

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการ

3.1 การแยกเชื้อสาเหตุโรครากเน่า

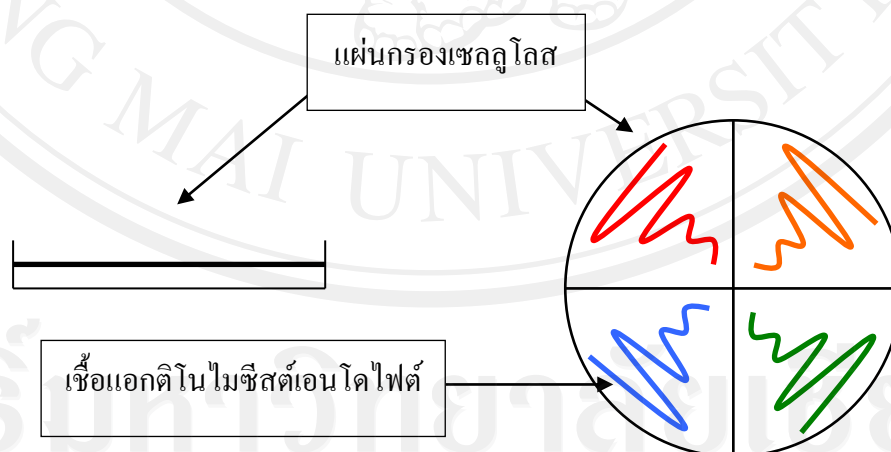
เก็บตัวอย่างโรครากเน่าของสตรอว์เบอร์รีพันธุ์ 329 (Yael) จากแปลงเพาะต้นกล้าของเกษตรกรในอำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ นำมาแยกเชื้อสาเหตุด้วยวิธี tissue transplant คัดแปลงจากวิธีการของ Nelson and Abad (2010) โดยนำชิ้นส่วนของรากและลำต้นสตรอว์เบอร์รีมาล้างน้ำไหลให้สะอาด ตัดบริเวณแผลให้มีขนาด 1 เซนติเมตร นำไปฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างชิ้นพืชด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจำนวน 1 ครั้ง ซับให้แห้ง นำชิ้นพืชวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี hyphal tip isolation โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดชิ้นวัฏบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา นำชิ้นวัฏที่ได้มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการตรวจสอบลักษณะของเส้นใย การสร้างสปอร์ และลักษณะโคโลนีของเชื้อราสาเหตุเพื่อจำแนก และเพิ่มปริมาณเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค ด้วยวิธี soil infestation คัดแปลงจากวิธีการของ Bowman *et al.* (2007) โดยเริ่มจากเตรียม inoculums ของเชื้อราสาเหตุ โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างมาแช่น้ำ 1 ถัง ล้างให้สะอาด จากนั้นบรรจุในถุงทนความร้อนอุณหภูมิ 200 กรัม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นใช้ cork borer เจาะปลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ (ที่แยกได้จากการทดลองที่ 3.1) ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 5 วัน จำนวน 3 ชิ้น วางลงในถุงเมล็ดข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในสภาพปลอดเชื้อ เขย่าถุงเบาๆ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 - 7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญเต็มถุงแล้วจึงนำ inoculum ของเชื้อราสาเหตุไปปลูกเชื้อในต้นสตรอว์เบอร์รี ปริมาณ 3 กรัมต่อต้น ลงในดินบริเวณรอบๆ โคนของต้นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์ 329 (Yael) อายุ 30 วัน คลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้นเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำถุงพลาสติกออก สังเกตการเกิดโรค และบันทึกอาการเกิดโรคที่เกิดขึ้น

3.3 การแยกเชื้อแอคติโนไมซิสต์เอนโดไฟต์

แยกเชื้อแอคติโนไมซิสต์เอนโดไฟต์จากพืชวงศ์กุหลาบ (Rosaceae) จำนวน 4 ชนิด และพืชสมุนไพรจำนวน 12 ชนิด (ตารางที่ 1) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Shimizu *et al.* (2000) เริ่มจากเก็บตัวอย่างพืชเฉพาะส่วนที่สมบูรณ์ไม่มีการเข้าทำลายของโรคหรือแมลง นำตัวอย่างพืชที่ได้มาล้างน้ำไหลเป็นให้สะอาดเวลา 10 - 15 นาที (ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช) นำมาผึ่งลมให้แห้งแล้วตัดใบให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 1 x 1 เซนติเมตร ส่วนก้านยาว 1 เซนติเมตร จากนั้นนำชิ้นพืชที่ได้มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในสารละลายคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ชับน้ำให้แห้งโดยนำไปวางบนกระดาษกรองที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งลมให้แห้งภายในตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลา 2 วัน นำชิ้นพืชมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Inhibitory Mold Agar-2 (IMA-2) (ภาคผนวก ก) จำนวน 15 ชิ้น ต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มในที่มืดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน เมื่อเชื้อเจริญออกมาจากชิ้นพืช ใช้เข็มเย็บเย็บเชื้อย้ายเชื้อที่คาดว่าจะเชื้อแอคติโนไมซิสต์เอนโดไฟต์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 ที่วางแผ่นกรองเซลลูโลส (cellulose membrane filters) (Whatman 0.22 ไมโครเมตร) (ภาพที่ 4) เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำแผ่นกรองเซลลูโลสออกหากเชื้อจุลินทรีย์นั้นเป็นเชื้อแอคติโนไมซิสต์เอนโดไฟต์จะพบว่าเชื้อสามารถเจริญลอดผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสไปยังผิวหน้าอาหารได้ แยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้ง จากนั้นตั้งชื่อไอโซเลทของเชื้อจากชื่อวิทยาศาสตร์ 3 ตัวแรกของพืชแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อเก็บเป็น stock culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 บ่มไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 4 การปิดเชื้อแอคติโนไมซิสต์เอนโดไฟต์บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 ที่วางแผ่นกรองเซลลูโลส (cellulose membrane filters)

ตารางที่ 1 ชื่อไอโซเลทของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชวงศ์กุหลาบ และ สมุนไพร

	พืชอาศัย	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไอโซเลท
พืชวงศ์กุหลาบ	1.นางพญาเสือโคร่ง	<i>Prunus cerasoides</i>	PRU
	2. กุหลาบ	<i>Rosa</i> sp.	ROS
	3. สตรอว์เบอร์รี่	<i>Fragaria ananassa</i>	FRA
	4. สตรอว์เบอร์รี่ป่า	<i>Duchesnea indica</i> Focke	DUC
พืชสมุนไพร	1. สะระแหน่	<i>Metha cordifolia</i> Opiz.	MET
	2. ผักไผ่	<i>Polygonum odoratum</i> Lour.	POL
	3. กาแฟ	<i>Coffea arabica</i> L.	COF
	4. หม่อน	<i>Morus alba</i> L.	MOR
	5. อบเชย	<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl	CINv
	6. การบูร	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J.S. Presl	CINc
	7. เอื้องหมายนา	<i>Costus speciosus</i>	COS
	8. ตะไคร้ต้น	<i>Litsea cubeba</i> Per.	LIT
	9. ผักชีฝรั่ง	<i>Eryngium foetidum</i> L.	ERY
	10. โสม	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	PAN
	11. สะเดา	<i>Azadirachta indica</i>	AZA
	12. ดอกไม้จีน	<i>Hemerocallis fulva</i> Linn.	HEM

3.4 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรครากเน่า

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุด้วยวิธี dual culture โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ International Streptomyces Project-2 (ISP-2) (Taechowisan *et al.*, 2005) (ภาคผนวก ก) ด้วยการฉีดเชื้อบนผิวหน้าอาหารความยาว 4 เซนติเมตร และห่างจากขอบจานอาหาร 2 เซนติเมตร นำไปบ่มไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเส้นใยเชื้อราสาเหตุที่มีอายุ 5 - 7 วัน นำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณตรงกันข้ามกับเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ระยะห่าง 4 เซนติเมตร (ภาพที่ 5) บ่มไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 - 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการทดลอง

ไอโซเลทละ 4 ซ้ำ ซึ่งหาคความคลุมเลี้ยงเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค ตรวจสอบผลการทดลองโดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดทดสอบ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent Inhibition of Radial Growth : PIRG) โดยใช้สูตร

$$PIRG = \frac{(R1-R2) \times 100}{R1}$$

R1

R1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 ในชุดควบคุม

R2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 ในชุดทดสอบ

นำเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้ มาประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งตามวิธีการของ เกษม สร้อยทอง (2532) ดังนี้

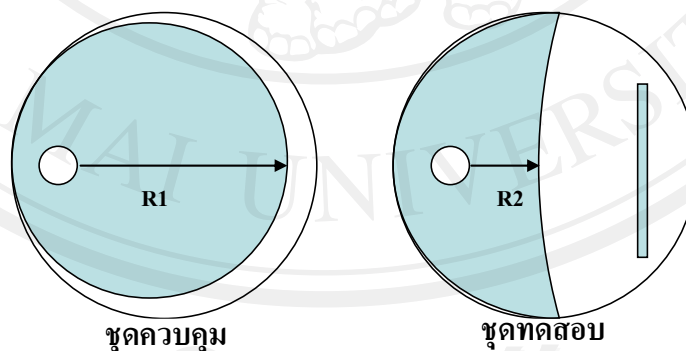
ระดับสูงมาก = เปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์

ระดับสูง = เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 61 – 75 เปอร์เซ็นต์

ระดับปานกลาง = เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 51 – 60 เปอร์เซ็นต์

ระดับต่ำ = เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่า 51 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นคัดเลือกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งในระดับสูงมาก มาตรวจสอบผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุ โดยบันทึกลักษณะเส้นใยของเชื้อราสาเหตุที่ถูกยับยั้งการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 จากการทดสอบด้วยวิธี dual culture และนำเส้นใยเชื้อราสาเหตุบริเวณที่ถูกยับยั้งการเจริญมาตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะของเส้นใยเชื้อราสาเหตุที่พบเปรียบเทียบกับเส้นใยเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม



ภาพที่ 5 การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุด้วยวิธี dual culture (○ เชื้อสาเหตุ, — เชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์) โดยที่

R1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 ในชุดควบคุม

R2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 ในชุดทดสอบ

3.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

นำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.4 มา streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 บ่มไว้ในที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นบันทึกลักษณะสีของโคโลนี (อ้างอิงหมายเลขสีจาก New Dictionary of Color Name, 1987) การเจริญของโคโลนี และการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และจำแนกชนิดของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ด้วยวิธี slide culture โดยการ streak เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 แล้วปิดแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทำมุม 45 องศา กับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 6) บ่มไว้ในที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น นำแผ่นปิดสไลด์ที่มีเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์เจริญติดอยู่มาย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบลักษณะเส้นใย การสร้างสปอร์ของเชื้อ และการเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ตามเอกสารของ Miyadoh *et al.* (1997) และ Stanley *et al.* (1989) เพื่อจัดจำแนกเชื้อในเบื้องต้น



ภาพที่ 6 การเตรียม slide culture ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2

3.6 การตรวจสอบความสามารถในการเข้าอาศัยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในต้นตรั่วเบอร์รีในสภาพปลอดเชื้อ

3.6.1 การเพิ่มปริมาณต้นตรั่วเบอร์รีในสภาพปลอดเชื้อ

เพิ่มปริมาณต้นตรั่วเบอร์รีพันธุ์ 329 (Yael) ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดโดยคัดเลือกต้นแม่พันธุ์ มาปลูกเลี้ยงในโรงเรือนดูแลจนให้ไหลนำไหลที่สมบูรณ์มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที ก่อนนำไปตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดให้มีขนาดความยาวไม่เกิน 0.5 มิลลิเมตร นำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 60 วัน จากนั้นเมื่อตรวจพบการเจริญของกลุ่มยอดตรั่วเบอร์รีจึงตัดแบ่ง และย้ายลงเลี้ยงในอาหาร

กระตุ้นการแตกออกเป็นเวลา 40 - 50 วัน ก่อนแยกเป็นต้นเดี่ยว ๆ ไปเลี้ยงในอาหาร MS ไม่มีฮอร์โมนโดยจัดให้มีระยะห่างระหว่างต้นพอสมควรเพื่อให้ต้นเจริญเติบโตได้ดี

3.6.2 การปลูกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในต้นสตรอว์เบอร์รีในสภาพปลอดเชื้อ

นำเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.4 มา streak เพิ่มปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 บ่มไว้ในที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดชิ้นวัชบริเวณที่มีเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์เจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน จากนั้นย้ายเชื้อไอโซเลทละ 5 ชิ้น ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Inhibitory Mold Broth-2 (IMB-2) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มไว้ในที่มีอุณหภูมิห้องบนเครื่อง orbital shaker ความเร็ว 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ความเข้มข้น 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ต่อต้น ลงบริเวณโคนต้นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์ 329 (Yael) อายุ 20 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ไม่มีฮอร์โมน จากนั้นเลี้ยงต้นสตรอว์เบอร์รีไว้ในสภาพปลอดเชื้ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1200 lux 16 ชั่วโมงต่อวัน

3.6.3 การตรวจสอบความสามารถในการเข้าอาศัยของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในต้นสตรอว์เบอร์รีในสภาพปลอดเชื้อ

ตรวจสอบความสามารถในการเข้าอาศัยพืชด้วยวิธีการแยกเชื้อกลับ (re-isolation) โดยนำต้นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์ 329 (Yael) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และได้รับการปลูกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากวิธีการ 3.6.2 เป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน มาแยกเชื้อกลับ โดยตัดต้นสตรอว์เบอร์รีเป็นชิ้นเล็ก ๆ แยกเป็นส่วนใบ ลำต้น และราก นำชิ้นพืชทั้งหมดมาฆ่าเชื้อที่ผิวเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.3 โดยแช่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และสารละลายคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 - 2 นาที ซับชิ้นพืชให้แห้งโดยนำมาวางบนกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งลมให้แห้งภายในตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลา 2 - 3 วัน จากนั้น วางชิ้นพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 ขึ้นส่วนละ 10 ชิ้นต่อจานอาหาร บ่มไว้ในที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 - 14 วัน ตรวจสอบการเจริญของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช และ

นับจำนวนชิ้นพืชที่สามารถแยกเชื้อกลับได้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ
แอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ จำนวนเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับจากสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับ} = \frac{\text{จำนวนชิ้นพืชที่แยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ได้}}{\text{จำนวนชิ้นพืชทั้งหมด}} \times 100$$

3.7 การชักนำความต้านทานโรครากเน่าในต้นสตรอว์เบอร์รี

3.7.1 การชักนำความต้านทานโรครากเน่าในต้นสตรอว์เบอร์รีในสภาพปลอดเชื้อ

ทดสอบความต้านทานโรครากเน่าโดยนำต้นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์ 329 (Yael) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และได้รับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ ที่คัดเลือกได้เป็นเวลา 30 วัน มาปลูกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่า ดัดแปลงจากวิธีการของ Ingram (1967) โดยหยด oospore แวนลอยของเชื้อราสาเหตุที่ความเข้มข้น 1×10^4 สปอร์ ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 ไมโครลิตร บริเวณโคนต้นสตรอว์เบอร์รีในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นบ่มไว้ในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำการทดลองไฮโดรเลทละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น โดยชุดควบคุมปลูกเฉพาะเชื้อราสาเหตุ เพียง อย่างเดียว บันทึกผลโดยประเมินระดับความรุนแรงของโรครากเน่าในต้น สตรอว์เบอร์รีแต่ละต้นซึ่งให้เกณฑ์การประเมินที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Martínez *et al.* (2010) โดยแบ่งเป็น 5 ระดับ (ภาพที่ 7) ดังนี้

ระดับ 0 ต้นสตรอว์เบอร์รีไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 1 โคนและรากของต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเน่าเป็นสีน้ำตาล และลาม
ไปสู่ก้านใบ 1 - 2 ใบ

ระดับ 2 โคนและรากของต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเน่าเป็นสีน้ำตาล และลาม
ไปสู่ก้านใบ 3 - 5 ใบ

ระดับ 3 โคนและรากของต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเน่าเป็นสีน้ำตาล และลาม
ไปสู่ก้านใบทุกยกเว้นส่วนยอด

ระดับ 4 ต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเน่าเป็นสีน้ำตาลทั้งต้น

จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของการเกิดโรคโดยใช้สูตร
ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของการเกิดโรค = $\frac{(0 \times N_0) + (1 \times N_1) + (2 \times N_2) + (3 \times N_3) + (4 \times N_4)}{LN}$

LN

หมายเหตุ

ตัวเลข 0 - 4 = ระดับความรุนแรงของโรคตั้งแต่ระดับ 0 ถึง ระดับ 4

N_0 = จำนวนต้นสตรอว์เบอร์รีที่แสดงอาการของโรคในระดับความรุนแรงที่ 0

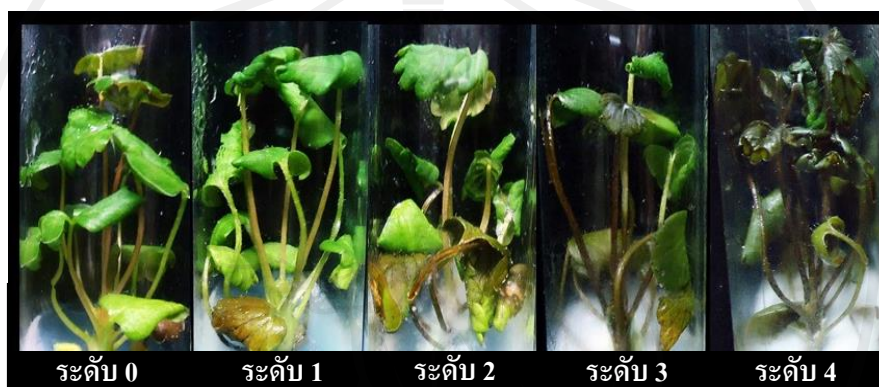
N_1 = จำนวนต้นสตรอว์เบอร์รีที่แสดงอาการของโรคในระดับความรุนแรงที่ 1

N_2 = จำนวนต้นสตรอว์เบอร์รีที่แสดงอาการของโรคในระดับความรุนแรงที่ 2

N_3 = จำนวนต้นสตรอว์เบอร์รีที่แสดงอาการของโรคในระดับความรุนแรงที่ 3

N_4 = จำนวนต้นสตรอว์เบอร์รีที่แสดงอาการของโรคในระดับความรุนแรงที่ 4

LN = จำนวนต้นสตรอว์เบอร์รีทั้งหมด



ภาพที่ 7 ระดับความรุนแรงโรครากเน่าของต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้รับการปลูกเชื้อแอคติโนไมซีสเอนโดไฟต์เป็นเวลา 30 วัน หลังจากปลูกเชื้อรา *Phytophthora cactorum* เป็นเวลา 14 วัน ในสภาพปลอดเชื้อ

ระดับ 0 ต้นสตรอว์เบอร์รีไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 1 โคนและรากของต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเน่าเป็นสีน้ำตาล และลามไปสู่ก้านใบ 1 - 2 ใบ

ระดับ 2 โคนและรากของต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเน่าเป็นสีน้ำตาล และลามไปสู่ก้านใบ 3 - 5 ใบ

ระดับ 3 โคนและรากของต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเน่าเป็นสีน้ำตาล และลามไปสู่ก้านใบทุกก้านส่วนยอด

ระดับ 4 ต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเน่าเป็นสีน้ำตาลทั้งต้น

3.7.2 การชักนำความต้านทานโรครากเน่าในต้นสตรอว์เบอร์รี ในสภาพโรงเรือน

ทดสอบความต้านทานโรครากเน่าของต้นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์ 329 (Yael) ในสภาพโรงเรือน โดยเริ่มจากนำต้นสตรอว์เบอร์รีที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และได้รับการปลูกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ที่คัดเลือกได้ เป็นเวลา 21 วัน มาออกปลูก โดยนำขวดที่เพาะเลี้ยงต้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำต้นสตรอว์เบอร์รีออกจากขวด ล้างต้นให้ปราศจากวัชอาหารเพาะเลี้ยง จากนั้นย้ายลงปลูกในกระบะชำซึ่งใช้ peat moss ผสมกับแกลบดำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ส่วน (w/w) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเป็นวัสดุปลูก จากนั้นครอบ กระบะชำด้วยโครงผ้าพลาสติกเพื่อรักษาความชื้น 80 - 10 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 22 - 25 องศาเซลเซียส และพรางแสงตลอดช่วงระยะปลูกภายในโรงเรือนกันแมลงเป็นเวลา 3 วันเพื่อให้ต้นตั้งตัว จากนั้นปลูกเชื้อราสาเหตุโดยใช้ inoculums ของเชื้อราที่เตรียมในเมล็ดข้าวฟ่างจากการทดลองที่ 3.2 ปริมาณ 1 กรัมต่อต้น ลงบนดินบริเวณรอบ ๆ โคนของต้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำการทดลอง ไอโซเลตละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น โดยชุดควบคุมปลูกเฉพาะเชื้อราสาเหตุเพียงอย่างเดียว บันทึกผลโดยประเมินระดับความรุนแรงของโรคจากอาการเหี่ยวของต้นสตรอว์เบอร์รี ในแต่ละต้น ซึ่งให้เกณฑ์การประเมินที่ดัดแปลงจากวิธีการของนุชนารถ จงเลขา (2544) โดยแบ่งเป็น 5 ระดับ (ภาพที่ 8) ดังนี้

ระดับ 0 ต้นสตรอว์เบอร์รีไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 1 ต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเหี่ยวโดยใบ และก้านใบเหี่ยว 1 - 2 ใบ

ระดับ 2 ต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเหี่ยวโดยใบ และก้านใบเหี่ยว 3 - 5 ใบ

ระดับ 3 ต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเหี่ยวโดยทุกใบเหี่ยวยกเว้นส่วนยอด

ระดับ 4 ต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น

จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรค (จากสูตรการหาค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคในการทดลองที่ 3.7.1)



ภาพที่ 8 ระดับความรุนแรงโรครากเน่าของต้นสตรอว์เบอร์รี่ที่ได้รับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 30 วัน และออกปลูกในโรงเรือน และได้รับการปลูกเชื้อรา *Phytophthora cactorum* เป็นเวลา 14 วัน

ระดับ 0 ต้นสตรอว์เบอร์รี่ไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 1 ต้นสตรอว์เบอร์รี่แสดงอาการเหี่ยวโดยใบ และก้านใบเหี่ยว 1 - 2 ใบ

ระดับ 2 ต้นสตรอว์เบอร์รี่แสดงอาการเหี่ยวโดยใบ และก้านใบเหี่ยว 3 - 5 ใบ

ระดับ 3 ต้นสตรอว์เบอร์รี่แสดงอาการเหี่ยวโดยทุกใบเหี่ยวยกเว้นส่วนยอด

ระดับ 4 ต้นสตรอว์เบอร์รี่แสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น

3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการควบคุมโรครากเน่าในสภาพโรงเรือน

3.8.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

นำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.4 มา streak เพิ่มปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 บ่มไว้ในที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นชุดสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 ด้วยแผ่นสไลด์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ นำสปอร์ของเชื้อที่ได้มาผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปรับปริมาตรให้มีความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 ลิตร ผสม tween 80 ปริมาณ 2 - 3 หยด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

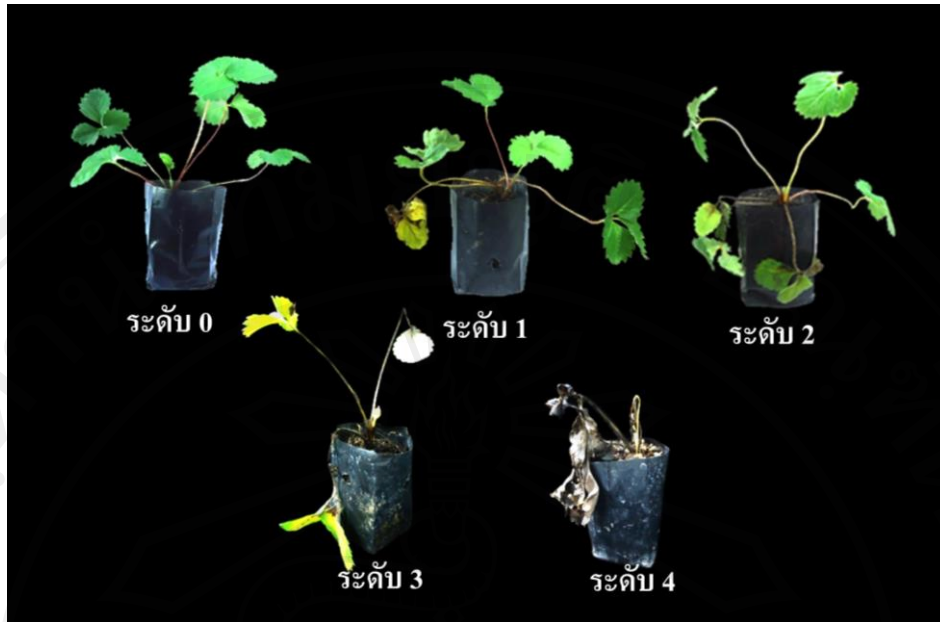
3.8.2 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ในการควบคุมโรครากเน่าของต้นสตรอว์เบอร์รี

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ในการควบคุมโรครากเน่าของต้นสตรอว์เบอร์รี โดยนำต้นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์ 329 (Yael) อายุ 30 วัน ที่ได้จากไหลของต้นแม่พันธุ์ จากอำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ มาปลูกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์โดยแบ่งเป็น 2 กรรมวิธีคือ

กรรมวิธีที่ 1 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์บนต้นสตรอว์เบอร์รี

กรรมวิธีที่ 2 ราดสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์บริเวณโคนต้นสตรอว์เบอร์รี

ซึ่งในแต่ละกรรมวิธีทำการปลูกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อที่เตรียมจากการทดลองที่ 3.8.1 ความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยในกรรมวิธีที่ 1 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ลงบนใบ และลำต้นของสตรอว์เบอร์รี ปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อต้น และกรรมวิธีที่ 2 ราดสปอร์แขวนลอยของเชื้อลงไปบริเวณโคนของต้นสตรอว์เบอร์รี ปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อต้น ทำการปลูกเชื้อแต่ละไอโซเลตทุก ๆ 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นปลูก inoculums ของเชื้อราสาเหตุที่เตรียมในเมล็ดข้าวฟ่างจากการทดลองที่ 3.2 ปริมาณ 3 กรัมต่อต้น ลงบนดินบริเวณรอบ ๆ โคนของต้นสตรอว์เบอร์รี บ่มเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยในแต่ละกรรมวิธีทำการปลูกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ไอโซเลตละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น ซึ่งชุดควบคุมปลูกเชื้อเฉพาะเชื้อราสาเหตุเพียงอย่างเดียว บันทึกผลโดยประเมินระดับความรุนแรงของโรค จากอาการเหี่ยวของต้นสตรอว์เบอร์รี ในแต่ละต้น ซึ่งให้เกณฑ์การประเมินออกเป็น 5 ระดับ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.7.2 (ภาพที่ 9) จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของการเกิดโรค (จากสูตรการหาค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรค ในการทดลองที่ 3.7.1)



ภาพที่ 9 ระดับความรุนแรงของโรคในต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้รับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์ เอนโดไฟต์ทุก ๆ 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง หลังจากปลูกเชื้อรา *Phytophthora cactorum* เป็นเวลา 14 วันในสภาพโรงเรือน

ระดับ 0 ต้นสตรอว์เบอร์รีไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 1 ต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเหี่ยวโดยใบ และก้านใบเหี่ยว 1 - 2 ใบ

ระดับ 2 ต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเหี่ยวโดยใบ และก้านใบเหี่ยว 3 - 5 ใบ

ระดับ 3 ต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเหี่ยวโดยทุกใบเหี่ยวยกเว้นส่วนยอด

ระดับ 4 ต้นสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น

3.9 การศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รี หลังการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์ เอนโดไฟต์ในสภาพปลอดเชื้อ

ศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รี โดยเริ่มจากคัดเลือกต้นสตรอว์เบอร์รี พันธุ์ 329 (Yael) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้ออายุ 20 วันให้มีขนาดใกล้เคียงกัน นำมาตัดแต่งใบให้เหลือ 4 ใบต่อต้น แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน ปริมาณ 15 มิลลิลิตรต่อต้น จากนั้นนำต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้มาปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.4 โดยหยดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแต่ละไอโซเลทความเข้มข้น 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อต้น บริเวณโคนต้นสตรอว์เบอร์รี เลี้ยงต้นสตรอว์เบอร์รีไว้สภาพปลอดเชื้อ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1200 lux 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นนำต้นสตรอว์เบอร์รี มาวัดอัตราการเจริญเติบโตโดยดัดแปลงจากวิธีการของ El-Tarabily *et al.* (2010) วางแผนการทดลอง

แบบ CRD โดยแบ่งการทดลองแต่ละไอโซเลทเป็น 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น โดยวัดค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความสูงต้น ความยาวราก จำนวนใบ และจำนวนราก เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 1 ที่หยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว และชุดควบคุม 2 ที่หยดเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ IMB-2 ปริมาณ 0.1 มิลลิตรต่อต้น

3.10 การตรวจสอบความคงอยู่ของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในต้นสตรอว์เบอร์รี่หลังการออกปลูกในสภาพโรงเรือน

ตรวจสอบความคงอยู่ของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในต้นสตรอว์เบอร์รี่หลังการออกปลูกในสภาพโรงเรือน ด้วยวิธีการแยกเชื้อกลับ โดยนำต้นสตรอว์เบอร์รี่พันธุ์ 329 (Yael) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ และได้รับการปลูกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้เป็นเวลา 21 วัน มาออกปลูก โดยนำขวดที่เพาะเลี้ยงต้นวางไว้ในอุณหภูมิห้องเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นย้ายลงปลูกในกระบะชำซึ่งใช้ peat moss ผสมกับแกลบดำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ส่วน (w/w) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเป็นวัสดุปลูก จากนั้นครอบกระบะชำด้วยโครงผ้าพลาสติกเพื่อรักษาความชื้น 80 - 10 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 22 - 25 องศาเซลเซียส และพรางแสงตลอดช่วงระยะปลูกภายในโรงเรือนกันแมลงเป็นเวลา 3 วันเพื่อให้ต้นตั้งตัว จากนั้นแยกเชื้อกลับจากต้นสตรอว์เบอร์รี่หลังจากออกปลูกเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างต้นสตรอว์เบอร์รี่ครั้งละ 5 ต้นในแต่ละไอโซเลท นำต้นสตรอว์เบอร์รี่ที่ได้มาตัดชิ้นเป็นชิ้น ๆ แยกเป็นส่วนราก ลำต้น และใบ จากนั้นนำชิ้นพืชทั้งหมดมาฆ่าเชื้อที่ผิวเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.3 โดยแช่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และสารละลายคาร์เบนดาซิมความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ซับชิ้นพืชให้แห้งโดยนำมาวางบนกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วผึ่งลมให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลา 2 - 3 วัน จากนั้นวางชิ้นพืชในอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 ชิ้นส่วนละ 10 ชิ้นต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ในที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 - 14 วัน ตรวจสอบการเจริญของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช และนับจำนวนชิ้นพืชที่สามารถแยกเชื้อกลับได้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับ (จากสูตรการหาเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับในการทดลองที่ 3.6.3)