บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สถานที่และระยะเวลาการทำการทดลอง

ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระยะเวลาทดลองตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2553 ถึงเดือนกุมภาพันธุ์ พ.ศ. 2554

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พันธุ์คนเหล็กซุปเปอร์ ได้มาจากบริษัทพืชพันธุ์ตะวันเหนือ จำกัด
2. น้ำมันหอมระเหยกานพลู โหระพา และสะระแหน่ จากบริษัทยูไนเต็ด เคมีคอล แอนด์ เทรดดิ้ง จำกัด 108/19 หมู่ที่ 1 ถ.มหิดล ต.หนองหอย อ.เมือง จ.เชียงใหม่ เบอร์โทร (053) 800659
3. ไคโตซานชนิดเกล็ดผง จากหจก. นอร์ทเทอร์นเคมิเคิล แอนด์ กลาสแวร์ 154/2 หมู่ที่ 2 ถ.ซุปเปอร์ไฮเวย์เชียงใหม่-ลำปาง ต.ช้างเผือก อ.เมือง จงเชียงใหม่ เบอร์โทร (053) 223866-7
4. โซเดียมลิกโนซัลโฟเนท (Sodium-lignosulphonate)
5. กรดอะซิติก

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยกานพลู โหระพา สะระแหน่ และแคปแทนต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

การเคลือบเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จำนวน 1 กิโลกรัม จะประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากพืช 2 มิลลิลิตร และสารละลายไคโตซาน (Chitosan lignosulphonate polymer, CLP) 8 มิลลิลิตรเป็นวัสดุประสาน การเตรียม CLP เตรียมได้จากนำสารละลายไคโตซาน 3 เปอร์เซ็นต์ (ไคโตซาน 3 กรัม ละลายใน 1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 100 มิลลิลิตร) ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมลิกโนซัลโฟเนท (Sodium-lignosulphonate) (Sodium-lignosulphonate 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 9:1 ทำการทดลองแบบ 15*4 Factorial in CRD ทวนซ้ำ 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 กรรมวิธีในการเคลือบเมล็ดพันธุ์ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1. เมล็ดพันธุ์ชุดควบคุมไม่ทำการเคลือบสารใด ๆ

กรรมวิธีที่ 2. เคลือบเมล็ดพันธุ์เฉพาะแคปแทน 3 กรัม

กรรมวิธีที่ 3. เคลือบเมล็ดพันธุ์เฉพาะ CLP 8 มล.

กรรมวิธีที่ 4. เคลือบเมล็ดพันธุ์เฉพาะน้ำมันหอมระเหยกานพลู 2 มล.

กรรมวิธีที่ 5. เคลือบเมล็ดพันธุ์เฉพาะน้ำมันหอมระเหยโหระพา 2 มล.

กรรมวิธีที่ 6. เคลือบเมล็ดพันธุ์เฉพาะน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ 2 มล.

กรรมวิธีที่ 7. เคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วย CLP 8 มล. น้ำมันหอมระเหยกานพลู 0.5 มล. และน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1.5 มล. (CO+BO; 1:3)

กรรมวิธีที่ 8. เคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วย CLP 8 มล. น้ำมันหอมระเหยกานพลู 1.0 มล. และน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1.0 มล. (CO+BO; 1:1)

กรรมวิธีที่ 9. เคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วย CLP 8 มล. น้ำมันหอมระเหยกานพลู 1.5 มล. และน้ำมันหอมระเหยโหระพา 0.5 มล. (CO+BO; 3:1)

กรรมวิธีที่ 10. เคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วย CLP 8 มล. น้ำมันหอมระเหยกานพลู 0.5 มล. และน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ 1.5 มล. (CO+PO; 1:3)

กรรมวิธีที่ 11. เคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วย CLP 8 มล. น้ำมันหอมระเหยกานพลู 1.0 มล. และน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ 1.0 มล. (CO+PO; 1:1)

กรรมวิธีที่ 12. เคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วย CLP 8 มล. น้ำมันหอมระเหยกานพลู 1.5 มล. และน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ 0.5 มล. (CO+PO; 3:1)

กรรมวิธีที่ 13. เคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วย CLP 8 มล. น้ำมันหอมระเหยโหระพา 0.5 มล. และน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ 1.5 มล. (BO+PO; 1:3)

กรรมวิธีที่ 14. เคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วย CLP 8 มล. น้ำมันหอมระเหยโหระพา 1.0 มล. และน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ 1.0 มล. (BO+PO; 1:1)

กรรมวิธีที่ 15. เคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วย CLP 8 มล. น้ำมันหอมระเหยโหระพา 1.5 มล. และน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ 0.5 มล. (BO+PO; 3:1)

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ภายหลังจากการเคลือบเมล็ด

1. เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ระยะเวลา 0 เดือน
2. เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ระยะเวลา 2 เดือน
3. เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ระยะเวลา 4 เดือน
4. เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ระยะเวลา 6 เดือน

เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ไว้ในถังพลาสติกสีดำที่อุณหภูมิห้อง และนำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มาทดสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในระหว่างการเก็บรักษาด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

1. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อการป้องกันกำจัดเชื้อรา

1.1 ตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด

1.1.1 โดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter method)

นำกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรจำนวน 1 แผ่น ประกบติดกับกระดาษเพาะที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรจำนวน 3 แผ่น โดยให้กระดาษกรองวางอยู่ด้านบน แล้วนำไปจุ่มในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ชุ่ม จากนั้นนำมาวางในจานอาหาร นำเมล็ดข้าวโพดที่ต้องการทดสอบวางบนกระดาษชื้น จำนวนจานละ 10 เมล็ด ทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำไปตรวจหาเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนเมล็ดที่ติดเชื้อรา (ISTA, 2006) และทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การควบคุมเชื้อราจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่มีการติดเชื้อ} \times 100}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา} = \frac{(\text{เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราในชุดควบคุม} - \text{เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราในแต่ละกรรมวิธี}) \times 100}{\text{เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราในชุดควบคุม}}$$

2. การทดสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ภายหลังการเคลือบเมล็ด

2.1 ทดสอบความงอก (Germination test)

2.1.1 โดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Between paper method)

นำกระดาษเพาะจำนวน 3 แผ่นที่มีขนาดเท่ากันจุ่มน้ำให้เปียกชุ่ม พับปลายกระดาษเพาะขึ้นมาประมาณ 1 นิ้ว แล้วดึงกระดาษเพาะแผ่นแรกลงมา วางเมล็ดข้าวโพดจำนวน 50 เมล็ด ทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 200 เมล็ด วางเมล็ดให้อยู่ห่างกันพอประมาณ จากนั้นดึงกระดาษเพาะแผ่นแรกปิดทับบนเมล็ดแล้วม้วนกระดาษเพาะ นำม้วนกระดาษใส่ในตะแกรงและนำไปเพาะไว้ในตู้เพาะเมล็ด เมื่อครบ 7 วัน นำม้วนกระดาษเพาะมาเปิดออก ตรวจนับจำนวนต้นกล้าปกติ (ISTA, 2006)

2.2 ทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (Seed vigor test)

2.2.1 ตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Seedling growth rate test)

สุ่มเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ขอแต่ละกรรมวิธีมาวางเรียงบนกระดาษ เช่นเดียวกับการทดสอบความงอก แต่วิธีการเรียงเมล็ดบนกระดาษนี้ต้องใช้ความประณีตมากกว่าการทดสอบความงอก คือ จัดวางเมล็ดแถวละ 25 เมล็ด 2 แถว เป็นแนวตามความยาวของกระดาษ ให้ห่างจากขอบด้านหนึ่งประมาณ 6 เซนติเมตร และ 13 เซนติเมตร การจัดเรียงเมล็ดพันธุ์บนกระดาษให้วางให้ส่วนปลายของรากอ่อนอยู่ด้านล่างของกระดาษ เมล็ดพันธุ์ที่จัดวางเรียบร้อยแล้ว ต้องปิดทับด้วยกระดาษเพาะอีกชั้นหนึ่งแล้วจึงม้วน นำม้วนกระดาษใส่ในตะแกรงและนำไปเพาะไว้ในตู้เพาะเมล็ดที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ต้องให้แสง เมื่อครบกำหนด 7 วัน นำเมล็ดออกมานับความงอก และตัดเอาเฉพาะส่วนของยอดและรากของต้นกล้าปกติบรรจุใส่ในถุงกระดาษ นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อน แล้วคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (AOSA, 2001)

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อน (มิลลิกรัม/ต้น)}}{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}}$$

2.2.2 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของยอดและราก (Shoot and Root Growth rate)

นำกระดาษเพาะจำนวน 3 แผ่นที่มีขนาดเท่ากันจุ่มน้ำให้เปียกชุ่ม พับปลายกระดาษเพาะขึ้นมาประมาณ 1 นิ้ว แล้วดึงกระดาษเพาะแผ่นแรกลงมา วางเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จำนวน 20 เมล็ด ทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 80 เมล็ด โดยวางเมล็ดเรียงให้เป็นแถวยาวตามความยาวของกระดาษ ให้แถวห่างจากขอบกระดาษ 5 เซนติเมตร จากนั้นดึงกระดาษเพาะแผ่นแรกปิดทับบนเมล็ดแล้วม้วน

กระดาษเพาะ นำม้วนกระดาษใส่ในตะแกรงและนำไปเพาะไว้ในตู้เพาะเมล็ด เมื่อครบ 5 วัน นำม้วนกระดาษเพาะมาประเมินผล โดยวัดความยาวของส่วนที่งอกเป็นรากและลำต้น (AOSA, 2001)

2.2.3 โดยวิธีการเร่งอายุ (Accelerated aging test)

เตรียมขวดโหลหรือขวดเร่งอายุโดยการเติมน้ำลงไปในขวด 100 มิลลิลิตร จากนั้นสุ่มนับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ จำนวน 200 เมล็ด ใส่ลงในตะแกรงลวดที่เตรียมไว้ และนำตะแกรงลวดที่บรรจุเมล็ดไว้แล้ววางลงในขวดเร่งอายุ ปิดฝาขวดให้สนิท นำขวดเร่งอายุไปใส่ไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 86 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดที่ผ่านการเร่งอายุแล้วมาทดสอบความงอกโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้นทันที เมื่อครบ 7 วันหลังการเพาะทำการตรวจนับต้นกล้าปกติและเมล็ดตาย (AOSA, 2001)

2.2.4 การวัดดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (Germination Index)

การวัดดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ ทำควบคู่ไปกับการทดสอบความงอกมาตรฐาน แต่ทำการประเมินผลโดยการตรวจนับจำนวนต้นกล้าที่งอกทุกวันหลังเพาะจนครบ 7 วัน นำผลการตรวจนับมาคำนวณหาค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ดังนี้ (ISTA, 2006)
ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ = ผลบวกของ (จำนวนต้นกล้าที่งอก/จำนวนวันหลังเพาะ) (ต้น/วัน)

2.2.5 การจำแนกความแข็งแรงของต้นกล้า (Classification test)

การจำแนกความแข็งแรงของต้นกล้า ทำควบคู่ไปกับการทดสอบความงอกมาตรฐาน หลังจากเพาะเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จนครบ 7 วัน ทำการประเมินผลโดยการวัดความสูงของต้นกล้า ต้นกล้าสูง 0-7 เซนติเมตร คือ ต้นกล้าอ่อนแอ ต้นกล้าสูง 7.1-14 เซนติเมตร คือ แข็งแรงปานกลาง และต้นกล้าที่สูงตั้งแต่ 14.1 เซนติเมตรขึ้นไป คือ แข็งแรงมาก (ISTA, 2006)

การทดลองที่ 2 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยกานพลูร่วมกับโหระพาต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus*

ทำการแยกเชื้อ *A. flavus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ โดยใช้เข็มเขี่ยเขี่ยเส้นใยของเชื้อ *A. flavus* นำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เลี้ยงเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อที่มีอายุ 7 วัน มาทำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา โดยการเทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตรลงไปในจานอาหาร ใช้แผ่น slide ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วขูดผิวหน้าอาหารที่มีโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* เจริญอยู่ จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น ที่รองด้วยบีกเกอร์ นำส่วนที่ได้ไปตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วย Haemacytometer ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองแบบ CRD ทวนซ้ำ 4 ซ้ำ โดยนำสปอร์ของเชื้อ *A. flavus* ที่ได้มาทำการทดสอบกับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1. เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ *A. flavus* ลงไป และไม่ได้เคลือบเมล็ดด้วยน้ำมันหอมระเหย

กรรมวิธีที่ 2. นำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราฉีดพ่นลงบนเมล็ดข้าวโพดที่ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วให้ทั่ว ผึ่งเมล็ดให้แห้ง ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง (ปลูกเชื้อลงบนเมล็ดพันธุ์)

กรรมวิธีที่ 3. ทำการเคลือบเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ด้วยกรรมวิธีที่ให้ผลในการป้องกันกำจัดเชื้อราดีที่สุด (กรรมวิธีที่ 7-15) จากผลการทดลองที่ 0 เดือน (ไม่ปลูกเชื้อ *A. flavus* ลงบนเมล็ดพันธุ์แต่ทำการเคลือบเมล็ดด้วยน้ำมันหอมระเหย)

กรรมวิธีที่ 4. นำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราฉีดพ่นลงบนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วให้ทั่ว ผึ่งเมล็ดให้แห้ง ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วยกรรมวิธีที่ให้ผลในการป้องกันกำจัดเชื้อราดีที่สุด (กรรมวิธี 7-15) จากผลการทดลองที่ 0 เดือน (เคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วยน้ำมันหอมระเหยภายหลังจากการปลูกเชื้อ)

จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แต่ละกรรมวิธีมาตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *A. flavus* ที่ติดมากับเมล็ด โดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter method) และทำการทดสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (Germination test) โดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Between paper method)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์หาความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโดย Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์โดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient)