บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ (compound microscope)
2. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope)
3. ตู้เขี่ยเชื้อ (lamina flow)
4. ตู้เย็น (refrigerator)
5. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
6. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
7. เตาไฟฟ้า (hot plate)
8. เตาไมโครเวฟ (microwave)
9. เครื่องชั่งแบบดิจิตอล ทศนิยม 2 และ 3 ตำแหน่ง (digital balance)
10. ไมโครปิเปต (micro pipette) และไมโครทิป
11. แผ่นสไลด์แก้วและกระจกปิดสไลด์
12. อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น flask, Petri dish, test tube, cylinder
13. อุปกรณ์แยกเชื้อ (เข็มเขี่ย, มีดผ่าตัด, cork borer, ตะเกียงแอลกอฮอล์, ไฟแช็ค)
14. วัสดุงานบ้านงานครัว กล่องพลาสติก/ ตะกร้าพลาสติก/ถุงพลาสติกร้อน
15. อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (potato dextrose agar, PDA)
16. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์
17. ผลมะม่วง และใบมะม่วง
18. สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 9 ชนิด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคและการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์

นำผลมะม่วงอกร่องที่แสดงอาการเป็นโรคแอนแทรคโนสจากบ้านเสม็ดงาม ตำบลหนองบัว จังหวัดจันทบุรี นำมาศึกษาอาการ จากนั้นทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ ด้วยเทคนิควิธี tissue transplanting โดยการตัดชิ้นส่วนของผิวบริเวณขอบแผลให้ติดบริเวณที่ไม่เป็นโรคขนาดประมาณ 0.5 X 0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลายไฮเตอร์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซับให้แห้งด้วยกระดาษเอนกประสงค์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปวางบนอาหาร WA (water agar) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28$\pm$2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 3 วัน ตัดปลายเส้นใยที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนของพืช วางลงบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารทดลอง แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค single spore ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโดยศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA จากนั้นเขี่ยเส้นใย และสปอร์เชื้อรานำวางลงบนกระจกสไลด์ ตรวจ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

โครงสร้างเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ (compound microscope) เมื่อได้เชื้อราบริสุทธิ์ ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยเชื้อราเก็บลงอาหาร PDA ในหลอดทดลอง (PDA slant) เก็บรักษาในตู้เย็น เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

2. การทดสอบความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อผสมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นระดับต่าง ๆ คือ 0.1, 1, 10, 100, 500 (อัตราแนะนำ) และ 1,000 ppm เทอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมความเข้มข้นต่าง ๆ ใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ทดสอบความทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมด้วยวิธี culture disc technique โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราแต่ละไอโซเลตที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้จากการทดลองขั้นตอนที่ 1 นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ข้างต้นเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเชื้อราชุดควบคุม (control) ซึ่งใช้อาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 4 ซ้ำต่อไอโซเลต บันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อรา และการเจริญของเชื้อราโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา เมื่อเชื้อราชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารทดลอง โดยบันทึกทั้งในแกน X และแกน Y เพื่อหาค่าเฉลี่ยการเจริญของเส้นใย

2.1 ความสามารถเจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง เป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อราจากทุกไอโซเลตมาจัดระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม 4 ระดับ ดังนี้

2.1.1 เชื้อราที่อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม หรือ สายพันธุ์ปกติ (sensitive; S) คือเชื้อราที่ไม่สามารถเจริญได้ หรือ เจริญได้เพียงเล็กน้อยบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 0.1-1 ppm

2.1.2 เชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับต่ำ (weakly resistance; WR) คือเชื้อราที่เจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 0.1-10 ppm

2.1.3 เชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับปานกลาง (moderately resistance; MR) คือเชื้อราที่เจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 0.1-100 ppm

2.1.4 เชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (highly resistance; HR) คือเชื้อราที่สามารถเจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 100 ppm

การประเมินระดับความต้านทานของเชื้อราต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม 4 ระดับ ตามหลักเกณฑ์ซึ่งดัดแปลงจาก Peres, N.A.R. et al. (2004) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ตารางที่ 3.1 หลักเกณฑ์ในการจัดระดับความต้านทานสารคาร์เบนดาซิม 4 ระดับ

ระดับความต้านทาน	ความเข้มข้นของสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (ppm)					
	0.1	1	10	100	500[1/]	1,000
Sensitive (S)	/	x	x	x	x	x
	/	/	x	x	x	x
Weakly resistant (WR)	/	/	/	x	x	x
Moderately resistant (MR)	/	/	/	/	x	x
Highly resistant (HR)	/	/	/	/	/	x
	/	/	/	/	/	/

หมายเหตุ : [1/] อัตราแนะนำ

x = เชื้อเจริญไม่ได้ หรือเจริญ <10% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

/ = เชื้อเจริญได้ >10% ขึ้นไป เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ที่มา : (Kongtragoul & Nalumpang, 2010)

2.2 อัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยนำค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อราที่ได้จากการทดลองมาประเมินหาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คำนวณจากสมการดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อรา (เทียบชุดควบคุม)} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

จากนั้นนำเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อราที่ได้มาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา ในแต่ละความเข้มข้น 5 ระดับการเจริญ ดังนี้คือ

- = เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 0-10 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
+ = เชื้อราที่เจริญได้มากกว่า 10 % แต่ไม่เกิน 35 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
++ = เชื้อราที่เจริญได้มากกว่า 35 % แต่ไม่เกิน 65 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
+++ = เชื้อราที่เจริญได้มากกว่า 65 % แต่ไม่เกิน 90 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
++++ = เชื้อราที่เจริญได้มากกว่า 90 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

3. การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างเชื้อราที่อ่อนแอ (S) และเชื้อราที่ต้านทานระดับสูง (HR) ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

ศึกษาลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อราโดยเลี้ยงเส้นใยเชื้อราที่อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (S) และเชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm (อัตราแนะนำ) และอาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมด้วยวิธี poisoned food technique โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดปลายเส้นใยของเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหารทดสอบ ทำการทดลองความเข้มข้นละ 4 ซ้ำต่อไอโซเลต จนกว่าเส้นใยเชื้อราในชุดควบคุมที่เจริญบนอาหาร PDA ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมจะเจริญเต็มจานอาหารทดลอง จากนั้นตรวจสอบลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อราที่เจริญ บนอาหาร PDA บันทึกลักษณะโคโลนีบนจานอาหารทดลอง และตรวจสอบการเจริญของเส้นใยบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm (อัตราแนะนำ) และอาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารป้องกันกำจัด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ด้วยวิธี slide culture

4. การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค

นำสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจากกรมวิชาการเกษตรจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (copper hydroxide), แมนโคเซบ (mancozep), แคปแทน (captan), คาร์บอกซิน (carboxin), คาร์เบนดาซิม (carbendazim), เบนโนมิล (benomyl), โพรคลอราซ (prochloraz), ไดฟีโคนาโซล+อะซ็อกซี่สโตรบิน (difeconazole+azoxytrobin) และไดฟีโคนาโซล+โพรพิโคนาโซล (difeconazole+propiconazole) ในอัตราแนะนำข้างฉลาก (ตารางที่ 3.2) นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงด้วยวิธี poisoned food technique เพื่อหาชนิดของสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราไอโซเลตที่อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (S) และไอโซเลตที่ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) รายละเอียดชื่อสามัญ ชื่อการค้า อัตราแนะนำ บริษัทผู้ผลิต และกลุ่มสารเคมี ของสารเคมีทั้ง 9 ชนิดที่นำมาใช้ในการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.2 วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) ประกอบด้วย 10 ทรีตเม้นต์ ๆ ละ 4 ซ้ำ ทำการทดลองโดยนำสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดในอัตราแนะนำข้างฉลาก มาผสมกับอาหาร PDA เทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละประมาณ 15 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ cork borer ที่ฆ่าเชื้อแล้วเจาะย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราไอโซเลตที่อ่อนแอต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (S) และไอโซเลตที่ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) เจริญอยู่ นำมาวางคว่ำลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา และบนชุดควบคุม (อาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา) เปรียบเทียบลักษณะโคโลนี และ เส้นใยเชื้อราของไอโซเลตที่อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (S) และไอโซเลตที่ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) โดยบันทึกลักษณะโคโลนี และการเจริญของเส้นใยบนอาหารทดลอง แล้วทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เพื่อใช้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งจากสมการ ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = (A-B)/A x100

A = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม (0 ppm)

B = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารป้องกันกำจัดโรคพืช

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ตารางที่ 3.2 สารป้องกันกำจัดเชื้อรา 9 ชนิดที่ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงอกร่อง บนจานอาหารทดลอง

ทรีตเมนต์	ชื่อการค้า	อัตราแนะนำ	บริษัท	กลุ่มสารเคมี
1. Copper hydroxide 77%WP	ฟังกูราน-โอเอช	20 กรัม/20 ลิตร	บ.โซตัส อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด	สารประกอบทองแดง (coppers)
2. Mancozeb 80%WP	ไดเทนเอ็ม 45	60 กรัม/20 ลิตร	บ.โซตัส อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด	EBDC's, Ethylene bis-dithiocarbamate
3. Captan 50%WP	ออโธไซด์ 50	50 กรัม/20 ลิตร	บ.อริสต้า ไลฟ์ซายน์ ประเทศไทย	Phthalimide
4. Carboxin 75%WP	ไวตาแว๊กซ์	15 กรัม/20 ลิตร	บ.เทพวัฒนา บจก.	Carboxamide
5. Carbendazim 50%SC	คาร์ดาซินเอฟ	60 มล./20 ลิตร	เอราวัณ เคมีเกษตร	Benzimidazoles
6. Benomyl 50%WP	ยิบเบนโนมิล 50	20 กรัม/20 ลิตร	บ.ยิบอินซอย และแย็คส์	Benzimidazoles
7. Prochloraz 45%EW	โค-ราช	30 มล./20 ลิตร	บ.ลัดดา จำกัด	Imidazoles
8. Difenoconazole+Azoxystrobin 20%+12.5%SC	ออติว่า	10 มล./20 ลิตร	บ.ซินเจนทา จำกัด	Triazole+Strobilurin type: Methoxyacrylate
9. Difenoconazole+Propiconazole15%+15%EC	คาวาเคียว	15 มล./20 ลิตร	บ.เจียไต๋ จำกัด	Triazole

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี