บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope
2. ตู้เขี่ยเชื้อ (lamina flow)
3. ตู้เย็น (refrigerator)
4. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
5. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
6. เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator)
7. อุปกรณ์ตรวจนับสปอร์ (haemacytometer)
8. เครื่องชั่งแบบดิจิตอล ทศนิยม 2 และ 3 ตำแหน่ง (digital balance)
9. ไมโครปิเปต (micro pipette) และไมโครทิป
10. แผ่นสไลด์แก้วและกระจกปิดสไลด์
11. อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น flask, Petri dish, test tube, cylinder
12. อุปกรณ์แยกเชื้อ (เข็มเขี่ย, มีดผ่าตัด, cork borer, ตะเกียงแอลกอฮอล์, ไฟแช็ค)
13. วัสดุงานบ้านงานครัว กล่องพลาสติก/ ตะกร้าพลาสติก/ถุงพลาสติกร้อน
14. อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (potato dextrose agar, PDA)
15. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์
16. ผงสมุนไพรอบเชย และน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย
17. ผลมะม่วง
18. สารเคมีคาร์เบนดาซิม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อราบริสุทธิ์

นำผลมะม่วงอกร่องที่แสดงอาการเป็นโรคแอนแทรคโนสจากบ้านเสม็ดงาม ตำบลหนองบัว จังหวัดจันทบุรี มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ด้วยเทคนิควิธี tissue transplanting โดยการตัดชิ้นส่วนของผิวบริเวณขอบแผลให้ติดบริเวณที่ไม่เป็นโรคขนาดประมาณ 0.5 X 0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ความเข้มเข้น 10 เปอร์เซ็นต์นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับฆ่าเชื้อ นำไปวางบนอาหาร WA (water agar) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28$\pm$2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 3 วัน ตัดปลายเส้นใยที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนของพืช วางลงบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโดยศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA จากนั้นเขี่ยเส้นใยและสปอร์เชื้อราวางลงบน

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

กระจกสไลด์ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ (compound microscope) เพื่อศึกษาโครงสร้างเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อได้เชื้อราบริสุทธิ์ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยเก็บลงอาหาร PDA ในหลอดทดลอง (PDA slant) เก็บรักษาในตู้เย็น เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดหยาบจากอบเชย และน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย

2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากอบเชย

การสกัดสารสกัดหยาบจากพืชด้วยวิธีมาเซอเรชั่น (maceration) โดยนำผงอบเชยแห้งที่บดละเอียดแล้วปริมาณ 200 กรัม ใส่ในขวดแก้วสีชาปากกว้าง เติมเอทิลแอลกอฮอล 95 เปอรเซ็นต ปริมาตร 800 มิลลิลิตร (ใชอัตราสวนพืชต่อตัวทำละลาย 1 : 4 โดยปริมาณตอปริมาตร) ทำการหมักเปน เวลา 7 วัน โดยคนสารทุกวัน ๆ ละ 1 ครั้ง จากนั้นกรองเศษพืชออกด้วยผ้าขาวบาง และกรองอีกครั้งด้วยกระดาษ whatman no.1 แลวนำสวนแอลกอฮอล์ที่ไดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) จนกระทั่งไดสารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดข้น ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บสารสกัดจากพืชไว้ในขวดสีชาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย

ซื้อน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายเป็นการค้า (commercial grade) จากบริษัทเคมีภัณฑ์คอร์ปอเรชั่น จำกัด มีวิธีการสกัดด้วยไอน้ำ (distillation) จากส่วนใบของอบเชยเทศที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cinnamomum zeylamicum*

3. การทดสอบผลการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนใบมะม่วงอกร่อง

การทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากอบเชย น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยเดี่ยว ๆ และใช้ร่วมกับกัมอะราบิก ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนใบมะม่วงอกร่อง ด้วยวิธี detached leaf ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยมีขั้นตอนในการศึกษา ดังนี้

3.1 การเตรียมใบมะม่วง

เตรียมใบมะม่วงอกร่อง (ใบที่ 4-5 จากยอด) ที่ไม่แสดงอาการเป็นโรค และไม่มีร่องรอยการทำลายของแมลง จากสวนมะม่วงของเกษตรกร บ้านเสม็ดงาม ตำบลหนองบัว อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด และล้างด้วยน้ำผสมน้ำยาล้างจานเล็กน้อยเพื่อล้างสิ่งสกปรกออก ผึ่งใบมะม่วงให้แห้ง จากนั้นเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เพื่อฆ่าเชื้อผิว ผึ่งให้แห้งเสียบกระเปาะน้ำโดยใช้สำลีจุ่มน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อพันรอบปลายก้านใบ ใส่ในถุงพลาสติกใช้ยางวงรัดเพื่อเก็บรักษาความชื้น ให้ใบมะม่วงมีความสดใหม่ได้หลายวันตลอดการทดลอง

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.2 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรค

ทำการเตรียมเชื้อราโดย *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่แยกได้จากการทดลองในขั้นตอนที่ 1 โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน

3.3 การทดสอบบนใบมะม่วง

การทดสอบผลการควบคุมโรคบนใบมะม่วงอกร่องที่เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 3.1 โดยใช้ปลายเข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วทำแผล 1 รอยต่อแผล โดยทำแผลจำนวน 3 ตำแหน่งต่อ 1 ใบ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรที่ฆ่าเชื้อแล้ว เจาะบริเวณขอบของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* อายุ 5 วัน บนอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 3.2 แล้วทำการปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเชื้อรา โดยใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วย้ายชิ้นวุ้น โดยวางด้านที่มีเส้นใยเชื้อราคว่ำลงบนรอยแผลบนใบมะม่วงที่ได้เตรียมไว้ บ่มใบมะม่วงที่ได้รับการปลูกเชื้อไว้ในกล่องพลาสติกที่ควบคุมความชื้น (moist chamber) โดยนำสำลีจุ่มน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อวางในกล่อง บ่มใบมะม่วงไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำชิ้นวุ้นออก จากนั้นจุ่มใบมะม่วงในสารสกัดหยาบจากอบเชย น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย และสารเคมีคาร์เบนดาซิมในอัตราแนะนำ ตามทรีตเม้นต์ที่ 2-8 นาน 5 นาที โดยชุดควบคุม คือการจุ่มใบมะม่วงที่ได้รับการทำแผลปลูกเชื้อนาน 24 ชั่วโมงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อนาน 5 นาที วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 8 ทรีตเมนต์ 6 ซ้ำ ดังนี้

ทรีตเม้นต์ที่ 1 ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)
ทรีตเม้นต์ที่ 2 สารสกัดหยาบจากอบเชย 0.50 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 3 สารสกัดหยาบจากอบเชย 1.00 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 4 สารสกัดหยาบจากอบเชย 1.50 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 5 น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย 0.50 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 6 น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย 1.00 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 7 น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย 1.50 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 8 สารเคมีคาร์เบนดาซิม 0.05 เปอร์เซ็นต์

หลังจากใบมะม่วงแห้ง บ่มต่อในกล่องพลาสติกที่ควบคุมความชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบอาการของโรค วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแผลที่เกิดขึ้น และนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังสมการ

คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = A-B)/A x 100

A =ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลบนใบในชุดควบคุม

B = ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลบนใบในชุดทดสอบ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

4. การทดสอบผลการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงอกร่อง

การทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากอบเชย น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยเดี่ยว ๆ และการใช้ร่วมกับกัมอะราบิก ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงอกร่องหลังการเก็บเกี่ยวในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยมีขั้นตอนในการศึกษา ดังนี้

4.1 การเตรียมผลมะม่วง

นำผลมะม่วงอกร่องจากสวนของเกษตรกรบ้านเสม็ดงาม ตำบลหนองบัว อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี ที่ไม่แสดงอาการเป็นโรค และไม่มีร่องรอยการทำลายของแมลง มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำไหล และล้างด้วยน้ำผสมน้ำยาล้างจานเล็กน้อย เพื่อล้างสิ่งสกปรกออก และลดแรงตึงผิว เมื่อล้างทำความสะอาดที่ผลมะม่วงเรียบร้อยแล้วผึ่งผลให้แห้ง จากนั้นฆ่าเชื้อผิวมะม่วงด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วทาขั้วผลด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในอัตราแนะนำ (ความเข้มข้น 500 ppm) เพื่อควบคุมโรคขั้วผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* จากนั้นนำผลมะม่วงมาเรียงในตะกร้าพลาสติกที่ทำการรองพื้นด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ โดยเอาขั้วผลมะม่วงไว้ด้านล่างให้ก้นมะม่วงชี้ด้านบน จนผลมะม่วงแห้ง

4.2 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรค

ทำการเตรียมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงอกร่องที่แยกได้จากการทดลองในขั้นตอนที่ 1 โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน เช่นเดียวกับขั้นตอนทดสอบบนใบ

4.3 การทดสอบบนผลมะม่วง

ทำการทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากอบเชย น้ำมันหอมระเหยอบเชย และกัมอะราบิก ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงอกร่อง โดยนำผลมะม่วงอกร่องที่ได้จากขั้นตอนที่ 4.1 มาทำแผลโดยใช้ปลายเข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วทำแผล 1 รอยต่อแผล โดยทำแผลจำนวน 2 ตำแหน่งต่อ 1 ผล ทำการปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเชื้อรา โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรที่ฆ่าเชื้อแล้วเจาะบริเวณขอบของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เตรียมไว้แล้วใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วย้ายชิ้นวุ้น โดยวางด้านที่มีเส้นใยเชื้อราคว่ำลงบนรอยแผลบนผลมะม่วง จากนั้นวางผลมะม่วงที่ได้รับการปลูกเชื้อไว้ในตะกร้าพลาสติกที่รองด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ คลุมด้วยถุงพลาสติกพร้อมกับใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อฉีดพ่นภายในถุงพลาสติกเพื่อควบคุมความชื้นให้เพียงพอ บ่มผลมะม่วงที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำชิ้นวุ้นออก จากนั้นจุ่มผลมะม่วงในสารสกัดหยาบจากอบเชย น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย และกัมอะราบิก ตามทรีตเม้นต์ที่ 2-10 นาน 5 นาที โดยชุดควบคุม คือการจุ่มผลมะม่วงที่ได้รับการทำแผลปลูกเชื้อนาน 24 ชั่วโมงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อนาน 5 นาที วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 10 ทรีตเมนต์ 9 ซ้ำ ดังนี้

ทรีตเม้นต์ที่ 1 ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)
ทรีตเม้นต์ที่ 2 สารสกัดหยาบจากอบเชย 1.00 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 3 สารสกัดหยาบจากอบเชย 1.50 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 4 น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย 0.25 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 5 น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย 0.50 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 6 สารสกัดหยาบจากอบเชย 1.00 เปอร์เซ็นต์+กัมอะราบิก 10 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 7 สารสกัดหยาบจากอบเชย 1.50 เปอร์เซ็นต์+กัมอะราบิก 10 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 8 น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย 0.25 เปอร์เซ็นต์+กัมอะราบิก 10 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 9 น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย 0.50 เปอร์เซ็นต์+กัมอะราบิก 10 เปอร์เซ็นต์
ทรีตเม้นต์ที่ 10 กัมอะราบิก 10 เปอร์เซ็นต์

หลังจากผลมะม่วงแห้ง วางผลมะม่วงในตะกร้าพลาสติกที่รองด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ นำแคลเซี่ยมคาร์ไบด์ (CaC_2) ห่อกระดาษแล้วบรรจุไว้ในตะกร้าเพื่อช่วยเร่งการสุกของผลมะม่วง เมื่อผลมะม่วงสุก วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแผลที่เกิดขึ้น และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังสมการ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = (A-B)/A x 100

เมื่อ A = ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลบนผลในชุดควบคุม

B = ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลบนผลในชุดทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan’s new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี