อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมมินต์พันธุ์สว.1 (Mentha arvensis var. piperascens.) ที่แสดงอาการเหี่ยว

ต้นมินต์พันธุ์สว.1 ที่แสดงอาการเหี่ยว เก็บรวบรวมจากไร่มินต์ตามสถานที่ต่าง ๆ ดังนี้คือ

1. อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่
2. อำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก
3. อำเภอเมือง จังหวัดเลย
4. แปลงทดลองของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์ บางเขน กรุงเทพมหานคร
5. อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่

2. การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากต้นมินต์ที่แสดงอาการเหี่ยว

นำต้นมินต์ที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวมาตัดเป็นท่อน ๆ ขนาด 7 - 10 มิลลิเมตร ล้างน้ำให้สะอาดแล้วเช็ดให้แห้ง หลังจากนั้นแช่ใน 10 เปอร์เซ็นต์ Clorox 5 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวของลำต้นเสียก่อน ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเพื่อล้างสารเคมีที่ผิวลำต้นออก ใช้มีดคมที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยการแช่ในอัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์แล้วลนไฟ ผ่าลำต้นตามยาว สังเกตบริเวณที่เป็นท่อนำน้ำและเนื้อเยื่อลำเลียงอาหาร (vascular bundle)ซึ่งเป็นสีน้ำตาล ใช้มีดที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดเอาบริเวณดังกล่าวมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA)ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจานละ 5 ชิ้นให้ระยะห่างเท่า ๆ กัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 วันจะสังเกตเห็นเส้นใย(mycelium) ของเชื้อรางอกมาจากส่วนของพืช ใช้เข็มที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเส้นใยนั้นไปใส่ในหลอดแก้วที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อนำไปจำแนกหาชนิดของเชื้อราต่อไป

สำหรับการจำแนกเชื้อราที่แยกได้จากต้นมินต์ที่เป็นโรคเหี่ยวนั้น เพื่อความสะดวกในการจำแนกจึงได้กำกับหมายเลขของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากมินต์ที่เป็นโรคเหี่ยวจากสถานที่ต่าง ๆ ดังนี้

หมายเลขที่ 1 เชื้อราบริสุทธิ์จากต้นมินต์ที่เก็บจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์ บางเขน กรุงเทพมหานคร

หมายเลขที่ 2 เชื้อราบริสุทธิ์จากต้นมินต์ที่เก็บจากอำเภอเมือง จังหวัดเลย

หมายเลขที่ 3 เชื้อราบริสุทธิ์จากต้นมินต์ที่เก็บจากอำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่

หมายเลขที่ 4 เชื้อราบริสุทธิ์จากต้นมินต์ที่เก็บจากอำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่

หมายเลขที่ 5 เชื้อราบริสุทธิ์จากต้นมินต์ที่เก็บจากอำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก

3. ศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อราบริสุทธิ์หมายเลขที่ 1,2,3,4 และ 5

3.1 การวัดขนาดของสปอร์

เชื้อ Fusarium มีสปอร์ 2 แบบคือ macroconidia เป็นสปอร์ขนาดใหญ่มีหลายเซลใน 1 สปอร์ รูปร่างเป็นเคียว และ microconidia ซึ่งมีขนาดเล็ก รูปไข่ เซลเดียว บางครั้งอาจมีผนังกั้น 1 ผนัง การวัดขนาดของ conidia ทั้งสองชนิดทำโดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่มีอายุ 10 วันจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ PSA (potato sucrose agar) ที่อุณหภูมิห้องมาใส่สไลด์ แล้วย้อมสีด้วย lacto-phenol cotton blue วัดความกว้างและความยาวสปอร์ชนิดละ 100 สปอร์ด้วยไมโครมิเตอร์ที่กำลังขยาย 400 เท่า หลังจากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) และหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation = SD) โดยใช้สูตร

$$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{N}$$

002563

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2/n}{n-1}}$$

n เป็นจำนวนสปอร์ที่ใช้ในการศึกษา = 100 สปอร์

จากการคำนวณได้ 1 ช่องของ ocular micrometer จะมีค่าเท่ากับ 0.3846 ช่องของ stage micrometer

3.2 การทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของ conidiophore เส้นใย macroconidia และ microconidia

วิธีทำ slide culture ทำดังนี้คือ นำจานที่ฆ่าเชื้อแล้วมาวางกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตรที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไป ใส่ 20 เปอร์เซ็นต์ glycerine ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปพอให้กระดาษกรองเปียกเพื่อเป็นตัวให้ความชื้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ นำแท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วยาวประมาณ 3.7 เซนติเมตรวางบนกระดาษกรองข้างละ 1 แท่ง นำสไลด์นุ่มเป็นวงกลมตรงกลางซึ่งฆ่าเชื้อแล้ววางบนแท่งแก้วทั้งสอง ใช้ volumetric pipette ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หยดลงบนส่วนนุ่มของสไลด์ให้เต็ม ทิ้งอาหารให้เย็นจนแข็ง นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 5 แห่งมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเอาส่วนของเส้นใยแตะบนส่วนกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปิด cover glass ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วบนวุ้นอาหาร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 วันจะสังเกตเห็นเส้นใยเจริญแผ่ไปรอบ ๆ วุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น นำสไลด์แบบธรรมดาที่สะอาดมาหยดสี lacto-phenol cotton blue ลงไป แล้วนำ cover glass จาก culture slide ปิดลงบนสไลด์นั้น นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ส่วนที่เป็นสไลด์นุ่มก็ทำเช่นเดียวกันโดยการย้อมสีด้วย lacto-phenol cotton blue แล้วปิดด้วย cover-glass แผ่นใหม่

4. จำแนกเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากต้นมินต์ตามข้อมูลข้อที่ 3.

การจำแนกเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกจากต้นมินต์ที่เป็นโรคเหี่ยวใช้ตามหลักของ Booth (1971) ซึ่งแบ่งชนิดต่าง ๆ ของ Fusarium ออกเป็น Section ต่าง ๆ ตาม key ต่อไปนี้

Key To Section

1. Microconidia abundant..... 2
1. Microconidia rare to absent..... 9
2. Microconidia formed from polyblastic conidial cells or polyphialides..... 3
2. Microconidia formed from simple phialides..... 4
3. Cultures red occasionally pale, chlamydospores usually present..... Arthrosporiella
3. Cultures beige, mauve to violet..... Liseola
4. Microconidia formed in chains..... 5
4. Microconidia not formed in chains..... 6
5. Cultures rose to deep red, macroconidia large, thick-walled, 'Martiella' type.... Spicarioides
5. Cultures beige, mauve to violet, macroconidia, if present, thin-walled falcate..... Liseola
6. Microconidia pyriform to clavate, culture red..... Sporotrichiella

6. Microconidia fusiform to ovate, colour pale beige, mauve to blue..... 7

7. Macroconidia straight, apically beaked. Lateritium

7. Macroconidia curved, not beaked.....8

8. Microconidiophores short, often grouped, macroconidia thin-walled falcate.... Elegans

8. Microconidiophores elongate, widely branched, macroconidia widest in upper half, thick-walled..... Martiella

9. Conidia formed at least in part from polyblastic conidiogenous cells..... Arthrosporiella

9. Conidia always formed from simple phialides..... 10

10. Growth rate below 1.0 cm. 11

10. Growth rate above 1.0 cm. 13

11. Isolated from, or growing on, other fungi or insects..... 12

11. Not associated with fungi or insects..... Arachnites

12. Isolated from, or associated with, other fungi..... Episphaeria

12. Isolated from, or associated with, scale insects..... Coccophilum

13. Mycelial chlamydospores rare or absent, conidia straight, usually

beaked apically.....Lateritium

13. Mycelial chlamydospores present,
conidia curved.....14

14. Intercalary chlamydospores present,
terminal chlamydospores absent,
conidia thin-walled with apical
cell often elongated aciculate,
foot cell usually pedicellate.....Gibbosum

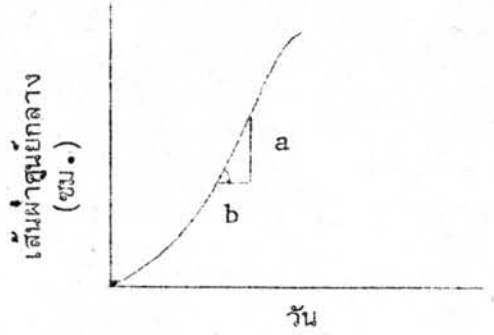
14. Intercalary and terminal chlamydospores
often present, macroconidia thick-
walled, distinctly septate, fusiform to
falcate with beaked or fusoid apical
cell and apedicellate foot cell.....Discolor

เมื่อจำแนกเชื้อราบริสุทธิ์ถึง section แล้ว ก็ทำต่อไปตามรายละเอียดของ section และเมื่อจำแนกเชื้อราที่แยกได้จากต้นมินต์ที่เป็นโรคเหี่ยวแล้วได้ส่งเชื้อบริสุทธิ์เหล่านี้ไปที่ Dr. C. Booth, Commonwealth Mycological Institute, Kew ประเทศอังกฤษ เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อราบริสุทธิ์ว่าเป็นชนิดเดียวกันกับที่จำแนกเองหรือไม่ โดยการนำเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงในหลอดแก้วที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อPDA ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วส่งไปที่ Dr.C. Booth เพื่อความสะดวกในการจำแนกจึงได้กำกับหมายเลขของเชื้อบริสุทธิ์เหล่านี้เป็นหมายเลขเดียวกันกับในข้อ 2

5. ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราที่พบจากต้นมินต์ที่เป็นโรคเหี่ยว

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกไว้มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อPDA และPSA ที่อุณหภูมิห้องแล้ววัดการเจริญเติบโตของเชื้อราบริสุทธิ์เหล่านี้แบบ linear growth โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ colony ทุกวันจนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจาน การวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ colony ทำเชื้อละ 3 ซ้ำด้วยกันแล้วหาค่าเฉลี่ย นำมาเขียนกราฟโดยให้แนวนอนเป็นวัน และแนวตั้งเป็นเส้นผ่าศูนย์กลาง สำหรับการหาอัตราการเจริญของเชื้อราคิดเป็นเซนติเมตรต่อวันโดยคิดจากความลาดเอียงของเส้นกราฟช่วงที่เป็นเส้นตรง ซึ่งเป็นช่วงที่มีอัตราการเจริญคงที่ การศึกษาหาค่า exponential growth rate เพื่อศึกษาถึงเชื้อราบริสุทธิ์เหล่านี้จะมีการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิปกติของประเทศเราเป็นอย่างไร

การหาอัตราการเจริญของเชื้อราเป็นเซนติเมตรต่อวันนั้น หาได้จาก



ค่า tan θ ดังกราฟ

$$\tan \theta = \frac{a}{b}$$

6. การพิสูจน์โรค

6.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

สำหรับพืชที่ใช้ในการทดลองนั้นใช้ต้นมินต์พันธุ์สว.1 ที่เจริญมาจากส่วนของไหลอายุ 1 เดือนและ 2 เดือนมีขนาดส่วนสูงประมาณ 10 และ 14 เซนติเมตรตามลำดับ ก่อนที่จะนำมาปลูกนำเอาต้นมินต์มาล้างให้สะอาดเสียก่อนแล้วแช่ส่วนของรากใน 0.1 % mercuric chloride เป็นเวลา 1 นาทีตามวิธีของ Rangaswami (1972) (ภาพที่4)

แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อเพื่อให้สารเคมีหมดไป นำมาปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตรกระถางละ 3 ต้น ดินที่ใช้ปลูกเป็นดินผสมของสีดาฟาร์มซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 30 นาที

พืชที่ใช้ในการทดลองได้เลี้ยงไว้ในเรือนต้นไม้ของแผนกพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการทดลองในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม พ.ศ. 2519

6.2 การเตรียมน้ำเชื้อ

นำเชื้อบริสุทธิ์หมายเลขที่ 1, 2, 3,4 และ 5 มาเลี้ยงในจานที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ใช้มีดที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยการแช่ในอัลกอฮอล์ 70เปอร์เซ็นต์ แล้วลนไฟ ตัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อบริสุทธิ์เป็นชิ้นมีขนาดประมาณ 6 x 6 x 3 ลูกบาศก์มิลลิเมตร นำชิ้นวุ้นมาใส่ในขวดแก้ว Erlenmeyer flask ขนาด 250 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดสังเคราะห์อย่างเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วอยู่ประมาณ 100-110 ลูกบาศก์เซนติเมตรขวดละ 3 ชิ้น อุดปากขวดแก้วด้วยสำลีแล้วหุ้มทับด้วยกระดาษตะกั่ว นำไปเขย่าเพื่อให้ได้ suspension ที่มีจำนวนสปอร์เพิ่มขึ้นด้วยเครื่องเขย่า (Shaker) ที่อุณหภูมิ 22 - 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน(ภาพที่ 3) แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:1 หาจำนวนสปอร์ต่อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรด้วย haemocytometer โดยนับจำนวนสปอร์ในแต่ละช่องบนตารางของ haemocytometer โดยนับ 10 ช่อง แล้วสุ่มหาจำนวนเฉลี่ยต่อ 1 ช่อง จากการคำนวณก็จะทราบปริมาณสปอร์ต่อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรได้

6.3 วิธีการพิสูจน์โรค

การพิสูจน์โรคนี้ทำการทดลอง 2 วิธีคือ

การทดลองวิธีที่ 1 ใช้ spore suspension ที่ได้จากข้อ 6.2 ราดบริเวณรอบ ๆ ต้นมินต์กระถางละ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ภาพที่ 5) สำหรับกระถางที่เป็น control นั้นราดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรรอบ ๆ ต้นมินต์เช่นเดียวกัน

การทดลองวิธีที่ 2 ถอนต้นมินต์มาแช่ส่วนรากใน spore suspension ในปริมาณเท่ากันเป็นเวลา 5 นาที (ภาพที่ 6) แล้วนำไปปลูกในกระถางตามเดิม การถอนต้นนั้นเพื่อให้รากเกิดบาดแผลเสียก่อน ส่วนกระถางที่เป็น controlนั้นให้ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแทน spore suspension

การทดลองแต่ละวิธีนั้นจะทำ 10 ซ้ำด้วยกัน โดยถือว่า 1 กระถางจะเท่ากับ 1 ซ้ำ สำหรับปริมาณสปอร์ที่ใช้ในการทดลองทั้ง 2 วิธีนี้อยู่ในระหว่าง 2.8×10^5 - 3.36×10^5 สปอร์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

6.4 การเก็บผล

สังเกตอาการของต้นมินต์ที่ทำการทดลองทุกวัน จนกระทั่งต้นมินต์แสดงอาการเหี่ยว ใบจะห้อยลง หลังจากนั้น 2 - 3วัน เก็บต้นมินต์ที่แสดงอาการเหี่ยวมาแยกเชื้อ การเก็บผลเก็บกระถางละ 2 ต้น ส่วนการแยกเชื้อนั้นทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2 ทำ 1 ต้นต่อ 1 จานจานละ 5 ชิ้น แล้วสังเกตดูเส้นใยที่งอกออกมาจากส่วนของพืช (ภาพที่ 2) แล้วจึงแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เขี่ยเชื้อแล้วย้อมสีด้วย lacto-phenol cotton blue เปรียบเทียบลักษณะกับเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2 หลังจากนั้นนับจำนวน colony ของเชื้อบริสุทธิ์ที่มีลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2 ของแต่ละวิธีการทดลองมาคำนวณ t - test เพื่อดูความแตกต่างของทั้งสองวิธีการทดลองโดยใช้สูตรดังนี้

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{x_1 - x_2}}$$

$$S_1^2 \text{ (variance)} = \frac{\Sigma x^2}{n_1 - 1}$$

$$S_2^2 \text{ (variance)} = \frac{\Sigma x_2^2}{n_2 - 1}$$

$$S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = \sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}$$

$\bar{x}_1$ = ค่าเฉลี่ยของจำนวน colony ของวิธีที่ 1

$\bar{x}_2$ = ค่าเฉลี่ยของจำนวน colony ของวิธีที่ 2

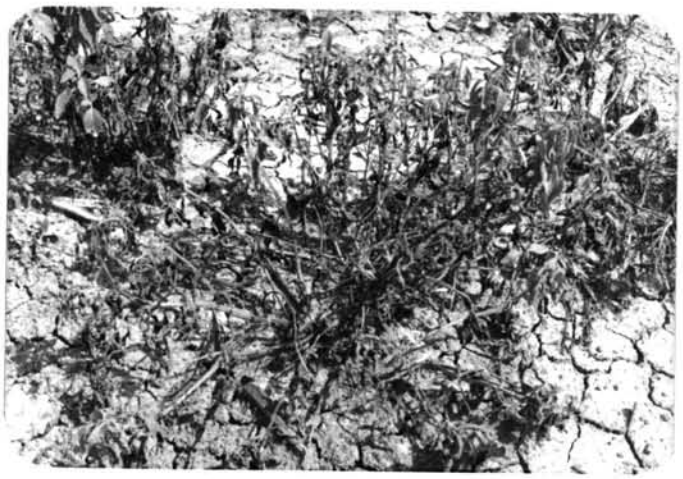
n_1 = จำนวนของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองวิธีที่ 1

n_2 = จำนวนของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองวิธีที่ 2

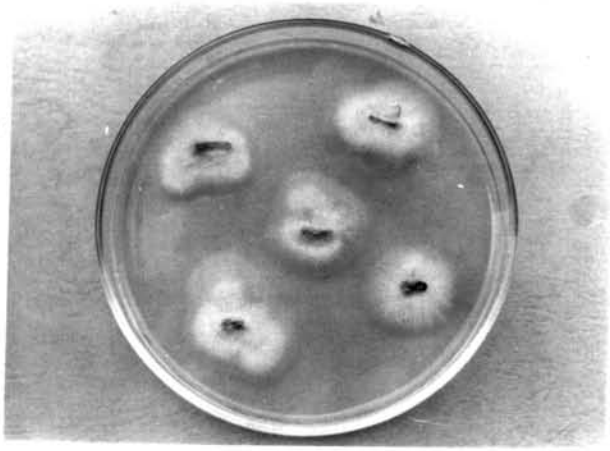
สำหรับต้นมินต์ที่เหลืออีก 1 ต้น ของแต่ละกระถาง นำมาตัดเป็นท่อน ๆ ขนาด 7 มิลลิเมตร แล้ว fix ใน fixative FAA 2 วัน นำมาตัด section ด้วย microtome ให้มีความหนาเท่ากับ 12 ไมครอน แล้วย้อม quadruple stain ตามวิธีของ Johansen (1940) เพื่อตรวจหาว่า เชื้อเข้าไปอยู่ในบริเวณใด

ภาพที่ 1 ก. โรคเหี่ยวของต้นมินต์พันธุ์สว. 1 ที่ปลูกบนร่องผัก

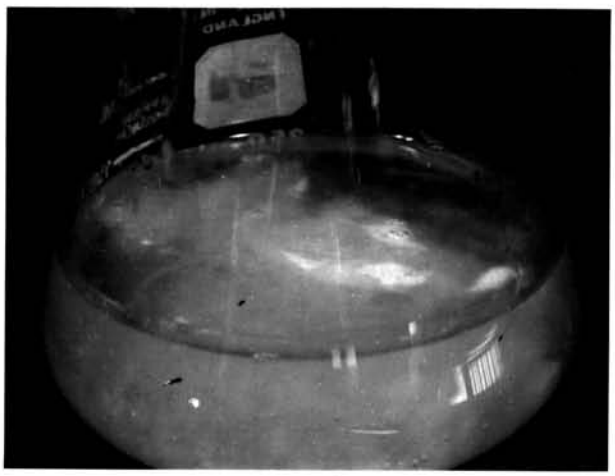
ภาพที่ 1 ข. ลักษณะของต้นมินต์พันธุ์สว. 1 ที่เริ่มแสดงอาการเหี่ยว



ภาพที่ 1 ค. ต้นมินต์พันธุ์สว. 1 ที่แสดงอาการเหี่ยว



ภาพที่ 2 แสดงส่วนของลำต้นมินต์ซึ่งเป็นโรค
เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 3 spore suspension

ภาพที่ 4 การแช่ส่วนรากต้นมินต์พันธุ์สว. 1
ด้วย 0.1 % mercuric chloride

ภาพที่ 5 การราด spore suspension ลง
ในกระถางต้นมินต์

ภาพที่ 6 การแช่ส่วนรากต้นมินต์ลงใน
spore suspension