บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะอาการของโรคและการแยกเชื้อ

1.1 การเก็บตัวอย่างพืชและการศึกษาลักษณะอาการของโรค

ทำการเก็บตัวอย่างใบ กิ่งก้านและผลมะเขือเทศที่แสดงอาการของโรคเออลี่ไบลท์ (early blight) จากแปลงทดลองของสถานีวิจัยเกษตรที่สูงปางดะ มูลนิธิโครงการหลวง อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่ มาศึกษาและตรวจลักษณะอาการของโรคโดยละเอียด

1.2 การตรวจเชื้อและการแยกเชื้อ

นำใบ กิ่งก้านและผลมะเขือเทศที่แสดงอาการของโรคตามข้อ 1.1 มาทำการตรวจหาเชื้อสาเหตุด้วยการตัดบริเวณที่เป็นแผลตามขวางโดยใช้มีดโกนที่คมและสะอาด (Free Hand Section Technique) แล้วทำการ mount slide ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นปิดด้วย cover glass แล้วนำไปตรวจหาเชื้อสาเหตุภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด compound microscope

นำใบมะเขือเทศที่แสดงอาการของโรคเออลี่ไบลท์มาตัดออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 2 x 2 มิลลิเมตร โดยตัดบริเวณริมแผลตรงรอยต่อระหว่างส่วนที่เป็นแผลและส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อปกติ จากนั้นนำมาแช่ด้วย Clorox 10 % นาน 3 นาที แล้วนำไปวางบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ที่อยู่ภายในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petridish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ย 30 องศาเซลเซียส ตอนกลางวัน และ 25 องศาเซลเซียส ตอนกลางคืน) รอจนกระทั่งมีเส้นใยของเชื้อราสาเหตุเจริญออกมา จึงทำการแยกเชื้อราดังกล่าวออกมาเก็บไว้ในหลอดแก้วที่มีอาหาร PCA เอียง (Potato Carrot Agar slant) เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test) ของเชื้อราที่แยกได้

2.1 การเตรียมกล้ามะเขือเทศ

นำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์มาสเตอร์ เบอร์ 2 ที่สั่งซื้อผ่านสถานีวิจัยเกษตรที่สูงปางดะ มูลนิธิโครงการหลวง อ.สะเมิง มาเพาะบนวัสดุเพาะเมล็ดสำเร็จรูป (medium) ตรายูนนาน ในถาดหลุมขนาด 104 หลุมต่อถาด โดยเพาะ 2 เมล็ดต่อหลุม จากนั้นรดน้ำจนวัสดุเพาะเปียกทั่วถึงกันทั้งหมด รดน้ำให้สม่ำเสมอทุก ๆ วัน จนกระทั่งกล้ามะเขือเทศมีอายุประมาณ 2 สัปดาห์ จึงทำการถอนกล้ามะเขือเทศ เหลือต้นที่แข็งแรงไว้หลุมละ 1 ต้นเท่านั้น เมื่อกล้ามะเขือเทศมีอายุได้ประมาณ 3 สัปดาห์ จึงทำการย้ายปลูกลงกระถางหรือแปลงปลูก เพื่อทำการทดลองต่อไป

2.2 การชักนำให้เชื้อราสร้างสปอร์ (spore induction)

หลังจากแยกเชื้อราบริสุทธิ์ได้แล้ว (จากข้อ 1.2) เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ไม่พบการสร้างสปอร์จึงนำไปชักนำให้สร้างสปอร์ โดยใช้แผ่นสไลด์แก้วขูดเส้นใยบริเวณผิวหน้าของอาหาร PDA ออก แล้วนำไปผ่านน้ำก๊อกไหล (running tap water) นานประมาณ 30 นาที จากนั้นแช่ในน้ำสะอาดนานประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาคว่ำให้เอียงด้านหนึ่งสูงจากพื้นเล็กน้อย เพื่อให้อากาศเข้าไปสัมผัสกับเชื้อราได้ ทิ้งไว้ประมาณ 2 วัน เพื่อให้เชื้อราสร้างสปอร์ตามวิธีของ Ludwig และคณะ (1962)

2.3 การเตรียม inoculum และการปลูกเชื้อ

เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์แล้วนำมาเตรียม inoculum (spore suspension) โดยเทน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วและทิ้งไว้ให้เย็น ถูเบา ๆ ที่บริเวณผิวหน้าของอาหารให้ทั่ว แล้วนำมาตรวจนับจำนวนของสปอร์ด้วย heamacytometer โดยปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ประมาณ 2.81×10^3 และ 3.46×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดพ่นบนต้นมะเขือเทศที่มีอายุประมาณ 6 สัปดาห์ โดยใช้ความเข้มข้นละ 5 ต้น สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำสะอาดฉีดพ่น จากนั้นนำต้นมะเขือเทศที่ปลูกเชื้อแล้วมาเก็บไว้ใน ครอบพลาสติกซึ่งช่วยรักษาสภาพภายในให้ชื้นอยู่เสมอ (moist chamber) โดยใช้ท่อ PVC ขนาด 6 หุน เป็นโครงสร้าง (ภาพที่ 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2 ลักษณะของ moist chamber ที่ใช้ท่อ PVC เป็นโครงสร้างและมีพลาสติกครอบไว้

3. การเตรียมสารสกัดหยาบจากรากและใบของแฝกหอม

พืชสมุนไพรที่นำมาสกัดคือ แฝกหอม (*Vetiveria zizanioides (Linn.) Nash*) พันธุ์สงขลา 3 อายุ 6 เดือน โดยนำใบของแฝกหอมมาตัดเป็นท่อนสั้น ๆ แล้วผึ่งให้แห้งในร่ม ส่วนรากนำมาล้างเอาเศษดินที่เกาะรากออกให้หมดด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งแล้วตัดเป็นท่อนสั้น ๆ นำแฝกหอมทั้งสองส่วนมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดที่มีลักษณะคล้ายเครื่องบดเนื้อหมู (ภาพที่ 3) จากนั้นนำใบและรากที่บดละเอียดแล้ว (ภาพที่ 4) ชนิดละ 200 กรัม มาแช่ในตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทธานอล เฮกเซนและอะซีโตน ชนิดละ 1,500 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วกรองเอาตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 โดยใช้เครื่องกรองซึ่งต่อกับ vacuum pump นำของเหลวที่ได้จากการกรองไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3 เครื่องบดที่ใช้ในการบดรากและใบแฝกหอมให้ละเอียด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 4 ลักษณะของรากและใบแฝกหอมที่บดแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากรากและใบของแฝกหอมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria solani* Sor. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการทดสอบ

นำสารสกัดหยาบ (Crude extract) จากรากและใบแฝกหอมที่สกัดได้ในข้อ 3 ซึ่งเป็นของเหลว ในสารตัวทำละลาย (solvent) แต่ละชนิด ชนิดละ 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัม ตามลำดับ มาละลายด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ในการสกัด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ผสมกับอาหาร PDA 90 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ขณะกำลังอุ่นอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 8 มิลลิลิตร ล้างคราบสารสกัดที่ติดค้างอยู่กับภาชนะ เทลงไปผสมกับอาหาร PDA นั้นด้วย เขย่าให้เข้ากันดีแล้วเทอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ได้อาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบเข้มข้น 500 1,000 5,000 10,000 และ15,000 ppm ตามลำดับ กำหนดให้มีชุดควบคุม (control) ที่ไม่ผสมสารสกัด จำนวน 2 ชุด ได้แก่ ชุดแรกใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิด ๆ ละ 2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 8 มิลลิลิตร ชุดหลังใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร นำเชื้อรา *A. solani* ที่เจริญบนอาหาร PDA อายุประมาณ 7 วัน มาตัดเป็นชิ้นกลมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ลนไฟฆ่าเชื้อและทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว จากนั้นใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตักชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราอยู่ มาวางตรงกึ่งกลางจานอาหารที่ผสมสารสกัดแต่ละชนิด (Culture Disc Technique) ทั้งหมดทำภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ (ใน Laminar Air Flow) นำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดผลการเจริญเติบโตโดยเริ่มวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราหลังจากปลูกเชื้อ 3 วัน และวัดต่อไปทุก ๆ 3 วัน จนกว่าเชื้อราบนอาหาร PDA ชุดควบคุมเจริญใกล้เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงหยุดวัดการเจริญ นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (ดูวิธีการคำนวณจากภาคผนวก) สารสกัดใดที่ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. solani* ได้ดีที่สุดจะถูกนำไปใช้กับการทดลองจากนี้ต่อไป

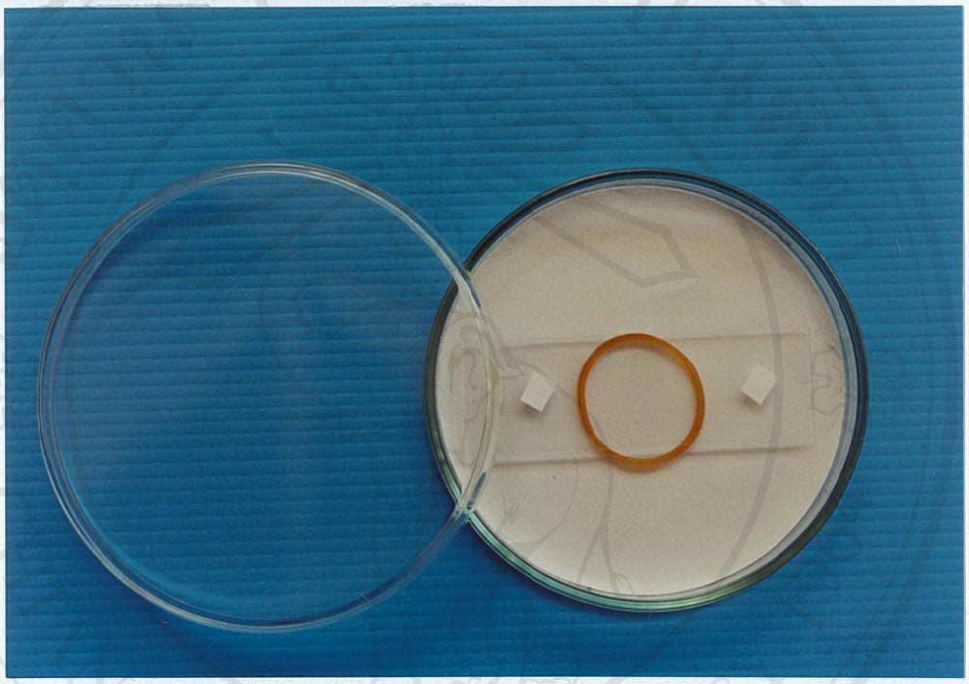
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากรากแฝกหอมในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria solami* Sor.

วิธีการทดสอบ

นำสารสกัดจากรากแฝกหอมที่ใช้อะซีโตนเป็นตัวทำละลาย (สกัดได้ตามข้อ 3) มาเตรียมให้มีความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับ คือ 500 1,000 5,000 10,000 15,000 และ 20,000 ppm จากนั้นหยดสารสกัดดังกล่าวปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงไปบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 ซึ่งตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ วางบน slide แก้ว แล้วทิ้งไว้นานประมาณ 15 นาที หรือจนกระทั่งอะซีโตนระเหยไปหมด แล้วจึงหยด spore suspension ของเชื้อรา *A. solani* ที่มีความเข้มข้น $3.78x10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงไปอีก 10 ไมโครลิตร จากนั้นรอจนกระทั่งถึงเวลาที่สปอร์งอกเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะชื้น (สมภพ, 2544) แล้วทำการหยด cotton blue ใน lactophenol ลงไปเพื่อหยุดการเจริญและย้อมสี สปอร์ ปิด cover glass นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า ตรวจนับจำนวน สปอร์ที่งอกและไม่งอกในแต่ละกรรมวิธี (treatment) โดยนับจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 สปอร์ แล้วคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยกำหนดให้ชุดควบคุมมี 2 ชุด ได้แก่ ชุดแรกใช้น้ำสะอาดปลอดเชื้อ และอีกชุดหนึ่งใช้อะซีโตน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 5 การทดสอบความงอกของสปอร์ โดยใช้เทคนิค Glass Slide Bioassay (Pusky และคณะ, 1982) ซึ่งดัดแปลงจากการใช้กระดาษกรองแบคทีเรีย (millipore filter) มาเป็นการใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แทน และย้อมสีด้วย cotton blue

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากรากแฝกหอมในการควบคุมโรคเออลี่ไบลท์ของมะเขือเทศในสภาพเรือนทดลอง

วิธีการทดสอบ

เตรียม inoculum ของเชื้อรา *A. solani* ให้มีความเข้มข้น 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาปลูกเชื้อลงบนต้นมะเขือเทศที่มีอายุ 5 สัปดาห์ ซึ่งปลูกอยู่ในกระถางพลาสติกขนาด 6 นิ้ว (วิธีการเดียวกับข้อ 2) แล้วทำการฉีดพ่นสารสกัดจากรากแฝกหอมลงไปบนต้นมะเขือเทศหลังจากที่ได้ปลูกเชื้อไปแล้ว 1 ชั่วโมง ดังรายละเอียดของกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ปลูกเชื้อ (control)

2 ปลูกเชื้ออย่างเดียว (Inoculation)

3 ปลูกเชื้อและพ่นไดเทน เอ็ม-45 อัตรา 80 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

4 ปลูกเชื้อและพ่นสารสกัดจากรากแฝกหอมเข้มข้น 5,000 ppm

5 ปลูกเชื้อและพ่นสารสกัดจากรากแฝกหอมเข้มข้น 10,000 ppm

6 ปลูกเชื้อและพ่นสารสกัดจากรากแฝกหอมเข้มข้น 5,000 ppm ที่ผสมไดเทน เอ็ม-45 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (1/2 ของอัตราที่แนะนำ 80 กรัมต่อน้ำ 2 ลิตร)

7 ปลูกเชื้อและพ่นสารสกัดจากรากแฝกหอมเข้มข้น 10,000 ppm ที่ผสมไดเทน เอ็ม-45 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 10 ซ้ำ หลังจากฉีดพ่นสารสกัดในครั้งแรกแล้วทำการฉีดพ่นสารสกัดอีก 3 ครั้ง โดยให้ห่างกันครั้งละ 7 วัน

ทำการบันทึกลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น และประเมินความเสียหายที่เกิดจากโรคหลังจากที่ทำการฉีดพ่นสัปดาห์ที่ 4 ผ่านไป ตามวิธีการที่สืบศักดิ์ (2540) ได้อธิบายไว้ โดยแบ่งออกเป็น 2 ค่า คือ

1. เปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรคต่อต้น (percentage of infected leaves) โดยการนับจำนวนใบที่เป็นโรคต่อต้นแล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากจำนวนใบทั้งหมดภายในต้นนั้นในแต่ละกรรมวิธี
2. เปอร์เซ็นต์ดรรชนีการทำลาย (disease index) โดยประเมินพื้นที่ใบที่เป็นโรคต่อต้นทุกซ้ำในแต่ละกรรมวิธี เพื่อนำค่าที่ได้มาแปลเป็นค่าของความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้น (disease severity) โดยแบ่งความรุนแรงออกเป็น 5 ระดับ คือ 0-4 เมื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระดับ 0 = ใบมะเขือเทศไม่มีอาการของโรคเออลี่ไบลท์เลย
ระดับ 1 = มีอาการแผล 1-25 % ของพื้นที่ใบทั้งหมด
ระดับ 2 = มีอาการแผล 26-50 % ของพื้นที่ใบทั้งหมด
ระดับ 3 = มีอาการแผล 51-75 % ของพื้นที่ใบทั้งหมด
ระดับ 4 = มีอาการแผล 76-100 % ของพื้นที่ใบทั้งหมด
(รวมทั้งที่แห้งจากโรคติดอยู่กับต้น)

การประเมินค่าความเสียหายของพืช โดยนำเอาผลการวัดระดับความรุนแรงของโรคที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ใบพืชถูกทำลายหรือดรรชนีการทำลายพืชของเชื้อโรค โดยใช้สูตรคำนวณที่นิยมกัน คือ สูตรของ McKinney (1923) (อ้างโดยสืบศักดิ์, 2540) ดังนี้

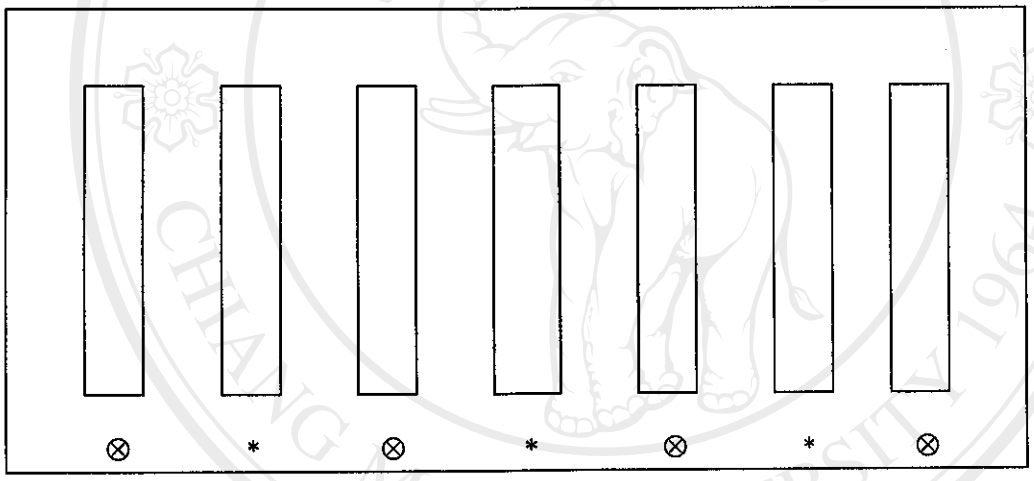
$$\% \text{ ดรรชนีการทำลาย} = \frac{\text{ผลรวมของความรุนแรงของโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่มวัด}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของความรุนแรงของโรค}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากรากแฝกหอมในการควบคุมโรคเออลี่ไบลท์ของมะเขือเทศในสภาพแปลงปลูก

วิธีการทดสอบ

เตรียมแปลงทดลองขนาด กว้าง 1 เมตร ยาว 30 เมตร ณ สถานีวิจัยเกษตรที่สูงปางดะ มูลนิธิโครงการหลวง อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่ จำนวน 3 แปลง และเตรียมแปลงปลูกแบบเดียวกันอีก 4 แปลง สลับกับแปลงทดลองทั้ง 3 แล้วใช้ผ้าพลาสติกคลุมแปลงโดยให้ด้านที่มีสีเงินอยู่ด้านบน เจาะหลุม 2 แถว ตามความยาวของแปลงทดลอง ให้แต่ละหลุมห่างกัน 40 เซนติเมตร เพื่อใช้ปลูกพืชเป็นแนวป้องกัน (guard row) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แผนผังแปลงทดลอง ณ สถานีวิจัยเกษตรที่สูงปางดะ มูลนิธิโครงการหลวง อ. สะเมิง จ. เชียงใหม่

แบ่งแปลงทดลองแต่ละแปลงออกเป็นแปลงเล็ก ๆ จำนวน 6 แปลง โดยปลูกพืชเป็นแนวป้องกันกั้นระหว่างแปลง ปลูกกล้ามะเขือเทศอายุ 3-4 สัปดาห์ ลงไป จนกระทั่งต้นมะเขือเทศมีอายุได้ 6 สัปดาห์ **จึงทำการฉีดพ่นสารสกัดจากรากแฝกหอมลงไปบนต้นมะเขือเทศที่ปล่อยให้เกิดโรคเออลี่ไบลท์ ตามธรรมชาติ (natural infection)** โดยการทดลองมี 6 กรรมวิธีดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (control) ไม่ฉีดพ่นสารใด ๆ

2 ฉีดพ่นไดเทน เอ็ม-45 อัตรา 80 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

3 ฉีดพ่นสารสกัดจากรากแฝกหอมเข้มข้น 5,000 ppm

4 ฉีดพ่นสารสกัดจากรากแฝกหอมเข้มข้น 10,000 ppm

5 ฉีดพ่นสารสกัดจากรากแฝกหอมเข้มข้น 5,000 ppm ที่ผสมไดเทน เอ็ม-45 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (1/2 ของอัตราที่แนะนำ 80 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร)

6 ฉีดพ่นสารสกัดจากรากแฝกหอมเข้มข้น 10,000 ppm ที่ผสมไดเทน เอ็ม-45 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 ต้น หลังจากฉีดพ่นสารสกัดในครั้งแรกแล้ว ทำการฉีดพ่นสารสกัดอีก 4 ครั้ง โดยให้ห่างกัน ครั้งละ 7 วัน หลังจากครบตามกำหนด ทำการบันทึกลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น และประเมินค่าความเสียหายที่เกิดจากโรค เช่นเดียวกับข้อ 6 โดยทำการสุ่มบันทึกตัวอย่างซ้ำละ 10 ต้นต่อกรรมวิธี

8. การแยกชนิดของสารสกัดด้วย Thin Layer Chromatography (TLC)

ใช้แท่งแก้วจิ๋ว (capillary tube) ที่ลนไฟแล้วดึงให้ขาดออกจากกันพร้อมทั้งหักปลายเล็กน้อย เพื่อให้ปลายของแท่งแก้วมีรูขนาดเล็ก หยดสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยอะซีโตนจากรากแฝกหอม (ในข้อ 3) ลงบนแผ่นกระจกที่เคลือบด้วยแผ่นซิลิกาเจล (silica gel 60 F 254) สำเร็จรูป ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร (Merk) ทิ้งไว้ประมาณ 15 – 20 นาที เพื่อให้อะซีโตนระเหยหมดไป จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายตัวพาที่ประกอบไปด้วย 2 % dichloromethane ใน ethyl acetate ทิ้งไว้ให้สารละลายตัวพาระเหยออกไปจนหมด นำไปรมด้วยไอของ iodine ที่อิ่มตัว นานประมาณ 60 นาที ตรวจหาแถบสีของสารสกัดที่แยกตัวออกมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. TLC-Bioassay

เตรียม spore suspension ของเชื้อรา *Alternaria solani* Sor. เข้มข้น $2.13x10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้อาหารเหลว PDB (Potato Dextrose Broth) แทนน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มาฉีดพ่นลงบนแผ่นกระจกเคลือบที่ผ่านการแยกแถบสารสกัด (ตามข้อ 8) แล้ววางลงในกล่องพลาสติกชื้นซึ่งได้ฉีดพ่นละอองน้ำสะอาดไว้ก่อน เพื่อให้เกิดความชื้นบ่มเชื้อบนแผ่นซิลิกาเจลไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน นำมาตรวจวัดบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved