บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การตรวจหาสาเหตุของโรคใบจุดดำลำไย

1.1 การแยกเชื้อราจากใบพืชที่ผ่านการกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ด้วยกรัมม็อกโซน (Grammoxone; paraquat dichloride)

นำใบลำไยปกติและที่เป็นโรคใบจุดดำมาทำการทดลอง โดยนำมาผ่านน้ำไหลก่อนนาน 5-6 ชั่วโมง แล้วจึงฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ใน alcohol 95% นาน 3-4 วินาที และแช่ใน Clorox 10% นาน 3-4 นาที จึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 1 นาที แล้วแช่ใน กรัมม็อกโซนความเข้มข้น 5 % นาน 4 นาที หลังจากนั้นนำมาบ่มเชื้อไว้ในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นสูงนาน 5 วัน จึงทำการบันทึกผลการทดลอง

แยกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ที่สร้างสปอร์บนผิวใบโดยใช้ห่วงลวดที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว นำมาแตะบริเวณกลุ่มของสปอร์สีส้ม แล้วนำมาวางไว้บนจานอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) หลังจากนั้นแยกเชื้อราบริสุทธิ์มาเพิ่มปริมาณในอาหาร MYA (Malt Yeast extract Agar) เก็บเชื้อไว้สำหรับการทดลองต่อไป

1.2 การใช้กรัมม็อกโซนในการตรวจหาเชื้อราบนใบลำไยที่ผ่านการปลูกเชื้อโดยวิธี Detach Leaf Technique และวิธีการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์

เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง ได้จากการแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากการทดลองที่ 1.1 คือ *Colletotrichum* sp.

การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร MYA เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งเชื้อราสามารถสร้างสปอร์ได้เป็นจำนวนมาก จากนั้นเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลถูให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหาร นำสารแขวนลอยสปอร์ กรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น จะได้สารแขวนลอยสปอร์ที่ต้องการ

ใช้ haemacytometer ในการนับจำนวนสปอร์ ปรับจำนวนสปอร์ให้มีที่ความเข้มข้น $9x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผสมสารจับใบ Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate) ในอัตรา 2 หยด (40 ไมโครลิตร) ต่อน้ำ 1 ลิตร ลงไปในสารแขวนลอยสปอร์นั้น

การปลูกเชื้อโดยวิธี Detached Leaf Technique

นำใบอ่อนลำไยมาทำการทดลอง โดยจุ่มใบลงในสารแขวนลอยสปอร์ หลังจากนั้นนำมาบ่มเชื้อลงในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นสูงเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำใบลำไยมาตรวจสอบอาการบนใบ

การปลูกเชื้อบนใบลำไยในโรงเพาะชำ

นำต้นกล้าลำไยพันธุ์ดออายุ 1 เดือน ที่เตรียมไว้มาปลูกเชื้อ และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการปลูกเชื้อ โดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงบนใบลำไย หลังจากปลูกเชื้อแล้วใช้ถุงพลาสติกใสขนาด 12x15 นิ้ว คลุมต้นลำไยเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเอาถุงพลาสติกออก ตรวจสอบการเกิดโรคบนใบลำไย

นำใบลำไยที่ผ่านการปลูกเชื้อทั้ง 2 วิธีมาทำการทดลอง โดยนำมาฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ใน alcohol 95% นาน 3-4 วินาที และแช่ใน Clorox 10% นาน 3-4 นาที จึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 1 นาที แล้วแช่ในกรัมม็อกโซนที่ความเข้มข้น 5% นาน 4 นาที หลังจากนั้นนำมาบ่มเชื้อไว้ในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นสูงนาน 5 วัน จึงทำการบันทึกผลการทดลอง

2. การศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อ

2.1 การศึกษาการงอกของสปอร์ของเชื้อราบนกระดาษกรอง

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เหมือนการทดลองที่ 1.2 แล้วจึงนำมาหยดบนแผ่นกรอง millipore ซึ่งวางบนแผ่นกระจก (slide) แผ่นละ 1 หยด (10 ไมโครลิตร) จากนั้นนำไปวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่ใส่กระดาษกรองชุบน้ำเพื่อให้ความชื้น บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง หยดสาร lactophenol cotton blue ลงบนแผ่นกระดาษกรองที่เวลา 5 6 7 8 9 10 11 และ 12 ชั่วโมง หลังบ่มเชื้อ เพื่อหาจำนวนชั่วโมงการงอกของสปอร์ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยถือว่าสปอร์ที่งอก germ tube มากกว่าขนาดความกว้างของสปอร์ เป็นสปอร์ที่งอกแล้ว

2.2 การศึกษาการงอกของสปอร์ของเชื้อราบนใบพืช

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เหมือนการทดลองที่ 1.2 ให้ได้ความเข้มข้น $4.45x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำใบอ่อนลำไยมาทำการทดลอง โดยฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงบนด้านท้องใบลำไย หลังจากนั้นนำมาบ่มเชื้อไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่

กระดาษกรองชุบน้ำเพื่อให้ความชื้น บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องในช่วงเวลาต่างๆ คือ 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84, 96 และ 108 ชั่วโมง

หลังจากนั้นใช้มีดโกนที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อที่ผิว ตัดบริเวณเนื้อใบที่ทำการปลูกเชื้อลงไป โดยตัดขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร โดยทำการสุ่มตัด 5 จุดต่อใบ และนำใบที่ได้ไปแช่ใน FAA (Formalin-Acetic acid-Alcohol) หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนต่างๆสองวิธีการก่อนการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

1. Clear leaf technique นำชิ้นพืชที่ผ่านการแช่ใน FAA ไปแช่ในสารละลาย Acid-Alcohol (glacial acetic acid:ethyl alcohol 95% ในอัตราส่วน 1:1) ไว้ 1 คืน หลังจากนั้นนำชิ้นพืชไปแช่ในสารละลาย Chloral hydrate (Chloral hydrate 5 กรัมต่อน้ำ 2 มิลลิลิตร) แช่จนกระทั่งชิ้นส่วนของพืชใส จึงนำมาย้อมสีด้วย Lactophenol cotton blue แล้วจึงทำการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์
2. ทำการตัดเนื้อเยื่อพืชโดยใช้วิธี Paraffin section โดยใช้ชิ้นพืชที่ผ่านการแช่ FAA มาผ่านขั้นตอนต่างๆ ตามวิธีของ Sass. จึงนำมาผ่านขั้นตอนการย้อมสี แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การตรวจสอบหาสารพิษที่ทำให้ใบลำไยแสดงอาการใบจุดดำ

3.1 การสกัดสารพิษจากเชื้อรา

การเตรียมเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อ *Colletotrichum* sp. บนอาหาร MYA พอเส้นใยของเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารแล้ว ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร ตัดตรงปลายเส้นใยของเชื้อจำนวน 3 ชิ้น ใส่ในอาหารเหลว Richard's medium ที่บรรจุอยู่ใน flask ขนาน 250 มิลลิลิตร อยู่ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส โดยให้แสงสลับกับมืดช่วงละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 28 วัน

การสกัดสารจากเชื้อราด้วยตัวทำละลาย (Amusa, 1994)

กรองเส้นใยออกด้วยผ้าขาวบางหนา 6 ชั้น นำเอาส่วนที่กรองได้ (culture filtrate) มาปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 3 ด้วย 10 N HCl แล้วนำมาสกัดด้วย ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำมาสกัดอีก 2 ครั้งโดยทำซ้ำเหมือนครั้งแรก หลังจากนั้นแยกเอาส่วนที่สกัดได้มาปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7 โดยล้างด้วย 10 N NaOH แล้วนำไประเหยเอา ethyl acetate ออกภายใต้ความดันต่ำ โดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดหยาบ

(crude extract) นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ -4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การตรวจแถบสารพิษโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

การเตรียมแผ่น TLC

ชั่ง Siliga gel 60 GF 60 กรัม เติมน้ำกลั่น 120 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เคลือบแผ่นกระจกขนาด 20x20 เซนติเมตร และขนาด 5x20 เซ็นติเมตรด้วยความหนา 1 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้หมาด นำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.1 มาละลายด้วยน้ำกลั่นจนสารสกัดละลาย ไปจุดบนแผ่น TLC plate แล้วนำไปจุ่มในสารละลายตัวพาซึ่งประกอบด้วย ethyl acetate : acetic acid : น้ำกลั่น ในสัดส่วน 3:3:1 หลังจากนั้นปล่อยให้สารละลายตัวพาระเหยออกไปจนหมด นำไปตรวจหาแถบสารพิษภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3.2 การทดสอบสารสกัดหยาบกับพืชทดสอบ

3.2.1 การทดสอบสารสกัดหยาบกับการงอกของเมล็ดผักกาดขาวบนแผ่น TLC

นำสารสกัดหยาบมาละลายด้วยน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อย และนำไปหยดบนแผ่น TLC เป็นแถบ 2 แถบ ส่วน negative control หยดสารละลาย sodium chlorate ($NaClO_3$) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาด และหยดสารละลาย Richard's medium ซึ่งเป็น positive control จากนั้นฉีดพ่นน้ำกลั่นลงบนแผ่น TLC ให้ทั่ว นำแผ่น TLC ที่ได้ เก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นสูง

3.2.2 การทดสอบสารสกัดหยาบกับใบถั่วเขียว

เตรียมใบถั่วเขียว โดยใช้ต้นกล้าถั่วเขียวอายุ 1 เดือน ตัดใบที่โตเต็มที่และหุ้มก้านใบด้วยสำลีที่เปียกน้ำ จากนั้นทำแผลบนใบถั่วเขียวทั้งสองด้าน โดยใช้ผง carborandum และล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำใบถั่วเขียวไปวางไว้ในจานอาหารที่มีความชื้นสูง

นำสารสกัดมาละลายน้ำกลั่นจนสารสกัดละลาย หยดลงบนใบถั่วเขียวทั้งสองด้าน โดยหยดด้านละ 10 ไมโครลิตร ส่วน control หยดด้วยสารละลาย Richard's medium ในแต่ละกรรมวิธีทำจำนวน 6 ซ้ำ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของใบถั่วเขียวบริเวณรอยหยดของสารสกัด

3.2.3 การทดสอบสารสกัดหยาบกับใบลำไย

นำใบอ่อนและใบแก่ลำไยมาทดสอบ โดยทำการทดลองเหมือนกับการทดสอบใบถั่วเขียว control หยดสารละลาย Richard's medium

การทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบ 1 กรัมมาละลายน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นระดับแรก แล้วลดความเข้มข้นลง 10 เท่าลงมาตามลำดับ 5 ลำดับ ได้สารละลายสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1/1, 1/10, $1/10^2$, $1/10^3$,$1/10^4$ และ $1/10^5$(w/v) นำสารละลายที่ได้มาทดสอบกับพืชทดสอบดังนี้

1. ทดสอบกับการงอกของเมล็ดผักกาดขาวบนแผ่น TLC
2. ทดสอบกับใบถั่วเขียว
3. ทดสอบกับใบอ่อนลำไย

3.3 การทดสอบสารสกัดที่ผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์ขึ้น

การทำสารสกัดให้มีความบริสุทธิ์ขึ้น

นำสารสกัดหยาบมาละลายด้วย ethyl acetate โดยให้ความร้อนเล็กน้อย เป็นตัวเร่งในการละลาย แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้ค่อย ๆ เกิดการตกผลึกใหม่ โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองเอาผลึกออก ตั้งทิ้งไว้ให้ ethyl acetate ระเหยออกให้หมด นำผลึกที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส และนำไปดูดความชื้นโดยใช้เครื่อง descicator (ดูดความชื้น) ก่อนนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

การเตรียมสารละลายของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

นำสารที่ได้จากข้อ 3.3 จำนวน 1 กรัมมาละลายในน้ำกลั่น 1000 ไมโครลิตร เป็นสารละลายเริ่มต้นในลำดับที่ 1 จากนั้นทำการลดความเข้มข้นของสารละลายลงตามอัตราส่วนตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเตรียมสารสกัด เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถทำให้เนื้อเยื่อพืชถูกทำลายได้

ลำดับที่	สารละลายที่ใช้ (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่นที่ใช้ (ไมโครลิตร)	อัตราส่วนความเข้มข้นของสารที่ได้ (v/v)	ความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้ (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)
1	1,000	-	1	1,000
2	500 จาก 1	500	1:2	500
3	500 จาก 2	500	1:4	250
4	500 จาก 3	500	1:8	125
5	500 จาก 4	500	1:16	62.5
6	500 จาก 5	500	1:32	31.25
7	500 จาก 6	500	1:64	15.62
8	500 จาก 7	500	1:128	7.81
9	500 จาก 8	500	1:256	3.91
10	500 จาก 9	500	1:512	1.95
11	Control	-	-	-

นำสารความเข้มข้นต่าง ๆ จากตารางที่ 2 มาทดสอบกับพืชทดสอบดังนี้

1. ทดสอบกับการงอกของเมล็ดผักกาดขาว
2. ทดสอบกับใบถั่วเขียว
3. ทดสอบกับใบอ่อนลำไย

การทดสอบสารสกัดกับใบลำไยแต่ละพันธุ์

นำใบอ่อนลำไยพันธุ์ อีดอ เบี้ยวเขียว และสีชมพู มาทดลอง โดยทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 3.2.4 แต่ใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และหยดสารละลาย Richard' medium เป็นตัวเปรียบเทียบ

3.4 การสกัดสารพิษจากแผลของโรคใบจุดดำที่เกิดในสภาพธรรมชาติ

เก็บใบลำไยที่แสดงอาการใบจุดดำในสภาพธรรมชาติ โดยคัดเลือกใบที่มีขอบแผลสีเหลืองล้อมรอบจุดดำ นำใบมาล้างด้วยน้ำกลั่น ต่อมาตัดตรงรอยแผลของใบ โดยตัดเอาบริเวณที่เป็นสีเหลือง

ล้อมรอบแผลด้วย จากนั้นบดให้เป็นผงละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลวช่วย สกัดตัวอย่างที่บดได้ด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7 ในอัตราส่วน 10:1 (v/w) ต่อกรัมน้ำหนักสด นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลา 15-30 นาที แยกเอาส่วนใส (supernatant) ออกมา และนำมาทำให้ตกตะกอนด้วยการใช้ acetone ในอัตราส่วน 4:1 (v/v) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บเอาตะกอน (pellet) ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ส่วนตัวเปรียบเทียบทำการสกัดสารจากใบลำไยปกติ โดยมีขั้นตอนในการสกัดเหมือนกัน

การตรวจหาแถบสารพิษโดยวิธี TLC

นำสารสกัดที่ได้จากการทดลอง 3.4 มาละลายด้วย PBS จนสารสกัดละลาย แล้วนำไปจุดลงบนแผ่น TLC เสร็จแล้วจุ่มลงในสารละลายตัวพา ซึ่งประกอบด้วย ethyl acetate : acetic acid : น้ำกลั่น สัดส่วน 3:3:1 หลังจากนั้นปล่อยให้สารละลายตัวพาระเหยออกไปจนหมด นำไปตรวจหาแถบสารพิษภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

การทดสอบสารสกัดกับพืชทดสอบ

นำสารที่สกัดได้จากการทดลองที่ 3.4 มาทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดกับพืชทดสอบดังนี้

1. ทดสอบสารสกัดกับการงอกของเมล็ดผักกาด
2. ทดสอบสารสกัดกับใบถั่วเขียว
3. ทดสอบสารสกัดกับใบลำไย

พืชทดสอบแต่ละชนิดมีกรรมวิธีในการทดสอบที่เหมือนกันดังนี้

กรรมวิธี	
1	หยดด้วยสารละลายของ สารสกัดจากแผลจุดดำ + PBS buffer 100 ไมโครลิตร
2	หยดด้วยสารละลายของ สารสกัดจากแผลจุดดำ + น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 ไมโครลิตร
3	หยดด้วยสารละลายของ สารสกัดจากแผลจุดดำ + น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 ไมโครลิตร
4	หยดด้วยสารละลายของ สารสกัดจากเนื้อเยื่อปกติ + PBS buffer 100 ไมโครลิตร
5	หยดด้วยสารละลายของ สารสกัดจากเนื้อเยื่อปกติ + น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 ไมโครลิตร
6	หยดด้วยสารละลายของ สารสกัดจากเนื้อเยื่อปกติ + น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 ไมโครลิตร
7	หยดด้วยสารละลายของ PBS buffer 100 ไมโครลิตร

5. การตรวจสอบหา Functional group ของสารพิษ

นำสารสกัดจากเชื้อราที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นจากการทดลองที่ 3.3 มา 1 กรัม ทำให้ละลายด้วยน้ำกลั่น จำนวน 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบน้ำตาล

Anthrone's test

บรรจุสารละลายสารสกัดเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย glucose เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และน้ำกลั่น จำนวน 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง 3 หลอดตามลำดับ จากนั้นเติม Anthrone's reagent 2 มิลลิลิตร (ละลาย anthrone 2 กรัมใน conce. H_2SO_4 1 ลิตร) ลงในหลอดทดลองทั้งสาม เขย่าหลอดทดลองให้สารผสมกัน และนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 3 นาที ทำให้เย็นและสังเกตสีในหลอดทดลองทั้งสามเปรียบเทียบกัน

การทดสอบโปรตีน

Ninhydrin test

บรรจุสารละลาย 0.1 M sodium acetate buffer pH 5 ลงในหลอดทดลองหลอดละ 2 มิลลิลิตรจำนวน 3 หลอด เติมสารละลายสารสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ สารละลายไข่ขาว 10 เปอร์เซ็นต์ (ผสมไข่ขาว 10 มิลลิลิตร กับ NaCl 1.5 เปอร์เซ็นต์ 90 มิลลิลิตร) สารละลาย casein 1 เปอร์เซ็นต์ และน้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง 4 หลอดตามลำดับ ใส่ Ninhydrin's reagent (ละลาย ninhydrin 0.2 กรัมใน absolute ethanol 100 มิลลิลิตร และ acetic acid 10 มิลลิลิตร) ลงในหลอดหลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองให้สารละลายผสมกัน จากนั้นนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีในหลอดทดลองแต่ละหลอด

Biuret test

เติมสารละลายสารสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ สารละลายไข่ขาว 10 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย casein 1 เปอร์เซ็นต์ และน้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง 4 หลอดตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ลงในทุกหลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากัน และเติมสารละลาย $CuSO_4$ เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ 5 หยด ลงในแต่ละหลอด เขย่าหลอดทดลองให้สารละลายให้สารละลายผสมกัน บันทึกผลการทดลอง

การตรวจสอบหาค่าการดูดกลืนแสง

ใช้สารละลายสารสกัดเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ไปตรวจสอบหาค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 200-800 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องมือ Spectrophotometer ของ Beckman รุ่น DU7500 และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ

6. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่มีแนวโน้มในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดดำในสภาพห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อรา *Colletotrichum* sp. มาทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี ในการทดลองนี้ใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา 6 ชนิดดังนี้

1. Antracol 70 wp (propineb)	อัตราที่ใช้คือ 35 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร คิดเป็นค่าของสารออกฤทธิ์ได้ 1225 ppm
2. Benlate OD (benomyl)	อัตราที่ใช้คือ 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร คิดเป็นค่าของสารออกฤทธิ์ได้ 500 ppm
3. Captan 50 WP (captan)	อัตราที่ใช้คือ 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร คิดเป็นค่าของสารออกฤทธิ์ได้ 1000 ppm
4. Daconil (chorothalonil)	อัตราที่ใช้คือ 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร คิดเป็นค่าของสารออกฤทธิ์ได้ 1500 ppm
5. Dithane M45 (mancozeb)	อัตราที่ใช้คือ 35 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร คิดเป็นค่าของสารออกฤทธิ์ได้ 1400 ppm
6. Octave (prochloroz)	อัตราที่ใช้คือ 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร คิดเป็นค่าของสารออกฤทธิ์ได้ 500 ppm

เทอาหาร PDA 13.5 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใส่สารเคมี 1.5 มิลลิลิตร ปรับเอียงไปมาให้อาหาร PDA และสารเคมีผสมเข้ากัน ในแต่ละสารเคมีทำ 10 ซ้ำ เมื่ออาหารวุ้นแข็งตัวแล้ว จึงปลูกเชื้อบนอาหาร โดยตัดส่วนปลายเส้นใย บริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ได้ 7 วัน ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร แล้วนำปลายเส้นใยไปวางบนอาหาร PDA ทดลองตามวิธี Culture Disc Technique (CDT) โดยวางคว่ำ เอาด้านที่มีเส้นใยเจริญลงแตะผิวหน้าอาหาร PDA เก็บไว้ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง วัดหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี ของเชื้อ ในวันที่ 3, 5, 7, และ 9 จนโคโลนีของเชื้อเจริญเต็มจานอาหาร