บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี

เมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีที่ใช้ในการทดลองมี 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ No. 1 ตราลูกโลก, พันธุ์ New Jersey (Tokita) C. M. และพันธุ์ Ruby Perfection T. K. ซึ่งได้รับจากมูลนิธิโครงการหลวง นำเมล็ดพันธุ์มาตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด โดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter method) และเพาะบนอาหารวุ้น (PDA plate method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1999) เพื่อตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อรา *A. brassicicola* และเชื้อราอื่นๆ ที่ติดมากับเมล็ด

1.1 การเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น (Blotter method)

สุ่มเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีแต่ละพันธุ์ไปเพาะบนกระดาษชื้น โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จำนวน 1 แผ่น วางบนกระดาษฟางขนาดเท่ากัน จำนวน 3 แผ่น นำไปจุ่มน้ำกลั่นให้ชุ่ม แล้ววางบนจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) จากนั้นวางเมล็ดลงในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ จำนวน 20 เมล็ด/ 1 จานเลี้ยงเชื้อ โดยวางเมล็ดทั้งหมด 400 เมล็ดต่อพันธุ์ นำเมล็ดที่เพาะบนกระดาษชื้นนี้ไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 25°C ภายใต้แสง NUV (Near Ultra Violet) สลับมืดช่วงละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 7 วัน จากนั้นตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่เจริญอยู่ผิวเมล็ด และต้นกล้าที่งอกออกมาจากเมล็ด ภายใต้กล้อง stereo microscope รวมทั้งตรวจผลเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดกะหล่ำปลีแต่ละพันธุ์

1.2 การเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้น (PDA plate method)

สุ่มเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีแต่ละพันธุ์ไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) นำเมล็ดกะหล่ำปลีมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่เมล็ดใน 0.1 % Sodium hypoclorite นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ซับเมล็ดให้แห้งบนกระดาษกรอง ใช้ปากคีบ (forcep) ลนไฟคีบเมล็ดวางลงบนจานเพาะเชื้อโดยวาง 20 เมล็ดต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 25 °C ภายใต้แสง fluorescent สลับมืดช่วงละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 10 วัน จากนั้นนำมาจำแนกชนิดของเชื้อราจากลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เจริญออกมาจากเมล็ด หรือลักษณะของเส้นใย โครงสร้างพิเศษหรือ สปอร์ของเชื้อราภายใต้กล้อง compound microscope

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดพันธุ์ (Seed transmission) ของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

ทำการศึกษาการถ่ายทอดโรคของเชื้อรา *A. brassicicola* ที่ทำให้เกิดอาการของโรคกับต้นกล้า (Seedling symptom test) ของซึ่งใช้วิธีการตรวจสอบ 3 วิธี ดังนี้

2.1 การปลูกเมล็ดพันธุ์บนอาหารวุ้นในหลอดแก้ว (Test tube agar method)

โดยนำเมล็ดกะหล่ำปลีพันธุ์ที่พบว่ามีปริมาณของเชื้อรา *A. brassicicola* ติดมากับเมล็ดสูงที่สุดโดยใช้เมล็ดพันธุ์ทั้งไม่ได้ฆ่าเชื้อที่ผิวและฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการแช่เมล็ดใน 0.1 % Sodium hypoclorite นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำเมล็ดมาเพาะในหลอดทดลองที่มี 2 % water agar (2% WA) บรรจุอยู่หลอดละ 15 มิลลิลิตร โดยเพาะเมล็ดกรรมวิธีละ 100 เมล็ด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 และ 14 วัน สังเกตลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้นกับต้นกล้า

2.2 การเพาะเมล็ดพันธุ์บนกระดาษชื้น (Modified blotter method)

นำเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีเหมือนการทดลองที่ 2.1 มาเพาะบนกระดาษชื้นที่มีกระดาษกรอง 1 แผ่นวางซ้อนบนกระดาษฟาง 3 แผ่น ลงในแต่ละช่องของถาดพลาสติกที่ใช้ทำน้ำแข็ง ขนาด 3 x 9 นิ้ว โดยวางเมล็ด 1 เมล็ดต่อ 1 ช่อง เพาะเมล็ดกรรมวิธีละ 100 เมล็ด รักษาความชื้นโดยคลุมด้วยพลาสติกใส จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 7 วัน บันทึกความงอกของเมล็ด ปริมาณของเชื้อรา *A. brassicicola* และสังเกตอาการของโรคที่พบบนต้นกล้า

2.3 การปลูกเมล็ดในดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Standard soil method)

นำเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีเหมือนการทดลองที่ 2.1 มาเพาะบนดินที่ฆ่าเชื้อแล้วในจานอาหาร โดยปลูกเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีลงไปจานละ 20 เมล็ด เพาะเมล็ดกรรมวิธีละ 100 เมล็ด จากนั้นรดน้ำให้ชุ่ม แล้วนำไปวางบนตะแกรงลวดในกล่องพลาสติกที่มีฝาซึ่งบรรจุน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วไว้ที่ก้นกล่องเพื่อให้ความชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกความงอกโผล่พ้นดินของเมล็ดและสังเกตลักษณะอาการที่เกิดขึ้นกับต้นกล้าเมื่ออายุครบ 7 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity) ของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

ทำการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *A. brassicicola* โดยดัดแปลงวิธีการของ Sivapalan (1993) ดังต่อไปนี้

3.1 การปลูกเชื้อบนเมล็ด (Seed inoculation)

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *A. brassicicola* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีพันธุ์ New Jersey โดยเลี้ยงเชื้อรา *A. brassicicola* บริสุทธิ์บนอาหาร PDA อายุ 5 - 10 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาด 1 ซม. เจาะชิ้นวุ้น ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น10 มิลลิลิตร นับจำนวนสปอร์ด้วย Haemacytometer ให้ได้ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร นำเมล็ดกะหล่ำปลีทั้ง 3 พันธุ์ไปแช่ใน spore suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* แต่ละไอโซเลทนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นผึ่งเมล็ดให้แห้งโดยวางเมล็ดบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อแล้ว แบ่งเมล็ดออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำเมล็ดไปเพาะบนกระดาษชื้นและส่วนที่สองนำไปเพาะในดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยเพาะเมล็ดกรรมวิธีละ 300 เมล็ด ตรวจผลเปอร์เซ็นต์ความงอก การติดเชื้อของเมล็ดและต้นกล้าปกติจากการเพาะบนกระดาษชื้น เปอร์เซ็นต์ความงอกโผล่พ้นดิน และต้นกล้าปกติจากการเพาะบนดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3.2 การปลูกเชื้อบนใบที่เด็ดออกจากต้น (Detached leaf inoculation technique)

เตรียม spore suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* แต่ละไอโซเลท เหมือนการทดลองที่ 3.1 โดยใช้ความเข้มข้นประมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นใช้ micropipette ดูด spore suspension ของเชื้อราปริมาตร 1 ไมโครลิตร หยดลงบนใบของต้นกล้ากะหล่ำปลีอายุ 4 สัปดาห์ ซึ่งเด็ดออกจากต้น จากนั้นเก็บใบของกะหล่ำปลีไว้ในกล่องพลาสติกใสที่ปลอดเชื้อ โดยวางบนตะแกรงลวดให้ความชื้นโดยใช้สำลีชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อวางไว้ที่มุมของกล่องพลาสติก นำกล่องพลาสติกบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25°C หลังจากนั้น 7 วัน ดูการพัฒนาของอาการของโรคและวัดขนาดแผลที่เกิดขึ้นบนใบกะหล่ำปลี เปรียบเทียบกันในแต่ละไอโซเลท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อรา (Fungicide) ในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

4.1 ทดสอบประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* บนอาหาร PDA ผสมสารกำจัดเชื้อรา

สารกำจัดเชื้อราที่ใช้ในการทดลองมี 7 ชนิด ได้แก่ benomyl (Benlate OD), captan (Orthocide 50), carbendazim (Carbenzin 50), chlorothalonil (Daconil), iprodione (Rovral), mancozeb (Dithane M-45) และ thiram (Thysan)

ชื่อสามัญ	ชื่อการค้า	สารออกฤทธิ์
1. benomyl	Benlate OD	methyl -1- (butyl carbomoyl) -2-benzimidazole-2-ylcarbamate 50 % WP
2. captan	Orthocide	N - (trichloromethylthio) cyclohex-4-ene-1, 2-dicarboximide) 50 % WP
3. carbendazim	Carbenzin 50	methyl benzimidazole-2-ylcarbamate 50 % WP
4. chlorothalonil	Daconil	tetrachloroisophthalonitrile 75 % WP
5. iprodione	Rovral	3 — (3, 5-dichlorophenyl-N-isopropyl-2, 4- dioxo-imidazolidine-1-carboximide 75 % WG
6. mancozeb	Dithane M-45	manganese ethylenebis (dithiocarbamate) polymeric complex with zinc salt 80 % WP
7. thiram	Thysan	tetramethylenethiuram disulfide 80 % WP

อัตราความเข้มข้นที่ใช้ 3 อัตรา คือ ต่ำกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า, อัตราแนะนำตามฉลาก และ สูงกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

	ระดับความเข้มข้น (ppm)
1. benomyl	125, 250, 375 ppm
2. carbendazim	250, 500, 750 ppm
3. chlorothalonil	562.5, 1125, 1687.5 ppm
4. mancozeb	1000, 2000, 3000 ppm
5. captan	500, 1000, 1500 ppm
6. iprodione	375, 750, 1125 ppm
7. thiram	400, 800, 1200 ppm

อัตราแนะนำและวิธีการคำนวณสารกำจัดเชื้อราแต่ละความเข้มข้นของ stock solution แสดงในภาคผนวก นำ stock solution ของสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 มิลลิลิตรผสมกับอาหาร PDA ปริมาตร 150 มิลลิลิตรที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วและหลอมจนกระทั่งอาหารอุ่นและยังไม่แข็งตัว ผสมให้เข้ากันจากนั้นเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ 16 มิลลิลิตร

นำเชื้อรา *A. brassicicola* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นโดยรอบใช้ loop ลนไฟแตะชิ้นวุ้นวางลงบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดในแต่ละความเข้มข้น ส่วนชุดควบคุมให้วางบนอาหาร PDA แต่ละกรรมวิธีทำ 5 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ Split plot design บันทึกผลขนาดโคโลนีของเชื้อราอายุ 14 วันของทุกซ้ำนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยสารกำจัดเชื้อรา โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{การยับยั้งการเจริญ(\%)} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหารชุดทดสอบ}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหารชุดควบคุม}} \times 100$$

จากนั้นนำข้อมูลของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแต่ละซ้ำนำไปวิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรรมวิธี โดยวิธี Least significant difference test (LSD)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 ผลของสารกำจัดเชื้อราต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

เตรียม spore suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* ที่ความเข้มข้น $10^6 - 10^7$ สปอร์/มิลลิลิตร และ suspension ของสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดความเข้มข้นตามอัตราแนะนำ เทอาหาร PDA บางๆ ลงบนจานอาหาร ใช้มีดลนไฟฆ่าเชื้อตัดชิ้นวุ้นให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณ 0.50 นิ้ว เตรียมจานอาหารที่มีกระดาษกรองและแผ่นสไลด์ที่วางบนยางรัดสองเส้น ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใช้ loop ลนไฟตักชิ้นวุ้นลงบนแผ่นสไลด์ทั้งสองด้าน จากนั้นดูด spore suspension เชื้อรา *A. brassicicola* ปริมาตร 10 ไมโครลิตรหยดลงบนชิ้นวุ้น และหยดสารละลายของสารกำจัดเชื้อราทับลงไปชิ้นวุ้นนั้นด้วย แล้วให้ความชื้นแก่แผ่นสไลด์ในจานอาหารโดยหยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงบนกระดาษกรอง และปิดฝาจานอาหารเพื่อรักษาความชื้น จากนั้นทุกๆ 2 ชั่วโมง ทำการ fix ด้วย lactophenol ทิ้งไว้สักครู่ ทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราที่งอกและคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอกของสปอร์

4.3 ผลของสารกำจัดเชื้อราต่อการเข้าทำลายเมล็ด ความงอกของเมล็ด และการเกิดโรคในระยะกล้าของกะหล่ำปลี

เตรียม suspension ของสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิด ในอัตราแนะนำ จากนั้นดูด suspension ของสารกำจัดเชื้อราปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับ spore suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* ปริมาตรเท่ากัน นำเมล็ดแช่ใน suspension ดังกล่าวนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นผึ่งเมล็ดให้แห้ง แล้วแบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำเมล็ดไปเพาะบนกระดาษชื้น จำนวน 20 เมล็ด/จานอาหาร ส่วนชุดควบคุมทำ 2 ชุด คือแช่เมล็ดในน้ำกลั่นและแช่เมล็ดใน spore suspension ของ *A. brassicicola* แต่ละกรรมวิธีเพาะเมล็ดจำนวน 300 เมล็ด นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิห้องภายใต้แสงสลับมืดนาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้น 7 วัน ตรวจผลโดยนับจำนวนต้นกล้าที่งอกและต้นกล้าที่เป็นโรค ส่วนเมล็ดชุดสองนำไปเพาะบนดินที่ฆ่าเชื้อแล้วแล้วที่บรรจุในแก้วพลาสติก บันทึกผลหลังจากนั้น 14 วันโดยนับจำนวนต้นกล้าที่งอกและต้นกล้าที่แสดงอาการของโรคที่เกิดกับราก hypocotyls หรือบนใบเมื่ออายุครบ 4 สัปดาห์ ก็ถอนต้นกล้าในแต่ละกรรมวิธี ล้างน้ำให้สะอาดผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำต้นกล้าโดยสุ่มซ้ำละ 20 ต้นในแต่ละกรรมวิธีไปชั่งน้ำหนักสด วัดความยาวของราก และชั่งน้ำหนักแห้ง ซึ่งการชั่งน้ำหนักแห้งนั้นจะนำต้นกล้าไปอบที่ในตู้อบปรับอุณหภูมิ ที่ 60°C อบนาน 3 วัน และนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีโดยใช้วิธี LSD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การทดสอบเบื้องต้นในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดกะหล่ำปลีต่อเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

5.1 การแยกเชื้อราปฏิปักษ์จากเมล็ดกะหล่ำปลี

นำเมล็ดกะหล่ำปลีทั้งที่ฆ่าเชื้อที่ผิวและที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อที่ผิว มาทำการแยกเชื้อราปฏิปักษ์ที่เจริญอยู่บนผิวเมล็ดและเจริญอยู่ภายในเมล็ด โดยวางเมล็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสม lactic acid วางเมล็ดบนอาหารแต่ละชนิดๆ ละ 200 เมล็ด โดยวาง 20 เมล็ดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน จำแนกชนิดของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดภายใต้กล้อง Compound microscope จากนั้นจึงนำเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้แต่ละชนิดมาเก็บบนอาหาร PDA slant

5.2 การทดสอบความสามารถของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* บนอาหาร PDA โดยวิธี DuaI culture

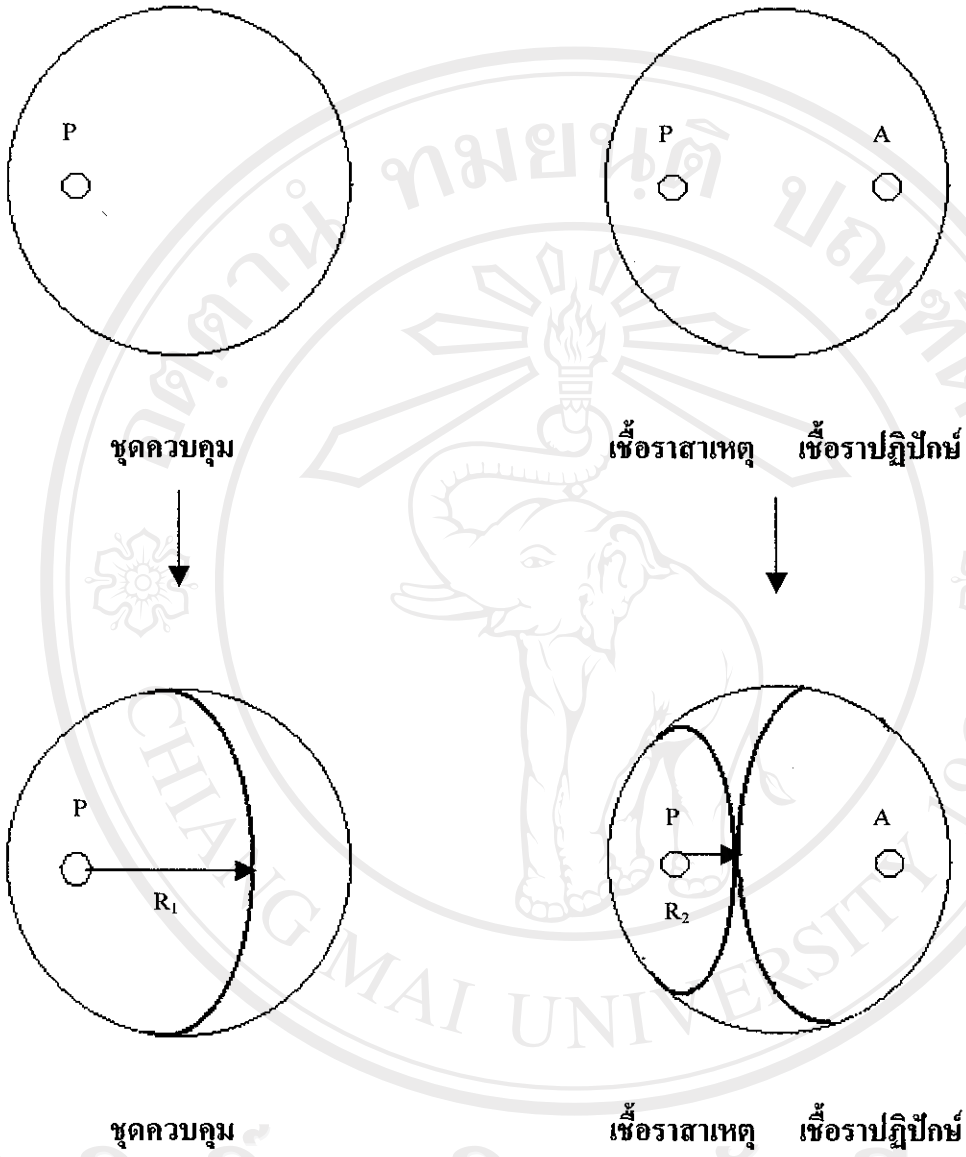
นำเชื้อรา *A. brassicicola* และเชื้อราปฏิปักษ์จาก stock culture มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณบนอาหาร PDA จากนั้นจึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบนอกโคโลนีของเชื้อรา *A. brassicicola* แล้วนำไปวางลงในจานอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบของจานอาหาร 2 เซนติเมตร จากนั้นจึงวางเชื้อราปฏิปักษ์ลงไปอีกด้านหนึ่งของจานอาหาร ให้ห่างจากขอบของจานอาหาร 2 เซนติเมตร โดยทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ จากนั้นจึงนำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บันทึกการเจริญของเชื้อราสาเหตุโดยวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุด้านที่เจริญไปทางเชื้อราปฏิปักษ์ และวัดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุจากชุดควบคุม (ภาพ 1) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรัศมีการเจริญ (Percent inhibition of radial growth หรือ PIRG) ของเชื้อสาเหตุจากสูตร (เกษม, 2532)

$$PIRG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} x\,100$$

โดย R_1 คือ รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุในจานชุดควบคุม

R_2 คือ รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุด้านที่เจริญไปทางเชื้อราปฏิปักษ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



P = เชื้อราสาเหตุ

A = เชื้อราปฏิปักษ์

R_1 = รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุในจานชุดควบคุม

R_2 = รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุด้านที่เจริญไปทางเชื้อราปฏิปักษ์

ภาพ 1 การวางเชื้อราทดสอบ และรัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยวิธี Dual culture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

> 75 %	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (very high antagonistic activity)
61 – 75 %	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง (high antagonistic activity)
51 – 60 %	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (moderate antagonistic activity)
< 50 %	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ (low antagonistic activity)

นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีโดยวิธี LSD

5.3 ผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

ทำการคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์จาก 5.2 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางตั้งแต่ 51 - 60 % นำมาเตรียม mycelium suspension หรือ spore suspension ความเข้มข้น 10^7- 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร และเตรียม spore suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* ที่ความเข้มข้น10^6 - 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นใช้ micropipette ดูด spore suspension ของ *A. brassicicola* หยดลงบนแผ่น สไลด์ที่มีชิ้นวุ้น และหยดสารแขวนลอยเส้นใยหรือสปอร์ของเชื้อราปฏิปักษ์ตามลงไป ปิดฝาจานอาหารเพื่อรักษาความชื้น จากนั้นทุก ๆ 2 ชั่วโมง ทำการ fix โดยหยด lactophenol ลงไป ปิดด้วย cover slip ทิ้งไว้สักครู่ แล้วทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราที่งอกและคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอกของ สปอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.4 ผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการเข้าทำลายเมล็ด ความงอกของเมล็ด และการเกิดโรคในระยะกล้าของกะหล่ำปลี

นำเชื้อราปฏิปักษ์แต่ละชนิดและเชื้อรา *Alternaria. brassicicola* มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหาร PDA เตรียม spore suspension ให้ได้ความเข้มข้น 10^7-10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำ spore suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับ spore suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์แต่ละชนิดปริมาตรเท่ากัน นำเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว แช่ใน suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* ที่ผสมกับ suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์แต่ละชนิดนาน 2 ชั่วโมง ผึ่งเมล็ดให้แห้ง จากนั้นแบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วน แล้วนำเมล็ดพันธุ์ที่เตรียมไว้ไปเพาะบนกระดาษชื้นและเพาะในดินที่ฆ่าเชื้อแล้วกรรมวิธีละ 300 เมล็ด ตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *A. brassicicola* บนเมล็ดที่เพาะบนกระดาษชื้น ความงอกของเมล็ดในจานทดลอง และความงอกโผล่พ้นดิน ต้นกล้าปกติ ความยาวราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง จากการเพาะเมล็ดในดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีโดยใช้วิธี LSD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช (Essential oil) ในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

6.1 ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* บนอาหาร PDA ผสมน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดลองได้มาจากพืช 11 ชนิด ได้แก่

ชนิดของพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์
1. การบูร	*Cinnamomum camphora*
2. มาร์จอแรม	*Origanum majorana*
3. ยูคาลิปตัส	*Eucalyptus camadulensis*
4. สวีทเบซิล	*Ocimum basilicum*
5. เสจ	*Salvia officinalis*
6. ตะไคร้ต้น	*Litsea cubeba*
7. โรสแมรี่	*Rosmarinus officinalis*
8. ตะไคร้หอม	*Cymbopogon narus*
9. พิมเสนต้น	*Pogostemon cablin*
10. ลาเวนเดอร์	*Lavendula angustifolia*
11. เปปเปอร์มิ้นต์	*Mentha piperita*

นำน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดมาผสมกับอาหารโดยใช้ micropipette ดูดน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดปริมาตร 50, 100 และ 200 ไมโครลิตร ผสมในอาหาร PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วย้ายชิ้นวุ้นของเชื้อราลงตรงกลางจานอาหาร แต่ละกรรมวิธีทำ 5 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ Split plot design บันทึกผลขนาดโคโลนีของเชื้อราอายุ 14 วันของทุกซ้ำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้สูตร

$$\text{การยับยั้งการเจริญ(\%)} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหารชุดทดสอบ}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหารชุดควบคุม}} \times 100$$

จากนั้นนำค่าขนาดโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแต่ละซ้ำ นำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี LSD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.2 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

นำน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด ไปทำให้เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร โดยใช้ 95 % Ethanol เป็นตัวทำละลาย เตรียม spore suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* ที่ความเข้มข้น 10^6 - 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ดูด spore suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* หยดลงบนแผ่น สไลด์ที่มีชิ้นวุ้น และหยดน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่เจือจางแล้วตามลงไปบนชิ้นวุ้น ปิดฝาจานอาหารเพื่อรักษาความชื้น จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราที่งอกทุกๆ 2 ชั่วโมงโดย fix แผ่นสไลด์ด้วย lactophenol และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอกของสปอร์

6.3 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อการเข้าทำลายเมล็ด ความงอกของเมล็ด และการเกิดโรคในระยะกล้าของกะหล่ำปลี

เตรียมน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดเหมือนการทดลอง 5.2 นำน้ำมันหอมระเหยที่เจือจางแล้วแต่ละชนิด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับ spore suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* ปริมาตรเท่ากัน นำเมล็ดไปแช่ในน้ำมันหอมระเหยที่มี inoculum นาน 2 ชั่วโมง ผึ่งเมล็ดให้แห้งแล้วแบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน เมล็ดส่วนแรกนำไปเพาะบนกระดาษชื้นและส่วนที่สองเพาะในดินที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยเพาะเมล็ดกรรมวิธีละ 300 เมล็ด จากนั้นทำการตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *A. brassicicola* บนเมล็ดที่เพาะบนกระดาษชื้น ความงอกของเมล็ดในจานทดลอง และความงอกโผล่พ้นดิน ต้นกล้าปกติ ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งจากการเพาะเมล็ดในดินฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีโดยใช้วิธี LSD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved