# บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ปลูกถั่วเขียวตั้งแต่วันที่ 20 เมษายน พ.ศ. 2543 ถึง วันที่ 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2543 เพื่อเก็บเมล็ดพันธุ์ที่แปลงทดลองการเกษตร ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ จากนั้นนำเมล็ดที่ได้ ไปลดความชื้น ที่ระดับอุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ระดับความชื้น 11 เปอร์เซ็นต์ ใส่ถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในถังสีดำ

การเตรียมเชื้อสาเหตุโรคพืชที่จะใช้ทดสอบ โดยใช้ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร เจาะเส้นใยรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ *Macrophomina phaseolina* นำมาวางบน PDA ผสมผงพืชสมุนไพรความเข้มข้น 0, 10, 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 วัน ที่ห้องปฏิบัติการโรคพืช ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่

การอบพืชสมุนไพร โดยหันพืชสมุนไพร 10 ชนิด คือ กระเทียม กระชาย กระเพรา ขิง ข่า ขมิ้น ดีปลี ตะไคร้ สะเดา และหอมหัวใหญ่ นำไปอบลดความชื้นได้ 3 เปอร์เซ็นต์โดยใช้ซิลิก้า (silica gel)แล้วบดให้เป็นผง ที่ศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 7 ต.แม่เหียะ อ.หางดง จ.เชียงใหม่

การคลุกเชื้อกับเมล็ด โดยนำเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์ละ 1,000 เมล็ด ผสมกับสารจับพื้นผิว (Surfactant) แล้วคลุกด้วยเส้นใยเชื้อ *Macrophomina phoseolina* จำนวน 1 x $10^6$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผึ่งให้แห้ง แล้วคลุกด้วยผงพืชสมุนไพรต่าง ๆ

การทดสอบคุณภาพเบื้องต้นของเมล็ดพันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ใช้ถั่วเขียว 8 พันธุ์ คือ

ถั่วเขียวผิวมัน ได้แก่ พันธุ์กำแพงแสน1 (KPS1) พันธุ์กำแพงแสน2 (KPS2) พันธุ์ชัยนาท 36(CN36) พันธุ์ชัยนาท60 (CN60) พันธุ์ชัยนาท72 (CN72) และพันธุ์อู่ทอง1 (UT1)

ถั่วเขียวผิวดำ ได้แก่ พันธุ์อู่ทอง2 (UT2)และพันธุ์พิษณุโลก2 (PT2) นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวของแต่ละพันธุ์ไปทดสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์เบื้องต้นดังต่อไปนี้

### 1.ความงอกของเมล็ดพันธุ์ (Seed germination)

ทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานโดยเพาะเมล็ดระหว่างกระดาษเพาะชื้น(Between paper method) ตามกฎการทดสอบความงอกของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 1999) โดยนำเมล็ดพันธุ์มาพันธุ์ละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด เพาะในกระดาษสำหรับเพาะเมล็ด จากนั้นเก็บไว้ในตู้

เพาะที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (°C) ตรวจนับความงอกในวันที่ 7 หลังจากเพาะ ประเมินผลต้นกล้าปกติ (normal seedling) แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความงอก

2. ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (Seed vigor test) ดังนี้

2.1 ทดสอบด้วยการเร่งอายุ (Accelerated aging test) นำเมล็ดพันธุ์ในแต่ละพันธุ์ พันธุ์ละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด ใส่ลงในขวดเร่งอายุ ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ใส่น้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร นำไปไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิคงที่ 41±2 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดมาทดสอบความงอกมาตรฐานโดยเพาะเมล็ดระหว่างกระดาษ(Between paper method)

2.2 การทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์โดยวิธีทางชีวเคมี (Tetrazolium test) สุ่มเมล็ดพันธุ์ในแต่ละพันธุ์ ๆ ละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด แช่ในสารละลาย 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride ที่มี pH 6.5-7.5 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้ววางไว้ในที่มืด เมื่อครบกำหนดล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่น แกะเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ตรวจดูการติดสีตามตำแหน่งต่าง ๆ ของเมล็ดพันธุ์

2.3 การทดสอบด้วยวิธีวัดค่านำไฟฟ้า (Electrical conductivity test) สุ่มเมล็ดถั่วเขียว ในแต่ละพันธุ์ ๆ ละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 25 เมล็ด ชั่งน้ำหนักเมล็ด แล้วแช่ในน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร นำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 20 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นรินน้ำที่แช่เมล็ดมาวัดการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง Fisher conductivity meter model 152 แล้วรายงานผลการทดสอบการนำไฟฟ้า ที่มีหน่วยเป็นไมโครโมส์ต่อกรัม (micromhos/gram)(Perry,1981) แล้วคำนวณค่านำไฟฟ้าจากสมการดังนี้

$$\text{ค่าการนำไฟฟ้า} = \frac{\text{ค่านำไฟฟ้า}}{\text{น้ำหนักเมล็ด 25 เมล็ด (gram)}} \quad \text{(micromhos/cm)}$$

2.4 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Seedling growth rate) นำเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละพันธุ์ ๆ ละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด วางลงในกระดาษเพาะ 2 แถว ๆ ละ 25 เมล็ด นำไปเพาะ แล้ววัดความยาวของยอดและราก อบต้นกล้า ที่ระดับอุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าจากสมการดังนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (กรัม/จำนวนต้น/7 วัน)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของต้นกล้า}}{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}}$$

**3. การตรวจเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว**

3.1 ทดสอบเชื้อโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter method) โดยใช้กระดาษฟาง 3 แผ่น กระดาษกรอง 2 แผ่น วางเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละพันธุ์ลงในจานแก้ว(petri dishes) ทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 เมล็ด

3.2 ทดสอบเชื้อโดยวิธีเพาะบนอาหารวุ้น(Agar method) PDA ฆ่าเชื้อที่ติดมากับเปลือกเมล็ดพันธุ์ด้วย คลอรอกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้ววางเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละพันธุ์ลงในจานอาหาร PDA เพื่อดูเชื้อรา

จากนั้นแบ่งเป็น 2 การทดลองคือ

**การทดลองที่ 1** การทดสอบประสิทธิภาพของผงพืชสมุนไพรต่อการเจริญของเชื้อ *Macrophomina phaseolina*

วางแผนการทดลองแบบ 10 x 5 factorial in Completely Randomized Design มี 2 ปัจจัย จำนวน 6 ซ้ำ คือ

**ปัจจัยที่ 1** ได้แก่ ชนิดของผงพืชสมุนไพร 10 ชนิด คือ

กระเทียม

กระชาย

กระเพรา

ขิง

ข่า

ขมิ้น

ดีปลี

ตะไคร้

สะเดา

หอมหัวใหญ่

**ปัจจัยที่ 2** ได้แก่ ระดับความเข้มข้นของผงพืชสมุนไพร 5 ระดับได้แก่

0 กรัมต่อลิตร

10 กรัมต่อลิตร

20 กรัมต่อลิตร

30 กรัมต่อลิตร

40 กรัมต่อลิตร

โดยผสมผงพืชสมุนไพรแต่ละชนิดในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันลงในอาหาร PDA แล้วนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 ซม. วางบนอาหาร PDA เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใย จำนวน 8 ซ้ำ ซ้ำละ 4 plates เป็นเวลา 3 วัน

**การทดลองที่ 2** การศึกษาประสิทธิภาพของผงพืชสมุนไพรต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด ผสมสารจับพื้นผิว จากนั้นนำผงพืชสมุนไพรความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อได้ดีที่สุด นำมาคลุกเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 8 พันธุ์ นำไปทดสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ดังต่อไปนี้

2.1 ความงอกของเมล็ดพันธุ์ (Seed germination) ทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานโดยเพาะเมล็ดระหว่างกระดาษ(Between paper method) ทั้งในห้องปฏิบัติการของภาควิชาพืชไร่และภาควิชาโรคพืช และทดสอบความงอกในดิน(Larry O. *et al.*, 1995) ที่ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.2 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าโดยเพาะเมล็ดถั่วเขียวลงในดิน อบต้นกล้าที่ระดับอุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าจากสมการดังนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (กรัม/จำนวนต้น/7 วัน)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของต้นกล้า}}{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}}$$

2.3 วัดความสูงของต้นกล้าที่เพาะในดินเมื่อครบ 7 วัน แล้ววัดตั้งแต่โคนต้นถึงใบจริงคู่แรก

**วิธีการเก็บข้อมูล**

แบ่งการเก็บข้อมูลออกเป็น 5 ส่วนได้แก่

1. หาน้ำหนักเมล็ด 100 เมล็ด
2. หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราดังสมการต่อไปนี้(ธรรมศักดิ์, 2528)

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

3. หาผงพืชสมุนไพรที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมในการควบคุมเชื้อโดยเปรียบเทียบจากการทดลองในห้องปฏิบัติการโรคพืช

4. หาเปอร์เซ็นต์ความงอกของต้นกล้าที่คลุกด้วยสารสกัดจากผงพืชสมุนไพรในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

5. หาความแข็งแรงของเมล็ดถั่วเขียวหลังจากคลุกด้วยสารสกัดจากผงพืชสมุนไพร

6. ศึกษาลักษณะต้นกล้าที่ปกติและผิดปกติ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University