บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อราจากผิวใบพืชตระกูลผักกาด

1.1 การแยกเชื้อจากผิวใบพืช

เก็บตัวอย่างใบพืชตระกูลผักกาด 5 ชนิดที่สมมบูรณ์ แข็งแรงและไม่เป็นโรค ได้แก่ กะหล่ำปลี ผักกาดขาว ผักกาดเขียวปลี บร็อคโคลี่ และคะน้า จาก 4 แหล่ง ได้แก่

1. โครงการหลวงดอยอินทนนท์ อำเภอจอมทองจังหวัดเชียงใหม่
2. แปลงเกษตรกร อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน
3. แปลงพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. แปลงผักเกษตรเขตชลประทาน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นำใบผักที่เก็บจาก 4 แหล่งมาแช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สปอร์และเส้นใยของเชื้อราชนิดต่างๆ ที่อยู่บนใบพืชตกลงในน้ำกลั่นที่แช่เพื่อใช้เป็น spore suspension นำ spore suspension ที่ได้มาทำการ streak plate บนอาหาร PDA ที่หยดกรด lactic จำนวน 10 หยดต่ออาหาร PDA 1 ลิตร เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อราสร้างสปอร์และเส้นใยบนอาหาร PDA

1.2 การแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์

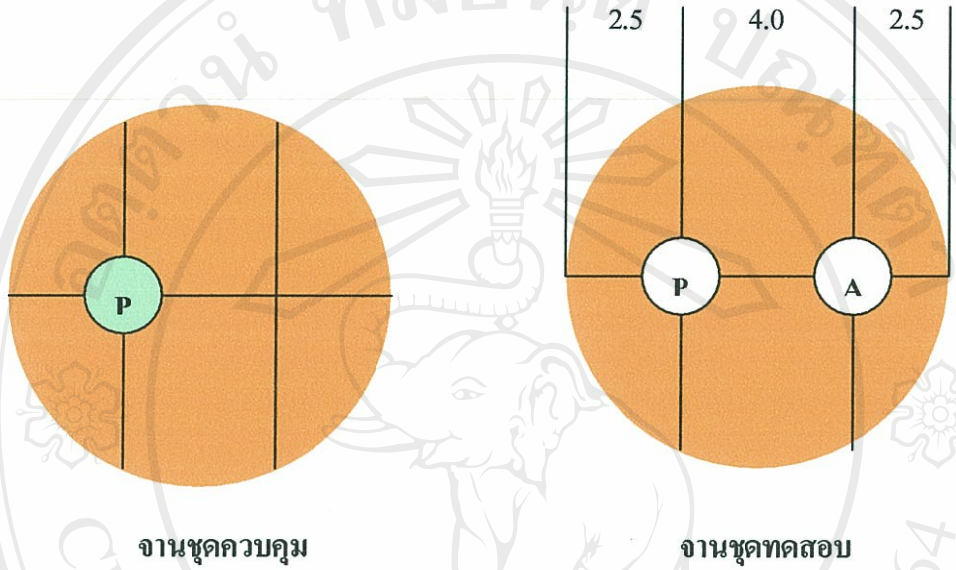
ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์จากอาหาร PDA ที่ได้จากการ streak plate โดยวิธีการ Hyphal Tip Isolation โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นบริเวณส่วนปลายของเส้นใยเชื้อรา จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่ได้มาวางบนอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ (นุชนารถ, 2540) และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 25°C จนกว่าเชื้อราจะสร้างโคโลนีขึ้นมาเต็ม plate จากนั้นจึงนำเชื้อราไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุของโรคใบจุดในคะน้าต่อไป

2. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดในคะน้า

นำเชื้อราที่แยกให้บริสุทธิ์แล้วจาก 1.2 มาทำการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุของโรคใบจุดในคะน้าโดยวิธีการ Dual Culture Technique (ภาพที่ 4) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ตัดชิ้นอาหาร PDA ที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บริสุทธิ์ที่แยกได้จากผิวใบพืช (1.2) และชิ้นอาหาร PDA ที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *A. brassicicola* โดยนำชิ้นวุ้นทั้งสองวางบน plate อาหาร PDA ที่เตรียมไว้โดยให้ห่างกัน 4 เซนติเมตรและห่างจากขอบจานอาหารทั้งสองด้าน 2.5 เซนติเมตร (วันพร, 2543) จากนั้นทำการจัดกลุ่มเชื้อราโดยอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากผิวใบพืช (1.2) กับเชื้อ *A. brassicicola*



ภาพที่ 4 การทดสอบ Dual Culture Technique (Bi-Culture)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากผิวใบพืชกับ *A. brassicicola* ในห้องปฏิบัติการ

ได้คัดเลือกเชื้อราที่ได้ทดสอบคุณสมบัติการเป็นปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติดีที่สุดมาทำการศึกษาต่อ ในการทดลองนี้แบ่งเชื้อราในการทดสอบออกเป็น 2 กลุ่มด้วยกัน คือ

1. เชื้อราปฏิปักษ์เจริญคลุมโคโลนีของเชื้อ *A. brassicicola*
2. เชื้อราปฏิปักษ์เกิด clear zone กับเชื้อ *A. brassicicola*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อราปฏิปักษ์เจริญคลุมโคโลนีของเชื้อ *A. brassicicola*

นำเชื้อราปฏิปักษ์ที่แสดงปฏิกิริยาเจริญคลุมโคโลนีของเชื้อ *A. brassicicola* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA วัดอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) โดยทำการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อราทุกๆ 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตดีที่สุด

3.2 ศึกษาผลกระทบของสาร antibiotic หรือ toxin ใน culture filtrate ของเชื้อ antagonist ต่อการงอกและสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola*

3.2.1 ทดสอบประสิทธิภาพการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. brassicicola* ใน culture filtrate โดยการนำเชื้อราปฏิปักษ์ที่เกิดปฏิกิริยา clear zone กับเชื้อ *A. brassicicola* มาเลี้ยงในอาหาร PDB (Potato Dextrose Broth) เป็นเวลา 7 วันเพื่อให้เชื้อราสร้างสาร antibiotic หรือ toxin ในอาหาร นำอาหารมากรองเอาเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราออก ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 (culture filtrate) แล้วจึงทำการเตรียม spore suspension ของเชื้อ *A. brassicicola* ความเข้มข้น 0.1×10^5 spore/ml จากนั้นดูด spore suspension ของเชื้อ *A. brassicicola* ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี culture filtrate ปริมาตร 5 ml. โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ย เป็นเวลาทุกๆ 3, 5 และ 7 วันแล้วเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใส่เฉพาะ spore suspension ของเชื้อ *A. brassicicola* กับอาหารเหลว (PDB)

3.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของเชื้อ *A. brassicicola* นับจำนวนสปอร์ โดยเตรียม spore suspension ของเชื้อ *A. brassicicola* ความเข้มข้น 0.1×10^5 spore/ml จากนั้นดูด spore suspension ของเชื้อ *A. brassicicola* ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี culture filtrate ปริมาตร 5 ml ของ *A. brassicicola* ใช้ haemacytometer นับจำนวนสปอร์โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย เป็นเวลาทุกๆ 3, 5 และ 7 วัน เพื่อคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีความสามารถยับยั้งการสร้างและการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุด แล้วเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใส่เฉพาะ spore suspension ของเชื้อ *A. brassicicola* กับ อาหารเหลว (PDB)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากผิวใบพืชกับ *A. brassicicola* ในสภาพเรือนทดลอง

โดยนำเชื้อราที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากการทดลองใน 3.1 และ 3.2 มาใช้ทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1 ทดสอบประสิทธิภาพโดยทำการฉีดพ่น spore suspension ของ antagonist บนใบคะน้าก่อนทำการฉีดพ่น spore suspension ของ *A. brassicicola*

เตรียม spore suspension ของ antagonist ที่ความเข้มข้น 2.0×10^6 spore/ml ฉีดพ่นปริมาตร 10 ml บนใบคะน้าที่อายุได้ประมาณ 30 วัน จากนั้นจึงทำการฉีดพ่น spore suspension ของเชื้อ *A. brassicicola* ความเข้มข้น 2.0×10^6 spore/ml ปริมาตร 10 ml ตามลงไปหลังจากฉีดพ่น spore suspension ของ antagonist แล้วเป็นเวลา 3, 5 และ 10 วัน ทำการบันทึกผลทุกๆ 7, 10 และ 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นเฉพาะ antagonist และ *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว

4.2 ทดสอบประสิทธิภาพโดยทำการฉีดพ่น spore suspension ของ *A. brassicicola* บนใบคะน้าก่อนทำการฉีดพ่น spore suspension ของ antagonist

เตรียม spore suspension ของ *A. brassicicola* ความเข้มข้น 2.0×10^6 spore/ml ฉีดพ่นปริมาตร 10 ml บนใบคะน้าที่อายุได้ประมาณ 30 วัน จากนั้นจึงทำการฉีดพ่น spore suspension ของเชื้อ antagonist ความเข้มข้น 2.0×10^6 spore/ml ปริมาตร 10 ml. ตามลงไปหลังจากฉีดพ่น spore suspension ของ *A. brassicicola* แล้วเป็นเวลา 3, 5 และ 10 วัน ทำการบันทึกผลทุกๆ 7, 10 และ 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นเฉพาะ antagonist และ *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว

5. การบันทึกผลและประเมินผล

ประเมินความเสียหายที่เกิดจากโรค โดยแบ่งออกเป็น 2 ค่า คือ

1. การหาปริมาณของโรค (disease intensity) โดยการนับจำนวนใบที่เป็นโรคต่อต้นแล้วนำมาคำนวนเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากจำนวนใบทั้งหมดในแต่ละกรรมวิธี
2. ประเมินพื้นที่ใบที่ถูกเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายต่อต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์พื้นที่ผิวใบที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย โดยแบ่งใบพืชออกเป็น 10 ส่วน โดยแต่ละส่วนมีระดับการเข้าทำลายเป็น 10 %
3. ทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS for Windows Release 10.0

6. สถานที่ดำเนินงานวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลทางโรคพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved