บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

กระดาษลอกลายและกระดาษ A4

กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound

กล้องถ่ายรูป

ขวดใส่อาหาร

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่จำเป็นอื่นๆ

เครื่องเขย่า (magnetic shaker)

เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด

จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)

ดินสอดำขนาด 2B

ตะเกียงแก๊ส (bunsen burner)

ตู้ปลอดเชื้อ (lamina air flow)

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (incubator)

บีกเกอร์

ปากคีบ (forceps)

ปิเปตต์ (pipette)

แผ่นสไลด์

ฟิล์มถ่ายรูป

ไมโครปิเปตต์ (micro pipette)

ลูป (loop)

หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

หลอดทดลอง (test tube)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

computer diskette

paper disc เพื่อทดสอบสารเคมี

2.วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงทดลอง

กระถางปลูกต้นไม้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว

กระบอกฉีด

กรรไกรตัดแต่งกิ่ง

กล้องถ่ายรูป

ต้นพันธุ์พืชอาศัยชนิดต่าง ๆ

ต้นพันธุ์หน้าวัวสายพันธุ์ต่าง ๆ

ถุงพลาสติกทนร้อน

ป้ายพลาสติก

ปุ๋ย Osmocote® สูตร 14-14-14

ฟิล์มถ่ายรูป

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีป้องกันกำจัดแบคทีเรียจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Funguran® Kasuran® Kupravit® และ Oxy-Strep®

วุ้นผง

Arabinose

Cellobiose

Dextrose

Esculin

Glucose

Glycerol

Melibiose

Nutrient broth (Difco)

Starch (soluble-potato)

Trehalose

Beef extract (Difco)

D-methionine

Powder skim milk

Proteose peptone (Difco)

Urea

Yeast extract

$CaCO_3$, USP light powder

Ferric ammonium citrate

$FeCl_3.6H_2O$

KH_2PO_4

K_2HPO_4

$MgSO_4.7H_2O$

NaH_2PO_4

NH_4Cl

$NH_4H_2PO_4$

NaCl

Bromcresol purple

Bromthymol blue

Cephalexin

Cresol red

Cycloheximide

Malachite green

Methyl green

Methyl violet 2B

Pyridoxin

Triphenyl-tetrazolium chloride

Trimethoprine

Ethanol

วิธีการวิจัย

1. การสำรวจศึกษาโรคใบไหม้ของหน้าวัวและการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ปลูกต่าง ๆ ของภาคใต้

1.1 การเก็บตัวอย่างโรค

ทำการเก็บตัวอย่างหน้าวัวที่แสดงอาการโรคและคาดว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ในแปลงปลูกของเกษตรกรที่พบการระบาดของโรค โดยเก็บตัวอย่างในพื้นที่แปลงปลูก 11 แปลงใน 6 จังหวัดของภาคใต้ นำชิ้นส่วนพืชบรรจุในถุงพลาสติกและเก็บในตู้เย็น รวมทั้งบันทึกข้อมูลสถานที่ สายพันธุ์หน้าวัว ส่วนของพืชที่เกิดโรค ลักษณะอาการโรค และระดับการระบาดในสวน โดยออกเก็บตัวอย่างโรคในพื้นที่ดังต่อไปนี้คือ

- สวนมังกรทอง อำเภอสะเดา จังหวัดสงขลา
- สวนหน้าวัวคุณศักดิ์ โสภณ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
- สวนหน้าวัวคุณกฤษกรณ์ อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา
- สวนหน้าวัวคุณวารินทร์ อำเภอพนม จังหวัดสุราษฎร์ธานี
- สวนหน้าวัวคุณโกวิทย์ อำเภอถลาง จังหวัดภูเก็ต
- สวนหน้าวัวคุณบุญชาติ อำเภอกะทู้ จังหวัดภูเก็ต
- สวนหน้าวัวหมู่บ้านจุฬาภรณ์ 5 อำเภอเมือง จังหวัดนราธิวาส
- ศูนย์พันธุ์พืชเพาะเลี้ยงจังหวัดตรัง อำเภอเมือง จังหวัดตรัง
- สวนหน้าวัวคุณสุดา อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร
- สวนหน้าวัวคุณวิรัตน์ อำเภอเมือง จังหวัดชุมพร
- สวนหน้าวัวคุณวิวัฒน์ อำเภอสวี จังหวัดชุมพร

1.2 การวินิจฉัยเบื้องต้น

ทำการบันทึกข้อมูลเพิ่มเติมก่อนนำตัวอย่างพืชไปทำการแยกเชื้อ โดยการวาดรูป ถ่ายภาพและตรวจกลุ่มของแบคทีเรีย (bacterial ooze) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound จากนั้นจึงนำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์

1.3 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

ทุกขั้นตอนในการปฏิบัติ กระทำโดยวิธีการที่ปราศจากเชื้อ (aseptic technique) โดยหลังจากการศึกษาในข้อ 1.2 แล้วหากพบตัวอย่างที่มี bacterial ooze ทำความสะอาดตัวอย่างโดยล้างผ่านน้ำไหล

ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 5 x 5 ตารางมิลลิเมตร จากนั้นแช่ในสารละลาย chlorox 10% เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง นำไปบดขยี้ให้ละเอียดในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยเขย่าเพื่อให้เชื้อออกจากเนื้อเยื่อพืช ใช้ loop แตะน้ำคั้นมา 1 loop ทำการแยกเชื้อโดยวิธีสตรีค (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เทไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับอาหารที่ใช้คือ nutrient agar (NA) บ่มเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 ºC) เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ลักษณะสีเหลืองเป็นมัน ผิวหน้าโค้งนูน ขอบเรียบ ขนาดประมาณ 1-2 มม. ซึ่งคาดว่าเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรค เก็บในหลอดที่มีอาหาร potato semi-synthetic agar (PSA slant) เพื่อทำการศึกษาต่อไปตามวิธีการของ Schaad และคณะ (2001)

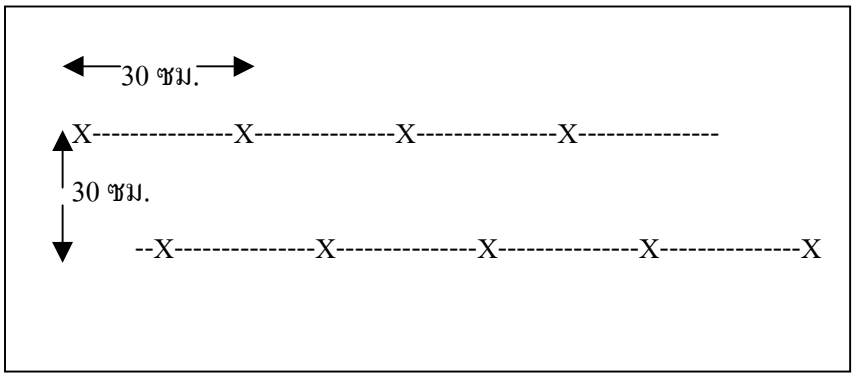
2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับหน้าวัวตามหลัก Koch's postulation

2.1 การเตรียมโรงเรือน และการเตรียมแปลงทดลอง

การเตรียมโรงเรือน เตรียมตามวิธีการของ อดิศร กระแสชัย (2539) การเตรียมแปลงปลูกใช้ระยะปลูกระหว่างแถว 30 เซนติเมตร และระหว่างต้น 30 เซนติเมตร โดยการปลูกสับฟันปลาระหว่างแถว (ภาพที่ 1) ปุ๋ยที่ใช้คือ Osmocote® สูตร 14-14-14 ส่วนการให้น้ำ การกำจัดวัชพืชและอื่น ๆ ใช้วิธีการเดียวกับ อดิศร กระแสชัย (2539)

2.2 การเตรียมพืช

เตรียมต้นหน้าวัวสายพันธุ์ Tropical อายุ 1 ปี 6 เดือน ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ใช้ถ่านและกะลาปาล์มน้ำมันเผาเป็นวัสดุปลูก แต่ละต้นคลุมด้วยถุงพลาสติกซึ่งพ่นน้ำไว้ภายในก่อนการปลูกเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. การเลือกใช้หน้าวัวสายพันธุ์ Tropical ทดสอบความสามารถในการเกิดโรคเนื่องจาก จากการสำรวจพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการเกิดโรคชนิดนี้



ภาพที่ 1 ระบบการปลูกหน้าวัวและพืชอาศัย

หมายเหตุ แต่ละแถวประกอบด้วยหน้าวัวหรือพืชอาศัยทั้งหมด 11 ต้น

2.3 การปลูกเชื้อ

ทำการย้ายเชื้อที่เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA slant มาเพิ่มปริมาณเชื้อ 2 ครั้ง ในอาหาร NA slant แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA เก็บไว้ในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทำให้เป็นสารแขวนลอยแบคทีเรียด้วยน้ำกลั่น (bacterial suspension) ปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร (cfu/มล.) ที่ 0.5 McFarland ทำการปลูกเชื้อโดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยแบคทีเรีย บนใบหน้าวัวที่ใช้ทดสอบทุกใบ ส่วนชุดควบคุมฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น คลุมต้นอีกครั้งด้วยถุงพลาสติกเพื่อเพิ่มความชื้นเป็นเวลา 24 ชม. จึงนำถุงออก หลังจากปลูกเชื้อแล้วทำการให้น้ำตามปกติ และเมื่อพืชแสดงอาการโรคแล้วจึงนำกลับไปศึกษาตามวิธีการที่ 1.3 เพื่อแยกเชื้อสาเหตุของโรคอีกครั้ง

3. จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี

เชื้อที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับหน้าวัว นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี ทำการทดสอบทุกกระบวนการ โดยศึกษาตั้งแต่ระดับสกุล (genus) และชนิด (species) ของเชื้อ ทุกขั้นตอนปฏิบัติตามวิธีการรวมทั้งเทียบเคียงรายงานจากผลการทดลองของ Schaad และคณะ (2001)

3.1 การศึกษาระดับสกุล (genus)

เตรียมน้ำเชื้อที่เป็นสารแขวนลอย จากเชื้ออายุ 24 ชม. ที่เจริญในอาหาร PSA slant โดยใช้เชื้อ 2 loop ในน้ำ 3 มิลลิลิตร ปรับให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 (cfu/มล.) ที่ 0.5 McFarland เขย่าให้เข้ากัน

แล้วใช้ loop แตะมา 1 loop ทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีรายละเอียดใน ภาคผนวกที่ 1 ตามขั้นตอนและวิธีการดังนี้

3.1.1 ปฏิกิริยาแกรม (gram reaction)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : NA (slant)

วิธีการ : streak จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18-24 ชม. เมื่อครบกำหนดเวลา หยด 3% KOH บนสไลด์ 1 หยด แล้วเขี่ยเชื้อมาแตะบนหยด KOH จากนั้นคนให้เข้ากันยก loop ขึ้นมาตรง ๆ หากเชื้อเหนียวติด loop ขึ้นมาอ่านผลว่าเป็นบวก แสดงว่าแบคทีเรียเป็น gram negative หากไม่เหนียวติด loop ขึ้นมาอ่านผลเป็นลบ แสดงว่าแบคทีเรียเป็น gram positive

3.1.2 การเจริญแบบต้องการและไม่ต้องการออกซิเจน (grows anaerobically, aerobically)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : H-L medium จำนวน 2 หลอด

วิธีการ : ใช้ needle stab ลงไปตรง ๆ ในหลอดอาหาร ประมาณครึ่งหลอดของอาหารทั้ง 2 หลอด เทปิดทับด้วย paraffin oil ให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร 1 หลอด ส่วนอีก 1 หลอดไม่เท paraffin oil ปิดทับ นำไปบ่มทันทีที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนและไม่เปลี่ยนสีของอาหารทั้ง 2 หลอด ในวันที่ 1 3 5 และ 7 หลังจากการทดสอบ หากอาหารในหลอดที่ปิดทับด้วย paraffin oil เปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อไม่ต้องการออกซิเจน หากหลอดที่ไม่มี paraffin oil เปลี่ยนสี แสดงว่าเชื้อต้องการออกซิเจน หากเปลี่ยนทั้ง 2 หลอดแสดงว่าเจริญได้ในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน

3.1.3 โคโลนีสีเหลืองบนอาหาร YDC (yellow colonies on YDC)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : YDC (plate)

วิธีการ : streak จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจผลโดยการดูสีของโคโลนี พร้อมทั้งลักษณะต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ รูปร่าง ขนาด ความโค้งนูนของผิวหน้า ขอบและความขุ่นใสของโคโลนี

3.1.4 โคโลนีมีลักษณะ mucoid บนอาหาร YDC ที่อุณหภูมิ 30 ºC (colonies mucoid on YDC at 30ºC)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : YDC (plate)

วิธีการ : streak จากนั้นบ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจผลโดยการ ดูลักษณะผิวหน้าของโคโลนี การโค้งนูน เมือกและเป็นมัน

3.1.5 การสร้างสารเรืองแสงในอาหาร KB (fluorescent pigment on KB)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : KB (King *et al*.'s medium B agar plate)

วิธีการ : streak จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ºC เป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยการนำจานเลี้ยงเชื้อไปส่องใต้หลอดไฟ ซึ่งมีคลื่นแสงยาว 360-366 nm (black light) โดยสังเกตการสร้างสารเรืองแสงสีเขียว (fluorescin) บนอาหารที่ใช้ในการทดสอบ

3.1.6 การแพร่ของสารไม่เรืองแสงในอาหาร KB (diffusible non-fluorescent pigment on KB)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : KB (King *et al.*'s medium B agar plate)

วิธีการ : streak จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ºC เป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยการนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ไปส่องใต้แสงไฟธรรมดา สังเกตการสร้างสารสีน้ำตาลอ่อนบนอาหารที่ใช้ในการทดสอบ

3.1.7 การสร้างเอนไซม์ urease (urease production)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : YS broth (control) และ YS broth + urea (tube)

วิธีการ : stab ทั้ง 2 หลอด บ่มเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจผลโดยการดูการเปลี่ยนสีของอาหาร หากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้ อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง

3.1.8 การสร้างเอนไซม์ oxidase (oxidase production)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : NGA (plate)

วิธีการ : streak จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ºC ตรวจผลภายใน 24 ชม. โดยใช้ไม้จิ้มฟันตักเชื้อปริมาณเล็กน้อย แตะบนกระดาษกรอง จากนั้นหยดสาร 1% (w/v) tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride solution สังเกตการเปลี่ยนเป็นสีม่วงของเชื้อ โดยหากเชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วงภายใน 10-60 วินาที อ่านผลเป็นบวก ถ้าเปลี่ยนหลัง 60 วินาที อ่านผลเป็นลบ

3.1.9 การเจริญที่อุณหภูมิ 40 ºC (grows at 40 ºC)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : NBY (broth) จำนวน 2 หลอดต่อเชื้อ

วิธีการ : เลี้ยงเชื้อใน NBY เหลว เป็นเวลา 18-24 ชม. บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดเชื้อที่เจริญในอาหาร NBY เหลวนั้นจำนวน 20 µl ใส่ใน NBY หลอดใหม่และบ่มเลี้ยงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 ºC พร้อมกับเขย่าเพื่อให้เชื้อในหลอดได้รับความร้อนอย่างสม่ำเสมอทั่วหลอด ตรวจดูความขุ่นของอาหารหลังจากเลี้ยงไว้ที่ 15 และ 24 ชม.

3.1.10 การมี flagella มากกว่า 4 เส้น (more than four peritrichous flagella)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : semi-solid NA (slant)

วิธีการ : stab เชื้อบนผิวหน้าของอาหาร บ่มเลี้ยงไว้ 16-18 ชม. ตรวจผลโดยการนำมาย้อมด้วยวิธี wet mount staining โดยหยดน้ำ 1 หยดเล็ก ๆ บนสไลด์ ค่อย ๆ เขี่ยเชื้อมาแตะที่ขอบผิวน้ำเบา ๆ โดยไม่กวนหรือ smear แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นหยดสีย้อม flagella ที่ขอบกระจกปิดสไลด์ทิ้งไว้ 5 นาที ตรวจและนับ flagella ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound

3.1.11 การเจริญบนอาหาร D1M (growth on D1M agar)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : D1M agar (plate)

วิธีการ : streak จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจผลโดยการดูว่ามีเชื้อเจริญบนอาหารหรือไม่ รูปร่าง ลักษณะและสีเป็นอย่างไร

3.1.12 การสร้างสปอร์ (spore formation)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : NA (slant)

วิธีการ : streak จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-5 วัน ตรวจผลในวันที่ 1 และ 5 การย้อมสปอร์โดยหยดน้ำบนสไลด์ ใช้ loop แตะแบคทีเรียจำนวนเล็กน้อย คนให้เข้ากัน ปล่อยทิ้งให้แห้ง จากนั้นหยดด้วย 5.0% (w/v) aq. malachite green ให้ท่วม ปล่อยทิ้ง 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำไหล ปล่อยให้แห้ง จากนั้น counter stain ด้วย 5.0% (w/v) aq. safranin O เป็นเวลา 15 วินาที ล้างโดยผ่านน้ำซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound ที่ 40x เซลล์ของแบคทีเรียติดสีแดง ส่วนสปอร์ติดสีเขียว

3.1.13 ลักษณะโคโลนีคล้ายเส้นใย (aerial mycelium)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : NA (plate)

วิธีการ : streak จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจผลโดยการดูลักษณะของโคโลนี ว่ามีลักษณะคล้ายเส้นใยของเชื้อราหรือไม่อย่างไร

3.2 การศึกษาระดับชนิด (species)

เตรียมน้ำเชื้อที่เป็นสารแขวนลอย จากเชื้ออายุ 24 ชม. ที่เจริญในอาหาร PSA slant โดยใช้เชื้อ 2 loop ในน้ำ 3 มิลลิลิตร ปรับให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 (cfu/มล.) ที่ 0.5 McFarland เขย่าให้เข้ากัน แล้วใช้ loop แตะมา 1 loop ทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย ซึ่งมีรายละเอียดในภาคผนวกที่ 1 ตามขั้นตอนและวิธีการดังนี้

3.2.1 โคโลนีสีเหลืองบนอาหาร YDC (yellow colonies on YDC)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : YDC (plate)

วิธีการ : streak จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจผลโดยการดูสีของโคโลนี พร้อมทั้งลักษณะต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ รูปร่าง ขนาด ความโค้งนูนของผิวหน้า ขอบและความขุ่นใสของโคโลนี

3.2.2 การเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ºC (growth at 35ºC)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : YS broth + peptone (tube)

วิธีการ : stab เชื้อในหลอดอาหาร จากนั้นบ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 35 ºC พร้อมกับเขย่าเพื่อให้เชื้อได้รับออกซิเจนและเชื้อในหลอดได้รับความร้อนสม่ำเสมอทั่วหลอดอยู่ตลอดเวลาเป็นเวลา 10-12 วัน ตรวจผลโดยการสังเกตอาหาร หากพบว่าอาหารขุ่น อ่านผลเป็นบวก

3.2.3 การเจริญของเชื้อบนอาหาร SX (growth on SX)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : SX (plate)

วิธีการ : streak จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 ºC ในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 3-4 วัน ตรวจผลโดยการสังเกตดูว่าเชื้อสามารถเจริญบนอาหารชนิดนี้ได้หรือไม่ รูปร่างและลักษณะอย่างไร หากเชื้อสามารถเจริญได้อ่านผลเป็นบวก

3.2.4 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : starch agar (plate)

วิธีการ : streak จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลเมื่อครบ 48 ชม. โดยหยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วจาน ไอโอดีนจะทำปฏิกิริยากับแป้งในอาหาร ทำให้บริเวณที่มีแป้งอยู่กลายเป็นสีน้ำเงินอมม่วง ถ้าเชื้อสามารถย่อยแป้งได้จะเกิดบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนี แสดงผลการทดสอบเป็นบวก

3.2.5 การทดสอบความสามารถในการย่อย esculin (esculin hydrolysis)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : esculin (tube) และ ET medium (plate)

วิธีการ : stab เชื้อในอาหาร esculin (tube) จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 ºC เป็นเวลา 3-4 วัน ตรวจผลโดยการสังเกตสีของอาหาร หากอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ยืนยันผลอีกครั้งโดยหยดเชื้อที่เจริญในอาหาร esculin บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ET medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-4 วัน อาหารรอบ ๆ โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำเช่นกัน

3.2.6 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน (protein digestion)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : powder skim milk (plate)

วิธีการ : spot เชื้อบนอาหาร powder skim milk บ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 3-4 วัน ตรวจผลโดยการดูความสามารถในการย่อยโปรตีนของเชื้อบนอาหาร หากเกิดลักษณะวงกลมใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี แสดงว่าเชื้อสามารถย่อยโปรตีนได้ อ่านผลเป็นบวก

3.2.7 การสร้างกรดหรือด่างใน litmus milk (litmus milk)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : litmus milk (plate)

วิธีการ :streak เชื้อบนอาหารที่ใช้ในการทดสอบ จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลหลังจากการปลูกเชื้อ 3 10 30 และ 40 วัน โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร

3.2.8 การทดสอบกิจกรรม ice nucleation (ice nucleation activity)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : -

วิธีการ : นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่จะนำมาทดสอบกิจกรรม ice nucleation เตรียม suspension นำน้ำเกลือใส่ถังโฟมที่เตรียมไว้ ค่อย ๆ เติมน้ำแข็งบดลงไป ปล่อยทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงถึง -5 ถึง -9 ºC นำแผ่นกระดาษอลูมิเนียม พับเป็นกระทงขนาด 5x7 ซม. นำไปลอยในน้ำเกลือ ทิ้งไว้สักครู่ เพื่อให้ความเย็นจากน้ำเกลือถ่ายเทมาที่กระทง หลังจากนั้นนำเชื้อที่ต้องการทดสอบปริมาตร 50 µl หยดลงบนกระทงดังกล่าว และใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) สังเกตการแข็งตัวของเชื้อ หากเชื้อมีกิจกรรม ice nucleation ก็จะแข็งตัวภายใน 5 นาที

3.2.9 การทดสอบการสร้างกรดจาก arabinose (acid from arabinose)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : medium C ที่มีส่วนผสมของ arabinose (agar slant)

วิธีการ : streak เชื้อบนอาหาร จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารหลังจากการปลูกเชื้อ 2 4 6 21 และ 28 วัน หากมีสภาพเป็นกรด อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

3.2.10 การทดสอบการใช้ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน (utilization of glycerol)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : medium C ที่มีส่วนผสมของ glycerol (agar slant)

วิธีการ : streak เชื้อบนอาหาร จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารหลังจากการปลูกเชื้อ 2 4 6 21 และ 28 วัน ดูการเจริญของเชื้อบนอาหาร

3.2.11 การทดสอบการใช้ melibiose เป็นแหล่งคาร์บอน (utilization of melibiose)

อาหารที่ใช้ทดสอบ : medium C ที่มีส่วนผสมของ melibiose (agar slant)

วิธีการ : streak เชื้อบนอาหาร จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารหลังจากการปลูกเชื้อ 2 4 6 21 และ 28 วัน ดูการเจริญของเชื้อบนอาหาร

4. ศึกษาระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในหน้าวัวสายพันธุ์ต่าง ๆ

4.1 การเตรียมโรงเรือน และการเตรียมแปลงทดลอง

การเตรียมโรงเรือน เตรียมตามวิธีการของ อดิศร กระแสชัย (2539) การเตรียมแปลงปลูกใช้ระยะปลูกระหว่างแถว 30 เซนติเมตร และระหว่างต้น 30 เซนติเมตร โดยการปลูกสับฟันปลาระหว่างแถว (ภาพที่ 1) ปุ๋ยที่ใช้คือ Osmocote® สูตร 14-14-14 ส่วนการให้น้ำ การกำจัดวัชพืชและอื่น ๆ ใช้วิธีการเดียวกับ อดิศร กระแสชัย (2539)

4.2 การเตรียมพืช

เตรียมต้นหน้าวัว 7 สายพันธุ์ ๆ ละ 10 ต้น อายุ 1 ปี 6 เดือน ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ สายพันธุ์ Acropolis Alexis Calipso Casino Midori Sweet heart pink และ Tropical ปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ใช้ถ่านและกะลาปาล์มน้ำมันเผาเป็นวัสดุปลูก แต่ละต้นคลุมด้วยถุงพลาสติกซึ่งพ่นน้ำไว้ภายในก่อนการปลูกเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) 10 ซ้ำ ส่วนชุดควบคุมจำนวน 7 สายพันธุ์ ๆ ละ 1 ต้น

4.3 การปลูกเชื้อ

นำเชื้อสาเหตุโรค isolate ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงจากการทดสอบในข้อ 2 มาศึกษาระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในหน้าวัวสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยทำการย้ายเชื้อที่เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA slant มาเพิ่มปริมาณเชื้อ 2 ครั้งในอาหาร NA slant แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA เก็บไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทำให้เป็นสารแขวนลอยแบคทีเรียด้วยน้ำกลั่น ปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อน้ำ 1 มล. (cfu/มล.) ที่ 0.5 McFarland ทำการปลูกเชื้อโดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยแบคทีเรียบนใบหน้าวัวที่ใช้ทดสอบจำนวน 10 ต้น ชุดควบคุมฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น คลุมใบอีกครั้งด้วยถุงพลาสติกเพื่อเพิ่มความชื้นเป็นเวลา 24 ชม. จึงนำถุงออก หลังจากปลูกเชื้อแล้วทำการให้น้ำตามปกติ บันทึกลักษณะแผลและระยะเวลาเมื่อพืชเริ่มแสดงอาการ

4.4 การบันทึกข้อมูล

ทำการวัดขนาดของแผลบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยวัด 5 ใบนับจากยอด แล้วนำมาบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผล โดยการนำกระดาษลอกลายมาทาบบนใบที่แสดงอาการและทำการวาดรูปแผลบนใบ หลังจากนั้นนำกระดาษลอกลายที่บันทึกพื้นที่ใบและขนาดของแผลมาลอกใส่กระดาษถ่ายเอกสาร A4 โดยใช้ดินสอที่มีความเข้ม 2B ขึ้นไป นำกระดาษที่ลอกอาการและพื้นที่ใบไปเข้าเครื่อง scanner เพื่อเก็บบันทึกข้อมูล วัดพื้นที่ใบและส่วนที่แสดงอาการโรคด้วยโปรแกรม DT-SCAN และหาร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคในแต่ละใบ รวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Reynolds and Cunfer, 1997)

5. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชชนิดอื่นที่นอกเหนือจากหน้าวัว

5.1 การเตรียมโรงเรือน และการเตรียมแปลงทดลอง

การเตรียมโรงเรือน เตรียมตามวิธีการของ อดิศร กระแสชัย (2539) การเตรียมแปลงปลูกใช้ระยะปลูกระหว่างแถว 30 เซนติเมตร และระหว่างต้น 30 เซนติเมตร โดยการปลูกสับฟันปลาระหว่างแถว (ภาพที่ 1) ปุ๋ยที่ใช้คือ Osmocote® สูตร 14-14-14 ส่วนการให้น้ำ การกำจัดวัชพืชและอื่น ๆ ใช้วิธีการเดียวกับ อดิศร กระแสชัย (2539)

5.2 การเตรียมพืช

เตรียมต้นพันธุ์พืชที่อยู่ในวงศ์ Araceae ที่มีอายุ 2 เดือน จำนวน 6 สกุลคือ

1) สกุล *Aglaonema* หรือเขียวหมื่นปีได้แก่ เขียวหมื่นปี เศรษฐีพูนทรัพย์ เงินเต็มบ้าน คฑา

ทอง เศรษฐีเมืองราชและทองศรีเทพ

2) สกุล *Caladium* หรือบอนสีได้แก่ ทับทิมสยาม ร.9 มหามงกุฎ พริกกะเกลือ บอนใบยาว และแดงจอมทัพ

3) สกุล *Dieffenbachia* หรือสาวน้อยประแป้งได้แก่ ทรอปิคสโนว์ ดิฟเฟ่นสโนว์ดร็อป สาวน้อยนวลจันทร์ โสนก สาวน้อยประแป้ง1 (พื้นเมือง) และไจแอนท์ดัมเคน

4) สกุล *Philodendron* ได้แก่ ซานาดู ฟิโลทอง พลูเขียว พลูสนิม และมรกตแดง

5) สกุล *Scindapsus* หรือพลูด่าง ได้แก่ พลูฉลุ ราชินีสีทอง และราชินีหินอ่อน

6) สกุล *Syngonium* หรือเงินไหลมาได้แก่ เงินไหลมา ออมเงิน ออมทอง ออมทรัพย์ ออมเพชร และออมนาก

ทำการทดสอบชนิดละ 10 ต้น คลุมใบพืชที่ใช้ในการทดสอบด้วยถุงพลาสติกซึ่งพ่นน้ำไว้ภายในเป็นเวลา 24 ชม. วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ส่วนชุดควบคุมจำนวน 32 ชนิด ๆ ละ 1 ต้น

5.3 การปลูกเชื้อ

นำเชื้อสาเหตุโรค isolate ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงจากการทดสอบในข้อ 2 มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชจำนวน 32 ชนิด โดยทำการย้ายเชื้อที่เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA slant มาเพิ่มปริมาณเชื้อ 2 ครั้ง ในอาหาร NA slant แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA เก็บไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเชื้อมาทำให้เป็นสารแขวนลอยด้วยน้ำกลั่น ปรับมีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 (cfu/มล.) ที่ 0.5 McFarland ปลูกเชื้อโดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยแบคทีเรียบนใบพืชที่ใช้ทดสอบจำนวน 10 ต้น ชุดควบคุมฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น คลุมใบอีกครั้งด้วยถุงพลาสติกเพื่อเพิ่มความชื้นเป็นเวลา 24 ชม. จึงนำถุงออก หลังจากปลูกเชื้อแล้วทำการให้น้ำตามปกติ บันทึกลักษณะแผลและระยะเวลาเมื่อพืชเริ่มแสดงอาการ

5.4 การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกระยะเวลาของการเกิดโรค ขนาดและการขยายตัวของแผลหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน ยกเว้นสกุล *Caladium* และ *Syngonium* ที่ทำการบันทึกขนาดและการขยายตัวของแผลหลังจากการปลูกเชื้อ 20 วัน ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานของใบที่เล็กและอ่อนบาง ทำการบันทึกข้อมูลเช่นเดียวกับข้อ 4.4 โดยการนำกระดาษลอกลายมาทาบบนใบที่แสดงอาการโรคและวาดรูปแผลบนใบ หลังจากนั้นนำกระดาษลอกลายที่บันทึกพื้นที่ใบและขนาดของแผลมาลอกใส่กระดาษถ่ายเอกสาร A4 โดยใช้ดินสอที่มีความเข้ม 2B ขึ้นไป นำกระดาษที่ลอกอาการและพื้นที่ใบไปเข้าเครื่อง scanner เพื่อ

เก็บบันทึกข้อมูล วัดพื้นที่ใบและส่วนที่แสดงอาการโรคด้วยโปรแกรม DT-SCAN และหาร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคทั้งต้นรวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Reynolds and Cunfer, 1997)

5.5 การตรวจหาเชื้อจากใบที่ปลูกเชื้อแต่ไม่แสดงอาการโรค

จากการที่ Norman และ Alvarez (1994) ได้กล่าวว่าเชื้ออาจอาศัยอย่างแอบแฝง (latent infection) อยู่บนพืชอาศัยได้โดยไม่แสดงอาการโรค หากพืชที่ทำการปลูกเชื้อไม่แสดงอาการโรคหลังจากปลูกเชื้อ 30 วัน จึงได้ทำการตรวจหาเชื้อที่อาจแอบแฝงอยู่โดยการนำตัวอย่างจากชิ้นส่วนพืชบริเวณใบและก้านใบมาทำการแยกเชื้อ โดยทำความสะอาดตัวอย่างด้วยการล้างผ่านน้ำไหล ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 5 X 5 ตารางมิลลิเมตร ชั่งตัวอย่าง 0.3 กรัม แช่ใน chlorox 10% เป็นเวลา 10 นาที ล้างในน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง นำตัวอย่างแช่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชม. หยดน้ำกลั่นที่แช่ชิ้นส่วนพืชปริมาตร 20 µl บนอาหาร YDC เกลี่ยด้วยแท่งแก้วรูปตัว L บ่มเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 ºC เป็นเวลา 3-4 วัน นับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

6. การศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดแบคทีเรียในการควบคุมโรค

6.1 ศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดแบคทีเรียในการควบคุมโรคภายในห้องปฏิบัติการทดลอง

6.1.1 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อสาเหตุโรคที่เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA slant มาเพิ่มปริมาณเชื้อ 2 ครั้ง ในอาหาร NA slant แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA เก็บไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทำให้เป็นสารแขวนลอยด้วยน้ำกลั่น ปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร (cfu/มล.) ที่ 0.5 MaFarland

สารเคมีที่ใช้ได้แก่

1. Funguran® อัตราสารแนะนำในฉลาก 15-20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (ชื่อสามัญ คอปเปอร์ ไฮดรอกไซด์ มีสารออกฤทธิ์ : copper hydroxide 77%) ในการทดลองนี้ใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร
2. Kasuran® อัตราสารแนะนำในฉลาก 20-30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (ชื่อสามัญ คาซูก้าไมซินไฮโดรคลอไรด์ + คอปเปอร์ออกซีคลอไรด์ มีสารออกฤทธิ์ : kasugamycin 2% + copper chloride 75.6%) ในการทดลองนี้ใช้ 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร
3. Kupravit® อัตราสารแนะนำในฉลาก 30-80 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (ชื่อสามัญ คอปเปอร์ ออกซี

คลอไรด์ มีสารออกฤทธิ์ : dicopper chloride trihydroxide 84%) ในการทดลองนี้ใช้ 80 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

4. Oxy-Strep® อัตราสารแนะนำในฉลาก 6-12 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (ชื่อสามัญ สเตร็พโตมัยซิน ซัลเฟต + ออกซีเตตระไซคลิน ไฮโดรคลอไรด์ มีสารออกฤทธิ์ : streptomycin sulphate 18% + oxytetracycline HCL 1.5%) ในการทดลองนี้ใช้ 12 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

6.1.2 การเตรียมสารเคมี

ทำการทดลองโดยใช้สารเคมีจำนวน 4 ชนิด ละลายสารในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อัตราความเข้มข้นสารต่าง ๆ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ทำการทดสอบ 21 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 Funguran® อัตราความเข้มข้นสาร 0.50 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 2 Funguran® อัตราความเข้มข้นสาร 0.75 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 3 Funguran® อัตราความเข้มข้นสาร 1.00 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 4 Funguran® อัตราความเข้มข้นสาร 1.25 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 5 Funguran® อัตราความเข้มข้นสาร 1.50 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 6 Kasuran® อัตราความเข้มข้นสาร 0.50 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 7 Kasuran® อัตราความเข้มข้นสาร 0.75 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 8 Kasuran® อัตราความเข้มข้นสาร 1.00 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 9 Kasuran® อัตราความเข้มข้นสาร 1.25 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 10 Kasuran® อัตราความเข้มข้นสาร 1.50 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 11 Kupravit® อัตราความเข้มข้นสาร 0.50 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 12 Kupravit® อัตราความเข้มข้นสาร 0.75 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 13 Kupravit® อัตราความเข้มข้นสาร 1.00 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 14 Kupravit® อัตราความเข้มข้นสาร 1.25 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 15 Kupravit® อัตราความเข้มข้นสาร 1.50 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 16 Kupravit® อัตราความเข้มข้นสาร 0.50 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 17 Oxy-Strep® อัตราความเข้มข้นสาร 0.75 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 18 Oxy-Strep® อัตราความเข้มข้นสาร 1.00 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก

- กรรมวิธีที่ 19 Oxy-Strep® อัตราความเข้มข้นสาร 1.25 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 20 Oxy-Strep® อัตราความเข้มข้นสาร 1.50 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 21 น้ำกลั่น

6.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบด้วยวิธี zonal inhibition โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ปริมาตร 20 มล. ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปล่อยทิ้งไว้ให้อาหารแห้งเป็นเวลา 2 วัน เมื่ออาหารแห้งดีแล้ว ทำการ swob เชื้อบนอาหารที่เตรียมไว้ให้เต็มพื้นผิวจาน จากนั้นนำ paper disc ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ววางทาบให้สนิทกับผิวอาหารทันที หยดสารเคมีปริมาตร 20 µl ลงบน paper disc ส่วนชุดควบคุมหยดด้วยน้ำกลั่น ทำการทดสอบโดยใช้ปริมาณสารและวิธีการเดียวกันกับสารเคมีทั้ง 4 ชนิด

6.1.4 การบันทึกข้อมูล

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของจุดวงกลมใส (clear zone) ในแนวราบ 2 แนวตั้งฉากกัน ที่เกิดขึ้นบนแต่ละชุดการทดลองหลังจากการทดสอบ 24 ชม.

6.1.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

6.2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดแบคทีเรียในการควบคุมโรคในเรือนทดลอง

6.2.1 การเตรียมพืช

เตรียมต้นหน้าวัวสายพันธุ์ Alexis ที่มีอายุ 1 ปี 6 เดือน ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยปฏิบัติเช่นเดียวกันกับการปลูกพืชในข้อ 4.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD)

6.2.2 การเตรียมเชื้อ

ทำการทดลองโดยใช้เชื้อ isolate ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงจากการทดสอบในข้อ 2 โดยทำการย้ายเชื้อที่เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA slant มาเพิ่มปริมาณเชื้อ 2 ครั้งในอาหาร NA slant แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA เก็บไว้ในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้น

นำเชื้อที่ได้มาทำให้เป็นสารแขวนลอยด้วยน้ำกลั่น ปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 (cfu/มล.) ที่ 0.5 McFarland

6.2.3 การเตรียมสารเคมี

ทำการทดลองโดยใช้สารเคมีที่ทดสอบในข้อ 6.1 ทั้ง 4 ชนิดคือ Funguran® Kasuran® Kupravit® และ Oxy-Strep® โดยละลายสารในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อัตราความเข้มข้นสาร 0.75 1.00 และ 1.25 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ทำการทดสอบ 13 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 Funguran® อัตราความเข้มข้นสาร 0.75 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 2 Funguran® อัตราความเข้มข้นสาร 1.00 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 3 Funguran® อัตราความเข้มข้นสาร 1.25 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 4 Kasuran® อัตราความเข้มข้นสาร 0.75 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 5 Kasuran® อัตราความเข้มข้นสาร 1.00 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 6 Kasuran® อัตราความเข้มข้นสาร 1.25 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 7 Kupravit® ตราความเข้มข้นสาร 0.75 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 8 Kupravit® อัตราความเข้มข้นสาร 1.00 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 9 Kupravit® อัตราความเข้มข้นสาร 1.25 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 10 Oxy-Strep® อัตราความเข้มข้นสาร 0.75 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 11 Oxy-Strep® อัตราความเข้มข้นสาร 1.00 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 12 Oxy-Strep® อัตราความเข้มข้นสาร 1.25 เท่าของอัตราสารแนะนำในฉลาก
- กรรมวิธีที่ 13 ฉีดพ่นโดยน้ำกลั่น

6.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดแบคทีเรียในการควบคุมโรค

6.2.4.1 การกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคก่อนการฉีดพ่นสารเคมี เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารเคมีในกรณีที่มีเชื้อเข้าทำลายแล้ว โดยฉีดพ่นสารแขวนลอยแบคทีเรียบนใบหน้าวัวที่ใช้ทดสอบทุกต้น คลุมด้วยถุงพลาสติกเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นจึงทำการฉีดพ่นสารเคมีแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารแต่ละชนิด ส่วนชุดควบคุมฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 5 ต้น (5 ซ้ำ) จากนั้น

ฉีดพ่นทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำการให้น้ำตามปกติ บันทึกลักษณะรอยแผลและระยะเวลาเมื่อพืชเริ่มแสดงอาการ

6.2.4.2 การป้องกันและกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

ทำการฉีดพ่นสารเคมีก่อนการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเป็นเวลา 2 สัปดาห์ สัปดาห์ละครั้ง เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารเคมีในการป้องกันโรคก่อนการเข้าทำลายของเชื้อ โดยการฉีดพ่นสารเคมีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารแต่ละชนิดบนใบหน้าวัวที่ใช้ทดสอบทุกต้น ส่วนชุดควบคุมฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น ในสัปดาห์ที่ 3 ก่อนการฉีดพ่นสารเคมี 48 ชม. คลุมต้นหน้าวัวด้วยถุงพลาสติกก่อนเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นจึงทำการฉีดพ่นสารแขวนลอยแบคทีเรียบนใบหน้าวัวที่ใช้ในการทดสอบแล้วจึงฉีดพ่นสารเคมีครั้งที่ 3 หลังจากการปลูกเชื้อแล้ว 24 ชม. ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 5 ต้น (5 ซ้ำ) จากนั้นฉีดพ่นสารเคมีอีก 2 ครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สัปดาห์ละครั้ง ทำการให้น้ำตามปกติ บันทึกลักษณะรอยแผลและระยะเวลาเมื่อพืชเริ่มแสดงอาการ

6.2.5 การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกระยะเวลาของการเกิดโรค ขนาดและการขยายตัวของแผลหลังจากการปลูกเชื้อ 21 วัน บันทึกผลโดยนำกระดาษลอกลายมาทาบบนใบที่แสดงอาการและทำการวาดรูปแผลบนใบ หลังจากนั้นนำกระดาษลอกลายที่บันทึกพื้นที่ใบและขนาดของแผลมาลอกใส่กระดาษถ่ายเอกสาร A4 โดยใช้ดินสอที่มีความเข้ม 2B ขึ้นไป นำกระดาษที่ลอกอาการและพื้นที่ใบไปเข้าเครื่อง scanner เพื่อเก็บบันทึกข้อมูล วัดพื้นที่ใบและส่วนที่แสดงอาการโรคด้วยโปรแกรม DT-SCAN และหาร้อยละของพื้นที่ใบที่เกิดโรคในแต่ละใบ รวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Reynolds and Cunfer, 1997)