บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อบริสุทธิ์และการจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์

1.1 การเก็บตัวอย่างพืช (sample collection)

ทำการเลือกเก็บตัวอย่างกิ่งและใบส้มสายน้ำผึ้ง ในพื้นที่ปลูกเขตอำเภอแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่ โดยเลือกเก็บเฉพาะส่วนที่สมบูรณ์ ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลงหรือแสดงอาการของโรค

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

1. นำตัวอย่างใบ และกิ่งยอดของส้มมาล้างน้ำให้สะอาด โดยล้างน้ำไหลผ่าน (running water) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผึ่งลมให้แห้ง
2. ใช้กรรไกรตัดใบเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส และกิ่งยอดของส้มเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยมีขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร
3. นำชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และสุดท้ายในน้ำผสม Heritage (อัตราส่วนน้ำ 1,000 มิลลิลิตรต่อ heritage 3 กรัม) เป็นเวลา 1 นาที
4. ซับน้ำให้แห้งโดยนำชิ้นพืชวางบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งให้แห้ง
5. จากนั้นทำการวางชิ้นพืชในจานอาหาร inhibitory mold agar-2 (IMA-2) ที่ผสมด้วยสารปฏิชีวนะ คือ amphotericin B, riphampin - viccillin และ Heritage จำนวน 10 ชิ้นต่อ 1 จานอาหาร
6. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน

1.3 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ และการเก็บเชื้อแอคติโนมัยซีส (Shimizu *et al*., 2000)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเอนโดไฟท์ที่คาดว่าจะเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีสที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช มา streak ลงบนอาหาร IMA-2 โดยที่ผิวหน้าของอาหารวางด้วยแผ่นเซลลูโลสเมมเบรน (cellulose membrane filter) ที่มีขนาดช่องเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร นำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสเมมเบรนออก เชื้อแอคติโนมัยซีสจะเจริญผ่านแผ่นเมมแบรนไปยังผิวอาหารได้ จึงเก็บเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ได้ไว้เป็น stock culture โดยเก็บเชื้อใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลอดอาหาร IMA-2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4 การจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีส (ดัดแปลงจากวิธีของ Williams *et al*., 1989)

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้มาเลี้ยงโดย streak บนอาหาร IMA-2 ให้เกิดเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วันแล้วปักแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บริเวณที่มีโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีสอยู่หนาแน่นโดยให้ทำมุมประมาณ 45 องศากับผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วนำแผ่นปิดสไลด์ที่มีเชื้อแอคติโนมัยซีสเจริญขึ้นติดอยู่ทำการย้อมสีแบบ simple stain โดยหยดด้วยสารละลาย crystal violet เพื่อตรวจดูลักษณะของ mycelium การสร้างสปอร์ และการเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ตามเอกสารของ Miyadoh *et al.* (1997), Holt *et al.* (1994) และ Williams *et al*. (1989) เพื่อจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีสเบื้องต้น

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโรคแอนแทรคโนสของส้ม

2.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากส้มที่เป็นโรค มาทำการแยกเชื้อด้วยวิธีการใช้เหยื่อล่อ (baiting) โดยนำดิน 20 กรัมใส่ถ้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 80 มิลลิลิตร (อัตราส่วนดิน : น้ำ เท่ากับ 1 : 4) คนให้ดินละลายเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน จากนั้นจึงตัดใบส้มให้มีขนาดประมาณ 0.3 x 0.3 เซนติเมตร มาลอยบนน้ำเพื่อใช้เป็นเหยื่อล่อ โดยใบส้มที่นำมาใช้ต้องไม่แก่หรืออ่อนเกินไป และต้องไม่เป็นใบที่เพิ่งได้รับการฉีดพ่นด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 1-2 วัน โดยตรวจสอบการเข้าทำลายชิ้นใบส้มของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกๆ 6 ชั่วโมง หากพบว่าเชื้อราเจริญอยู่รอบ ๆ ขอบของชิ้นใบส้ม จึงนำใบส้มมาล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วซับด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง จากนั้นนำชิ้นใบส้มมาวางบนอาหาร water agar (WA) ตรวจสอบเส้นใยที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อและทำการแยกเส้นใยลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA)

2.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของส้ม

เก็บตัวอย่างโรคแอนแทรคโนสจากสวนส้มในเขตอำเภอแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่ มาทำการแยกเชื้อด้วย tissue transplanting technique บนอาหาร PDA โดยการตัดชิ้นส่วนของใบที่เป็นโรคให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย sodium hypochloride 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที จากน้ำจึงล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาที นำชิ้นพืชวางบนกระดาษกรองที่

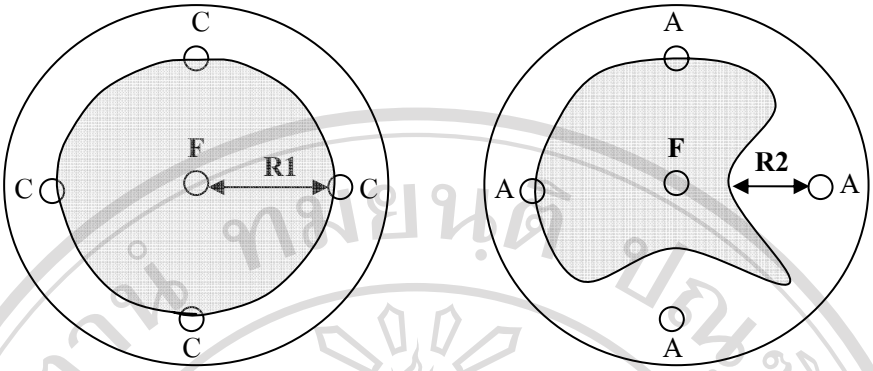
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผ่านการฆ่าเชื้อ เพื่อซับให้ชิ้นพืชแห้ง แล้วจึงนำไปวางบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสังเกตเห็นเส้นใยที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อแล้วจึงตัดปลายเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง ส่วนการแยกเชื้อสาเหตุบนผลทำได้โดยการบ่มผลที่แสดงอาการของโรคใน moist chamber จนสังเกตเห็น mass หรือเส้นใยของเชื้อเจริญบนแผล จึงทำการเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส้มสายน้ำผึ้งมาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส และโรครากเน่าด้วยวิธีการ dual culture โดยการวางเชื้อราสาเหตุโรคตรงกลาง หลังจากนั้นวางเชื้อแอคติโนมัยซีสในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 แต่ละด้านโดยวางห่างกัน 2.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 6) ในการวางจะทำการวางเชื้อแอคติโนมัยซีสก่อนเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เชื้อแอคติโนมัยซีสเจริญเป็นโคโลนีที่สมบรูณ์และสร้างสารปฏิชีวนะ แล้วจึงวางเชื้อราสาเหตุโรคพืชตาม วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในการทดสอบเชื้อแอคติโนมัยซีส แต่ละชนิด และในชุดควบคุมทำการวางเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกว่าเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบในกลุ่มควบคุม เจริญคลุมจุดวางเชื้อในชุดควบคุม (ดัดแปลงจากวิธีการของ Shimizu *et al*. (2000) สังเกตพร้อมทั้งทำการบันทึกผลการสร้าง clear zone ของเชื้อแอคติโนมัยซีส โดยวัดขนาดความกว้างระหว่างขอบของโคโลนีเชื้อราสาเหตุกับขอบโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีส นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีต่อเชื้อราสาเหตุโรค เพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญสูงสุดจำนวน 3 ไอโซเลท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ชุดควบคุม **ชุดทดสอบ**

ภาพที่ 6 การทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ด้วยวิธี dual culture โดยวางเชื้อแอคติโนมัยซีส (A) ร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรค (F) และไม่มีการวางเชื้อในชุดควบคุม (C) เพื่อเปรียบเทียบความกว้างของ clear zone ในชุดทดสอบ (R2) กับความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม (R1)

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ (Percent inhibition of radial growth : PIRG)

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

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R2 = ความกว้างของ clear zone ในชุดทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การทดสอบประสิทธิภาพน้ำกรองเชื้อในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกจำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ ไอโซเลท EAC06, EAC26 และ EAC 46 มาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว IMB-2 โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่อง orbital shaker ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นกรองตะกอนของเชื้อออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วนำของเหลวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที จึงมากรองผ่าน bacterial filter ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร นำกระดาษกรอง Whatman No.1 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ชุบน้ำกรองที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อ ทดสอบกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยวิธี dual culture วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทดลอง 3 ซ้ำ เชื้อราสาเหตุโรคที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ เชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าของส้ม เชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของส้ม และเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่นดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เชื้อสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพน้ำกรองเชื้อ

เชื้อรา	โรค	พืชอาศัย
Alternaria brassicicola	ใบจุด	คะน้า
Colletotrichum gloeosporioides	แอนแทรคโนส	มะละกอ
Colletotrichum gloeosporioides	แอนแทรคโนส	ส้มสายน้ำผึ้ง
Colletotrichum gloeosporioides	แอนแทรคโนส	ส้มโอ
Corynespora sp.	ใบจุด	กล้วยไข่
Curvularia ap.	ใบจุด	กล้วยไม้
Drechslera sp.	ใบจุด	กล้วย
Fusarium sp.	รากเน่าโคนเน่า	พริก
Pestalotiopsis sp.	ใบจุด	กล้วย
Phytophthora sp.	รากเน่า	มะเขือม่วง
Phytophthora sp.	รากเน่า	ส้มสายน้ำผึ้ง
Pythium sp.	รากเน่า	หน้าวัว
Rhizoctonia solani	เน่าคอดิน	ผักกาดหอม
Sclerotium rolfsii	เน่าคอดิน	คะน้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรครากเน่าในแปลงปลูก

5.1 การสำรวจและประเมินความรุนแรงของโรครากเน่าในแปลกปลูก

ทำการสำรวจและประเมินความรุนแรงของโรครากเน่าโคนเน่าของส้มในแปลงปลูกส้มของคุณอุดม ปินทีโย ซึ่งตั้งอยู่ที่ บ้านเดื่องก อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ โดยสวนส้มดังกล่าวมีเนื้อที่ประมาณ 6 ไร่ ต้นส้มมีอายุประมาณ 5 ปี จำนวนทั้งหมด 520 ต้น ทำการประเมินโรครากเน่าโคนเน่าจากอาการที่ปรากฏส่วนที่อยู่เหนือดิน ซึ่งได้แก่ ขนาด ลักษณะ และสีของใบ อาการตายจากกิ่งยอด และการประเมินภาพรวมอาการเหี่ยวของต้นส้ม เป็นต้น โดยจัดระดับความรุนแรงออกเป็น 5 ระดับต่าง ๆ กัน ซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 11 และภาพที่ 7 ซึ่งดัดแปลงจากพรพรรณ, (2544) พร้อมทั้งตรวจวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดินโดยสุ่มวัดจากดินบริเวณโคนต้นส้มที่ระดับความรุนแรงต่าง ๆ ระดับละ 10 ต้น ต้นละ 3 จุด

ตารางที่ 11 หลักการประเมินระดับความรุนแรงของโรครากเน่า

ความรุนแรงของโรครากเน่า	อาการผิดปกติที่พบ
ระดับที่ 1	ใบของส้มมีสีเขียวทั้งต้น มีใบเรียวเล็ก และม้วนพลิกกลับด้านให้เห็น
ระดับที่ 2	ใบของส้มมีสีเขียวอมเหลือง ใบเรียวเล็ก และม้วนพลิกกลับด้านให้เห็น ไม่แสดงอาการทิ้งใบ
ระดับที่ 3	ใบของส้มมีสีเหลือง ใบลู่เรียวเล็ก ใบเริ่มหลุดร่วงทำให้ทรงพุ่มบางลง
ระดับที่ 4	ใบของส้มมีสีเหลือง มีกิ่งที่แสดงอาการเหี่ยวหรือตายให้เห็น มีการทิ้งใบทำให้ทรงพุ่มบาง
ระดับที่ 5	ใบของส้มมีสีเหลือง กิ่งส่วนใหญ่ที่แสดงอาการเหี่ยวหรือตายให้เห็น มีการทิ้งใบมากทำให้ทรงพุ่มบางมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 7 ลักษณะอาการโรครากเน่าของส้มที่ระดับความรุนแรงต่าง ๆ

ก: อาการของโรครากเน่าโคนเน่าระดับที่ 1

ข: อาการของโรครากเน่าโคนเน่าระดับที่ 2

ค: อาการของโรครากเน่าโคนเน่าระดับที่ 3

ง: อาการของโรครากเน่าโคนเน่าระดับที่ 4

จ: อาการของโรครากเน่าโคนเน่าระดับที่ 5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรครากเน่า

5.2.1 การเตรียมเชื้อแอคติโนมัยซีส

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ไอโซเลท EAC46 ในอาหารเหลว ด้วยเครื่อง orbital shaker ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมาเทบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน จนเชื้อแอคติโนมัยซีสเจริญเต็มจานอาหารและใช้อาหารจนหมด (สังเกตจากการที่อาหารแห้ง) จากนั้นจึงทำการขูดสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสไปผสมกับผง talcum ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจวัดปริมาณ ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ในอัตรา 10^8 cfu/gm เก็บไว้ในที่แห้งเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5.2.2 การทดสอบการควบคุมโรครากเน่าในแปลงปลูก

ทำการคัดเลือกต้นส้มที่แสดงอาการของโรคในระดับต่าง ๆ ระดับละ 5 ต้น จำนวน 3 กลุ่ม จำนวนทั้งสิ้น 75 ต้น โดยกลุ่มแรกให้เป็นชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ทำการเพิ่มจุลชีพลงไปในดิน ส่วนชุดที่ 2 และ 3 มีการเติมเชื้อแอคติโนมัยซีสและชีวภัณฑ์ของเชื้อ *Chaetomium* ตามลำดับ โดยใช้เชื้อแอคติโนมัยซีส หรือชีวภัณฑ์ของเชื้อ *Chaetomium* ในปริมาณ 20 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร ราดบริเวณโคนต้นส้มโดยรอบ โดยทำซ้ำอีก 3 ครั้ง ห่างกัน 15 วัน ก่อนทำการประเมินผล โดยที่ก่อนทำการทดลองทุกครั้งจะใส่ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพรอบ ๆ โคนต้นส้มในทุกการทดลองโดยใส่ในอัตรา 5 กิโลกรัมต่อต้น เพื่อเป็นการปรับสภาพดิน และเพิ่มปริมาณอินทรียวัตถุในดิน จากนั้นประเมินระดับความรุนแรงของโรคหลังการทดลองครั้งสุดท้าย 15 วัน และนำระดับความรุนแรงของโรคมาแปลงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ดัชนีความเป็นโรค โดยมีสูตรดังนี้ (ประเทือง, 2538)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเป็นโรค} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคในแต่ละระดับ X 100}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่ม X ระดับความรุนแรงสูงสุด}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved