บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยก *Pseudomonas solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชตระกูลมะเขือ

นำตัวอย่างพืชตระกูลมะเขือที่แสดงอาการเหี่ยว 3 ชนิด คือ พริกหวาน (sweet pepper) มะเขือม่วง (eggplant) และมะเขือเทศ (tomato) (ภาพ 1) จากแหล่งที่มีการปลูกพืชดังกล่าว 3 แหล่ง คือ พื้นที่ในเขตอำเภอ แม่ริม (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง หนองหอย) อำเภอเชียงดาว (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง ห้วยลึก) และอำเภอสะเมิง (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงปางคะ) มาทำการตรวจสอบขั้นต้น โดยการล้างรากและโคนต้นให้สะอาด ใช้กรรไกรตัดแต่งกิ่งที่คมตัดโคนต้นตามขวางออกเป็นท่อนๆ ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร นำส่วนที่มีแผลตามรอยตัดจุ่มลงในน้ำกรองที่บรรจุในบีกเกอร์ (beaker) เป็นเวลา 2 - 3 นาที เพื่อตรวจสอบการไหลของของเหลวสีขาวขุ่น หรือ ooze ที่ออกมาตามรอยตัด เมื่อพบแล้วจึงนำมาแยกแบคทีเรียสาเหตุของโรคเหี่ยว โดยตัดเนื้อเยื่อพืชบริเวณท่อน้ำท่ออาหารดังกล่าว นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย Clorox (Sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 10 % เป็นเวลา 3 นาที ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) ที่ปลอดเชื้อย้ายชิ้นเนื้อเยื่อพืชดังกล่าวมาวางบนอาหาร Nutrient Agar (NA) ที่เตรียมไว้ดังภาคผนวก 1 จำนวน 4 ชิ้น ต่อ 1 จาน จำนวน 2 จาน ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ปิดขอบจานอาหารด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำมาวางบนชั้นวางจานอาหารที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 - 3 วัน จากนั้นจึงคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรีย ซึ่งมีลักษณะที่คาดว่าเป็น *Pseudomonas solanacearum* กล่าวคือ มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น จากนั้นใช้ลูปที่ปลอดเชื้อแตะโคโลนีดังกล่าวแล้วนำมา streak บนอาหาร Tetrazolium Chloride Agar (TZC)ที่เตรียมไว้ตามภาคผนวก ข้อ 1 ปิดขอบจานอาหารและวางไว้ที่อุณหภู มิห้อง (28 ° C ± 2 ° C) เป็นเวลาประมาณ 2 วัน ตรวจสอบและคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวขุ่นตรงกลางมีสีชมพูแดง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *P. solanacearum* และนำมาเก็บในขวดไวแอล. จำนวน 2 หลอดต่อไอโซเลท เพื่อใช้เป็น stock culture ต่อไป

ภาพ 1 ลักษณะของมะเขือเทศที่แสดงอาการเหี่ยว ซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* เข้าทำลาย

2. การทดสอบ Pathogenicity ของ *Pseudomonas solanacerum* 8 ไอโซเลท

2.1 การเตรียมวัสดุปลูก

นำดินมาผสมกับขุยมะพร้าวและขี้เถ้าแกลบในปริมาณเท่าๆกับ โดยคลุกเคล้าให้เข้ากันและบรรจุลงถุงพลาสติก ขนาด 12 x 18 นิ้ว นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอเป็นเวลา หนึ่งชั่วโมงครึ่ง แล้วนำไปบรรจุลงถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 4 x 9 นิ้ว ปริมาณ 500 กรัมต่อถุง

2.2 การเตรียมกล้ามะเขือเทศ

นำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์ T 276 ลงเพาะในวัสดุเพาะ จากบริษัท เพื่อนเกษตรกร ที่บรรจุในถาดพลาสติกหลุมสีดำ ขนาด 130 x 45 เซนติเมตร จำนวน 145 หลุมต่อถาด รดน้ำเวลาเช้า ประมาณ 8.30 น. และเวลาเย็น 16.30 น. ในโรงเรือนที่กันแมลง จนกล้ามะเขือเทศ มีอายุ 30 วัน จึงพร้อมนำมาปลูก

2.3 การเตรียม inoculum ของเชื้อ *P. solanacearum*

นำเชื้อ *P. solanacearum* 8 ไอโซเลท (isolate) ที่แยกได้จากการทดลองที่ 1 ใน stock culture มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ลูปที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงใน suspension ของแบคทีเรีย ใน stock culture มา streak ลงบนผิวหน้าอาหาร NA ที่เตรียมไว้ตามข้อ1.ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ จากนั้นปิดขอบจานอาหารด้วยพาราฟิล์ม เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่นๆ นำมาวางบนชั้นวางจานอาหารที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 28 ^{0} C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เทลงในจานอาหาร 10 มิลลิลิตร ต่อจานอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขูดแบคทีเรียให้หลุดจากผิวหน้าของอาหารเบาๆ แล้วเทรวมกันในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จึงได้ cell suspension หรือ inoculum ของแบคทีเรียดังกล่าว จากนั้นนำมาวัดความเข้มข้นของ inoculum โดยเปรียบเทียบความขุ่นกับ suspension มาตราฐาน ที่ผ่านการวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความขุ่น 0.2 O. D. ช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 3 x 10 ^{8} cfu / ml

2.4 การปลูกเชื้อสาเหตุ

นำกล้ามะเขือเทศที่เตรียมไว้มาล้างรากให้สะอาด ตัดปลายรากด้วยกรรไกรที่คม จากนั้นนำไปแช่ลงใน inoculum ที่เตรียมไว้ดังข้อ 2.3 เป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปปลูกลงในวัตถุปลูกที่เตรียมไว้

2.5 การวัดผลการทดลอง

บันทึกลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น วัดผลความรุนแรงของโรคโดยดูจากอาการที่แสดงออกตามวิธีการของ Winstead and Kelman (1953) ดังนี้

ระดับการแสดงออกของโรคเหี่ยวแบ่งเป็น 6 ระดับดังนี้

ระดับ	0	หมายถึง	ไม่แสดงอาการเหี่ยว
ระดับ	1	หมายถึง	ใบแสดงอาการเหี่ยว 1 - 2 ใบ
ระดับ	2	หมายถึง	ใบแสดงอาการเหี่ยว 3 - 4 ใบ
ระดับ	3	หมายถึง	ยอดเริ่มแสดงอาการเหี่ยว
ระดับ	4	หมายถึง	ต้นพืชแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น
ระดับ	5	หมายถึง	ต้นเหี่ยวและแห้งตาย

การประเมินความรุนแรงของโรค โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยว} = \frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้น}} \times \frac{100}{\text{ระดับการเกิดโรคสูงสุด}}$$

2.6 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomize Design) 9 กรรมวิธี (treatment) 3 ซ้ำ (replication) ซ้ำละ 10 ต้น

3. การทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคเหี่ยวของแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacerum* ในมะเขือเทศ 8 พันธุ์

3.1 การเตรียมกล้ามะเขือเทศและการปลูกเชื้อสาเหตุ

นำกล้ามะเขือเทศชนิดผลเล็ก คือ มะเขือเทศเชอรี่ 5 พันธุ์ ได้แก่พันธุ์ Sweet Keneko , Red Sweet K.N. , Pep T.K. , Sweet Peto Seed และ Santa # 0392 และมะเขือเทศชนิดผลโต 3 พันธุ์ ได้แก่ Master No. 2 T.K., Taiwan และ Royard R.S.ที่เตรียมไว้ตามวิธีที่อธิบายไว้ดังข้อ 2.2 และเมื่อต้นกล้ามีอายุ 30 วัน นำมาล้างรากให้สะอาดตัดปลายรากเพียงเล็กน้อยด้วยกรรไกรที่คม แล้วนำมาแช่ลงใน inoculum ของ *P. solanacearum* ไอโซเลทที่ 8 (Ps.8) ที่ความเข้มข้น 3 X 10^8 cfu/ml เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปลูกลงในวัสดุปลูกที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.1

3.2 การวางแผนการทดลอง

โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomize Design) 8 กรรมวิธี ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น

3.3 การบันทึกผลการทดลอง

สังเกตุลักษณะอาการของโรคและวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยว ตามข้อ 2.5 หลังการปลูกเชื้อสาเหตุเป็นเวลา 3 5 และ 7 วัน ตามลำดับ

4. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งที่มีการปลูกพืช จำนวน 5 แหล่ง ดังนี้ อำเภอ แม่ริม (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง หนองหอย) อำเภอ เชียงดาว (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง ห้วยลึก) อำเภอ แม่แตง (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง แม่หลอด) อำเภอ หางดง (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง ทุ่งเรา) และอำเภอ เวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย (ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง แม่ปูนหลวง) โดยเก็บจากบริเวณรอบรากพืชที่ความลึกจากผิวหน้าดิน 15 - 50 เซนติเมตร จำนวน 5 จุด จุดละประมาณ 200 กรัม นำดินที่เก็บมาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำมาผึ่งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 คืน จึงนำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี Dilution Plate บนอาหาร 3 ชนิด คือ PDA , NA และ KB ตามวิธีของ Xu and Gross (1986) เริ่มจากชั่งดิน แหล่งละ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ (flask) ที่บรรจุน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายดิน (soil suspension) ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ยี่ห้อ Vertex ที่ความเร็วระดับ 3 เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้สารละลายดินมีการกระจายตัวอย่างสมบูรณ์ ซึ่งทำให้ได้สารละลายดินที่ความเข้มข้น 1 : 10 (10^{-1}) จากนั้นดูดสารละลายดินที่ความเข้มข้นดังกล่าวด้วย micropipette ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 15 นาที ได้สารละลายดินที่ความเข้มข้น 1 : 100 (10^{-2}) แล้วนำไปเจือจางลงเป็นลำดับ ตามวิธีการดังกล่าว จนได้ความเข้มข้นที่ 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} จากนั้นใช้ micropipette ที่ปลอดเชื้อดูดสารละลายดินในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหารแต่ละชนิด จำนวน 5 จานต่ออาหารแต่ละชนิด และต่อความเข้มข้นของสารละลายดิน จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยผิวหน้าอาหารให้ทั่ว ปิดขอบจานอาหารด้วยพาราฟิล์ม นำมาวางบนชั้นวางที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 - 3 วัน เมื่อพบการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงนำมาทำการตรวจสอบ แยกและจำแนกชนิด โดยคัดเลือกลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้บนอาหารแต่ละชนิดต่อไป

5. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ต่อต้านโรค ในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas solanacearum* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

5.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ดิน

นำเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆที่แยกได้จาก stock culture จำนวน 165 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ โดยเริ่มจากการย้ายเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรีย จาก stock culture มา

streak บนอาหาร NA บ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาเตรียม suspension ที่ความเข้มข้น 3 x 10^8 cfu /ml ในกรณีของเชื้อรา ใช้เข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเส้นใยของเชื้อราจาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน

5.2 การเตรียม *P. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยว

นำอาหาร NA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว มาเทลงในจานแก้วที่ปลอดเชื้อ 15 มิลลิลิตรต่อ 1 จานอาหารเพื่อเป็น basal layer เมื่ออาหารแข็งตัวแล้ว จึงนำ NA อีกส่วนที่เตรียมไว้ในหลอดแก้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งได้ปล่อยให้มีอุณหภูมิลดลง ประมาณ 45 - 50 ^{0} C โดยอุ่นใน water bath มาผสมกับ cell suspension ของ *P. solanacearum* ที่ความเข้มข้น 3 x 10^8 cfu / ml ปริมาตร 500 µl เขย่าให้ NA และเซลล์ของแบคทีเรียเข้ากันด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปเทลงในจานอาหาร NA ที่เป็น basal layer รอจนกระทั่งอาหารแข็งตัว จึงพร้อมที่จะนำไปใช้

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ดิน

นำกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลม (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ปากคีบ (forceps) ที่ปลอดเชื้อคีบชิ้นกระดาษกลมมาวางบนผิวหน้าอาหาร NA ที่มี *P. solanacearum* จากนั้นใช้ micropipette ที่ปลอดเชื้อดูด cell suspension ของแบคทีเรีย ของแต่ละไอโซเลท มาหยดลงบนชิ้นกระดาษกลม 20 µl ต่อ 1 ชิ้น โดยวาง 4 ชิ้นต่อ 1 จาน จำนวน 5 จานต่อ 1 ไอโซเลท โดยใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นชุดควบคุม กรณีที่เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ เป็นเชื้อรา ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดบริเวณปลาย ของโคโลนีของเชื้อราดังกล่าวออกเป็นชิ้นกลม (culture disc) ใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นดังกล่าว มาวางบนอาหาร NA ที่มีเชื้อ *P. solanacearum* เจริญอยู่ จำนวน 4 ชิ้น ต่อ 1 จาน เช่นกัน สำหรับชุดควบคุมใช้ชิ้นวุ้นเปล่าที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรคเจริญอยู่วางแทน บ่มเชื้อดังกล่าวทุกกรรมวิธีไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็น เวลา 3 วัน

5.4 การบันทึกผลการทดลอง

วัดเส้นผ่าศูนย์กลางพื้นที่บริเวณที่เกิด clear zone

6. การบ่งบอกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค

นำแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ที่ทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. solanacearum* ได้แก่ ไอโซเลท ที่ 14 , 19 และ 39 ที่แยกได้จาก อำเภอ แม่ริม มาทำการศึกษาลักษณะรูปร่างของโคโลนีบนอาหาร NA และทำการบ่งบอกชนิด โดยอาศัยความสามารถทางชีวเคมีตามระบบ API (Automatic Product Identification) โดยได้รับความร่วมมือในการตรวจสอบจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทย กรุงเทพมหานคร ฯ

7. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในสภาพเรือนทดลอง

7.1 เตรียมกล้ามะเขือเทศ

เตรียมกล้ามะเขือเทศพันธุ์ Pep T. K. ที่อายุ 30 วัน จำนวน 600 ต้น ในถาดหลุม

7.2 ระยะเวลาการทดลอง

ระหว่างเดือน สิงหาคม - ตุลาคม 2541

7.3 ขั้นตอนการทดลอง

นำกล้ามะเขือเทศที่ได้ไปปลูกเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว คือ *P. solanacearum* ที่ความเข้มข้น 3×10^{8} cfu / ml และปลูกเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค ชนิดใดชนิดหนึ่งใน 3 ชนิด คือ *Bacillus cereus* , *Pseudomonas aeruginosa* และ *P. putida* ที่ความเข้มข้น 3×10^{8} cfu/ ml ซึ่งได้อธิบายไว้ในข้อ 3.1 และ 3.2 ดังรายละเอียดของ 8 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค ก่อนการปลูกแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยว เป็นเวลา 30 นาที ด้วยวิธีการแช่ราก (ดูคำอธิบายในข้อ 2 .4)
กรรมวิธีที่ 2	ปลูกเชื้อสาเหตุของโรคก่อนการปลูกเชื้อด้วยเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค 30 นาที ด้วยวิธีการแช่ราก
กรรมวิธีที่ 3	ปลูกเชื้อด้วยวิธีการแช่รากใน inoculum ที่ผสมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรคและเชื้อสาเหตุของโรคเป็นเวลา 30 นาที

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อด้วยวิธีการราด inoculum ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรคในวัสดุปลูก 3 วัน ก่อนนำไปปลูกเชื้อสาเหตุ ด้วยวิธีการแช่ราก

กรรมวิธีที่ 5 แช่เมล็ดใน inoculumของเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค 30 นาที ก่อนนำไปแช่ในเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว 30 นาที

กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเพียงอย่างเดียว เป็นเวลา 30 นาที โดยวิธีการแช่ราก

กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อด้วย inoclum ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรคแต่ละชนิดด้วยวิธีการแช่ราก เป็นเวลา 30 นาที

กรรมวิธีที่ 8 ชุดควบคุม (Control) โดยแช่รากในน้ำกลั่น

7.4 การวางแผนการทดลอง

โดยวางแผนการทดลองแบบ Split plot ใน CRD(Completely Randomize Design) จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น

7.5 การบันทึกผลการทดลอง

สังเกตอาการของโรคและประเมินความรุนแรงของโรคตามวิธีของ Winstead and Kelman โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยว ตามข้อ 2.5 หลังจากย้ายปลูกที่ 7 14 21 28 และ 35 วัน

8 . การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรคในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในสภาพแปลงปลูก

8.1 การเตรียมแปลง

เตรียมแปลง ขนาด 1 x 4 เมตร จำนวน 30 แปลง โดยมีระยะห่างระหว่างแปลง 80 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างแถว 60 เซนติเมตร ยกแปลงสูง 20 เซนติเมตร จากนั้นขุดดินตากแดดเป็นเวลา 7 วัน และ วัด pH ดินได้ 7.15 ดังนั้นในการเตรียมแปลงจึงผสม ปุ๋ยหมักในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อ 1 ตารางเมตร และปุ๋ยเคมีสูตร 12 - 24 - 12 อัตรา 50 กรัมต่อ 1 ตารางเมตร ผสมคลุกเคล้ากับดินให้ทั่ว จากนั้นคลุมแปลงด้วยผ้าพลาสติกสีเงิน เจาะหลุมปลูก ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร จำนวน 20 หลุมต่อแปลง โดยมีระยะห่างระหว่างหลุม 40 x 40 เซนติเมตร

8.2 การเตรียมกล้ามะเขือเทศ

ใช้กล้ามะเขือเทศผลเล็กพันธุ์ Pep T.K. อายุ 30 วัน จำนวน 600 ต้น (ภาพ 2)

8.3 สถานที่การทดลอง

ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง หนองหอย อำเภอ แม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ (ภาพ 3)

8.4 ระยะเวลาการทดลอง

ระหว่างเดือน พฤศจิกายน 2541 ถึง มีนาคม 2542

ภาพ 2 ต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์ Pep T. K. ที่ อายุ 30 วัน

ภาพ 3 โรงเรือนที่ใช้ในการทดลอง ที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง หนองหอย อำเภอ แม่ริม จังหวัด เชียงใหม่

8.5 กรรมวิธีการทดลอง

ทำการปลูกเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค โดยวิธีแช่รากใน suspension ที่ความเข้มข้นเดียวกัน เป็นเวลา 30 นาที (ภาพ 4) ก่อนย้ายลงแปลงปลูก จากนั้นเมื่อปลูกมะเขือเทศแล้ว ทำ การราดด้วย เชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ต่อต้นอีกครั้งหนึ่ง โดยแบ่งกรรมวิธีออกเป็น 5 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่รากใน suspension ของ *Bacillus cereus* เป็นเวลา 30 นาที และราด *B. cereus* 30 มิลลิลิตร ต่อต้นหลังย้ายปลูก

กรรมวิธีที่2 แช่รากใน suspension ของ*Pseudomonas aeruginosa* เป็นเวลา 30 นาที และราด *P. aeruginosa* 30 มิลลิลิตร ต่อต้นหลังย้ายปลูก

กรรมวิธีที่ 3 แช่รากใน suspension ของ *P. putida* เป็นเวลา 30 นาที และราด *P. putida* 30 มิลลิลิตร ต่อต้นหลังย้ายปลูก

กรรมวิธีที่ 4 แช่รากใน suspension ผสมของเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค ทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 30 นาที และราด 30 มิลลิลิตร ต่อต้นหลังย้ายปลูก

กรรมวิธีที่ 5 แช่รากในน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที ชุดควบคุม

หลังจากนั้นทำการใช้น้ำแบบระบบน้ำหยด (ภาพ 5)ให้แก่มะเขือเทศ ในทุกกรรมวิธี จำนวน 2 ครั้ง ต่อ วัน

8.6 การวางแผนการทดลอง

โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) จำนวน 6 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ต้น

8.7 การบันทึกผลการทดลอง

สังเกตอาการของโรคและประเมินความรุนแรงของโรคตามวิธีของ Winstead and Kelman โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยว ตามข้อ 2.5 หลังจากย้ายปลูก 10 , 20 , 30 , 45 และ 60 วัน

ภาพ 4 การแช่รากมะเขือเทศ พันธุ์ Pep. T.K. ที่อายุ 30 วัน ใน suspension ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค 3 ชนิด คือ *Bacillus cereus* , *Pseudomonas aeruginosa* และ *P. putida* ที่ความเข้มข้น 3 x 10^{8} cfu/ml 30 นาที ก่อนการย้ายปลูก

ภาพ 5 ระบบการให้น้ำแบบน้ำหยด แก่มะเขือเทศหลังย้ายปลูก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University