

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

การศึกษาศาสตร์อัลลีโลเคมีคอลจากพืช 3 ชนิด ที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดพืชเศรษฐกิจและวัชพืชบางชนิด และการเจริญเติบโตของ *Colletotrichum* sp. และ *Xanthomonas* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังรายละเอียดต่อไปนี้

การทดลองที่ 1

การศึกษาศาสตร์อัลลีโลเคมีคอล (allelochemical) ที่มีอยู่ในพืชต่อการงอกของเมล็ดพืชเศรษฐกิจ และวัชพืช

การวางแผนการทดลอง

การศึกษาศาสตร์อัลลีโลเคมีคอล ที่มีอยู่ในพืชต่อการงอกของเมล็ดพืชเศรษฐกิจ และวัชพืช การวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) โดยการเตรียมสารสกัดจากพืชทั้งหมด 3 ชนิด แต่ละชนิดแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ใบ ลำต้น และราก แต่ละส่วนแบ่งเป็น 5 ระดับความเข้มข้น ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำๆ ละ 1 จานเพาะ (50 เมล็ด ต่อ 1 จานเพาะ)

การเตรียมพืชอัลลีโลพาติและพืชทดสอบ

พืชอัลลีโลพาติที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 3 ชนิด คือ ต้อยติ่ง กระดุมทองเลื้อย และผักโขม เมล็ดพืชทดสอบที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด แบ่งเป็น พืชเศรษฐกิจ 3 ชนิด คือ พริก มะเขือเทศ และข้าว และวัชพืช 3 ชนิด คือ ไมยราบ ผักโขม และผักเสี้ยนผี

การเตรียมสารสกัดจากพืช

สกัดสารจากพืชทั้ง 3 ชนิด ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ โดยล้างพืชผ่านน้ำให้สะอาด ตัดแบ่งพืชออกเป็นสามส่วน คือ ใบ ลำต้น และราก ชับให้แห้งด้วยกระดาษเยื่อหนึ่งฆ่าเชื้อ นำแต่ละส่วนแยกบดด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้ออัตราส่วนพืช (น้ำหนักสด) 50 กรัม ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นเจือจางสารสกัดที่ได้ให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100% ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ทดสอบภายใน 3-4 วัน

ทดสอบการงอกของเมล็ดพืชและวัชพืช

เพาะเมล็ดพืชและวัชพืชบนจานเพาะที่มีกระดาษสำหรับเพาะเมล็ดหนึ่งผืนเชื้อ จำนวน 50 เมล็ดต่อ 1 จานเพาะ หยดสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ปริมาณ 5 ml ใช้น้ำกลั่นหนึ่งผืนเชื้อเป็นการทดลองควบคุม (control) วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลองทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน โดยวัดค่าอัตราการงอกของเมล็ด ดังนี้

- ค่าเปอร์เซ็นต์การงอกทั้งหมด (Total germination, G_T) จากสูตร

$$G_T = \left[\frac{N_T * 100}{N} \right]$$

N_T : จำนวนเมล็ดที่งอกแต่ละทรีทเมนต์ ในวันสุดท้ายของการบันทึกผล

N : จำนวนเมล็ดที่ใช้ในการทดสอบ

- ค่าความเร็วของการงอก (Speed of germination, S) จากสูตร

$$S = (N_1 * 1) + (N_2 - N_1) * \frac{1}{2} + (N_3 - N_2) * \frac{1}{3} + \dots + (N_n - (N_n - 1)) * \frac{1}{n}$$

$N_1, N_2, N_3, \dots, N_{n-1}, N_n$: จำนวนเมล็ดที่งอกวันที่ 1, 2, 3, ..., วันที่ n

- ค่าความเร็วสะสมของการงอก (Speed of Accumulated germination, AS) จากสูตร

$$AS = \left[\frac{N_1}{1} + \frac{N_2}{2} + \frac{N_3}{3} + \dots + \frac{N_n}{n} \right]$$

$N_1, N_2, N_3, \dots, N_n$: จำนวนสะสมของความเร็วในการงอกที่เวลา 1, 2, 3, ..., N

- ค่าสัมประสิทธิ์ของอัตราการงอก (Coefficient of the germination, CRG) จากสูตร

$$CRG = \frac{[N_1 + N_2 + N_3 + \dots + N_n]}{(N_1 * T_1) + (N_2 * T_2) + (N_3 * T_3) + \dots + (N_n * T_n)} * 100$$

N_1 : จำนวนของความเร็วในการงอกที่เวลา T_1

N_2 : จำนวนของความเร็วในการงอกที่เวลา T_2

N_3 : จำนวนของความเร็วในการงอกที่เวลา T_3

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test, DMRT (Steel and Torrie, 1980) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS 6.12 (มนชัย, 2537) เพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการงอกของเมล็ดพืช และวัชพืช

การทดลองที่ 2

ศึกษาผลของสารสกัดและความสามารถเบื้องต้นต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

การวางแผนการทดลอง

การศึกษาผลของสารสกัดและความสามารถเบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD โดยการเตรียมสารสกัดจากพืชทั้งหมด 3 ชนิด แต่ละชนิดแบ่งเป็นส่วน ราก ใบ และลำต้น แต่ละส่วนแบ่งเป็น 5 ระดับความเข้มข้น ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ

เตรียมสารสกัดจากพืช

สกัดสารจากพืชทั้ง 3 ชนิด โดยล้างพืชผ่านน้ำให้สะอาด ตัดแบ่งพืชออกเป็นสามส่วน คือ ใบ ลำต้น และราก นำแต่ละส่วนแยกบดด้วยเครื่องปั่น แช่ในสารละลายเฮกเซน อัตราส่วนพืช (น้ำหนักสด) 50 กรัม ต่อเฮกเซน 100 มิลลิลิตร แช่ไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกกากออก จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วยเครื่อง Rotary evaporator จนได้สารสกัดที่เข้มข้น เก็บไว้รักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการทดสอบ

เตรียมเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมราโดยตัดชิ้นส่วนปลายวุ้นของเชื้อราที่แยกได้จากพืชที่แสดงลักษณะอาการของโรค วางลงบนอาหาร PDA บ่มไว้เพื่อให้เชื้อราเจริญเต็มผิวหน้าของอาหาร และเตรียมเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี spread plate โดยปิเปตต์เชื้อที่แยกได้จากพืชที่แสดงอาการของโรค เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^6 ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาใส่ลงบนผิวของอาหาร NA จากนั้นนำแท่งแก้วมาทำการเกลี่ยให้ทั่วบริเวณผิวหน้าของอาหารเพื่อใช้ในการทดสอบสารสกัด

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

นำกระดาษกรองที่ตัดเป็นแผ่นกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขูดลงในสารสกัดความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100% ปล่อยให้แห้ง นำแผ่นกระดาษที่ขูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้น วางบนผิวหน้าของอาหารที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อรา และแบคทีเรียที่เตรียมไว้ โดยมีแผ่นกระดาษกลมชุบเฉพาะเฮกเซนเป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ทำ

การทดลองจำนวน 4 ซ้ำ ปั่นเชื้อไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการบันทึกผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโต (inhibition zone or clear zone) ของเชื้อ ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน คัดค่าเฉลี่ยของวงใสในแต่ละวันที่ทำการบันทึกผล