5. ระเบียบวิธีวิจัย

<u>การทดลองที่ 1</u> : ความทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา*Colletotrichum* spp. สายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

1.1 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์ และเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

เก็บรวบรวมตัวอย่างจากใบและผลมะม่วง ที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากตลาดและสวนมะม่วงในเขต อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ตรวจดูเชื้อจากแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) จากนั้นตรวจสอบเชื้อสาเหตุด้วยวิธีการ free hand section โดยตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) เพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา หากพบว่าเชื้อสาเหตุเป็นเชื้อรา *Colletotrichum* sp. จึงแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting technique โดยล้างผลมะม่วงด้วยน้ำไหลประมาณ 15 นาที เพื่อชะล้างสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ออก จากนั้นตัดชิ้นพืชบริเวณแผลกับเนื้อเยื่อปกติให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 cm ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน 10% Clorox (sodium hypochlorite) ประมาณ 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 5 นาที ซับชิ้นพืชให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำชิ้นพืชวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน เมื่อสังเกตเห็นเส้นใยเชื้อราเจริญออกจากชิ้นส่วนพืช จึงเขี่ยบริเวณปลายเส้นใยมาวางบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องจนกว่าเชื้อราจะเจริญเต็มจานอาหาร (เป็นเวลา 10 วัน)

ทดสอบการเป็นเชื้อสาเหตุของโรคโดยการปลูกเชื้อลงบนผลมะม่วง สังเกตลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น โดยสังเกตลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น ตรวจดูลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อราที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรค โดยใช้ cork borer ตัดบริเวณปลายเส้นใยของโคโลนีที่บริสุทธิ์ เก็บตัวอย่างเส้นใยส่วนหนึ่งไว้เป็น stock ใน PDA slant และอีกส่วนหนึ่งนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

วัดขนาดและรูปร่างของ conidium และ appressorium ของเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยวิธี slide culture โดยวางแผ่นสไลด์และ cover slips บนกระดาษชำระที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเทอาหาร PDA ลงบนจานอาหารให้หนาประมาณ 2-3 mm แล้วตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 1 x 1 cm วางอาหารบนแผ่นสไลด์ เขี่ยเส้นใยเชื้อราหรือกลุ่ม conidium (mass) ป้ายที่ขอบของ PDA ทั้ง 4 ด้าน ปิดทับด้วย cover slips แล้วเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงบนกระดาษชำระเพื่อให้ความชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3-4 วัน จึงนำ

แผ่น cover slide มาย้อมด้วย phenol cotton blue ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสุ่มเลือก conidium และ appressoria อย่างละ 30 อัน (ใช้กำลังขยาย 1000 เท่า) บันทึกขนาดและรูปร่าง

1.2 ทดสอบความทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อผสมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้นระดับต่างๆ ได้แก่ 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1000 ppm โดยมีอาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารคาร์เบนดาซิมเป็นชุดควบคุม เทอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัด เชื้อราคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้นต่างๆ ลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm จานละประมาณ 15 mm ทดสอบความทนทานต่อสารสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ด้วยวิธี culture disc technique โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราแต่ละไอโซเลท ที่แยกได้จากการทดลองที่ 1.1 เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้นระดับต่างๆ เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเชื้อรากับชุดควบคุม ทดลองความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ ต่อไอโซเลท ถ่ายภาพลักษณะโคโลนีของเชื้อรา และบันทึกการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราทุก 3, 5 และ 7 วันแล้วหาค่าเฉลี่ยเมื่อเชื้อราชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การประเมินระดับความทนทานของเชื้อรา พิจารณาจาก 2 กรณี

A. ความสามารถเจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

ประเมินระดับความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมเป็น 4 ระดับ ตามหลักเกณฑ์ ซึ่งดัดแปลงจาก Koenraadt *et al.* (1992) และ Peres *et al.* (2004) (Table 1)

- เชื้อราที่อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม หรือสายพันธุ์ปกติ (sensitive : S) คือ เชื้อราที่ไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญได้เพียงเล็กน้อยบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ระดับความเข้มข้น 0 - 1 ppm
- เชื้อราที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับต่ำ (weakly resistant : WR) คือ เชื้อราที่เจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ระดับความเข้มข้น 0 - 10 ppm

- เชื้อราที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับปานกลาง (moderately resistant : MR) คือเชื้อราที่เจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ระดับความเข้มข้น 0 - 100 ppm

- เชื้อราที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (highly resistant : HR) คือ เชื้อราที่สามารถเจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับความเข้มข้น 0 – 500 และ/หรือ 1000 ppm

Table 1 Phenotype-resistant levels of fungi to carbendazim at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l supplemented with potato dextrose agar (modified from Koenraadt *et al.*, 1992; Peres *et al.*, 2004)

Phenotype-resistant levels	Carbendazim concentration (mg/l)					
	0.1	1	10	100	500*	1,000
Sensitive (S)	✓	X	X	X	X	X
	✓	✓	X	X	X	X
Weakly resistant (WR)	✓	✓	✓	X	X	X
Moderately resistant (MR)	✓	✓	✓	✓	X	X
Highly resistant (HR)	✓	✓	✓	✓	✓	X
	✓	✓	✓	✓	✓	✓

* = the field recommendation rate
✓= the percentage of growth ≥ 10% compared with the control
X = the percentage of growth < 10% compared with the control

B. อัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

ประเมินหาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละความเข้มข้น โดยนำค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อราที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราคำนวณจากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อรา (เทียบกับชุดควบคุม)} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

นำเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อราที่ได้มาเปรียบเทียบระดับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา ดังนี้คือ

-	=	เชื้อราที่เจริญได้ < 10 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
+	=	เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 10% แต่ไม่ถึง 35% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
++	=	เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 35% แต่ไม่ถึง 65% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
+++	=	เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 65% แต่ไม่ถึง 90% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
++++	=	เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 90% ขึ้นไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

1.3 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างเชื้อราสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (HR)

1.3.1 การศึกษาลักษณะโคโลนี และเส้นใยของเชื้อรา

เลี้ยงเส้นใยเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ระดับความเข้มข้น 500 ppm (อัตราแนะนำ) ด้วยวิธี poisoned food โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราแต่ละไอโซเลท ที่แยกได้จากการทดลองที่ 1.1 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม โดยทดลองความเข้มข้นละ 4 ซ้ำต่อไอโซเลท รอจนกว่าเส้นใยเชื้อราในชุดควบคุม ซึ่งคืออาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม เปรียบเทียบลักษณะโคโลนีและเส้นใยในชุดควบคุม กับสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (HR) บันทึกลักษณะโคโลนี และการเจริญของเส้นใย

1.3.2 การศึกษาลักษณะ conidium และการงอก germ tube บนเยื่อหอม

ตรวจสอบลักษณะ conidium และ appressorium และหาอัตราการงอกของ conidium โดยการเลี้ยงบนเยื่อหอม ซึ่งประยุกต์จากวิธีการของ Hirata (1942) ดังนี้ คือ เตรียมเยื่อหอม โดยนำหอมหัวใหญ่มาผ่าแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ลอกกลีบหอมหัวใหญ่ออกเป็นชิ้นๆ ใช้มีดกรีดผิวด้านในให้เป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1x1 cm ใช้ปากคีบ (forceps) ลอกเซลล์ผิว (epidermal cells) ด้านในกลีบหอม นำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 80% ทิ้งไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ เมื่อต้องการใช้ นำเซลล์เยื่อหอมมาล้าง โดยเปิดน้ำไหลผ่านเบาๆ อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบ จากนั้นเตรียม spore suspension ของเชื้อราในข้อ 1.3.1 โดยเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) เกลี่ยให้

สปอร์ของเชื้อราหลุดออกจากผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อ 3-4 ชั้น เพื่อกรองเอาเศษวุ้นและเส้นใยเชื้อราออก นำ spore suspension ไปปรับปริมาตรด้วย haemacytometer ให้ได้ความเข้มข้นสปอร์เท่ากับ 8×10^5 spores/ml เขี่ยเยื่อหอมวางบนกระจกสไลด์ที่สะอาด โดยให้หงายด้านที่มีแวกซ์ขึ้นด้านบน ซับน้ำส่วนที่เหลือด้วยกระดาษกรอง นำ spore suspension (8×10^5 spores/ml) ปริมาตร 20 µm หยดลงบนเยื่อหอมที่เตรียมไว้ แล้วนำไปลอยบนน้ำกลั่นผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา 500 ppm เปรียบเทียบกับชุดที่ลอยอยู่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหาเปอร์เซ็นต์การงอกของ conidium บนเยื่อหอม โดยนำเยื่อหอมที่หยด spore suspension มาวางบนแผ่นสไลด์ แล้วหยด lactophenol cotton blue ลงไป เพื่อหยุดการงอกและการเจริญของ conidium ปิดทับด้วย cover slips ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกของ conidium และ appressorium โดยสุ่มนับ 100 conidia ต่อซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำต่อไอโซเลท ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ ที่ระยะเวลา 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง โดย conidium ที่นับว่างอกต้องเป็น conidium ที่งอก germ tube ออกมามากกว่าความกว้างของ conidium

1.4 วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งยีนเบต้าทูบูลิน (β-tubulin) โดยสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทั้งสี่ระดับความทนทาน ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® kit จากนั้นตรวจดูปริมาณของ genomic DNA โดยวิธีการ electrophoresis และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน *TUB2* ด้วยปฏิกิริยา nested-PCR โดยรอบแรกใช้ไพรเมอร์ TUB2L (5' GTT TCC AGA TCA CCC ACT CC 3') และไพรเมอร์ TUB2R (5' TGA GCT CAG GAA CAC TGA CG 3') และรอบที่สองใช้ไพรเมอร์ CTB2L (5' TCC AAG ATC CGT GAG G 3') และ CTB2R (5' AAG AAG TGG ACG GG 3') ตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้โดยวิธี gel electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer และย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลท จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากปฏิกิริยารอบที่สอง โคลนเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pGEM®-T easy ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ และนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ชุดปฏิกิริยา QIAprep Spin Miniprep kit และ BigDye® Terminator V 1.1 Cycle Se-quencing Kit วิเคราะห์ด้วยเครื่อง automated fluorescent DNA sequencer นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลของยีนเบต้าทูบูลิน ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLAST โดยเข้าไปที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov พร้อมกับการเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่แปลรหัสด้วย

โปรแกรม BioEdit version 5.0.6. ควบคู่กัน นอกจากนี้นำข้อมูลทั้งสองเปรียบเทียบกับ *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* สายพันธุ์ wild type (accession no. U14138) ตามรายงานของ Buhr and Dickman (1994) ด้วยโปรแกรม ClustalX, version 2.0.10 เพื่อตรวจสอบหาจุดกลายพันธุ์

<u>การทดลองที่ 2</u> : ประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ในการทดสอบคือ น้ำส้มควันไม้ 2 ชนิด ได้แก่ น้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัส และน้ำส้มควันไม้สะเดา โดยผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 4 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 0.5, 1, 1.5 และ 2% (v/v) ตามลำดับ ทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยคัดเลือกเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงในกลุ่มต่างๆ มาทดสอบ ได้แก่ เชื้อสายพันธุ์ปกติ (S53), เชื้อสายพันธุ์ต้านทานสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับปานกลาง (MR63) และเชื้อสายพันธุ์ต้านทานสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR12)

2.1 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย

เลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* จาก stock บนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm เจาะขอบนอกของโคโลนีเชื้อรา ให้มีส่วนการเจริญของเส้นใยที่สม่ำเสมอ (culture disc) วางบนอาหาร PDA ที่ผสมน้ำส้มควันไม้ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราเมื่อชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำค่าเฉลี่ยมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

ตรวจสอบลักษณะเส้นใยของเชื้อรา โดยนำเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ที่ผสมน้ำส้มควันไม้ในระดับความเข้มข้นต่างๆ วางบนสไลด์ที่หยด lactophenol สุ่มเขี่ยเส้นใย โคโลนีละ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ บริเวณรอบโคโลนีจำนวน 4 ตำแหน่ง และตรงกลางโคโลนีอีก 1 ตำแหน่ง จากนั้นปิด cover slip นำไปตรวจดูลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อเปรียบเทียบลักษณะเส้นใยของเชื้อราในชุดทดสอบกับชุดควบคุม โดยทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

2.2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์

ทดสอบการยับยั้งการงอกของโคนิเดียด้วยวิธี slide culture technique โดยเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 10 ml ลงบนผิวหน้าโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 10 วัน จากนั้น ใช้ loop ขูดทั่วผิวหน้าโคโลนีเชื้อรา กรองแยกสารแขวนลอยออกด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนับจำนวนโคนิเดียต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1 ml เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 25×10^4 spores/ml เพาะเลี้ยงโคนิเดียบนอาหารวุ้น (water agar; WA) บนชุด slide culture โดยหยด spore suspension ปริมาตร 1 µl บนชิ้นวุ้น แล้วปิด cover slip โดยทดสอบน้ำส้มควันไม้ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2% ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะของโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อตรวจดูลักษณะโคนิเดียเชื้อรา เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมน้ำส้มควันไม้ และนับจำนวนโคนิเดียที่งอก โดยโคนิเดียที่ถือว่างอกนั้น ต้องเป็นโคโลนีที่งอก germ tube ออกมามากกว่าความกว้างของโคนิเดีย ซึ่งการตรวจดูลักษณะของโคนิเดีย และการตรวจนับการงอกของโคนิเดียนั้นจะสุ่มตรวจ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ บริเวณรอบชิ้นวุ้นจำนวน 4 ตำแหน่ง และตรงกลางชิ้นวุ้นอีก 1 ตำแหน่ง ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

2.3 ประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง

ทำความสะอาดผลมะม่วงที่ปราศจากโรคและแมลง ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70% ethanol ผึ่งไว้ให้แอลกอฮอล์ระเหย ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ในการควบคุมโรค โดยแช่ผลมะม่วงในน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัส 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 1, 2 และ 3% (v/v) เป็นระยะเวลา 1, 3 และ 5 นาที ตามลำดับ โดยชุดควบคุมคือ มะม่วงที่แช่น้ำส้มควันไม้และไม่ปลูกเชื้อ และมะม่วงที่แช่น้ำส้มควันไม้และปลูกเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* สังเกตและบันทึกผลจากลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น