บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องผลิตน้ำ deionized ยี่ห้อ ELGA
2. เครื่องผลิตน้ำอิเล็กโทรไลต์ ยี่ห้อ SUPER OXSEED LABO
3. เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ OHAUS
4. เครื่องกวนสารละลาย บริษัท ยูเนี่ยนซายน์
5. เครื่องวัดค่า pH (Multi-Parameter) บริษัท ยูเนี่ยนซายน์
6. เครื่องวัดค่า Electrolyte conductivity (Multi-Parameter) บริษัท ยูเนี่ยนซายน์
7. เครื่องวัดค่าความเข้มข้นของคลอรีน (Pocket Colorimeter II) บริษัท HACH
8. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (OLYMPUS CX31 RBSFA) บริษัท อี ฟอร์ แอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด
9. เครื่อง Vortex Mixer บริษัท DAIHAN Scientific
10. Disposable syringe บริษัท NIPRO
11. แท่งแก้วรูปตัวแอล
12. Micropipette และ Tips
13. หลอดทดลองขนาดเล็ก
14. Haemacytometer และ Counter
15. มีดผ่าตัด
16. บีกเกอร์
17. ขวด Duran
18. กล่อง Moist chamber
19. ถังพลาสติก
20. สำลี
21. inoculator

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

22. อุปกรณ์ด้านจุลชีววิทยา

- ตู้ถ่ายเชื้อ
- หม้อนึ่งความดันไอ
- Hot Air Oven
- Cork borer
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- เข็มเขี่ยเชื้อ

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA), half-PDA, half-MS และ V-8 juice
2. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ
3. เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Labscan Asia
4. แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

พืชทดลอง

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาอาการโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วง เชื้อสาเหตุของโรค และความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุ

1.1 การศึกษาอาการโรคและการแยกเชื้อบริสุทธิ์

ศึกษาลักษณะอาการของโรคแอนแทรกโนสที่เริ่มเข้าทำลายผลมะม่วงตั้งแต่ระยะเริ่มต้น ได้แก่ ลักษณะของแผล สี และลักษณะที่เชื้อสาเหตุสร้างขึ้นบนผลมะม่วง บันทึกผล

ทำความสะอาดผลมะม่วงที่เป็นโรคแอนแทรกโนสในระยะเริ่มต้นด้วยน้ำไหลและเช็ดฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะบริเวณที่ต้องการแยกเชื้อ วางผลมะม่วงที่ทำความสะอาดแล้วในตู้ถ่ายเชื้อ ใช้มีดผ่าตัดที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว กรีดบริเวณแผลบางๆ แล้วเปิดออก จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อย้ายเนื้อของมะม่วงที่อยู่ระหว่างส่วนที่เป็นโรคและส่วนเนื้อปกติ วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตและบันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหาร ตรวจดูลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเก็บเชื้อสาเหตุของโรคไว้ในหลอดทดลองทั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

1.2 การชักนำและเปรียบเทียบสูตรอาหารในการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุ

เชื้อสาเหตุที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ในช่วงฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม) ไม่มีการสร้างกลุ่มสปอร์ (spore masses) จึงต้องดัดแปลงสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เพื่อกระตุ้นให้เชื้อสาเหตุสร้างสปอร์ในปริมาณมากเพียงพอที่จะใช้ในการทดลอง โดยสูตรอาหารที่เลือกใช้ได้แก่ อาหาร half-PDA, half-MS และ V-8 juice (ภาคผนวก)

1.3 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุ

ล้างผลมะม่วงด้วยน้ำไหลและเช็ดฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำแผลบนผลมะม่วง ผลละ 4 จุด ในตู้ถ่ายเชื้อ โดยใช้มีดผ่าตัดกรีดให้มีความลึกประมาณ 0.1 เซนติเมตร ยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ใช้เชื้อสาเหตุที่เลี้ยงบนอาหาร PDA, half-PDA, half-MS และ V-8 juice อายุ 14 วัน ปลูกเชื้อบนผลมะม่วงผลเดียวกันสูตรละ 1 แผล ทำซ้ำกัน 4 ครั้ง โดยใช้ cork borer เจาะบริเวณกลุ่มสปอร์ของเชื้อ แล้วใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายชิ้นวุ้นมาวางบนผลมะม่วงที่ทำแผล คว่ำชิ้นวุ้นด้านที่มีเชื้อเจริญอยู่ลงประกบกับแผล แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อกดเบาๆ เพื่อให้ผิวหน้าชิ้นวุ้นแนบสนิทกับผิวมะม่วง จากนั้นวางผลมะม่วงไว้ในกล่อง moist chamber (ภาคผนวก) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส สังเกตและบันทึกอาการที่เกิดขึ้น โดยใช้เชื้อสาเหตุที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบกับเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารดัดแปลงแต่ละสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 ศึกษาคุณสมบัติของน้ำอิเล็กโทรไลต์

ผลิตน้ำอิเล็กโทรไลต์ โดยใช้เครื่องผลิตยี่ห้อ SUPER OXSEED LABO ซึ่งอาศัยหลักการ electrolysis และที่ใช้สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นต่างกันได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใส่ลงไปในช่องใส่น้ำ (chamber) ของเครื่อง จากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำอิเล็กโทรไลต์ชนิดกรด (Electrolyzed Oxidizing; EO) ที่ได้แต่ละความเข้มข้นส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), ค่า electrolyte conductivity (EC) และค่าความเข้มข้นของคลอรีนอิสระ (available free chlorine) ด้วยวิธี DPD (N,N-diethyl-p-phenylene diamine) test (Palin, 1967; Smilanick *et al*., 1997) อีกส่วนหนึ่งเก็บไว้ในขวด Duran ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การทดลองที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำ Electrolyzed Oxidizing (EO) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในระดับห้องปฏิบัติการ

3.1 ศึกษาผลของน้ำ EO ต่อการเจริญของโคโลนีเชื้อสาเหตุ

นำสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ EO ความเข้มข้นเกลือที่ต้องการทดสอบทีละความเข้มข้น (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยปริมาตร 10 ไมโครลิตร มา spread plate บนผิวหน้าอาหาร PDA ส่วนชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญและวัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.2 ศึกษาผลของน้ำ EO ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการงอกของสปอร์เชื้อสาเหตุ

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แช่รวมกับน้ำ EO ทุกกรรมวิธีในข้อ 3.1 ไปตรวจสอบผลของน้ำ EO ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการงอกของสปอร์เชื้อสาเหตุภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

3.3 ศึกษาการคงสภาพของน้ำ EO ที่เก็บรักษาในภาชนะปิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ EO ความเข้มข้นเกลือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในแต่ละกรรมวิธีได้แก่ ผลิตแล้วทันที (0 นาที) และเก็บรักษาไว้ในภาชนะปิดเป็นเวลา 5, 10, 15, 30 นาที และ 1, 2, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร PDA ด้วยวิธี micro-drop technique บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ), น้ำ deionized (DI), น้ำ deionized ที่ผ่านกระแสไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที (DI+Activated) และสารละลายเกลือ NaCl ในน้ำ DI ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่ได้ผ่านกระแสไฟฟ้า

3.4 ศึกษาการคงสภาพของน้ำ EO ที่เก็บรักษาในภาชนะเปิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ EO ความเข้มข้นเกลือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่เปิดฝาภาชนะทิ้งไว้เป็นเวลา 5, 10, 15 และ 30 นาที นำน้ำ EO ที่ระยะเวลาดังกล่าว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อสาเหตุไว้ เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร PDA ด้วยวิธี micro-drop technique บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)

3.5 ศึกษาผลของน้ำ EO เจือจางต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุ

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดที่ 1 และเตรียมน้ำ EO ความเข้มข้นเกลือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดที่ 2 จากนั้นเจือจางความเข้มข้นเป็น 2 เท่า โดยใช้น้ำ deionized ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อสาเหตุและน้ำ EO เจือจางที่เตรียมไว้อย่างละ 1 มิลลิลิตร ผสมรวมกัน เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 1, 3, 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร PDA ด้วยวิธี micro-drop technique บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)

การทดลองที่ 4 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำ Electrolyzed Oxidizing (EO) ในการลดโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วง

เตรียมผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ โดยซื้อผลิตผลจากเกษตรกรซึ่งผลิตเพื่อการส่งออก ในพื้นที่อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ จากนั้นคัดเลือกที่ผลสมบูรณ์ ไม่มีบาดแผล ไม่มีโรคและแมลงทำลาย นำมาตัดก้านให้มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพื่อให้ยางไหลออกจากผล นำผลมะม่วงวางบนกระดาษหนังสือพิมพ์โดยคว่ำขั้วผลลงเพื่อซับยางออกให้หมด แล้วทำความสะอาดผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มะม่วงด้วยระบบน้ำไหลแบบหมุนเวียน ผึ่งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำมาเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และผึ่งให้แห้งเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การตรวจวัดคุณภาพของผลมะม่วงและบันทึกผลการทดลอง ดังนี้

ก. การสูญเสียน้ำหนัก

วัดการสูญเสียน้ำหนักโดยชั่งน้ำหนักผล แล้วนำไปคิดเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก จากสูตร เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก = $\frac{(\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนัก ณ วันที่ตรวจผล})}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$

ข. การประเมินการเกิดโรค (ภาพ 2)

โดยประเมินจากพื้นที่เกิดโรค แล้วให้ระดับคะแนนอัตราการเกิดโรคแบ่งเป็น 6 ระดับ ดังนี้

0 = ผลมะม่วงมีความสมบูรณ์ ไม่เกิดโรค

1 = มีพื้นที่เกิดโรครวมกันไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวเปลือก (ไม่มีผลต่อการซื้อขาย)

2 = มีพื้นที่เกิดโรครวมกันมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เกิน 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวเปลือก (มีผลต่อการซื้อขาย)

3 = มีพื้นที่เกิดโรครวมกันมากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวเปลือก (มีผลต่อการซื้อขาย)

4 = มีพื้นที่เกิดโรครวมกันมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เกิน 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวเปลือก (มีผลต่อการซื้อขาย)

5 = มีพื้นที่เกิดโรครวมกันมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวเปลือก (ขายไม่ได้)

ภาพ 2 ระดับความรุนแรง (จาก 1 - 5) ของการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค. อายุการวางจำหน่าย

ประเมินอายุการวางจำหน่ายจากข้อมูลการตรวจวัดคุณภาพผล และผลมะม่วงหมดอายุการวางจำหน่าย ดังนี้

- ผลเหี่ยว
- พื้นที่เกิดโรครวมกันมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวเปลือก

การประเมินอายุการวางจำหน่ายของผลมะม่วง อาจใช้เกณฑ์การตัดสินข้างต้นเกณฑ์ใดเกณฑ์หนึ่งหรือหลายเกณฑ์ร่วมกัน

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำ EO ความเข้มข้นเกลือ 0.1 - 0.5 และ 1.0 - 5.0 เปอร์เซ็นต์ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในทุกระดับความเข้มข้น ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำ EO ที่ระดับความเข้มข้นเกลือ 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้การทดลองกับผลมะม่วงสามารถปฏิบัติในสภาพห้องปฏิบัติการที่มีพื้นที่จำกัดได้โดยสะดวก และเป็นระดับความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมสำหรับเกษตรกรที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้ และเนื่องจากการเกิดโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงในธรรมชาติเกิดจากเชื้อสาเหตุที่มีลักษณะการเข้าทำลายแบบ latent infection ซึ่งเป็นกลไกที่ซับซ้อนและควบคุมได้ยาก ดังนั้นการทดลองนี้สามารถแบ่งเป็น 4 การทดลอง เพื่อให้สอดคล้องกับลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุที่อาจเกิดขึ้นตามธรรมชาติ ดังนี้

4.1 ปลูกเชื้อสาเหตุบนผลมะม่วงก่อนแช่ล้างผลในน้ำ EO

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร หยด Tween 20 ลงไป 2 - 3 หยด เพื่อให้สปอร์ของเชื้อสาเหตุเกาะติดกับผิวผลมะม่วงได้ดี นำไปพ่นลงบนผลมะม่วง แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสาเหตุเจริญ จากนั้นแช่ผลมะม่วงในน้ำ EO ที่ความเข้มข้นเกลือต่างกัน ได้แก่ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ ผึ่งให้แห้ง เก็บรักษาผลมะม่วงไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน บันทึกผลการเกิดโรคบนผลมะม่วงตามเกณฑ์การประเมินการเกิดโรคดังกล่าวข้างต้น เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์แขวนลอยแล้วล้างด้วยน้ำประปา

4.2 แช่สปอร์แขวนลอยของเชื้อสาเหตุในน้ำ EO ก่อนพ่นบนผลมะม่วง

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร แช่ในน้ำ EO ความเข้มข้นเกลือ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ หยด Tween 20 ลงไป 2 - 3 หยด เพื่อให้สปอร์ของเชื้อเกาะติดกับผิวผลมะม่วงได้ดี จากนั้นนำมาพ่นลงบนผลมะม่วง ผึ่งให้แห้ง เก็บรักษาผลมะม่วงไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นเวลา 14 วัน บันทึกผลการเกิดโรคบนผลมะม่วงตามเกณฑ์การประเมินการเกิดโรคดังกล่าวข้างต้น เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยที่แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

4.3 ปลูกเชื้อสาเหตุบนผลมะม่วงก่อนพ่นด้วยน้ำ EO

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร หยด Tween 20 ลงไป 2 - 3 หยด แล้วพ่นลงบนผลมะม่วง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสาเหตุเจริญ จากนั้นพ่นน้ำ EO ความเข้มข้นเกลือ 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลงบนผลมะม่วง ผึ่งให้แห้ง เก็บรักษาผลมะม่วงไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน บันทึกผลการเกิดโรคบนผลมะม่วงตามเกณฑ์การประเมินการเกิดโรคดังกล่าวข้างต้น เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่พ่นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

4.4 ปลูกเชื้อสาเหตุบนผลมะม่วงและทำการทดสอบกับน้ำ EO ด้วยวิธีไมโครเทคนิค

วาดรูปสี่เหลี่ยมขนาด 2.5 x 2.5 เซนติเมตร ลงบนผิวมะม่วงบริเวณที่จะปลูกเชื้อ ผลละ 7 ช่อง ทำแผลโดยใช้ inoculator (ภาคผนวก) แทงลงในช่องสี่เหลี่ยม 1 ครั้ง จากนั้นหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (10^4 สปอร์/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผล และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

เตรียมแผ่นสำลี เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 2.5 x 2.5 เซนติเมตร จากนั้นจุ่มแผ่นสำลีในน้ำ EO ความเข้มข้นเกลือ 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ บีบสำลีให้พอหมาด แล้ววางแผ่นสำลีลงบนช่องสี่เหลี่ยมบนผลมะม่วง โดยให้ทุกกรรมวิธีอยู่บนผลมะม่วงผลเดียวกัน ทิ้งแผ่นสำลีดังกล่าวไว้เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนดจึงนำแผ่นสำลีออก ทิ้งไว้ให้แห้ง เก็บรักษาผลมะม่วงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผล ประเมินการเกิดโรคโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผล วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved