บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเตรียมต้นแม่พันธุ์ส้มทรอยเยอร์ในสภาพปลอดเชื้อ

นำเมล็ดส้มทรอยเยอร์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของเกษตรกรผู้ปลูกส้มสายน้ำผึ้ง จังหวัดเชียงใหม่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 100 เมล็ด โดยนำมาล้างน้ำให้สะอาดพร้อมทั้งคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่จมน้ำ ซึ่งมีลักษณะสมบูรณ์ ไม่ลีบหรือฝ่อ และไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อราหรือแบคทีเรีย ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกด้วย Clorox 15 % ที่ผสม Tween 20 ประมาณ 2 หยด นาน 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง แล้วใช้คีมปอกเปลือกหุ้มเมล็ดออก จากนั้นวางลงบนอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จำนวน 5 เมล็ดต่อขวด บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน และตัดขยายเพื่อเพิ่มปริมาณเมื่อต้นกล้ามีอายุประมาณ 3 เดือน

2. การทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดของส้มทรอยเยอร์

ทดลองเพิ่มปริมาณยอดส้มทรอยเยอร์ในอาหารสังเคราะห์ MS โดยใช้อาหารแข็งดัดแปลงฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 สูตร ดังนี้

1. สูตร MS ชุดควบคุมไม่เติม สารควบคุมการเจริญเติบโต
2. สูตร MS1 เติม BAP 1.5 mg/l, kinetin 1.5 mg/l และ NAA 0.1 mg/l
3. สูตร MS2 เติม BAP 1.0 mg/l, kinetin 1.0 mg/l และ NAA 0.1 mg/l
4. สูตร MS3 เติม BAP 2.0 mg/l และ NAA 0.1 mg/l
5. สูตร MS4 เติม kinetin 2.0 mg/l และ NAA 0.1 mg/l

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ การเพาะเลี้ยงส่วนลำต้น และรากของกล้าส้มที่เตรียมไว้ในข้อ 1 โดยเลือกส่วนของลำต้นสีเขียวเข้มและรากที่มีลักษณะอวบใหญ่ สีขาวอมน้ำตาล ที่ได้จากต้นแม่พันธุ์ นำมาตัดให้ได้ขนาดยาวประมาณ 0.5 - 1 เซนติเมตร วางบนผิวหน้าอาหารในแต่ละสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ15 ชิ้น/จาน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตลักษณะการเกิดยอดและบันทึกจำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อชิ้นพืช บนอาหารแต่ละสูตรเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3. การศึกษาอาการ และการแยกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

3.1 การศึกษาอาการ

เก็บตัวอย่างใบมะกรูดจากต้นที่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์อย่างรุนแรง จากอำเภอขุนตาล จังหวัดเชียงราย แล้วบันทึกลักษณะอาการของโรค โดยสังเกตจาก การเปลี่ยนแปลงของใบ ความผิดปกติ และการเกิดแผล ทั้งบนใบและใต้ใบ

3.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

แยกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์โดยนำใบมะกรูดที่แสดงอาการโรคระยะเริ่มแรกมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วใช้มีดผ่าตัด ตัดเอาส่วนที่เป็นแผลให้มีขนาด 0.3 x 0.3 ตารางเซนติเมตร นำมาวางบนแผ่นสไลด์ ใช้มีดหั่นชิ้นพืชให้ละเอียด หยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไป 1-2 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที จากนั้นใช้เข็มเขี่ยแตะที่น้ำคั้นแล้วขีดลงบนอาหาร NA (Nutrient Agar) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวมาขีดลงบนอาหาร YDC (Yeast Extract Dextrose $CaCO_3$) เพื่อแยกเชื้อสาเหตุให้บริสุทธิ์ (Schaad *et al.*, 2001) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปตรวจแกรมแบคทีเรียด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) พร้อมทั้งย้อมสีแกรม (Suslow *et al.,* 1982) เพื่อตรวจดูลักษณะและการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า แล้วเก็บไว้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

4. การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์

4.1 การทดสอบในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นกล้าส้มทรอยเยอร์อายุ 3 เดือน ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาล้างอาหารวุ้นออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จำนวน 20 ต้น โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรค ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ทำแผลที่ใบให้มีขนาดเท่าๆ กัน ด้วยเข็มเขี่ย จำนวน 10 ต้น ส่วนกลุ่มที่ 2 ไม่ทำแผล จำนวน 10 ต้น จากนั้นจุ่มต้นกล้าจำนวน 5 ต้น ของแต่ละกลุ่มลงในเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 50 มิลลิลิตรซึ่งเตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.2 ในอาหารเหลว NA แล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นปรับความเข้มข้นและนับปริมาณเซลล์แขวนลอยด้วยวิธีเจือจาง (dilution plating) ให้ได้ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ส่วนในชุดควบคุมจุ่มต้นกล้า จำนวน 5 ต้น ของแต่ละกลุ่มในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อโดยจุ่มไว้เป็นเวลา 5 นาที ทั้ง 2 กลุ่ม จากนั้นย้ายต้นกล้าปลูกลงใน vermiculite ที่ฆ่าเชื้อแล้ว บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25±1องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะของต้นกล้าที่เกิดโรค อาการ ผิดปกติของต้นกล้า ตลอดจนระยะเวลาของการเกิดโรคหลังจากได้รับการปลูกเชื้อเปรียบเทียบกับลักษณะของต้นกล้าในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ พร้อมทั้งแยกเชื้อสาเหตุกลับ

4.2 การทดสอบในสภาพโรงเรือน

นำต้นกล้าส้มทรอยเยอร์และคลีโอพัตราอายุประมาณ 6 เดือน ที่เพาะเลี้ยงในสภาพโรงเรือน จำนวน พันธุ์ละ 24 ต้น โดยเช็ดทำความสะอาดใบด้วย แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแบ่งต้นกล้าทั้ง 2 พันธุ์ ออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรค ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ทำแผลที่ใบให้มีขนาดเท่าๆ กัน ด้วยเข็มเขี่ย จำนวน 12 ต้น ส่วนกลุ่มที่ 2 ไม่ทำแผล จำนวน 12 ต้น โดยในแต่ละกลุ่ม จะทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีการ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 ปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 ลงบนต้นกล้าจำนวน 3 ต้น ในชุดควบคุมฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจำนวน 3 ต้น วิธีที่ 2 จุ่มต้นกล้าเฉพาะส่วนใบและลำต้นลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อเดียวกัน จำนวน 3 ต้น ส่วนชุดควบคุมจุ่มลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจำนวน 3 ต้น จุ่มนานเป็นเวลา 5 นาที ซึ่งทั้ง 2 วิธีจะใช้เซลล์แขวนลอยของเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^8 cfu/ml จากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติก เพื่อควบคุมความชื้น สังเกตลักษณะของต้นกล้าที่เกิดโรค อาการ ผิดปกติของต้นกล้า ตลอดจนระยะเวลาของการเกิดโรคหลังจากได้รับการปลูกเชื้อเปรียบเทียบกับลักษณะของต้นกล้าในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ พร้อมทั้งแยกเชื้อสาเหตุกลับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

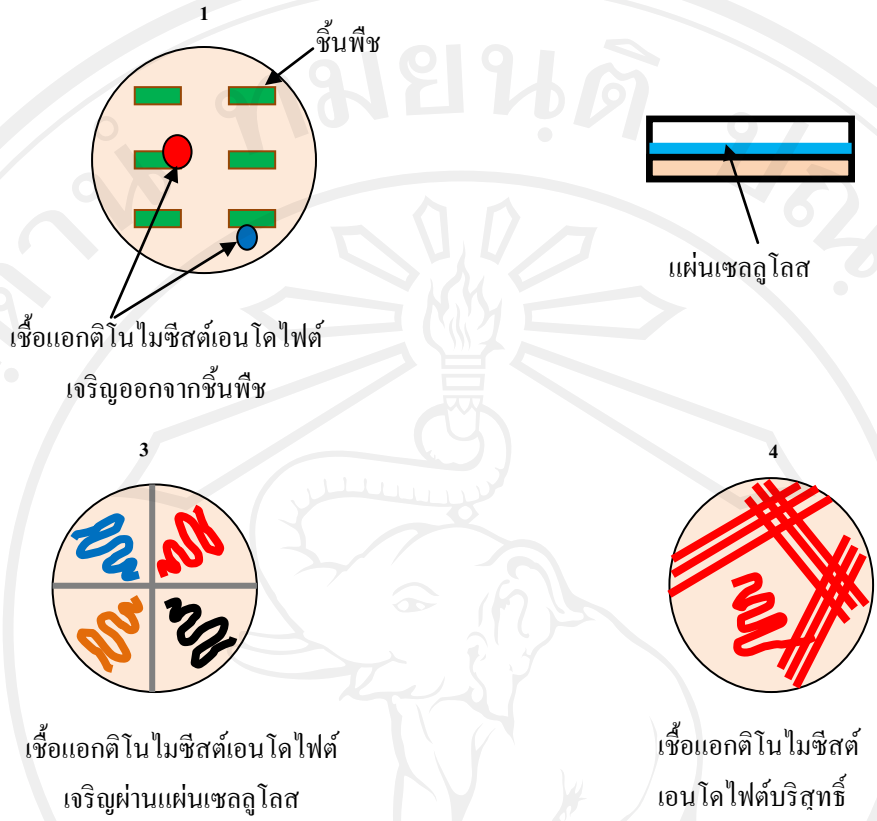
5.1 การแยกเชื้อ

เก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้ม 2 ชนิด ได้แก่ มะขวิด (Wood apple: *Limonia acidizssima* L.) และ มะสัง (Wood apple, Java feroniella: *Feroniella lucida* Scheff.) เลือกเก็บใบและก้านเฉพาะส่วนที่สมบูรณ์ไม่มีการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลงมาแยกเชื้อโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Shimizu *et al.* (2000) ด้วยการนำตัวอย่างพืชทั้ง 2 ชนิด มาล้างน้ำให้สะอาด โดยล้างน้ำไหลผ่าน (running water) เป็นเวลา 30 นาที ผึ่งลมให้แห้ง แล้วใช้มีดตัดใบพืชเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณ 1x1 ตารางเซนติเมตร ส่วนก้านและลำต้นตัดเป็นท่อน ความยาวท่อนละ 1 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดไปฆ่าเชื้อทีผิว โดยแช่ในสารละลาย Clorox ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในสารฆ่าเชื้อรา carbendazim เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที ซับชิ้นพืชให้แห้งด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อ โดยนำมาวางบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งลมให้แห้งภายในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นนำไปแยกเชื้อบนอาหาร Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) โดยวางชิ้นพืชจำนวน 15 ชิ้น ต่อ 1 จานอาหาร บ่มชิ้นพืชที่มืด ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

5.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

เมื่อตรวจพบการเจริญของเชื้อออกมาจากชิ้นพืช ใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อที่มีลักษณะของโคโลนีคล้ายผงแป้งไปเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 โดยใช้เข็มเขี่ยที่ย้ายเชื้อขีดลงบนแผ่นกรองเซลลูโลส (cellulose membrane filter) ขนาดรูเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร ที่วางบนผิวอาหาร IMA-2 (ภาพ 2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำแผ่นกรองเซลลูโลสออก หากเชื้อจุลินทรีย์นั้นเป็นเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จะพบว่า เชื้อนั้นสามารถเจริญผ่านแผ่นกรองไปยังผิวอาหารได้ (Meguro *et al.,* 2006) เพิ่มปริมาณเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 ด้วยวิธี streak plate และเก็บเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่ได้ไว้เป็น stock culture บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งตรวจดูลักษณะของเส้นใย การสร้างสปอร์ และการเรียงตัวของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยปักแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบริเวณที่มีการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ทำมุม 45 อาศา กับผิวหน้าอาหารบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำแผ่นปิดสไลด์ที่มีการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ติดอยู่มาย้อมสีแบบ simple stain ด้วยสารละลาย crystal violet 0.1 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2 ขั้นตอนการแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากชิ้นพืชบนอาหาร IMA-2 และการแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญผ่านแผ่นกรองเซลลูโลส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อส่วนกิ่งและก้านของมะขวิดและมะสัง ในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ ด้วยวิธี well diffusion ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Kafur and Khan (2011) โดยเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ในอาหารเหลว ISP-2 (Shirling and Gottlieb, 1966) pH 7.3 แล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแต่ละไอโซเลท ปริมาตร 50 µl หยดลงในหลุมบนอาหาร NA ที่เจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่เกลี่ยผิวหน้าอาหารด้วยเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยปรับความเข้มข้นและนับปริมาณเซลล์แขวนลอยด้วยวิธีเจือจาง (dilution plating) ให้ได้ความเข้มข้น $5x10^8$ cfu/ml นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ ต่อเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลท เมื่อเชื้อแบคทีเรียเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลโดยวัดขนาดบริเวณยับยั้ง clear zone ในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่หยดน้ำกลั่น แล้วคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่ให้ค่าบริเวณยับยั้งดีที่สุดเพื่อศึกษาขั้นต่อไป

7. การทดสอบความสามารถในการชักนำให้เกิดความต้านทานโรคของต้นกล้าส้ม ในสภาพปลอดเชื้อ

ปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากข้อ 6 โดยนำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง IMA-2 จำนวน 3 ชิ้นเชื้อ เลี้ยงในอาหารเหลว IMB-2 แล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน แล้วหยดเซลล์แขวนลอยของเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น 10^4 cfu/ml ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MS ที่เพาะเลี้ยงต้นกล้าส้มทรอยเยอร์อายุ 3 เดือน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นเลือกถอนต้นกล้าส้มทรอยเยอร์จำนวน 18 ต้นที่แข็งแรง มีลำต้นตั้งตรง ใบมีสีเขียวเข้ม รากเจริญดี ไม่แสดงอาการเหี่ยวหรือใบร่วง ขึ้นมาล้างเอาอาหารวุ้นออกจากรากด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค เพื่อทดสอบต้านทานของต้นกล้าส้มโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Meguro *et al*. (2004) จุ่มเฉพาะส่วนลำต้นและใบลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค ที่มีความเข้มข้น 10^8 cfu/ml เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้ายต้นกล้าปลูกลงในขวดแก้วที่มี vermiculite 50 กรัม ผสมอาหารเหลว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

MS 20 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25±1องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะการเกิดโรคและบันทึกระยะเวลาการเกิดโรคระดับความรุนแรงของโรคหลังจากปลูกเชื้อ ตลอดจนติดตามการเกิดโรคบนต้นกล้าส้มโดยใช้ตัวเลข 0-4 เพื่อประเมินระดับความรุนแรงของโรค

ระดับความรุนแรงของโรคแคงเกอร์

0 = ไม่มีแผล (ไม่เกิดโรค)

1 = มีแผลบนต้นกล้าเป็นพื้นที่ 1-10%

2 = มีแผลบนต้นกล้าเป็นพื้นที่ 11-50%

3 = มีแผลบนต้นกล้าเป็นพื้นที่ 50-80%

4 = มีแผลบนต้นกล้าเป็นพื้นที่ 80 % และต้นกล้าตาย

8. การทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อของต้นกล้าส้ม

8.1 สภาพปลอดเชื้อ

นำต้นกล้าส้มทรอยเยอร์อายุ 3 เดือนที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในอาหารแข็งสูตร MS มาปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ โดยหยดเซลแขวนลอยของเชื้อที่เตรียมด้วยวิธีการตามที่ระบุในข้อ 7 ความเข้มข้น 10^4 cfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25±1องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 และ 30 วัน นำต้นกล้าส้มที่ปลูกเชื้อแล้วส่งตรวจที่ศูนย์วิจัยและบริการจุลทรรศนศาสตร์อิเล็กตรอน สวท.- มช. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อตรวจดูลักษณะการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อต้นกล้าส้มภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) (JEOL รุ่น JMS-5910LV) พร้อมทั้งแยกเชื้อกลับโดยการสุ่มตัวอย่างส่วนใบ ลำต้น และราก มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเช่นเดียวกับการทดลอง 5.1 โดยวางชิ้นพืชแต่ละส่วน บนอาหาร IMA-2 ทำทั้งหมด 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 ชิ้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์บนชิ้นพืช บันทึกผลโดยการนับจำนวนชิ้นพืชที่มีการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เจริญออกมา แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับได้จากจำนวนชิ้นพืชทั้งหมดเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ดังนี้

$$\% \text{ แยกเชื้อกลับ} = \frac{\text{จำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อเจริญออกมา/จำนวนซ้ำ}}{\text{จำนวนชิ้นพืชที่ใช้แยกเชื้อทั้งหมด}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8.2 สภาพโรงเรือน

นำต้นกล้าส้มทรอยเยอร์อายุ 3 เดือนที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในอาหารแข็งสูตร MS มาปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ หยดสารแขวนลอยของเชื้อความเข้มข้น 10^4 cfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25±1องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน แล้วย้ายปลูกลงในถาดหลุมที่มีวัสดุปลูกเป็นแกลบดำนึ่งฆ่าเชื้อ โดยปลูก 1 ต้น ต่อ 1 หลุม คลุมถาดหลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อให้ความชื้นเป็นเวลา 7 วัน แล้วนำถุงออก จากนั้นแยกเชื้อกลับที่ระยะเวลา 7, 14, 21 และ 30 วัน หลังการออกปลูกโดยการสุ่มตัวอย่างส่วนใบ ลำต้น และราก มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเช่นเดียวกับการทดลอง 5.1 โดยวางชิ้นพืชแต่ละส่วน บนอาหาร IMA-2 ทำทั้งหมด 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 ชิ้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์บนชิ้นพืช พร้อมทั้งบันทึกผลโดยการนับจำนวนชิ้นพืชที่มีการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับได้จากจำนวนชิ้นพืชทั้งหมดเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ดังนี้

$$\% \text{ แยกเชื้อกลับ} = \frac{\text{จำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อเจริญออกมา/จำนวนซ้ำ}}{\text{จำนวนชิ้นพืชที่ใช้แยกเชื้อทั้งหมด}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved