

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การประเมินปริมาณการเกิดโรคต้นแคกยางไผ่บนพืชตระกูลแตง

ผู้ตรวจนับจำนวนต้นที่แสดงอาการของโรคต้นแคกยางไผ่จากแปลงแตงโม แคนตาลูปและแตงกวาที่ปลูกเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ส่งต่างประเทศในเขตจังหวัดขอนแก่นใน 2 ช่วงปลูก คือเดือนมีนาคมและเดือนตุลาคม โดยแบ่งเป็นแปลงละ 4 จุดๆ ละ 20 ต้น จากอาการที่เกิดบนใบ ลำต้นและผล แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและวิเคราะห์ผลความแตกต่างทางสถิติเพื่อดูปริมาณของโรคที่เกิดขึ้นว่ามีปริมาณมากน้อยเพียงใด

2. การแยกและเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุ

2.1 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

เก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงจากบริเวณส่วนต่างๆ ของลำต้นที่แสดงอาการของโรคจากในแปลงเกษตรกรที่สำรวจปริมาณการเกิดโรคในเขตจังหวัดขอนแก่น มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplanting (Johnston and Booth, 1983) โดยตัดชิ้นส่วนพืชขนาดเล็กๆ ตรงบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (คลอโรกซ์) ความเข้มข้น 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง จากนั้นนำไปวางเลี้ยงบน Water Agar (WA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ รอจนมีเส้นใยเจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืชนั้น แล้วตัดเอาชิ้นส่วนที่มีเส้นใยของเชื้อสาเหตุติดอยู่ไปวางเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA, Difco Ltd.) เก็บเชื้อไอโซเลตต่างๆ ที่แยกได้จนบริสุทธิ์ในหลอดทดลอง นำเก็บไว้ในตู้เย็น (4°C) เพื่อไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2 การคัดเลือกไอโซเลตของ *D. bryoniae* ที่เหมาะสมสำหรับศึกษาในงานทดลองต่างๆ

นำเชื้อสาเหตุไอโซเลตต่างๆ ที่เก็บรวบรวมไว้ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) กับแตงโมพันธุ์ซูการ์เบบี้ (Sugar baby) ในสภาพห้องทดลองโดยตัดลำต้นของแตงโมเป็นท่อนยาวประมาณ 7 เซนติเมตร ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 10 % นาน 3 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง ปลุกเชื้อสาเหตุลงบนท่อนแตงโมโดยใช้ไม้จิ้มฟันที่วางเลี้ยงบนอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่เต็มเป็นเวลา 5-7 วัน จนมีเส้นใยหรือฟัคนิเดียของเชื้อไอโซเลตต่างๆ เจริญอยู่เต็มไม้จิ้มฟัน นำท่อนแตงโมที่ปลุกเชื้อแล้วใส่ในกล่องขึ้น บ่มที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 % ภายใต้แสง (ฟลูออเรสเซนต์ 10 วัตต์) จำนวน 4 หลอด เมื่อครบเวลา 3 วัน สังเกตการเกิดแผลบนชิ้นแตงโมจากบริเวณที่ทำการปลุกเชื้อ คัดเลือกเฉพาะไอโซเลตที่สามารถทำให้พืชเกิดแผลได้เท่านั้นเพื่อเก็บไว้ใช้ในงานทดลองอื่นต่อไป

3. การตรวจหาไอโซเลตของ *D. bryoniae* ที่ด้านทานและอ่อนแอต่อสารเบนซิมิดาโซลและสารไดคาร์บอกซิไมด์

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. เจาะปลายเส้นใยของเชื้อสาเหตุไอโซเลตต่างๆ ที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 5-7 วัน แล้วนำมาวางเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมและไม่ผสมสารเบนซิมิดาโซล (คาร์เบนดาซิม 50 % w/v : บ.เอ็กซ์ไทย จำกัด) ความเข้มข้น 1, 10 มก./ล. (FAO, 1982) และสารไดคาร์บอกซิไมด์ (ไฮโปรไดโอน 50 % w/p : บ. เมย์แอนด์เบเกอร์ จำกัด) ความเข้มข้น 1, 10 มก./ล. (FAO, 1982) บ่มที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเป็นเวลาอย่างน้อย 5 วัน เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อที่ได้ โดยจะสามารถแบ่งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้ 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มของเชื้อที่ต้านทานต่อสาร คือ เชื้อสาเหตุสามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมสารเบนซิมิดาโซลและไดคาร์บอกซิไมด์ความเข้มข้น 1 มก./ล.

กลุ่มของเชื้อที่อ่อนแอต่อสาร คือ เชื้อสาเหตุไม่สามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมสารเคมีที่ระดับ

ความเข้มข้น 1 มก./ล. ในสารเคมีทั้ง 2 ชนิด หลังจากนั้นจึงเพิ่มความเข้มข้นของสารขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 3, 10, 30, 100, 300, 1,000 มก./ล. สำหรับไอโซเลตของเชื้อที่ต้านทานต่อสารเบนซิมิดาโซล และที่ระดับความเข้มข้นที่ .01, .05, .10, .13, .20, .30, .55 มก./ล สำหรับไอโซเลตของเชื้อที่อ่อนแอต่อสารเบนซิมิดาโซล ส่วนในกรณีของสารไดคาร์บอกซิไมด์ จะเพิ่มความเข้มข้นของสารเป็น 5, 10, 30 มก./ล. ในทุกไอโซเลตของเชื้อสาเหตุ บันทึกอัตราการเจริญของเส้นใยบนอาหาร PDA ทั้งที่ไม่ผสมและผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ในแต่ละความเข้มข้นของสาร นำผลดังกล่าวไปหาสมการรีเกรสชัน (regression) แล้วนำค่าความชัน (b) จากสมการดังกล่าวไปลงในโพรบิท กราฟ (probit) หรือแก้สมการเพื่อหาค่า EC_{50} ของสารป้องกันกำจัดเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ในการควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุและเพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อในแต่ละไอโซเลตต่อไป

4. การศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชและปัจจัยพื้นฐานด้านระบาดวิทยา

คัดเลือกเชื้อสาเหตุจำนวน 10 ไอโซเลต จากเชื้อที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคและที่ผ่านการทดสอบความต้านทานหรืออ่อนแอต่อสารเคมี มาปลูกเชื้อลงบนพืชตระกูลแดง 3 ชนิด คือ แดงโม แคนตาลูปและแตงกวา ตามวิธีการดังข้อ 2.2 บ่มเชื้อที่ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 % ภายใต้แสงสว่าง (ฟลูออเรสเซนต์ 10 วัตต์) จำนวน 4 หลอด บันทึกผลการทดลองเปรียบเทียบความเร็วในการทำให้เกิดแผล (incubation period) อัตราการแผ่ขยายขนาดของแผล (rate of colonization) และความเร็วในการสร้างฟิคนิเคีย (latent period) ในกรณีที่มีการสร้างปรากฏให้เห็น ใช้การทดลองแบบ 10×3 factorial experiment in randomized complete blocks design จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วยปัจจัย 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลตของ *D. bryoniae* จำนวน 10 ไอโซเลต

ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ พืชตระกูลแดง 3 ชนิด คือ แดงโม แคนตาลูปและแตงกวา

ประวัติไอโซเลตของ *D. bryoniae* ที่คัดเลือกมาทดสอบในงานต่างๆ

ไอโซเลต	พืช	สถานที่เก็บ	ฟีนไทม์	ปีที่เก็บ	ความสามารถ ในการทำให้เกิดโรค	อัตราการเจริญ เฉลี่ย(มม./วัน)
WaR 1	แตงโม	อ.บ้านฝาง จ.ขอนแก่น	MBCR	2535	+	8.32
CuR 2	แตงกวา	อ.สีชมพู จ.ขอนแก่น	MBCR	2536	+	5.07
CuR 3	แตงกวา	อ.สีชมพู จ.ขอนแก่น	MBCR	2536	+	4.43
CuR 4	แตงกวา	อ.สีชมพู จ.ขอนแก่น	MBCR	2536	+	5.79
CuR 5	แตงกวา	อ.บ้านฝาง จ.ขอนแก่น	MBCR	2535	+	8.28
CuR 6	แตงกวา	อ.บ้านฝาง จ.ขอนแก่น	MBCR	2535	+	8.25
CuS 1	แตงกวา	อ.สีชมพู จ.ขอนแก่น	MBCS	2536	+	4.69
CuS 2	แตงกวา	อ.สีชมพู จ.ขอนแก่น	MBCS	2536	+	3.46
CuS 3	แตงกวา	อ.สีชมพู จ.ขอนแก่น	MBCS	2536	+	8.14
CuS 4	แตงกวา	อ.สีชมพู จ.ขอนแก่น	MBCS	2536	+	4.53

5. การศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุในสภาพธรรมชาติ

5.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์แตงโมและแตงกวาลูกผสมโดยวิธี blotter method

กลุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์แตงโมและแตงกวาลูกผสมที่ผลิตเมล็ดพันธุ์ส่งต่างประเทศที่ทราบและไม่ทราบเปอร์เซ็นต์ความเสียหายในแปลงปลูกจำนวน 400 เมล็ด/ตัวอย่าง มาทดสอบด้วยวิธี blotter method (พิศาล, 2530) โดยใช้กระดาษเพาะเมล็ดที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเท่างานเลี้ยงเชื้อ อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาวางในงานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petridish)

แล้วจึงเติมสารละลาย 2,4-D (2,4-Dichlorophen oxyacetic acid) ความเข้มข้น 0.1% ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแทนการใช้น้ำเปล่าเพื่อยับยั้งการงอกของเมล็ด (โสมภณ, ไม่ได้ตีพิมพ์) แล้วนำไปวางภายใต้แสงแบล็คไลต์ (40 วัตต์) จำนวน 3 หลอด ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5-7 วัน ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *D. bryoniae* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวภายใต้กล้องสเตอริโอ นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบ randomized complete block design จำนวน 4 ซ้ำ

5.2 การศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุในสภาพธรรมชาติ

ปลูกเชื้อสาเหตุจำนวน 10 ไอโซเลตเดิม ลงบนท่อนพันธุ์แดงโมโดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.2 ทั้งไว้นกกระทาท่อนแดงมีเส้นใยหรือฟัคมินิเดียเจริญอยู่เต็ม จึงนำไปห่อด้วยผ้าขาวบาง ผึ่งลงในดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ 40 % บรรจุในกระถางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6 นิ้ว ผึ่งในระดับความลึกประมาณ 5 เซนติเมตร นำกระถางดังกล่าวไปตั้งไว้กลางแจ้ง แล้วนำท่อนแดงดังกล่าวกลับมาตรวจสอบความมีชีวิตทุกๆ 2 เดือน โดยแยกเชื้อได้จากการแบ่งชิ้นส่วนแดงในแต่ละท่อนนำไปล้างน้ำไหลนาน 2 นาที ผึ่งให้แห้ง นำไปวางเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสเตรปโตไมซิน (streptomycin) ความเข้มข้น 1 มล./10 มล. (100 หน่วย/มล.) (Johnston and Booth, 1983) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ส่วนท่อนแดงที่เหลือนำกลับไปผึ่งไว้ตามเดิมเพื่อเก็บไว้ตรวจสอบผลในครั้งต่อไป บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเชื้อที่แยกได้และเมื่อครบ 6 เดือน ทำการตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชตระกูลแดงอีกครั้งหนึ่ง ใช้การทดลองแบบ randomized complete blocks design จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 10 ซ้ำ

6. การศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายพืชตระกูลแดงชนิดต่างๆ ของ *D. bryoniae*

ปลูกพืชตระกูลแดงแต่ละชนิดลงในแปลงขนาด 1x6 เมตร ฉีดพ่นสารประกอบซัลเฟอร์ (อีโอวิท 80 % w/w.) เพื่อป้องกันโรคราแป้งหลังจากการย้ายปลูกและฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดแมลงทุกสัปดาห์ เมื่อพืชมีอายุประมาณ 30 วัน หลังจากเมล็ดงอก ตัดลำต้นนำไปทดสอบในห้องปฏิบัติการ

เช่นเดียวกับข้อ 2.2 วัดขนาดแผลเพื่อเปรียบเทียบการเกิดโรคในพืชตระกูลแตงชนิดต่างๆ ใช้การทดลองแบบ 10x12 factorial experiment in randomized complete blocks design จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วยปัจจัย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลตของเชื้อ *D. bryoniae* จำนวน 10 ไอโซเลตเดิม ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ พืชตระกูลแตง 12 ชนิด คือ

พืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	ที่มา
แตงโม	<i>Citrullus lanatus</i>	Sugar baby ตรารดถึง หจก.พีเอชอีคส์
แตงกวา	<i>Cucumis sativus</i>	พันธุ์ลูกผสมของ หจก.โชคศิริ
แคนตาลูป	<i>Cucumis melo</i> var. cantaloupensis.	พันธุ์ลูกผสมของบริษัทสากลเมล็ดพันธุ์ จำกัด
แตงร้าน	<i>Cucumis sativus</i>	ตราเครื่องบิน บ.เจียใต้ จำกัด
บวบหอม	<i>Luffa cylindrica</i>	ตราดาว ห้างเมล็ดพันธุ์เจียฮะหลี
บวบเหลี่ยม	<i>Luffa acutangula</i>	ตราดาว ห้างเมล็ดพันธุ์เจียฮะหลี
แตงไทย	<i>Cucumis melo</i>	ตรารดถึง หจก.พีเอชอีคส์
ฟักทอง	<i>Cucurbita moschata</i>	ตรารดถึง หจก.พีเอชอีคส์
แฟง	<i>Benincasa cerifera</i>	ตรารดถึง หจก.พีเอชอีคส์
มะระจีน	<i>Momordica charantia</i>	ตราเครื่องบิน บ.เจียใต้ จำกัด
ขี้กา	<i>Trichosanthes wawraei</i>	วัชพืช
คำลิง	<i>Coccinea grandis</i>	วัชพืช

7. การศึกษาความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุโดยชีววิธี

คัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุ จำนวน 6 ไอโซเลต นำมาศึกษาเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *D. bryoniae* โดยวางเลี้ยงบนอาหาร PDA ในตำแหน่งตรงข้ามกับเชื้อ *D. bryoniae* ที่เจริญอยู่แล้ว (เนื่องจากเชื้อสาเหตุเจริญได้ช้า

กว่า จึงต้องทำการเลี้ยงให้เชื้อเจริญก่อนเป็นเวลา 3 วัน) บ่มที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ บ่มที่กผลโดยวัตรระยะทางที่ *Trichoderma* spp. เจริญขึ้นคลุมเชื้อสาเหตุเป็นเวลา 5 วัน ใช้การทดลองแบบ 6x7 factorial experiment in randomized complete blocks design ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วยปัจจัย 2 ประการ คือ ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลตของ *Trichoderma* spp. จำนวน 6 ไอโซเลต คือ T1, T2, T19, T20, T27, Tm

ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลตของเชื้อ *D. bryoniae* จำนวน 7 ไอโซเลต คือ WaR 1, CuS 1, CuS 2, CuR 1, CuR 3, Cu 6, Cu 28

8. การศึกษาปฏิกริยาของพันธุ์พืชตระกูลแตงต่อ *D. bryoniae*

ปลูกเชื้อสาเหตุจำนวน 10 ไอโซเลตเดิม ลงบนท่อนแตงที่ได้จากการปลูกและดูแลปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 6 จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยวิธีการเดียวกันกับข้อ 2.2 ใช้การทดลองแบบ 10x8 factorial experiment in randomized complete blocks design จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วยปัจจัย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลตของ *D. bryoniae* จำนวน 10 ไอโซเลตเดิม

ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ พันธุ์พืชตระกูลแตง จำนวน 8 พันธุ์ คือ แตงกวาพันธุ์ Cu 512, Cu 513, Cu 520, Cu 525, Cu 540, Cu 547 แก่นตาลูปพันธุ์ ME 550 และแตงโมพันธุ์ WM 508