บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การสกัดสารจากพืชสมุนไพรและการผสมสารสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำใบพืชสมุนไพรสด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นวัชพืช และเป็นพืชที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ ปลูกและขยายพันธุ์ง่ายพบอยู่ทั่วไปในท้องถิ่น โดยรวบรวมจากแหล่งต่างๆ ดังนี้

พลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.) จาก อ. สันป่าตอง จ. เชียงใหม่

ช้าพลู (*Piper samentosum* Rexb.) จาก ต. สุเทพ อ. เมือง จ. เชียงใหม่

ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn) จากบริเวณคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บัวตอง (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.bray จากบริเวณสถานีวิจัยอินทนนท์

ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* Kurz.) จากแปลงพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สาบหมา (*Eupatorium adenophorum* Spreng.) จากบริเวณสถานีวิจัยอินทนนท์

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Burm.) จากเรือนทดลอง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ทำการสกัดสารจากพืชสมุนไพรสดดังกล่าวด้วย 100% methanol โดยการหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งน้ำหนักให้ได้ชนิดละ 150 กรัมปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นยี่ห้อ Moulinex และแช่ในเมทานอล 250 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วกรองออกด้วยกระดาษกรอง Whatmam เบอร์ 1 โดยใช้เครื่องกรองซึ่งต่อกับ vacuum pump นำสิ่งกรองไประเหยตัวทำละลายให้แห้งด้วย Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 °C

นำสารสกัดหยาบ (crude extracts) ของพืชแต่ละชนิดมาผสมกับอาหาร PDA ให้ได้ความเข้มข้น 10,000 ppm โดยละลายสารสกัด 1 กรัมในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร PDA 90 มิลลิลิตร ขณะกำลังอุ่นอุณหภูมิประมาณ 50 °C และหยด tween 20 จำนวน

1 หยด เขย่าให้เข้ากันดีจากนั้นเทอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. จานละประมาณ 15 มิลลิลิตร และใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่ไม่ผสมสารสกัดเป็นชุดควบคุม (control)

3.2 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดออลเทอนาเรียของพืชผัก

การเก็บตัวอย่างพืชผักที่เป็นโรค

ทำการเก็บตัวอย่างใบของกะหล่ำปลีที่แสดงอาการใบจุดสีน้ำตาลอย่างชัดเจนจากแปลงเกษตรกร ต. สันผีเสื้อ อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ ผักกาดขาวปลีที่แสดงอาการใบจุดจากแปลงทดลองบริเวณคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หอมญี่ปุ่นที่แสดงอาการใบจุดสีม่วงจากฝ่ายงานคัดบรรจุมูลนิธิโครงการหลวง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เก็บใบแตงกวาญี่ปุ่นที่แสดงอาการใบจุด และใบมะเขือเทศที่แสดงอาการโรค early blight จากแปลงของสถานีเกษตรกลวงปางดะ อ. สะเมิง มูลนิธิโครงการหลวง

การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากพืชผักที่เป็นโรค

ทำการตรวจหาเชื้อสาเหตุด้วยวิธี Free hand section โดยการใช้มีดโกนที่คมและสะอาดตัดใบตรงที่เป็นแผลตามขวาง แล้วทำการ mount slide ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจากนั้นปิดด้วย cover glass แล้วนำไปตรวจหาส่วนต่างๆของเชื้อสาเหตุภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และทำการแยกเชื้อสาเหตุของโรคดังกล่าวโดยวิธี Single Spore Isolation จากการเขี่ยสปอร์เดี่ยวของ Alternaria แต่ละ species จากใบตัวอย่างพืชผักที่เป็นโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ด้วยเข็มเขี่ยปลายแหลมเล็ก (micro needle) วางบนอาหาร PDA และ PCA เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตรวจดูลักษณะรูปร่างของโคโลนีและสปอร์ของเชื้อราของแต่ละ species สำหรับบางชนิดที่ไม่สร้างสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง ทำการชักนำให้สร้างสปอร์ (ดังรายละเอียดในภาคผนวก) แล้วนำสปอร์มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test) เก็บเชื้อราที่พิสูจน์ชนิดของเชื้อราแล้วบน PDA slant เพื่อเก็บเป็น stock culture ไว้ทดสอบต่อไป

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

เตรียมเชื้อราที่จะใช้ทดสอบ โดยย้ายเชื้อราจากหลอดอาหารที่เป็น stock culture ลงเลี้ยงบนอาหาร PDA ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ยกลางวัน 30 °C กลางคืน 25 °C) เป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อเชื้อราเจริญสร้างโคโลนีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-7 ซม. ใช้ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer)

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ตัดเส้นใยที่บริเวณขอบโคโลนีพร้อมทั้งชิ้นวุ้นอาหารเป็นชิ้นกลม ในสภาพปลอดเชื้อ ทำการปลูกเชื้อด้วย Culture Disc Technique โดยใช้เข็มเขี่ยชิ้นวุ้นไป วางลงตรงกลางจุดกึ่งกลางของจานอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดและจานอาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารสกัด จำนวน 5 ซ้ำต่อสารสกัดแต่ละชนิด นำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลการเจริญเติบโตโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อทุก 4 วัน จำนวน 4 ครั้ง จนกว่าเชื้อราในอาหาร PDA ชุดควบคุมใกล้เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงหยุดวัดการเจริญ นำผลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดังสูตร (เกษม,2528)

$$\text{การยับยั้ง (\%)} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม} - \text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดทดลอง}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

เมื่อได้ผลจากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 7 ชนิดแล้ว จึงทำการคัดเลือกพืชสมุนไพรที่ให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของกะหล่ำปลี มาทดสอบในขั้นต่อไป

3.4 ศึกษาผลของสารสกัดจากสาบหมาและพลูคาวต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของกะหล่ำปลี

นำพืชสมุนไพร 2 ชนิด คือพลูคาวและสาบหมา ที่ได้คัดเลือดแล้วว่ามีประสิทธิภาพดีต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของกะหล่ำปลี มาทำการศึกษาดังนี้

3.4.1 เปรียบเทียบผลของสารสกัดจากสาบหมาและพลูคาวด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

นำพืชสมุนไพร 2 ชนิดคือ สาบหมา และพลูคาว มาทำการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ 50% และ 100 % methanol, ethanol 95% และ เหล้าขาว 35 ดีกรี โดยใช้ใบสาบหมาและใบพลูคาวสดหนัก 150 กรัมต่อ solvent 250 มิลลิลิตร และใช้ใบสาบหมาแห้ง 30 กรัม และใบพลูคาวแห้ง 20 กรัมจากการทำให้ใบพืชสด 150 กรัมของแต่ละชนิดให้แห้ง นำสารสกัดหยาบที่ได้ผสมกับอาหาร PDA ให้ได้ความเข้มข้น 10,000 ppm. มาทดสอบกับเชื้อรา *A. brassicicola* โดยวิธี Culture Disc Technique จากการปฏิบัติตามวิธีการและการทดสอบที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3.1 และ 3.3 จำนวน 8 ซ้ำต่อชนิดของพืชสมุนไพรและต่อสารสกัดในแต่ละ solvent

3.4.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพลูคาวและสาบหมาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. brassicicola* ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ

คัดเลือกตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการสกัดสารจากสาบหมาและพลูคาวจากผลการทดลองในข้อ 3.4.1 นำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบกับเชื้อรา *A. brassicicola* ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ โดยเตรียมสารสกัดหยาบจำนวน 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 กรัมผสมกับอาหาร PDA ให้ได้ความเข้มข้น 10,000 15,000 20,000 25,000 และ 30,000 ppm. แล้วทำการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* ตามวิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 3.1 และ 3.3

3.5 การทดสอบความเสถียรของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากสาบหมาและพลูคาวต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Alternaria brassicicola*

นำตัวทำละลายที่คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงในการสกัดสารจากสาบหมาและพลูคาว ในระดับความเข้มข้นที่ให้ผลดีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ที่ได้จากการทดสอบในข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 มาทดสอบความเสถียรของสารสกัด โดยเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1,3,6 และ 9 เดือน ก่อนนำมาผสมในอาหาร PDA เพื่อดูความคงฤทธิ์ของสารสกัดในช่วงระยะเวลาต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* โดยการปฏิบัติตามวิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 3.1 และ 3.3

3.6 ศึกษาผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรสองชนิดในการควบคุมโรคใบจุดของกะหล่ำปลีในสภาพเรือนทดลอง

การเตรียมวัสดุปลูก

นำดินแม่โจ้(ชื่อการค้าของดินผสม) ซึ่งมีส่วนผสมของ ดิน แกลบ ปุ๋ยคอก และ เปลือกถั่ว มาบรรจุถุงพลาสติกดำ ขนาด 5 x 10 นิ้ว จำนวน 220 ถุง โดยใส่ดินประมาณ ¾ ของถุง

การเตรียมกล้ากะหล่ำปลี

นำเมล็ดกะหล่ำปลี จากบริษัทเจียไต๋ จำกัด ลงเพาะในดินลำดวน (ชื่อการค้าดินผสม) ซึ่งบรรจุในถาดหลุมพลาสติก จำนวน 3 ถาด เมื่อต้นกล้าอายุได้ 14 วัน จึงพร้อมนำมาปลูก

การดูแลรักษา ทำการให้น้ำแก่ต้นกะหล่ำปลีทุกวันๆ ละครั้ง โดยให้ในปริมาณที่สม่ำเสมอ มีการใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 ถุงละประมาณ 1 ช้อนชาหลังย้ายปลูก 1 สัปดาห์ และใส่ปุ๋ยคอกอีกครั้ง

หลังจากปลูกได้ 4 สัปดาห์ และมีการฉีดพ่นสารฆ่าแมลงเป็นครั้งคราวเพื่อป้องกันการทำลายของเพลี้ยอ่อนและหนอนชอนใบ โดยสารฆ่าแมลงที่ใช้ได้แก่ เลนเนท (metomyl) อัตราความเข้มข้น 20-35 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และแอดแวนเตส (สมุนไพรกำจัดแมลง)อัตราความเข้มข้น 40-80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

การเตรียม Inoculum ของเชื้อ *Alternaria brassicicola*

การเตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งเพิ่มปริมาณโดยวิธี Flood Plate Technique จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วซึ่งผสมสารจับใบ (Apsa 80) ในอัตราความเข้มข้น 0.2 ต่อน้ำ 1 ลิตร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L)ขูดสปอร์ให้หลุดจากผิวหน้าอาหารเบาๆ แล้วเทรวมกันในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำสปอร์แขวนลอยกรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น จากนั้นนำมาวัดและปรับความเข้มข้นของ inoculum ให้ได้ปริมาณ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตรด้วยเครื่องมือ Haemacytometer

การเตรียมสารสกัดเพื่อฉีดพ่น

นำสารสกัดหยาบจากสาบหมาที่สกัดด้วย 50% methanol และพลูดาวที่สกัดด้วยเหล้าขาว 35 ดีกรี (ภาพที่4) ซึ่งได้ทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. brassicicola* มาทำการละลายน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 3 ระดับ และผสมสารจับใบ(Apsa 80)ในอัตรา 0.2 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ภาพที่ 5)

1) อัตราครึ่งหนึ่งที่ได้ผลในห้องปฏิบัติการ (10,000 ppm)
2) อัตราเท่ากับที่ได้ผลในห้องปฏิบัติการ (20,000 ppm)
3) อัตราสองเท่าที่ให้ผลในห้องปฏิบัติการ (40,000 ppm)

การปลูกเชื้อสาเหตุและการฉีดพ่นสารสกัด

จากการฉีดพ่นสารสกัดลงบนต้นกล้ากะหล่ำปลี อายุ 1 เดือน (ภาพที่2) ก่อนทำการปลูกเชื้อสาเหตุ 1 วัน ด้วยเครื่องพ่นขนาดเล็กยี่ห้อ foggy จำนวน 80 มิลลิลิตรต่อกรรมวิธี ด้วยน้ำหนักกดที่สม่ำเสมอเพื่อให้ปริมาณของสารสกัดที่เท่ากัน จากนั้นปลูกเชื้อสาเหตุที่ความเข้มข้นของ inoculum คือ 2.74×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยฉีดทางด้านบนและด้านข้างของต้นกะหล่ำปลี ห่างประมาณ 1 ฟุต จำนวน 50 มิลลิลิตรต่อกรรมวิธี และคลุมด้วยครอบพลาสติกใสขนาดกว้าง 1 เมตร ยาว 2 เมตร สูง 1 เมตรเพื่อรักษาความชื้น (ภาพที่ 3) ทิ้งไว้ 3 วันแล้วจึงเปิดพลาสติกออก ต่อมาทำการฉีดพ่นสารสกัดหลังจากปลูกเชื้อ ทุก 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง โดยวางแผนการทดลองแบบ

Spit Plot in CRD (Completely Randomized Design) จำนวน15 ซ้ำๆละต้นต่อกรรมวิธี โดยแบ่งเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาบหมาที่ความเข้มข้น 3 ระดับในการควบคุมโรคใบจุดของกะหล่ำปลี ซึ่งแบ่งออกเป็นกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธี 1 ไม่ปลูกเชื้อ (control)
2 ปลูกเชื้ออย่างเดียว (Inoc)
3 ปลูกเชื้อและฉีดพ่นสารสกัดสาบหมาที่ความเข้มข้น 10,000 ppm.
4 ปลูกเชื้อและฉีดพ่นสารสกัดสาบหมาที่ความเข้มข้น 20,000 ppm.
5 ปลูกเชื้อและฉีดพ่นสารสกัดสาบหมาที่ความเข้มข้น 40,000 ppm.

การทดลองที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพลูคาวที่ความเข้มข้น 3 ระดับในการควบคุมโรคใบจุดของกะหล่ำปลี ซึ่งแบ่งออกเป็นกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธี 1. ไม่ปลูกเชื้อ (control)
2. ปลูกเชื้ออย่างเดียว (Inoc)
3. ปลูกเชื้อและฉีดพ่นสารสกัดจากพลูคาวที่ความเข้มข้น 10,000 ppm.
4. ปลูกเชื้อและฉีดพ่นสารสกัดจากพลูคาวที่ความเข้มข้น 20,000 ppm.
5. ปลูกเชื้อและฉีดพ่นสารสกัดจากพลูคาวที่ความเข้มข้น 40,000 ppm.

การทดลองที่ 3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาบหมาและพลูคาวที่ความเข้มข้น 40,000 ppm ในการควบคุมโรคใบจุดของกะหล่ำปลี ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* ซึ่งแบ่งออกเป็นกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธี 1. ไม่ปลูกเชื้อ (control)
2. ปลูกเชื้ออย่างเดียว (Inoc)
3. ปลูกเชื้อและพ่นสารสกัดจากสาบหมาที่ ความเข้มข้น 40,000 ppm.
4. ปลูกเชื้อและพ่นสารสกัดจากพลูคาวที่ความเข้มขัน 40,000 ppm.
5. ปลูกเชื้อและพ่นสารสกัดจากสาบหมาผสมกับพลูคาวที่ความเข้มข้น 40,000 ppm.

สถานที่ทำการทดลอง

เรือนทดลอง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การบันทึกผลและประเมินผล

บันทึกลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น และประเมินความเสียหายที่เกิดจากโรค (สุภกิจ, 2536) โดยแบ่งออกเป็น 2 ค่า คือ

1. การหาปริมาณของโรค (disease intensity) โดยการนับจำนวนใบที่เป็นโรคต่อต้นแล้วนำมาคำนวนเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากจำนวนต้นทั้งหมดในแต่ละกรรมวิธี

2. ประเมินพื้นที่ใบที่เป็นโรคต่อต้นในแต่ละการทดลองจำนวน 15 ต้นต่อกรรมวิธี โดยแบ่งปริมาณของโรคออกเป็น 11 ระดับคือ 0-10 โดยที่ 0= ไม่มีอาการที่ใบ, 1=พื้นที่ใบเป็นโรค 10% จนถึง 10=พื้นที่ใบเป็นโรค100% รวมถึงอาการของใบร่วงที่เกิดจากโรคด้วย นำค่าที่ได้จากการปริมาณของโรคมาแปลเป็นค่าความเสียหายของพืช (crop loss) การประเมินความเสียหายกระทำโดยนำผลที่ได้จากการหาปริมาณของโรคมาคำนวนเป็นเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายหรือดัชนีการเข้าทำลายโดยมีสูตร

$$\% \text{ ดัชนีการเข้าทำลาย} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่มจัด}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของการเป็นโรค}}$$

ภาพที่ 2 ลักษณะต้นกล้ากะหล่ำปลี อายุ 1 เดือนก่อนทำการปลูกเชื้อสาเหตุ

ภาพที่ 3 ต้นกะหล่ำปลีหลังการปลูกเชื้อสาเหตุ แล้วคลุมด้วยพลาสติกใสเพื่อรักษาความชื้น

ภาพที่ 4 ลักษณะสารสกัดหยาบจากสาบหมาที่สกัดด้วย 50% methanol และสารสกัดพลูคาว (คาวตอง)ที่สกัดด้วยเหล้าขาว 35 ดีกรี หลังจากระเหยตัวทำละลายออกด้วย Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิ 50 °C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก

ข

ภาพที่ 5 ลักษณะของสารสะลายจากสาบหมาที่สกัดด้วยเมทานอล 50% และ พลูคาว (คาวตอง) ที่สกัดด้วยเหล้าขาว 35 ดีกรี ก่อนนำไปฉีดพ่นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ก. สารสกัดจากสาบหมา(สม) ข. สารสกัดจากพลูคาว (กต)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University