

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สายพันธุ์ฟริกจำนวน 140 สายพันธุ์ จากโครงการ การคัดเลือกและประเมินพันธุ์ฟริก ด้านทานไส้เดือนฝอยรากปม (นุชนารถ และคณะ, 2552)
2. ไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* บริสุทธิ์ (pure culture) จากโครงการ การคัดเลือกและประเมินพันธุ์ฟริกด้านทานไส้เดือนฝอยรากปม (นุชนารถ และคณะ, 2552)
3. กรงกันแมลงขนาด 85 x120x80 ซม.
4. โรงเรือนปลูกพืช
5. บล็อกซีเมนต์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 80 ซม. สำหรับปลูกพืชอาศัย
6. วัสดุปลูกพืช ได้แก่ ดินร่วน ดินร่วนปนทราย (ดินสีดา 50 : ดินทราย 50) และดินพีทมอส (Pindstrup compressed peat product)
7. ภาชนะปลูก ได้แก่ กระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 และ 12 นิ้ว ภาชนะปลูกชนิด 15 หลุม (กระถางพลาสติกสีดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 ซม. สูง 5.5 ซม.) และภาชนะปลูกชนิด 104 หลุม
8. เครื่องเขย่า 300 รอบ/นาที
9. สารละลาย 0.525 % NaOCl
10. เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ขนาด 50-1,000 มล. Elenmeyer flask ขนาด 250-500 มล. Petri dish ใช้สำหรับเพาะเมล็ด และจานนับจำนวนไส้เดือนฝอย
11. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (Stereo microscope) และกำลังขยายสูง (Compound microscope)
12. วัสดุอื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ เช่น ไมโครไปเปต ขนาด 500-1,000 มล. สไลด์หลุม กระดาษกรอง และกระดาษทิชชู เป็นต้น
13. เครื่องมือสำหรับปลูกพืชและสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ปุ๋ย และฮอร์โมน

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การคัดเลือกและประเมินพันธุ์ฟริกต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*)

1.1 การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*) บริสุทธิ์ในพีชอาศัย

เก็บรากปมฟริกจากพื้นที่ จ. อุบลราชธานี ที่พบการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) นำมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการโดยวิธีตัดรอยย่นส่วนก้น (perineal pattern) และยืนยันชนิดไส้เดือนฝอยด้วยเทคนิค PCR เพื่อได้ชนิดเป็น *M. incognita* จากนั้นเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ โดยการทำ single ของ egg mass ในถั่วเขียวผิวน้ำเพื่อขยายปริมาณไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ให้เพียงพอต่อการทดสอบ โดยเฉพาะเมล็ดถั่วเขียวในดินชนิดร่วนปนทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (อัตราส่วน 50:50) ในกระถางปลูก เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย ด้วย single egg mass ของไส้เดือนฝอย *M. incognita* ที่ฟักเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) แล้ว โดยใช้ micropipette ดูด J2 แล้วนำไปราดบริเวณโคนต้นใกล้กับรากของต้นถั่วเขียว นำไปตั้งวางในกรงกันแมลง (ขนาด 85x120x80 ซม.) เป็นเวลา 14-21 วัน

1.2 การเตรียมกล้าพันธุ์ฟริก

นำเมล็ดฟริกแต่ละสายพันธุ์ (โดยทำสำปด้าห้ละ 5 สายพันธุ์) เพาะในกระดาดที่ซุซุ่มน้ำเป็นเวลา 3-4 วัน นำเมล็ดฟริกที่งอกไปเพาะในดินพีทที่บรรจุในภาชนะชนิด 104 หลุม จำนวน 1-2 เมล็ด/หลุม นำไปตั้งวางในกรงกันแมลง (ขนาด 85 x120x80 ซม.) เมื่อใบจริงงอก 1 คู่ ทำการใส่ปุ๋ย สูตร 15-15-15 จำนวน 1-2 เม็ด/ต้น และใส่ปุ๋ยสำปด้าห้ละ 1 ครั้ง จนได้กล้าฟริกอายุครบ 30 วัน

1.3 การเตรียมไข่ไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*)

นำรากถั่วเขียวที่เป็นปมและมีกลุ่มไข่ (egg mass) มาแช่ใน 0.525 % NaOCl เป็นเวลา 3.5 นาที ด้วยเครื่องเขย่า 300 รอบ/นาที กลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยจะหลุดออกจากวุ้น (gelatinous matrix) ที่หุ้มไข่ จากนั้นนำไข่ไปผ่านตะแกรง 2 ขนาด (400 และ 500 mesh) เพื่อแยกเศษพืชออก โดยเปิดน้ำไหลผ่าน จากนั้นเก็บไข่ไส้เดือนฝอยจากตะแกรง 500 mesh นำไปนับจำนวน $1,000 \pm 100$ ฟอง/น้ำ 1 มิลลิลิตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนับเฉพาะไข่ที่สมบูรณ์และตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่ฟักแล้ว

1.4 การ inoculate ไข่ไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*)

ย้ายต้นกล้าฟริกแต่ละสายพันธุ์ที่มีอายุ 30 วัน ที่เตรียมจากข้อ 1.2 ปลูกในดินชนิดร่วนปนทราย (อัตราส่วน 50 :50) ในภาชนะชนิด 15 หลุม จำนวนต้นกล้าฟริก 15-20 ต้น /พันธุ์ จากนั้นปลูก

เชื้อไส้เดือนฝอย *M. incognita* โดยใช้ไข่ที่เตรียมจากข้อ 1.3 จำนวน $1,000 \pm 100$ ฟอง/ต้น ที่บริเวณ โกลักรากพืช นำพืชที่ผ่านการปลูกเชื้อแล้วไปตั้งวางในกรงกันแมลงขนาด 85 x120x80 ซม. และดูแล พืชปลูกโดยใส่ปุ๋ย 4-5 ครั้ง จนอายุครบ 40 วันหลังปลูกเชื้อ

บันทึกผล

1. rate โรครากปม การวัดดัชนีการเกิดปมที่ระบบราก ทำการถอนต้นพริกอายุ 70 วัน (หรือ 40 วันหลังปลูกเชื้อ) จำนวน 10 ต้น/พันธุ์ เพื่อประเมินดัชนีการเกิดปมที่ระบบราก/ต้น ตามวิธีของ นุชนารถและวารภรณ์ (2550) ดัดแปลงตามวิธีของ Hussey and Jansaen (2001) แบ่งเป็น 5 ระดับ ความต้านทาน (ภาพ 4)



ภาพ 4 ดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากของพริก

- | | | |
|----|-----------------------------------|--|
| A) | 1 = มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย | ระดับความต้านทาน Highly Resistant (HR) |
| B) | 2 = เกิดปมน้อยกว่า 25% ของระบบราก | ระดับความต้านทาน Very Resistant (VR) |
| C) | 3 = เกิดปม 25-50% ของระบบราก | ระดับความต้านทาน Moderately resistant (MR) |
| D) | 4 = เกิดปม 51-75% ของระบบราก | ระดับความต้านทาน Slightly Resistant (SR) |
| E) | 5 = เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก | ระดับความต้านทาน Susceptible (S) |

2. การนับไข่ไส้เดือนฝอยรากปม นำรากพริกแต่ละต้นที่ผ่านการประเมินดัชนีการเกิดปมของแต่ละสายพันธุ์แล้ว มาแช่ใน 0.525 % NaOCl เป็นเวลา 3.5 นาที ด้วยเครื่องเขย่า 300 รอบ/นาาที เพื่อแยกไข่ออกจาก gelatinous matrix และนำไปผ่านตะแกรง 2 ขนาด (400 และ 500 mesh) เพื่อแยกเศษพืชออก โดยเปิดน้ำไหลผ่าน จากนั้นเก็บไข่ไส้เดือนฝอยจากตะแกรง 500 mesh นำไปนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับเฉพาะไข่ที่สมบูรณ์

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาปฏิกริยาพันธุ์พริกต้านทานต่อการเข้าทำลายและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*)

2.1 ปฏิกริยาพันธุ์ต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*)

นำเมล็ดพันธุ์พริกต้านทานต่อโรครากปม จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่พันธุ์ CA735, CA1336, CA1399, CA1429 และ พันธุ์พริกขาว ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์พริกต้านทานต่อไส้เดือนฝอย *M. incognita* จากศูนย์พันธุ์และ วิศวกรรมแห่งชาติ (สวทช.) ภายใต้โครงการ การคัดเลือกและประเมินพันธุ์พริกต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม โดยนุชนารถและคณะ (2552) เปรียบเทียบกับพันธุ์หัวเรือซึ่งอ่อนแอต่อโรครากปม เพาะในกระดาดทรงช่มน้ำเป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อรากงอกย้ายปลูกในดินพีทเป็นเวลา 30 วัน ได้เป็นต้นกล้าจากนั้นย้ายต้นกล้าปลูกในดินชนิดร่วนปนทรายที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการใส่ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอย *M. incognita* จำนวน 100 ตัว/ต้น ใกล้เคียงบริเวณรากพริกแต่ละสายพันธุ์ ตั้งวางในกรงกันแมลงเป็นเวลา 15 วัน ทำการถอนต้นพริกและข้อมสีราก

บันทึกผล

1. นับจำนวนไส้เดือนฝอยระยะการเจริญต่างๆ ที่เข้าทำลายภายในระบบรากของพริกแต่ละสายพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับพันธุ์อ่อนแอ

2.2 ปฏิกริยาพันธุ์ต่อการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*)

นำเมล็ดพันธุ์พริกต้านทานต่อโรครากปม จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ CA735, CA1336, CA1399, CA1429 และ พันธุ์พริกขาว ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์พริกต้านทานต่อไส้เดือนฝอย *M. incognita* จากศูนย์พันธุ์และ วิศวกรรมแห่งชาติ (สวทช.) ภายใต้โครงการ การคัดเลือกและประเมินพันธุ์พริกต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม โดยนุชนารถและคณะ (2552) เปรียบเทียบกับพันธุ์หัวเรือซึ่งอ่อนแอต่อโรครากปม เพาะในกระดาดทรงช่มน้ำ เป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อรากงอกย้ายปลูกในดินพีทเป็นเวลา 30 วัน ได้เป็นต้นกล้า จากนั้นย้ายต้นกล้าปลูกในดินชนิดร่วนปนทรายที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการใส่ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอย *M. incognita* จำนวน 1,000 ตัว/ต้น ใกล้เคียงบริเวณรากพริกแต่ละสายพันธุ์ ตั้งวางในกรงกันแมลงเป็นเวลา 30 วัน ทำการถอนต้นพริกและข้อมสีราก

บันทึกผล

1. นับจำนวนปมที่รากพริกแต่ละสายพันธุ์
2. นับจำนวนตัวเมียของไส้เดือนฝอยต่อน้ำหนักราก 1 กรัม
3. นับจำนวนไข่/1 กลุ่มไข่ ที่รากพริกแต่ละสายพันธุ์

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*) ในพันธุ์พริกต้านทานเปรียบเทียบกับพันธุ์อ่อนแอ

นำเมล็ดพันธุ์พริกขาวซึ่งต้านทานต่อโรครากปม โดยมีพันธุ์หัวเรือเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากปมเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ เพาะในกระดวยกรองชุ่มน้ำเป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อรากงอกย้ายปลูกในดินพีทเป็นเวลา 30 วันได้เป็นต้นกล้า จากนั้นย้ายต้นกล้าปลูกในดินชนิดร่วนปนทรายที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการใส่ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของ ไส้เดือนฝอย *M. incognita* จำนวน $1,000 \pm 100$ ตัว/ต้น ใกล์บริเวณรากพริก ตั้งวางในกรงกันแมลง ทำการถอนต้นพริกและข้อมสีรากทุกๆ วัน ครั้งละ 3 ต้น จนครบวงจรชีวิต

บันทึกผล

1. การเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยและระยะเวลาตั้งแต่เริ่มเข้ารากเจริญเติบโตเป็นระยะต่างๆ เปรียบเทียบระหว่างพันธุ์พริกต้านทานและพันธุ์พริกอ่อนแอ
 - ช่วงสัปดาห์ที่ 1 ทำการถอนต้นพริก ทุกๆ ชั่วโมง 3 ต้น/พันธุ์ และสัปดาห์ต่อไปถอนทุกๆ 24 ชั่วโมง 3 ต้น/พันธุ์ จนครบวงจรชีวิต
2. จำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายรากพริกพันธุ์ต้านทานเปรียบเทียบกับพันธุ์อ่อนแอ