

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ฝรั่งพันธุ์เป็นสีทองจากตลาดค้าส่งสี่มุมเมือง และจากสวนในอำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม
2. ตะกร้าพลาสติก
3. ถังพลาสติกร้อนและเย็น
4. เครื่อง Vortex mixture รุ่น Vortex-Genie 2
5. ถังบรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซออกซิเจน และก๊าซไนโตรเจน
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Water Agar (WA)
8. แอลกอฮอล์ 95 % และ 70 %
9. คลอโรกซ์ (clorox) 1 %
10. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)
11. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี
12. Sodium hydroxide (NaOH) 1 N
13. Tension (Surfactant)
14. อุปกรณ์แยกเชื้อ (เข็มฉีดยา, มีดผ่าตัด, ปากกิบ, ตะเกียงแอลกอฮอล์, ไฟแช็ค)
15. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
16. กระดาษกรอง
17. Gas mixer
18. Gas chromatograph (GC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-8A
19. Compound microscope และ stereo microscope
20. Digital camera ยี่ห้อ Nikon รุ่น E4500 และยี่ห้อ Sony รุ่น Cyber-shot
21. Firmness tester รุ่น Effegi และหัววัดขนาด 0.5 เซนติเมตร
22. Hand refractometer ยี่ห้อ Atago รุ่น ATC-1

วิธีการ

การเตรียมผลฝรั่งสำหรับการทดลอง

นำผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทองจากสวนในอำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม (ภาพผนวกที่ ก1; ก) มาคัดให้มีขนาดสม่ำเสมอ และแยกผลที่มีตำหนิออก จากนั้นตัดขั้วผลด้วยกรรไกรให้ก้านผลยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร (ภาพผนวกที่ ก1; ข และ ก1; ค) ทำความสะอาดผิวผลด้วยการเช็ดด้วยผ้าชุบน้ำสะอาด แล้วล้างผลให้แห้งก่อนนำมาใช้ในการทดลองที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งมีชุดการทดลองละ 4 ซ้ำๆ ละ 4 ผล ส่วนการสำรวจเชื้อราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวใช้ผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทองจากตลาดค้าส่งสี่มุมเมือง ซึ่งทดลองจำนวน 5 ซ้ำๆ ละ 16 ผล

การทดลองที่ 1 การสำรวจเชื้อราสาเหตุโรคในระยะหลังการเก็บเกี่ยวของฝรั่งพันธุ์เป็นสีทอง

สำรวจเชื้อราสาเหตุโรคในระยะหลังการเก็บเกี่ยวของผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทองเพื่อศึกษาเชื้อราสาเหตุที่สำคัญ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำๆ ละ 16 ผล รวมทั้งหมด 80 ผล โดยนำผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทองที่ทำความสะอาดแล้วตามวิธีการเตรียมผลฝรั่งสำหรับการทดลองดังกล่าวมาข้างต้น จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (26-28 °C) จนกระทั่งผลฝรั่งแสดงอาการเน่าของโรค โดยก่อนการแยกเชื้อจะทำความสะอาดผิวผลฝรั่งบริเวณที่แสดงอาการเน่าโดยใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70 % มาเช็ดทำความสะอาดบริเวณดังกล่าวแล้วปล่อยให้แห้งเพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวผล จากนั้นใช้มีดผ่าตัดที่ทนไฟมาเชื้อแล้วตัดเนื้อเยื่อใต้ผิวผลบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อปกติ และเนื้อเยื่อที่แสดงอาการเน่าให้มีขนาดประมาณ 2x3 มิลลิเมตร จากนั้นใช้ปากคีบทนไฟมาเชื้อย้ายเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร WA (Water Agar) แล้วนำไปเก็บไว้ในสภาพที่มีแสงสว่าง ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุแต่ละชนิด เมื่อโคโลนีของเชื้อราโตมีขนาดพอสมควรให้ตัดปลายเส้นใยโคโลนีของเชื้อราซึ่งเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อในแต่ละชิ้นที่เป็นโรคไปเลี้ยงในหลอดอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) เมื่อเส้นใยของเชื้อราที่นำมาเลี้ยงเริ่มเจริญออกมาบนอาหารนาน 1-2 วัน ก็นำไปไว้ภายใต้สภาพที่มีแสง Near Ultraviolet หรือ Black Light (BL) ในช่วงความยาวคลื่น 300-380 นาโนเมตร โดยเปิดให้เชื้อราได้รับแสง BL วันละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลานานประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อให้เชื้อราสร้างสปอร์สำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคระยะหลังการเก็บเกี่ยวต่อไป

วิธีคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เชื้อราที่แยกได้

$$\text{เปอร์เซ็นต์เชื้อราที่แยกได้} = \frac{\text{จำนวนผลที่แยกได้เชื้อราแต่ละชนิดในแต่ละซ้ำของชุดทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนผลที่นำมาแยกเชื้อทั้งหมดในแต่ละซ้ำของชุดทดลอง}}$$

การทดลองที่ 2 การทดสอบสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ต่อการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเข้าทำลายผลฝรั่งพันธุ์แป้นสีทองที่จุ่มสารละลาย CaCl_2 โดยเชื้อรา

Colletotrichum gloeosporioides

2.1 การทดสอบ CaCl_2 ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1.1 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใย

เลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7-10 วัน แล้วเจาะบริเวณส่วนปลายของเส้นใยด้วย cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำอาหาร PDA หลอดที่นี้มาเชื้อแล้วมาผสมกับสารละลาย CaCl_2 ให้มีความเข้มข้น 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 % (w/v) และ non-treated control (ชุดการทดลองควบคุม) โดยใช้เครื่องผสม (vortex mixture) แล้วเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นรอให้อาหารแข็งตัว เมื่อผิวหน้าของอาหารแห้งแล้ว จึงวางชิ้นวุ้นโดยคว่ำด้านที่มีส่วนของเส้นใยของเชื้อราลงบนอาหาร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-28 °C) ซึ่งทำชุดการทดลองละ 4 ซ้ำๆ ละ 10 จานเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีทุกๆ 2 วัน คือในวันที่ 2, 4, 6 และ 8 และนำไปเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม เพื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย} = \frac{(X - Y) \times 100}{X}$$

โดย X คือค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในชุดการทดลองควบคุม

Y คือค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ผสมสารละลาย CaCl_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

2.1.2 การทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์

เตรียม spore suspension ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ให้มีความเข้มข้นประมาณ 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร (นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemocytometer) จากนั้นใช้ micropipette ดูด spore suspension มา 0.1 มิลลิลิตร แล้วหยดลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่ผสมกับสารละลาย CaCl_2 ให้มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 % (w/v) จากนั้นเกลี่ย spore suspension ให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้แท่งแก้วที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-28 °C) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลาย lactophenol cotton blue ลงบนผิวหน้าวุ้น และปิดทับด้วยแผ่นพลาสติกใสที่ใช้ตรวจนับการงอกของสปอร์ (ภาพผนวกที่ ก2) และตรวจดูการงอกของสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกภาพลักษณะการงอกของสปอร์ และนับจำนวนสปอร์ที่งอกในพื้นที่ 0.8 ตารางเซนติเมตร (20 ช่องเล็ก) ซึ่งใช้เครื่องมือช่วยในการตรวจนับดังกล่าว โดยพิจารณาจากความยาวของ germ tube ต้องยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของขนาดความยาวของสปอร์จึงถือว่าสปอร์งอกและนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์} = \frac{(X - Y) \times 100}{X}$$

โดย X คือค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่มีการงอกในชุดการทดลองควบคุม
 Y คือค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่มีการงอกในชุดการทดลองที่ผสมสารละลาย CaCl_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

2.2 การทดสอบ CaCl_2 ต่อการเข้าทำลายผลฝรั่งของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยการปลูกเชื้อ

นำผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทองซึ่งทำความสะอาดแล้วมาทำแผลโดยการกำหนดตำแหน่งก่อน (ภาพผนวกที่ ก1; ง) ซึ่งในการทำแผลบนผลฝรั่งจะทำโดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วนำมากดตรงกลางบริเวณวงกลมที่ทำเครื่องหมายไว้โดยให้มีความลึกจากผิวผลฝรั่งประมาณ 1 มิลลิเมตร แล้วนำผลฝรั่งไปปลูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยนำกระดาษกรองที่ตัดเป็นรูปวงกลมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร และนึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาจุ่มในสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่มีความเข้มข้นประมาณ 2×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร

จากนั้นนำกระดาศกรวดดังกล่าวไปวางตรงบริเวณที่กำหนดไว้ (ภาพผนวกที่ ก1; จ) บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เตรียมสารละลาย CaCl_2 ให้มีความเข้มข้นที่ระดับ 1, 2 และ 4 % (w/v) และจุ่มผลฝรั่งในสารละลาย CaCl_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลานาน 5 นาที (ภาพผนวกที่ ก1; จ) จากนั้นปล่อยให้แห้ง แล้วแบ่งผลฝรั่งที่ทดลองนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 ซ. และที่อุณหภูมิห้อง (26-28 ซ.) ตรวจสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลที่เกิดจากการปลุกเชื้อทุกๆ 2 วัน เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (non-treated control) เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งขนาดของแผลโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งขนาดของแผล} = \frac{(A - B) \times 100}{A}$$

โดย A คือขนาดของแผลในชุดการทดลองควบคุม
B คือขนาดของแผลในชุดการทดลองที่แช่ผลฝรั่งในสารละลาย CaCl_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

2.3 การทดสอบ CaCl_2 ต่อการเกิดโรคลำไส้หลังการเก็บเกี่ยวของผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทอง

นำผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทองที่ทำความสะอาดแล้วซึ่งเตรียมตามวิธีข้างต้นดังที่กล่าวมาแล้วและไม่ได้ปลุกเชื้อมาจุ่มในสารละลาย CaCl_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 1, 2 และ 4 % (w/v) เป็นเวลานาน 5 นาที ปล่อยให้แห้งแล้วแบ่งผลฝรั่งเพื่อนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 ซ. และที่อุณหภูมิห้อง (26-28 ซ.) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.2 ตรวจสอบการเกิดโรคทุกๆ 2 วัน สำหรับผลฝรั่งที่เก็บรักษาอุณหภูมิห้อง และตรวจสอบทุกๆ 4 วัน สำหรับผลฝรั่งที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 ซ. โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากจำนวนผลที่แสดงอาการเน่าและแยกหาเชื้อราสาเหตุโรคชนิดต่างๆ ตามวิธีเดียวกับการทดลองที่ 1

2.4 การทดสอบ CaCl_2 ต่อคุณภาพภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทอง

ตรวจสอบคุณภาพโดยหาความแน่นเนื้อซึ่งใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (ภาพผนวกที่ ก3; ก) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ใช้เครื่องวัด Hand refractometer (ภาพผนวกที่ ก3; ข) ปริมาณกรดโดยการไทเทรตน้ำคั้นฝรั่งด้วย NaOH เข้มข้น 1 N และวัดปริมาณวิตามินซีโดยวิธี 2,6-dichloroindophenol method (ภาพผนวกที่ ก3; ค)

ในการทดลองที่ 2.2, 2.3 และ 2.4 มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Design; CRD) โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้

- เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (26-28 ซ.)

ชุดการทดลองที่ 1	จุ่มผลฝรั่งในสารละลาย CaCl_2 1 %
ชุดการทดลองที่ 2	จุ่มผลฝรั่งในสารละลาย CaCl_2 2 %
ชุดการทดลองที่ 3	จุ่มผลฝรั่งในสารละลาย CaCl_2 4 %
ชุดการทดลองที่ 4	ชุดการทดลองควบคุม (non – treated control)

- เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 ซ.

ชุดการทดลองที่ 1	จุ่มผลฝรั่งในสารละลาย CaCl_2 1 %
ชุดการทดลองที่ 2	จุ่มผลฝรั่งในสารละลาย CaCl_2 2 %
ชุดการทดลองที่ 3	จุ่มผลฝรั่งในสารละลาย CaCl_2 4 %
ชุดการทดลองที่ 4	ชุดการทดลองควบคุม (non – treated control)

การทดลองที่ 3 การทดสอบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ต่อการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเข้าทำลายผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทองที่รมด้วยก๊าซ CO_2 โดยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

การปรับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้มีความเข้มข้นต่างๆ

วิธีการปรับระดับความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้มีระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 % ทำโดยใช้เครื่อง Gas mixer ซึ่งจะต่อท่อเข้ากับถังก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ถังก๊าซออกซิเจน และถังก๊าซไนโตรเจน (ภาพผนวกที่ ก3; ง) ปรับความเข้มข้นของก๊าซและอัตราการไหลของอากาศตามต้องการ ในการผสมก๊าซทำโดยเปิดถังก๊าซทั้ง 3 ถัง แล้วจึงเปิดเครื่อง Gas mixer จากนั้นปล่อยก๊าซที่ผสมแล้วทิ้งไว้สักครู่ แล้วจึงสุ่มเอาตัวอย่างก๊าซไปตรวจสอบความเข้มข้นของก๊าซ CO_2 ที่แน่นอนด้วยเครื่อง GC หรือ Gas chromatograph (ภาพผนวกที่ ก3; จ) อีกครั้ง เมื่อได้ความเข้มข้นที่แน่นอนแล้วจึงนำมาต่อเข้ากับถังรมผลฝรั่งเพื่อรมผลฝรั่งต่อไป

3.1 การทดสอบ CO₂ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใย

นำเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7-10 วัน มาเจาะบริเวณส่วนปลายของเส้นใยด้วย cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร แล้วจึงวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราโดยคว่ำด้านที่มีเส้นใยของเชื้อราลงบนอาหาร PDA จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อที่วางชิ้นวุ้นของเชื้อราแล้วไปรมก๊าซ CO₂ ในระบบปิดซึ่งปรับให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 % โดยใช้เครื่อง Gas mixer โดยใช้เวลารมนาน 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (26-28 ซ.) ทำชุดการทดลองละ 4 ซ้ำๆ ละ 10 จานเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีทุกๆ 2 วัน คือในวันที่ 2, 4, 6 และ 8 และนำไปเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (non-treated control) เพื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย} = \frac{(X - Y) \times 100}{X}$$

โดย X คือค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดการทดลองควบคุม

Y คือค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการรมด้วย CO₂ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

3.1.2 การทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์

ใช้ micropipette คูด spore suspension ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร PDA แล้วเกลี่ย spore suspension ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร โดยใช้แท่งแก้วที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปรมก๊าซ CO₂ ในระบบปิดซึ่งมีความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 % โดยใช้เวลารมนาน 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (26-28 ซ.) เมื่อรมเสร็จแล้วนำมา

ตรวจดูเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์นับจำนวนสปอร์ที่งอกโดยวิธีเดียวกันกับการทดลองที่ 2.1.2 และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์} = \frac{(X - Y) \times 100}{X}$$

โดย X คือค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่มีการงอกในชุดการทดลองควบคุม
Y คือค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่มีการงอกในชุดการทดลองที่ผ่านการรมด้วย CO₂ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

3.2 การทดสอบ CO₂ ต่อการเข้าทำลายผลฝรั่งของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยการปลูกเชื้อ

นำผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทองที่ทำความสะอาดแล้วมากำหนดตำแหน่งที่จะทำแผลก่อนโดยทำเครื่องหมายวงกลมด้วยปากกาเมจิกชนิด permanent จากนั้นทำแผลบนผลฝรั่งโดยใช้เข็มเย็บเชื้อที่ทนไฟฆ่าเชื้อแล้วมา กดลงตรงกลางบริเวณวงกลมที่ทำเครื่องหมายไว้โดยให้ความลึกจากผิวประมาณ 1 มิลลิเมตร แล้วนำไปปลูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยวิธีการเดียวกันกับการทดลองที่ 2.2 บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และนำไปรมก๊าซ CO₂ ที่ปรับให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 % โดยใช้ระบบปิดเป็นเวลานาน 12 และ 24 ชั่วโมง (ภาพผนวกที่ ก4; ก และ ก4; ข) แล้วจึงนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 ซ. และที่อุณหภูมิห้อง (26-28 ซ.) โดยบรรจุในตะกร้าพลาสติก (ภาพผนวกที่ ก4; ค และ ก4; ง) ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลที่เกิดจากการปลูกเชื้อทุกๆ 2 วัน เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (non-treated control) เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งขนาดของแผลโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งขนาดของแผล} = \frac{(A - B) \times 100}{A}$$

โดย A คือขนาดของแผลในชุดการทดลองควบคุม
B คือขนาดของแผลในชุดการทดลองที่รมผลฝรั่งด้วยก๊าซ CO₂ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

3.3 การทดสอบ CO₂ ต่อการเกิดโรคลำไส้หลังการเก็บเกี่ยวของผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทอง

นำผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทองที่ทำความสะอาดแล้วและไม่ได้ปลูกเชื่อมารมด้วยก๊าซ CO₂ ที่ปรับให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 % ในระบบปิดเป็นเวลานาน 12 และ 24 ชั่วโมงโดยใช้วิธีการเดียวกับการทดลองที่ 3.2 แล้วจึงนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 ซ. และที่อุณหภูมิห้อง (26-28 ซ.) เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 2.2 ตรวจสอบการเกิดโรคต่างๆ 2 วัน สำหรับผลฝรั่งที่เก็บรักษาอุณหภูมิห้อง และตรวจสอบผลต่างๆ 4 วัน สำหรับผลฝรั่งที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 ซ. โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากจำนวนผลที่แสดงอาการเน่าและแยกหาเชื้อราสาเหตุโรคชนิดต่างๆ

3.4 การทดสอบ CO₂ ต่อคุณภาพภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทอง

ตรวจสอบคุณภาพโดยหาความแน่นเนื้อ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ปริมาณกรด และปริมาณวิตามินซีเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 2.4

ในการทดลองที่ 3.2, 3.3 และ 3.4 มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Design; CRD) โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้

- เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (26-28 ซ.)

ชุดการทดลองที่ 1	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 5 % นาน 12 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 2	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 10 % นาน 12 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 3	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 15 % นาน 12 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 4	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 20 % นาน 12 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 5	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 5 % นาน 24 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 6	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 10 % นาน 24 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 7	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 15 % นาน 24 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 8	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 20 % นาน 24 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 9	ชุดการทดลองควบคุม (non – treated control)

- เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 ซ.

ชุดการทดลองที่ 1	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 5 % นาน 12 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 2	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 10 % นาน 12 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 3	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 15 % นาน 12 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 4	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 20 % นาน 12 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 5	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 5 % นาน 24 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 6	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 10 % นาน 24 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 7	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 15 % นาน 24 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 8	รมผลฝรั่งด้วย CO ₂ 20 % นาน 24 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 9	ชุดการทดลองควบคุม (non – treated control)

การทดลองที่ 4 การทดสอบสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂) ร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ต่อการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเข้าทำลายผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทองที่จุ่มในสารละลาย CaCl₂ ร่วมกับการรมด้วยก๊าซ CO₂ โดยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

คัดเลือกผลการทดสอบที่ให้ประสิทธิภาพดีจากการทดลองที่ 2 และ 3 มาศึกษาการใช้ร่วมกันระหว่างสารละลาย CaCl₂ และก๊าซ CO₂ โดยทดสอบการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเข้าทำลายผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทองของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

4.1 การทดสอบ CaCl₂ ร่วมกับ CO₂ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1.1 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใย

นำชิ้นวุ้นที่มีส่วนปลายเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7-10 วัน ซึ่งเจาะด้วย cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร มาวางโดยคว่ำด้านที่มีเส้นใยของเชื้อราลงบนอาหาร PDA ที่ผสมกับสารละลาย CaCl₂ ที่ระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกมาจากการทดลองที่ 2 ตามวิธีการที่ 2.1 จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อที่วางชิ้นวุ้นของเชื้อราแล้วไปรมก๊าซ CO₂ ในระบบปิดซึ่งปรับให้มีความเข้มข้นที่คัดเลือกมาจากการทดลองที่ 3 โดยใช้เครื่อง Gas mixer ที่อุณหภูมิห้อง (26-28 ซ.) ทำชุดการทดลองละ 4 ซ้ำๆ ละ 10

plates ตรวจสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีทุกๆ 2 วัน คือในวันที่ 2, 4, 6 และ 8 และนำไปเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (non-treated control) เพื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย} = \frac{(X - Y) \times 100}{X}$$

โดย X คือค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดการทดลองควบคุม
Y คือค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารละลาย CaCl_2 2 % และรมด้วย CO_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

4.1.2 การทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์

ใช้ micropipette ดูด spore suspension ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่ผสมกับสารละลาย CaCl_2 ที่ระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 2 ตามวิธีการที่ 2.2 แล้วเกลี่ย spore suspension ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร โดยใช้แท่งแก้วที่สนไฟมาเช็ดแล้ว จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปรมก๊าซ CO_2 ในระบบปิดซึ่งปรับให้มีความเข้มข้นในระดับที่คัดเลือกมาจากการทดลองที่ 3 เมื่อรมเสร็จแล้วนำมาตรวจดูเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์นับจำนวนสปอร์ที่งอกโดยใช้วิธีเดียวกันกับการทดลองที่ 2.1.2 และนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์} = \frac{(X - Y) \times 100}{X}$$

โดย X คือค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่มีการงอกในชุดการทดลองควบคุม
Y คือค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่มีการงอกในชุดการทดลองที่ผสมสารละลาย CaCl_2 2 % ร่วมกับการรมด้วยก๊าซ CO_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

4.2 การทดสอบสารละลาย CaCl_2 ร่วมกับก๊าซ CO_2 ต่อการเข้าทำลายผลฝรั่งพันธุ์เป็น สีทองของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยการปลูกเชื้อ

ศึกษาทั้งความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโดยการปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. gloeosporioides* บนผลฝรั่งก่อนการดำเนินการตามชุดการทดลองต่างๆ โดยนำผลฝรั่งที่ทำความสะอาดแล้วมาจุ่มในสารละลาย CaCl_2 ในระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกมาจากการทดลองที่ 2 ร่วมกับการรมด้วยก๊าซ CO_2 ในระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกมาจากการทดลองที่ 3 โดยใช้ระบบปิด และศึกษาความสามารถในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโดยการดำเนินการตามชุดการทดลองต่างๆ กับผลฝรั่งก่อนการปลูกเชื้อราสาเหตุ ซึ่งวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Design; CRD) โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้

- การทดสอบการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโดยวิธีปลูกเชื้อก่อนแล้ว
ดำเนินการตามชุดการทดลองต่างๆ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1	จุ่มผลฝรั่งใน CaCl_2 ที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 2
ชุดการทดลองที่ 2	รมผลฝรั่งด้วย CO_2 ที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 3
ชุดการทดลองที่ 3	จุ่มผลฝรั่งใน CaCl_2 ที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 2 และรมด้วย CO_2 ที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 3
ชุดการทดลองที่ 4	ชุดการทดลองควบคุม (non – treated control)
- การทดสอบการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโดยวิธีปลูกเชื้อภายหลังจาก
ดำเนินการตามชุดการทดลองต่างๆ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1	จุ่มผลฝรั่งใน CaCl_2 ที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 2
ชุดการทดลองที่ 2	รมผลฝรั่งด้วย CO_2 ที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 3
ชุดการทดลองที่ 3	จุ่มผลฝรั่งใน CaCl_2 ที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 2 และรมด้วย CO_2 ที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 3
ชุดการทดลองที่ 4	ชุดการทดลองควบคุม (non – treated control)

4.3 การทดสอบสารละลาย CaCl_2 ร่วมกับก๊าซ CO_2 ต่อการเกิดโรคลายหลังการเก็บเกี่ยวของผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทอง

นำผลฝรั่งที่ไม่ได้ปลูกเชื้อซึ่งผ่านการทำความสะอาดแล้วมาจุ่มในสารละลาย CaCl_2 ที่คัดเลือกมาจากการทดลองที่ 2 เป็นเวลานาน 5 นาที ร่วมกับการรมด้วยก๊าซ CO_2 ที่คัดเลือกมาจากการทดลองที่ 3 แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (26-28 ซ.) เป็นเวลา 8 วัน ตรวจผลทุกๆ 2 วัน โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากจำนวนผลที่แสดงอาการเน่าและนำมาแยกหาเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราสาเหตุโรคนิคมต่าง ๆ

4.4 การทดสอบสารละลาย CaCl_2 ร่วมกับก๊าซ CO_2 ต่อคุณภาพภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลฝรั่งพันธุ์เป็นสีทอง

ตรวจสอบคุณภาพทุกๆ 2 วัน โดยหาความแน่นเนื้อ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ปริมาณกรด และปริมาณวิตามินซีเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.4 ในการทดลองที่ 4.3 และ 4.4 มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Design; CRD) เช่นเดียวกัน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistical Analysis System (SAS) โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และ 99 %

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร
2. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง งานวิจัยพืชผลหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาทำการทดลอง

ระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2547 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2549