บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เมล็ดพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองเป็นเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาจากศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 7 กรมส่งเสริมการเกษตร จังหวัดเชียงใหม่

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดลอง

น้ำมันหอมระเหยจากพืชที่ใช้ในการทดลองมี 7 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยของกานพลู ขิง ตะไคร้หอม โหระพา เปปเปอร์มิ้นต์ โป๊ยกั๊ก และอบเชย โดยได้มาจากบริษัทยูไนเต็ด เคมีคอล แอนด์ เทรดดิ้ง จำกัด อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo) บริษัท Olympus
2. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Compound microscope) รุ่น BH-2, บริษัท Olympus
3. ตาชั่ง ขนาด 1,000 กรัม
4. เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น SN B041000710, บริษัท Ohaus
5. ตู้อบลมร้อน (Hot-air oven) บริษัท Memmert
6. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) รุ่น 25X, บริษัท All American
7. ตู้ถ่ายเชื้อ บริษัท S.K. Trading
8. ตู้เพาะเมล็ด (Seed germinator)
9. ไมโครปิเปต (micropipette)
10. Haemacytometer
11. Counter
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์
13. เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

14. ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
15. ที่วางหลอดทดลอง (rack)
16. สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ (slide and cover slip)
17. Cork borer
18. กระดาษกรอง Whatman No.1
19. กระดาษเพาะเมล็ด
20. กระดาษฟาง
21. คีมคีบ (forcep)
22. บีกเกอร์ (beaker)
23. ขวดรูปชมพู่ (flask)
24. กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 10, 50 และ 100 มิลลิลิตร
25. ปิเปต (pipette)
26. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
27. หลอดทดลอง (test tube)
28. แท่งแก้วคน (stirrer)
29. กระบะพลาสติก ขนาด 20 × 20 × 10 เซนติเมตร
30. แก้วพลาสติก ขนาด 10 ออนซ์
31. กล่องพลาสติก ขนาด 40 × 80 × 50 เซนติเมตร
32. ถุงพลาสติก ขนาด 3 × 5 นิ้ว

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Ethanol 70 และ 95%
2. โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1% (sodium hypochlorite; $NaClO_3$) ชื่อทางการค้าคลอร๊อกซ์ (Clorox 10%)
3. ผงวุ้น ตราเฮลิคอปเตอร์
4. Glucose-D
5. Lactic acid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

1. การตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวมาตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด โดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter method) และวิธีเพาะบนอาหารวุ้น (Agar method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1999) เพื่อตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าว

1.1 การเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น (Blotter method)

สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวไปเพาะบนกระดาษชื้น โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 1 แผ่น วางบนกระดาษฟางที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากัน จำนวน 3 แผ่น นำไปจุ่มในน้ำกลั่นให้ชุ่ม แล้ววางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) จากนั้นวางเมล็ดพันธุ์ข้าวลงในจานอาหารที่เตรียมไว้ จำนวน 20 เมล็ดต่อ 1 จานอาหาร วางเมล็ดทั้งหมดจำนวน 400 เมล็ด โดยแบ่งออกเป็น 4 ซ้ำ (replication) แต่ละซ้ำทำการเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวจำนวน 100 เมล็ด นำเมล็ดข้าวที่เพาะบนกระดาษชื้นนี้ไปบ่มเพาะ (incubate) ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดข้าวมาตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดภายใต้กล้อง stereo microscope และ compound microscope และทำการจำแนกชนิดของเชื้อราที่ตรวจพบบนเมล็ดโดยการศึกษาดูลักษณะโครงสร้างต่างๆ เช่น ลักษณะ และรูปร่างของ conidia ที่สร้างบน conidiophore และลักษณะของ fruiting body ของเชื้อราบางชนิด รวมทั้งบันทึกผลเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว

1.2 การเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้น (Agar method)

สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) นำเมล็ดข้าวมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่เมล็ดใน 1% sodium hypochlorite นาน 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับเมล็ดให้แห้งบนกระดาษกรอง จากนั้นใช้คีมคีบ (forcep) ลนไฟฆ่าเชื้อคีบเมล็ดวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวาง 20 เมล็ดต่อ 1 จานอาหาร วางเมล็ดทั้งหมดจำนวน 400 เมล็ด โดยแบ่งออกเป็น 4 ซ้ำ (replication) แต่ละซ้ำทำการเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวจำนวน 100 เมล็ด นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง fluorescent สลับมืดช่วงละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วนำมาตรวจและจำแนกชนิดของเชื้อราจากลักษณะของโคโลนีที่เจริญออกมาจากเมล็ด หรือลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราภายใต้กล้อง compound microscope

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การแยกเชื้อบริสุทธิ์ (Pure isolation) จากเมล็ดพันธุ์ข้าว

ทำการแยกเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวที่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อราดังกล่าวมากที่สุดให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยตรวจดูชนิดและลักษณะของเชื้อราบนเมล็ดข้าวภายใต้กล้อง stereo microscope และทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยสปอร์หรือเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นนำไปบ่มเพาะไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด สังเกตลักษณะรูปร่างของสปอร์และโคโลนีของเชื้อรา เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วทำการเก็บเชื้อราดังกล่าวไว้ในอาหาร PDA slant เพื่อใช้เป็น stock culture ในการทดสอบอื่นๆ ต่อไป

3. การศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *Bipolaris oryzae* ต่อความงอก ความแข็งแรง และอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า

ทำการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคของต้นกล้าข้าวของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *Bipolaris oryzae* โดยการปลูกเชื้อราลงบนเมล็ดแล้วนำไปเพาะโดยวิธีต่อไปนี้

3.1 การเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter method)

ทดสอบโดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวโดยแบ่งเมล็ดออกเป็น 3 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 400 เมล็ด ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เมล็ดไม่ปลูกเชื้อและแช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 2 เมล็ดที่ปลูกด้วยเชื้อรา *F. moniliforme*
กรรมวิธีที่ 3 เมล็ดที่ปลูกด้วยเชื้อรา *B. oryzae*

นำเมล็ดข้าวไปทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคโดยปลูกเชื้อราบนเมล็ดข้าวโดยแช่ในสปอร์แขวนลอย (spore suspension) หรือเส้นใยแขวนลอย (mycelium suspension) ของเชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นในช่วงประมาณ 1×10^{6} - 1×10^{7} spore / ml หรือ mycelium / ml ซึ่งพบว่าเชื้อรา *B. oryzae* ไม่มีการสร้างสปอร์บนอาหาร PDA ดังนั้นจึงใช้เส้นใยแขวนลอยที่ผ่านการปั่นให้แตกหักเป็นท่อนๆ และถือว่าเส้นใย 1 ท่อน เทียบเท่ากับ 1 สปอร์ (เรืองฤทธิ์, 2543)

การเตรียมสปอร์แขวนลอยหรือเส้นใยแขวนลอยของเชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* ทำโดยใช้วิธีการเดียวกันโดยการนำเชื้อราที่เจริญจนเต็มจานอาหาร ซึ่งมีอายุ 7 วันแล้ว เทน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรลงไปในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้แผ่น slide ที่ลนไฟฆ่าเชื้อขูดสปอร์หรือเส้นใยที่เจริญบนอาหารมากรองด้วยผ้าขาวบางพับ 2 ชั้น ที่รองรับด้วยบีกเกอร์ นำส่วนที่กรองได้ไปนับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนสปอร์หรือเส้นใยด้วย Haemacytometer โดยปรับความเข้มข้นของสปอร์หรือเส้นใยให้อยู่ในช่วงประมาณ 1 x 10^6 - 1 x 10^7 mycelium / ml นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วแช่ใน spore suspension หรือ mycelium suspension ที่เตรียมไว้ โดยแช่เมล็ดไว้นานประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเมล็ดมาซับด้วยกระดาษกรองที่สะอาดแล้วผึ่งให้แห้งนาน 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปเพาะบนกระดาษชื้น ตามวิธีการทดลองที่ 1.1 เมื่อครบกำหนด 10 วันแล้ว ตรวจสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* บันทึกลักษณะอาการผิดปกติบนเมล็ดและผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด

3.2 การเพาะบนดิน (Soil test)

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ผ่านการปลูกเชื้อทั้งสองชนิดเรียบร้อยแล้ว สุ่มเมล็ดข้าวทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยการปลูกลงในดินแบ่งเมล็ดออกเป็น 3 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 400 เมล็ด ตามวิธีการทดลองที่ 3.1 แต่นำเมล็ดข้าวไปเพาะในกระบะเพาะพลาสติกที่บรรจุด้วยดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยเพาะเมล็ดในกระบะ กระบะละ 100 เมล็ด ในแต่ละกรรมวิธีจะทำ 4 ซ้ำ เมื่อเพาะเสร็จแล้วรดน้ำให้ชุ่ม เมื่อทำการปลูกครบ 7, 14, 21 และ 28 วัน ทำการวัดเปอร์เซ็นต์ความงอก ความผิดปกติของต้นกล้า ความสูงของลำต้น ความยาวของราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง พร้อมทั้งบันทึกลักษณะอาการผิดปกติต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้าข้าวเปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดควบคุม

4. การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งได้ (Minimal inhibitory concentrations ; MICs) ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *Bipolaris oryzae*

ทำการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งได้ (MICs) ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ กานพลู ขิง ตะไคร้หอม โหระพา เปปเปอร์มิ้นต์ โป๊ยกั๊ก และอบเชย ต่อเชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* โดยเตรียมความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย 9 อัตราความเข้มข้น คือ 16, 31, 63, 125, 250, 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ppm โดยใช้ micropipette ดูดน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดปริมาตร 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25, 50, 100, 200 และ 400 ไมโครลิตร ผสมในอาหาร PDA ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วและยังอุ่นอยู่ ซึ่งดัดแปลงตามวิธีการของ Voda *et al*. (2003) จากนั้นนำหลอดทดลองวางเอียงไว้รอให้แข็งตัว แล้วย้ายชิ้นวุ้นของเชื้อราแต่ละชนิดที่ได้เตรียม inoculum ไว้แล้วจากวิธีการทดลองที่ 5.1.2 วางลงตรงกลางในหลอดทดลอง แต่ละกรรมวิธีทำ 5 ซ้ำ สังเกตผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในแต่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ละความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด โดยบันทึกความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

5. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช (Essential oil) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *Bipolaris oryzae*

5.1 การทดสอบบนอาหาร PDA ผสมน้ำมันหอมระเหยจากพืช

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* โดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืช จำนวน 7 ชนิด ได้แก่

ชนิดของพืช	**ชื่อวิทยาศาสตร์**
1. กานพลู	*Syzygium aromaticum*
2. ขิง	*Zingiber officinale*
3. ตะไคร้หอม	*Cymbopogon citratus*
4. โหระพา	*Ocimum basilicum*
5. เปปเปอร์มิ้นต์	*Mentha piperita*
6. โป๊ยกั๊ก	*Illicium verum*
7. อบเชย	*Cinnamomum cassia*

5.1.1 การเตรียมอาหาร PDA ผสมน้ำมันหอมระเหย

เตรียมอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 7 ชนิด ในอัตราส่วนความเข้มข้น 10 อัตรา คือ 500, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500 และ 5,000 ppm โดยนำน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดมาผสมกับอาหาร PDA โดยใช้ micropipette ดูดน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดปริมาตร 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 ไมโครลิตร ผสมในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จึงนำมาเทลงในจานอาหาร จานละ 20 มิลลิลิตร โดยแต่ละกรรมวิธีทำ 5 ซ้ำเพื่อใช้ในการปลูกเชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* ที่ต้องการทดสอบการเจริญเติบโตบนอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.1.2 การเตรียม inoculum และการปลูกเชื้อราบนอาหาร PDA ผสมน้ำมันหอมระเหยจากพืช

ทำการเตรียม inoculum ของเชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเมล็ดพันธุ์ในข้าว โดยนำเชื้อราที่เจริญใน PDA slant ถ่ายเลี้ยงบนอาหาร PDA ให้เชื้อราเจริญสร้างเส้นใยจนเกือบเต็มจานอาหาร เมื่อเชื้อราทั้งสองชนิดดังกล่าวมีอายุ 7 วัน แล้วจึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดตรงบริเวณรอบๆ ขอบโคโลนีของเชื้อรา นำชิ้นวุ้นของเชื้อราไปวางคว่ำลงตรงกลางจานอาหาร PDA ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

5.1.3 การบันทึกผลและการประเมินผลการทดสอบ

วัดการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* ที่เจริญบนอาหาร PDA ผสมน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีทั้งในแนวตั้งและแนวนอนทุกวันจนกระทั่งเชื้อราเจริญจนเต็มจานอาหาร แล้วนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราตามวิธีการของ ผ่องเพ็ญและคณะ (2542) และรณภพ (2545) โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต} = [(X - Y) / X] \times 100$$

โดย X = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ไม่ผสมน้ำมันหอมระเหย

Y = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมน้ำมันหอมระเหย

พร้อมทั้งบันทึกเกี่ยวกับลักษณะของสี รูปร่าง และความผิดปกติของเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ผสมกับน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) มี 7 × 10 กรรมวิธี (ชนิดของน้ำมันหอมระเหย × ความเข้มข้น) กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซึ่งประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 ชนิดของน้ำมันหอมระเหย (7 ชนิด) และปัจจัยที่ 2 ระดับความเข้มข้น (10 ระดับ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อการเข้าทำลายเมล็ด ความงอกของเมล็ด และการเกิดโรคในระยะต้นกล้าของข้าวโดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *Bipolaris oryzae*

เตรียมน้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิดโดยใช้อัตราความเข้มข้นเหมือนการทดลองที่ 5.1.1 ซึ่งใช้แอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลาย โดยใช้อัตราของแอลกอฮอล์ต่อน้ำ เป็น 1:9 มิลลิลิตรต่อเมล็ด 100 เมล็ด และชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นและแอลกอฮอล์เท่านั้น จากนั้นนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการปลูกด้วยเชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* แล้วตามวิธีการทดลอง 3.1 นำเมล็ดแช่ในน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมไว้ดังกล่าวเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเมล็ดมาผึ่งให้แห้งนาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแบ่งเมล็ดออกเป็น 3 ส่วนในปริมาณที่เท่ากัน ซึ่งในแต่ละส่วนของกรรมวิธีจะทำ 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด ได้แก่ เมล็ดส่วนแรกนำไปเพาะบนกระดาษชื้น ส่วนที่สองนำไปเพาะบนดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว และส่วนที่สามนำไปทดสอบด้วยวิธี Between paper ตามมาตรฐานสากลของ ISTA (1999) ดังวิธีการต่อไปนี้ คือ

5.2.1 การเพาะบนกระดาษชื้น

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวส่วนแรกมาวางเพาะบนกระดาษชื้นในจานอาหาร โดยทำการทดสอบ 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด เมื่อครบระยะเวลา 10 วัน ทำการวัดผลโดยตรวจจากเปอร์เซ็นต์ความงอก และความผิดปกติของเมล็ดข้าวเพื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

5.2.2 การเพาะบนดิน

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวส่วนที่สองมาเพาะลงในแก้วพลาสติก ขนาด 10 ออนซ์ ที่บรรจุดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในปริมาณ 3/4 ของความสูงของแก้วพลาสติก โดยทำการเพาะ 25 เมล็ดต่อแก้วพลาสติก ซึ่งแต่ละกรรมวิธีจะทำทั้งหมด 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด จากนั้นรดน้ำให้ชุ่ม เมื่อต้นกล้าข้าวอายุได้ 28 วัน ทำการวัดผลเปอร์เซ็นต์ความงอก ความผิดปกติ และการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว โดยนำต้นกล้าข้าวมาชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ซึ่งสามารถทำได้โดยเก็บต้นกล้าข้าวกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 100 ต้น นำมาชั่งน้ำหนักสดโดยนำต้นกล้าข้าวมาล้างทำความสะอาดแล้วนำไปผึ่งไว้ประมาณ 30 นาที จึงนำมาชั่งน้ำหนัก ส่วนการชั่งน้ำหนักแห้งนั้นนำต้นกล้าข้าวที่ผ่านการชั่งน้ำหนักสดมาอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จึงบันทึกผลของน้ำหนักแห้งที่ได้ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2.3 การเพาะในระหว่างกระดาษ

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวส่วนที่สามมาวางในระหว่างกระดาษ โดยใช้กระดาษเพาะเมล็ดจำนวน 3 แผ่น ที่มีขนาดเท่ากันมาประกบกัน จุ่มน้ำให้เปียกชุ่ม พับตรงปลายกระดาษเพาะขึ้นมาประมาณ 1 นิ้ว แล้วดึงกระดาษเพาะแผ่นแรกลงมา วางเมล็ดข้าวลงบนกระดาษเพาะแผ่นที่สองโดยให้มีระยะห่างเท่ากัน จำนวน 100 เมล็ด จากนั้นดึงกระดาษเพาะแผ่นแรกปิดทับบนเมล็ดแล้วม้วนกระดาษเพาะและรัดด้วยยางรัด นำไปเพาะไว้ในตู้เพาะเมล็ด (seed germinator) เมื่อครบกำหนด 7 และ 14 วัน ทำการบันทึกผลของเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด ความผิดปกติของต้นกล้า และจำนวนของเมล็ดที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

6. ความสามารถในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าวของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในการควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าว

เตรียมน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดและความเข้มข้นที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* ได้ดีที่สุด จากผลการทดลองที่ 5 แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมและกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด ซึ่งได้แก่ เมล็ดพันธุ์ข้าวที่แช่ในน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู 500 ppm อบเชย 500 ppm ทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวน้ำหนัก 4,800 กรัม ในแต่ละกรรมวิธี สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กรรมวิธี ดังนี้ คือ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (เมล็ดที่ไม่แช่ในน้ำและแอลกอฮอล์ และน้ำมันหอมระเหย)
กรรมวิธีที่ 2 เมล็ดแช่ในน้ำและแอลกอฮอล์
กรรมวิธีที่ 3 เมล็ดแช่ในน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ความเข้มข้น 500 ppm
กรรมวิธีที่ 4 เมล็ดแช่ในน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย ความเข้มข้น 500 ppm

โดยแต่ละกรรมวิธีนำเมล็ดพันธุ์ข้าวมาแช่ในน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่สามารถเตรียมได้จากวิธีการทดลองที่ 5.2 นานประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วนำเมล็ดข้าวผึ่งให้แห้งสนิทในที่ร่ม จากนั้นจึงนำไปบรรจุในถุงพลาสติก ถุงละ 200 กรัม โดยแต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำพร้อมทั้งมัดปากถุงให้แน่น เขียนป้ายระบุกรรมวิธีและวันเดือนปีที่ทำการทดลองติดไว้ที่ข้างถุงให้ชัดเจน นำไปเก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดมิดชิด โดยเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน โดยทุกๆ 1 เดือน สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวในแต่ละกรรมวิธี จำนวน 6,400 เมล็ด แบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำมาตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความงอก และการเข้าทำลายของเชื้อราด้วยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น และเมล็ดส่วนที่สองนำมาตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความงอก ความผิดปกติของต้นกล้า ความแข็งแรงของต้นกล้า และการเจริญเติบโตของต้นกล้าด้วยวิธีเพาะบนดิน ดังรายละเอียดดังนี้ คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.1 การเพาะบนกระดาษชื้น

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวมาเพาะบนกระดาษชื้นบนจานอาหาร จานละ 20 เมล็ด โดยทำการทดสอบในแต่ละกรรมวิธี 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด เมื่อครบเวลา 10 วันแล้วนำมาตรวจสอบตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น

6.2 การเพาะบนดิน

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวมาเพาะในดิน โดยนำดินร่วนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วบรรจุลงในกระบะพลาสติกขนาด 20 × 20 × 10 เซนติเมตร โดยบรรจุดินประมาณ 2/3 ของความสูงของกระบะพลาสติก เพาะในกระบะพลาสติกใบละ 100 เมล็ด ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด ดูแลรดน้ำอย่างสม่ำเสมอ เมื่อต้นกล้าข้าวอายุ 7, 14, 21 และ 28 วัน ทำการวัดและบันทึกความงอก ความยาวลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง สำหรับน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งทำได้โดยเก็บต้นกล้าข้าวกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 20 ต้น นำมาชั่งน้ำหนักสดโดยนำต้นกล้าข้าวมาล้างทำความสะอาดแล้วนำไปผึ่งไว้ประมาณ 30 นาที จึงนำมาชั่งน้ำหนัก ส่วนการชั่งน้ำหนักแห้งนั้นนำต้นกล้าข้าวที่ผ่านการชั่งน้ำหนักสดมาอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จึงบันทึกผลของน้ำหนักแห้งที่ได้

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) มี 8 × 6 กรรมวิธี (ชนิดของน้ำมันหอมระเหย × ระยะเวลา) กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซึ่งประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 ชนิดของน้ำมันหอมระเหย (8 ชนิด) และปัจจัยที่ 2 ระยะเวลา (6 เดือน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved