บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินของกลุ่มผักกาด

สำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดิน (damping-off) ได้แก่ *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. และ *Sclerotium* sp. ของผักกาดขาวปลี (*Brassica campestris* var. *pekinensis*) และผักกาดฮ่องเต้ (*B. campestris* var. *chinensis*) จากแปลงสถานีวิจัยการเกษตร เขตชลประทาน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีวิธีการแยก 2 วิธี ได้แก่

1.1 นำกล้าผักที่แสดงอาการเน่าคอดินล้างด้วยน้ำไหล เพื่อกำจัดเศษดินและสิ่งสกปรกที่ติดอยู่ภายนอกออกให้หมด จากนั้นแช่ใน Clorox 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาทีและ ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำกล้าผักใส่กล่องความชื้น (moist chamber) เป็นเวลา 2 วัน จะพบเชื้อสาเหตุเจริญออกมา

1.2 นำดินบริเวณที่เกิดโรคเน่าคอดินใส่ไว้ในกล่องความชื้น จากนั้นนำแตงกวาและแครอทฆ่าเชื้อด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ หั่นเป็นแว่นวางลงบนผิวหน้าดิน ประมาณ 2 วัน จะมีเชื้อราสาเหตุโรคเจริญขึ้นบนชิ้นพืชทั้งสอง

ใช้เข็มเขี่ยฆ่าเชื้อ เขี่ยเส้นใยของเชื้อราสาเหตุที่เจริญออกมา วางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เพื่อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ จากนั้นตรวจดูลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ตามเอกสารของวิจัย (2551); Barnett and Hunter (1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การแยกและจำแนกชนิดของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์

2.1 การแยกเชื้อ

เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร โดยเลือกเก็บเฉพาะส่วนที่สมบูรณ์ ไม่มีการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลงหรือแสดงอาการของโรค ตัวอย่างพืช 8 ชนิด ได้แก่

- กระเทียม (Garlic: *Allium sativum*) ส่วนของผล
- ข่า (Galanga: *Alpinia galangal*) ส่วนของเหง้า
- ขิง (Ginger: *Zingiber officinale*) ส่วนของเหง้า
- ตะไคร้ (Lemon grass: *Cymbopogon citratus*) ส่วนของลำต้น
- ผักชีฝรั่ง (Fit weed: *Eryngium foetidum*) ส่วนของใบและราก
- พลูคาว (Houttuynia: *Houttuynia cordata*) ส่วนของใบ
- มะกรูด (Kaffir lime: *Citrus hystrix*) ส่วนของใบและก้าน
- มะเขือพวง (Common Asiatic weed: *Solanum torvum*) ส่วนของผล

1. นำตัวอย่างพืชสมุนไพรส่วนใบ ก้าน ลำต้น ผล รากและเหง้า มาล้างในน้ำไหล (running water) ให้สะอาด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผึ่งลมให้แห้ง

2. ใช้กรรไกรตัดส่วนใบให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 1× 1 เซนติเมตร ส่วนก้าน ลำต้น และราก ยาว 1 เซนติเมตร ใช้มีดหั่นส่วนเหง้าเป็นชิ้นลักษณะคล้ายลูกเต๋ากว้างประมาณ 1 เซนติเมตร และใช้มีดเกาะผลด้านนอกออก 4 ชิ้นต่อผล

3. นำชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ในสารละลาย Clorox ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วแช่ใน ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในสารละลาย Heritage เข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที

4. ซับชิ้นพืชให้แห้ง โดยนำมาวางบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ผึ่งลมให้แห้ง

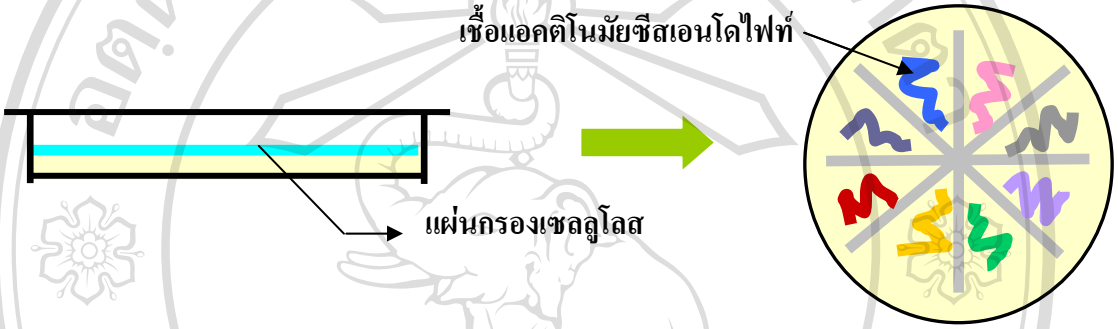
5. วางชิ้นพืชจำนวน 15 ชิ้นต่อ 1 จานอาหาร Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) (ภาคผนวก)

6. บ่มไว้ในตู้มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสให้บริสุทธิ์ (Shimizu *et al*., 2000)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเอนโดไฟท์ที่คาดว่าจะเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่เจริญขึ้นบนชิ้นพืช มาขีดลงบนแผ่นกรองเซลลูโลส (cellulose membrane filter) (Whatman 0.22 ไมโครเมตร) ที่วางบนหน้าอาหาร IMA-2 (ภาพ 6) นำไปบ่มไว้ในตู้มืดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นนำแผ่นกรองเซลลูโลสออก หากเชื้อจุลินทรีย์นั้นเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ จะพบว่าเชื้อสามารถเจริญผ่านแผ่นกรองไปยังผิวอาหารได้

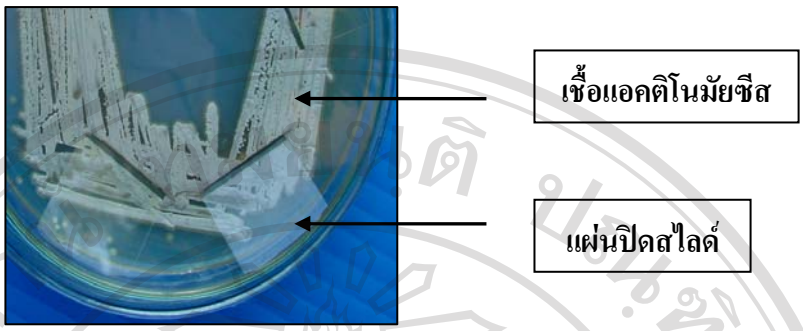


ภาพ 6 การขีดเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ลงบนอาหาร IMA2 ที่ผิวหน้าของอาหารวางด้วยแผ่นกรองเซลลูโลส

2.3 การจำแนกและเก็บรักษาเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ (ดัดแปลงจาก Williams *et. al*., 1989)

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่แยกได้แต่ละไอโซเลทเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 โดยวิธี streak plate แล้วปักแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ขวางบริเวณที่มีรอยขีดเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ ทำมุมประมาณ 45 องศากับผิวหน้าอาหาร (slide culture) (ภาพ 7) บ่มเชื้อไว้ในตู้มืดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำแผ่นปิดสไลด์ที่มีเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์เจริญติดอยู่มาย้อมสีแบบ simple stain โดยหยดด้วยสารละลาย crystal violet 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจดูลักษณะของเส้นใย การสร้างสปอร์ และการเรียงตัวของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ตามเอกสารของ Miyadoh (1997) และ Stanley *et al*. (1989) เพื่อจำแนกสกุลของเชื้อเอนโดไฟท์ โดยคัดเลือกเฉพาะเชื้อสกุล *Streptomyces* เพื่อตั้งชื่อไอโซเลทและเก็บเชื้อที่ได้ไว้เป็น stock culture ในหลอดอาหาร IMA-2 บ่มไว้ในตู้มืดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 7 ลักษณะการเลี้ยงเชื้อแบบ slide culture เพื่อตรวจดูลักษณะการเรียงตัวของเส้นสายและการสร้างสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

เลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ไอโซเลท SC2 SC14 และ SC16 บนอาหาร IMA-2 บ่มไว้ในมืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตเต็มที่และสร้างสปอร์ที่สมบูรณ์ นำเชื้อส่งตรวจที่ศูนย์วิจัยและบริการจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอน สวท.-มช. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่าง ดังนี้

1. ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์เจริญอยู่ ขนาดประมาณ 5×5 มิลลิเมตร จำนวน 5-6 ชิ้น ต่อเชื้อตัวอย่าง
2. รักษาสภาพ (fixing) โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ของตัวอย่าง โดยแช่ใน glutaraldyhyde 2.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1M phosphate buffer
3. ล้างออกด้วย 0.2M phosphate buffer pH 7.2
4. รักษาสภาพ (fixing) อีกครั้ง โดยการแช่ในสารละลาย osmium tetroxide 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1M phosphate buffer
5. ล้างออกด้วย 0.2M phosphate buffer pH 7.2
6. ไล่น้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยการแทนที่น้ำด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามลำดับจาก 30 50 70 80 90 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ 2-3 ครั้ง ตามลำดับ โดยใช้เวลาแช่ในแต่ละความเข้มข้น 5-10 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. ทำให้แห้ง (drying) ด้วยการรมตัวอย่างด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
8. เคลือบด้วยอนุภาคทองหนา 30 นาโนเมตร

นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (JEOL รุ่น JSM-5910LV) พร้อมทั้งบันทึกภาพลักษณะสปอร์และรูปแบบการสร้างสปอร์ของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์

4. การคัดเลือกเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินในสภาพห้องปฏิบัติการ

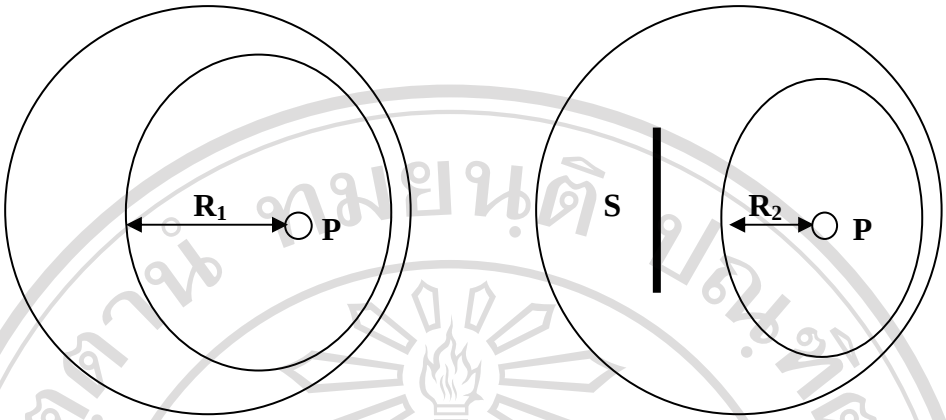
เชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินของกลุ่มผักกาดที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ ได้แก่

1. เชื้อรา *Pythium aphanidermatum*
2. เชื้อรา *Rhizoctonia solani*
3. เชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

ทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี Dual culture ทดสอบตามวิธีการของ Trejo-Estrada *et al*. (1998) และ Cao *et al*. (2005) โดยเลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์บนอาหาร IMA-2 บ่มเชื้อไว้ในตู้มืดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์เจริญเป็นโคโลนีที่สมบูรณ์และสร้างสารปฏิชีวนะ จากนั้นนำเชื้อราสาเหตุโรคแต่ละชนิดวางตรงข้ามห่าง 4 เซนติเมตรกับเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ (ภาพ 8)

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำต่อเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลท เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว เมื่อเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุมเจริญเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลโดยวัดขนาดบริเวณยับยั้ง clear zone (ที่เกิดขึ้นระหว่างโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ที่เป็นปฏิปักษ์) รวมทั้งวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมและชุดทดสอบ จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent Inhibition of Radial Growth; PIRG) จากสูตร $PIRG = \frac{R_1-R_2}{R_1} \times 100$ ดังภาพ 8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ชุดควบคุม ชุดทดสอบ

ภาพ 8 ลักษณะการวัดผลในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (ของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์) ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 โดยวิธี Dual culture

S: *Streptomyces* sp., P: Pathogenic fungi, R: Radial growth of Pathogenic fungi

R_1 = ขนาดความกว้างของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2 = ขนาดความกว้างของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

การวัดค่าความเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อ สามารถประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

> 75	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก
61 – 75	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
51 – 60	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
< 50	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

คัดเลือกเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในกลุ่มที่มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ โดยเลือกมา 2 ไอโซเลทที่ให้ค่ายับยั้งสูงสุดและจากพืชสมุนไพรที่ต่างกันของแต่ละเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพื่อศึกษาขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมโรคเน่าคอดินของกลุ่มผักกาด

5.1 การควบคุมโรคเน่าคอดินของกล้าผัก

นำเมล็ดผักกาดขาวปลีและผักกาดฮ่องเต้ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย Clorox 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาทีและล้างน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง คลุกด้วยเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้แต่ละไอโซเลทและรวมกันทั้ง 2 ไอโซเลทของแต่ละการทดสอบกับเชื้อราสาเหตุ จากนั้นนำเมล็ดมาเพาะในดินนึ่งฆ่าเชื้อที่บรรจุอยู่ในถาดเพาะขนาด 10×12×4.5 นิ้ว ด้วยวิธีการหยอดเมล็ด เมื่อกล้าผักมีอายุ 7 วัน (ใบแท้ 2 ใบ) จึงปลูกเชื้อราสาเหตุโรค โดยการหยดสารแขวนลอย (suspension) ของเชื้อราสาเหตุแต่ละชนิดลงไปบริเวณโคนต้นกล้าในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อ 1 หลุม หยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในชุดควบคุม แบ่งการทดลองเป็น 3 ซ้ำๆ ละ 10 ต้นต่อกรรมวิธี (treatment) เมื่อผักกาดขาวปลีและผักกาดฮ่องเต้อายุ 14 วัน บันทึกผลการทดลองโดยการประเมินความรุนแรงของโรคและเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรค โดยการวัดค่าความรุนแรงของโรคแบ่งเป็น 5 ระดับ (เกษม, 2532) ได้แก่

ระดับ 0 หมายถึง ไม่เป็นโรค ระดับ 1 หมายถึง เป็นโรค 1-10 %
ระดับ 2 หมายถึง เป็นโรค 11-25 % ระดับ 3 หมายถึง เป็นโรค 26-50 %
ระดับ 4 หมายถึง เป็นโรคมากกว่า 50 % ระดับ 5 หมายถึง เป็นโรคจนตาย

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรค ดังนี้

$$\% \text{ ยับยั้งการเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นปกติ (ชุดควบคุม)} - \text{จำนวนต้นเป็นโรค (ชุดทดสอบ)}}{\text{จำนวนต้นปกติ (ชุดควบคุม)}} \times 100$$

5.2 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าพืช

เตรียมเมล็ดผักกาดขาวปลีและผักกาดฮ่องเต้และเพาะเมล็ดตามวิธีการข้อ 5.1 โดยไม่ปลูกเชื้อราสาเหตุลงไป แบ่งการทดลองเป็น 3 ซ้ำๆ ละ 10 ต้นต่อกรรมวิธี เมื่อผักกาดขาวปลีและผักกาดฮ่องเต้อายุ 14 วัน บันทึกผลการทดลอง โดยการบันทึกน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความสูงต้น ความยาวรากและความกว้างใบ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม วางแผนการทดลองแบบ CRD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. ศึกษาวิธีการใช้เชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้เพื่อควบคุมโรคเน่าคอดินของกลุ่มผักกาดในสภาพโรงเรือน

6.1 เปรียบเทียบวิธีการใช้เชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์

นำเมล็ดผักกาดขาวปลีและผักกาดฮ่องเต้ฆ่าเชื้อตามวิธีการข้อ 5.1 ปลูกเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ตามกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์

กรรมวิธีที่ 2 พ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ เมื่อกล้าผักอายุ 5 วัน

กรรมวิธีที่ 3 หยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ หลังเพาะเมล็ด 1 วัน

กรรมวิธีที่ 4 ชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น)

จากนั้นเมื่อต้นกล้าอายุ 7 วัน ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค โดยการหยดสารแขวนลอยของเชื้อราสาเหตุความเข้มข้น 10^6 เส้นใยต่อมิลลิลิตร แต่ละชนิดลงไปบริเวณโคนต้นกล้าในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อ 1 หลุม หยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในชุดควบคุม แบ่งการทดลองเป็น 3 ซ้ำๆ ละ 10 ต้นต่อกรรมวิธี เมื่อผักกาดขาวปลีและผักกาดฮ่องเต้อายุ 14 วัน บันทึกผลการทดลองโดยการประเมินความรุนแรงของโรค เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรคและคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรคเช่นเดียวกับการทดลองที่ 5.1

6.2 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดขาวปลีและผักกาดฮ่องเต้

เตรียมเมล็ดผักกาดขาวปลีและผักกาดฮ่องเต้และเพาะเมล็ดตามกรรมวิธีข้อ 6.1 โดยไม่ปลูกเชื้อราสาเหตุลงไป แบ่งการทดลองเป็น 3 ซ้ำๆ ละ 10 ต้นต่อกรรมวิธี เมื่อผักกาดขาวปลีและผักกาดฮ่องเต้อายุ 14 วัน บันทึกผลการทดลอง โดยการบันทึกความสมบูรณ์ของกล้าผัก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความสูงต้น ความยาวรากและความกว้างใบ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยการวัดค่าความสมบูรณ์ของต้น แบ่งเป็น 4 ระดับ ได้แก่

\+ : ต้นสมบูรณ์น้อย เตี้ย แคระแกร็น

++ : ต้นสมบูรณ์ปานกลาง

+++ : ต้นสมบูรณ์มาก

++++ : ต้นสมบูรณ์มาก ใบมีขนาดใหญ่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. การตรวจสอบความสามารถในการครอบครองใบและรากพืชของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้

7.1 ความสามารถในการครอบครองใบพืช (ดัดแปลงจากวิธีการของ Shimizu *et al.*, 2000)

เตรียมเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ฆ่าเชื้อตามวิธีการข้อ 5.1 จากนั้นนำเมล็ดไปวางบนอาหาร water agar (WA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ไอโซเลท SC2 SC14 และ SC16 ลงไปบนใบเลี้ยง สำหรับชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อ เมื่อกล้าผักอายุ 7 วัน สังเกตการเจริญของใบกล้าผัก การเพิ่มปริมาณและการครอบครองใบพืชของแต่ละไอโซเลท ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีขนาดของใบเลี้ยงใหญ่ที่สุด ส่งตรวจที่ศูนย์วิจัยและบริการจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอน สวท.-มช. เพื่อประเมินผลการครอบครองใบพืช (leaf colonization) ของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

7.2 ความสามารถในการครอบครองรากพืช (Kortemaa *et al.*,1994)

เตรียมเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ฆ่าเชื้อตามวิธีการข้อ 5.1 จากนั้นนำเมล็ดไปวางบนอาหาร WA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมล็ดเริ่มงอกสังเกตเห็นราก คัดเลือกเมล็ดที่มีรากยาว 2-3 มิลลิเมตร วางบนอาหาร WA ใหม่ 1 เมล็ดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำ 5 ซ้ำ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยฆ่าเชื้อ เขี่ยย้ายเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ไอโซเลท SC2 SC14 และ SC16 แตะลงบนผิวรากของกล้าผัก 1 จุด เพาะไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อ เมื่อกล้าผักอายุ 7 วัน สังเกตการเจริญของรากกล้าผัก การเพิ่มปริมาณและการครอบครองรากพืช (root colonization) ของแต่ละไอโซเลท ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีการครอบครองรากมากที่สุด ส่งตรวจที่ศูนย์วิจัยและบริการจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอน สวท.-มช. เพื่อประเมินผลการครอบครองรากพืชของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอนโดไฟท์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved