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายต่อต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์พื้นที่ผิวใบที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย โดยแบ่งใบพืชออกเป็น 10 ส่วน โดยแต่ละส่วนมีระดับการเข้าทำลายเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (สืบศักดิ์, 2540)
3. ทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SXW (Statistic for Windows)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved