บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 ลักษณะอาการของโรคใบจุดและโรคใบไหม้และการแยกเชื้อราสาเหตุ

ทำการเก็บตัวอย่างใบสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการใบจุดและอาการใบไหม้ จากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย มาศึกษาและบันทึกลักษณะอาการของโรคทำการตรวจหาเชื้อสาเหตุด้วยวิธี Free Hand Section โดยการใช้ใบมีดโกนที่คมและสะอาดตัดบริเวณที่เป็นแผลตามขวางแล้วทำการ mount slide ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นปิดด้วย cover glass แล้วนำไปตรวจหาเชื้อสาเหตุ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า จากนั้นจึงทำการแยกเชื้อ (isolation) โดยตัดแผลบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อที่เป็นโรคและเนื้อเยื่อปกติ ให้มีขนาดประมาณ 3 x 3 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อแล้วย้ายชิ้นพืชไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ยกลางวันประมาณ 30^{o}C กลางคืน 25 ^{o}C) หลังจากที่เส้นใยของเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นพืชแล้ว จึงทำการแยกเชื้อราบริสุทธิ์โดยวิธี Hyphal Tip Isolation จากนั้นตรวจดูลักษณะรูปร่างของโคโลนี และสปอร์ของเชื้อทั้ง 2 ชนิด และนำสปอร์มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test) เก็บเชื้อราบนอาหาร PDA slant เพื่อเป็น stock culture ไว้ใช้สำหรับการศึกษาต่อไป

3.2 การแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากดิน และใบสตรอเบอรี่

3.2.1 การแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากดิน

นำเชื้อราปฏิปักษ์จาก stock culture บนอาหาร PDA slant ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณแปลงปลูกสตรอเบอรี่ของเกษตรกรในอำเภอสะเมิง และอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 38 ไอโซเลท ที่ได้ทำการทดสอบ ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 8 ชนิดคือ เชื้อรา *Rhizoctonia* sp. , *Fusarium* sp. , *Colletotrichum* sp. , *Phomopsis obscurans* , *Phaeoisariopsis griseola* , *Septoria* sp. , *Alternaria solani* และ *A. brassicicola* ได้เชื้อรา Trichoderma ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 8 ชนิดได้ดี 3 ชนิด (species) ด้วยกันคือ *Trichoderma viride* (CMU2000-9), *T. harzianum* (CMU2000-14) และ *T. hamatum* (CMU2000-16) (ยอดชาย, 2543) มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ด้วยวิธี CDT (Culture Disc Technique) จนกระทั่งเชื้อรามีอายุ 7 วัน จึงนำไปใช้ทดลองต่อไป

3.2.2 การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากใบสตรอเบอรี่

นำใบสตรอเบอรี่บริเวณแปลงปลูกของเกษตรกร จากอำเภอสะเมิง และอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนผิวใบของสตรอเบอรี่ (epiphytic bacteria) โดยวิธี Dilution Plate บนอาหาร NA โดยนำน้ำปลอดเชื้อที่ล้างใบสตรอเบอรี่มาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} จนถึง 10^{-7} ในการทดสอบเบื้องต้นคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้น 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7} ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยจะปรากฏโคโลนีของแบคทีเรียในระยะห่างพอดีสำหรับนำไปใช้แยกโคโลนีเดี่ยว (single colony) จากนั้นใช้ micropipette ดูดเซลล์แบคทีเรียแขวนลอย แต่ละความเข้มข้น ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ผสมในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ความเข้มข้นละ 5 จาน นำจานอาหารไปบ่มเชื้อ (incubate) ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 – 3 วัน หลังจากนั้นทำการแยกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย จากโคโลนีที่มีลักษณะต่างกันแล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร NA จากนั้นจึงนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากไอโซเลทต่าง ๆ มาเก็บบนอาหาร NA slant เก็บไว้เพื่อใช้เป็น stock culture ในตู้ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 4 – 7° C ไว้ศึกษาต่อไป

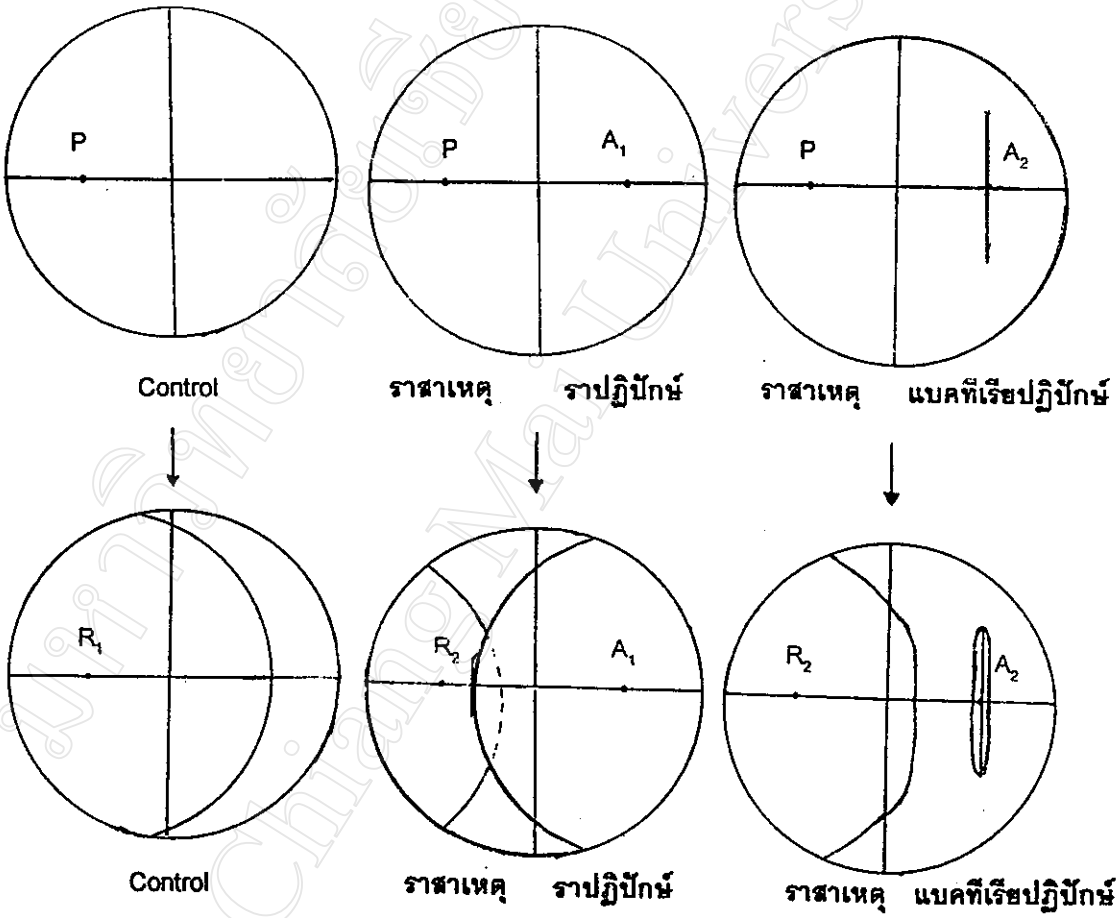
3.3 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดตานกและโรคใบไหม้โฟมอพซิสของสตรอเบอรี่

นำเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดตานก คือ *Ramularia tulasnei* ที่เจริญบน PDA อายุ 14 วัน และเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้โฟมอพซิสคือ *Phomopsis obscurans* ที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน มาทดสอบโดยการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะบริเวณรอบนอกของโคโลนีของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ออกเป็นชิ้นเชื้อกลม ๆ (culture disc) จากนั้นใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นเชื้อราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิด และชิ้นเชื้อราปฏิปักษ์ Trichoderma ทั้ง 3 ชนิด (species) มาวางบนจานอาหารให้ห่างจากชิ้นของเชื้อสาเหตุที่ทดสอบประมาณ 4 เซนติเมตร ตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลาง สำหรับแบคทีเรียปฏิปักษ์ทำโดยการใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด มาเลี้ยงบนจานอาหารโดยลากเป็นเส้นตรงยาวประมาณ 3 เซนติเมตรในแนวตั้งฉากกับเส้นผ่าศูนย์กลางเส้นหนึ่งและขนานกับเส้นผ่าศูนย์กลางอีกเส้นหนึ่ง และห่างจากเชื้อราสาเหตุประมาณ 4 มิลลิเมตร ตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลางซึ่งเป็นวิธีที่เรียกว่า Dual Culture Technique หรือ Biculture Technique (ภาพที่ 1) ในแต่ละกรรมวิธี (treatment) ทำ 5 ซ้ำ (replication) จากนั้นนำจานอาหารดังกล่าวไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัดการเจริญของเชื้อรา 7 วันหลังการปลูกเชื้อและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรดังนี้ (เกษม, 2532 ก.)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

โดย R1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในชุดควบคุม

R2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม



P = เชื้อราสาเหตุ

A = เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (รา/แบคทีเรีย)

R_1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม

R_2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

ภาพที่ 1 การวางเชื้อราทดสอบโดยวิธี Dual Culture Technique หรือ Biculture Technique

3.4 การศึกษาการเป็นปรสิตของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช

การทำ Dual Slide Culture นำจานแก้วที่รองด้วยกระดาษกรองและมียางวงเล็กวางอยู่ใต้แผ่นสไลด์แก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำจานอาหาร PDA มาตัด PDA ออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ สี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 5 x 5 มิลลิเมตร ย้ายชิ้น PDA วางตรงกลางแผ่นสไลด์ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดตานกหรือโรคใบไหม้โฟมอพซิส ทีละชนิดไปแตะตรงด้านข้างของชิ้น PDA ด้านหนึ่ง และย้ายเชื้อราปฏิปักษ์ไปแตะตรงด้านตรงข้ามกับเชื้อราสาเหตุ ปิดด้วย cover glass ให้ความชื้นภายในจานทดลองโดยการเติมน้ำกรองปลอดเชื้อลงไปที่กระดาษกรอง ทั้งหมดทำในสภาวะปลอดเชื้อ ตรวจสอบภายหลังการปลูกเชื้อ 2 วัน

การทำ Dual Vernal Slide Culture นำชุดสไลด์ ซึ่งเตรียมด้วยวิธีเดียวกันกับการทำ Dual Slide Culture นำอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ในหลอดแก้ว เทลงบนแผ่นสไลด์ประมาณ 10 มิลลิลิตรให้อาหาร PDA ไหลไปตามแผ่นสไลด์ให้มีความยาวประมาณ 3 เซนติเมตร และปล่อยให้อาหารแห้ง ใช้มีดโกนลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดเซาะให้เป็นร่องตรงกลางกว้างประมาณ 2 มิลลิเมตร เขี่ยเอาวุ้นบริเวณที่ตัดตรงกลางออกไป เหลือ PDA ที่เคลือบแผ่นสไลด์เป็น 2 ส่วน ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดตานกและโรคใบไหม้โฟมอพซิสของสตรอเบอรี่ ไปแตะตรงด้านข้างของร่องด้านหนึ่ง และย้ายเชื้อราปฏิปักษ์ไปแตะตรงขอบร่องด้านข้างของฝั่งตรงข้ามกับเชื้อราสาเหตุ ปิดด้วย cover glass ให้ความชื้นโดยการเติมน้ำกรองปลอดเชื้อลงไปที่กระดาษกรอง ทั้งหมดทำในสภาวะปลอดเชื้อ ตรวจสอบผลภายหลังจากการปลูกเชื้อ 2 – 3 วัน

3.5 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดตานกและโรคใบไหม้โฟมอพซิสของสตรอเบอรี่ในสภาพเรือนทดลอง

การเตรียมวัสดุปลูกและการปลูกกล้าสตรอเบอรี่

นำวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของ ดิน แกลบ ปุ๋ยหมัก ในอัตรา 5 : 1 : 1 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงบรรจุลงในกระถางที่สะอาด ขนาด 6 x 8 นิ้ว จำนวน 150 กระถางโดยใส่ดินประมาณ ¾ ของกระถาง

นำไหลสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทาน 70 สำหรับทดสอบโรคใบไหม้โฟมอพซิสและพันธุ์ Nyoho สำหรับทดสอบโรคใบจุดตานก จากโครงการหลวงอินทนนท์ ลงปลูกในกระถางที่เตรียมไว้

การดูแลรักษา

หลังปลูกทำการให้น้ำแก่ต้นสตรอเบอรี่ทุกวัน ๆ ละ 1 ครั้ง โดยให้ในปริมาณที่สม่ำเสมอ มีการใส่ปุ๋ยสูตร 16 – 16 – 16 กระถางละประมาณ 1 ช้อนชาหลังย้ายปลูก 1 สัปดาห์ และใส่ปุ๋ยอีกครั้งหลังจากปลูกได้ 4 สัปดาห์ มีการฉีดพ่นสารฆ่าแมลงเป็นบางครั้ง เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของหนอนชอนใบ เพลี้ยอ่อน และเพลี้ยไฟ สารฆ่าแมลงที่ใช้คือ แลนเนท (methomyl) ความเข้มข้น 1.5 กรัม / น้ำ 1 ลิตร และสารสกัดจากสะเดา ความเข้มข้น 0.5 มล. / น้ำ 1 ลิตร พ่นสลับกัน เมื่อพบการระบาด

การเตรียม inoculum ของเชื้อราสาเหตุ

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุ นำเชื้อราสาเหตุจาก stock culture มาเลี้ยงบน PDA แล้วเตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ดังนี้

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Ramularia tulasnei* ทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA โดยวิธี Spread Plate Technique ที่อุณหภูมิ 18^0 c + 2^0 c ในสภาพที่มืดเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเติมน้ำกรองที่สะอาด ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ขูดผิวหน้าของอาหารที่เชื้อราเจริญอยู่เบา ๆ แล้วนำสปอร์แขวนลอยจากทุกจานมาเทรวมกันในบีกเกอร์ แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น เพื่อแยกเส้นใยออก จากนั้นจึงนำมานับปริมาณและปรับความเข้มข้นของ inoculum ให้ได้ประมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตรด้วย Haemacytometer

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Phomopsis obscurans* ทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน จากนั้นจึงใช้สไลด์แก้วปลอดเชื้อขูดผิวหน้าของอาหารที่มี pycnidia อยู่ แล้วใส่ลงในโกร่งบดยาที่สะอาดใช้ที่บดของโกร่งบด pycnidia เบา ๆ เพื่อให้ pycnidia แตกออก และ conidia ทะลักออกมา จากนั้นจึงเตรียมสปอร์แขวนลอยตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร

การเตรียมจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

การเตรียมเชื้อราปฏิปักษ์ นำเชื้อราปฏิปักษ์จาก stock culture คือ *Trichoderma viride* (ไอโซเลท CMU 2000-9), *T.harzianum* (ไอโซเลท CMU 2000-14) และ *T. hamatum* (ไอโซเลท CMU 2000-16) มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเทน้ำกรองที่สะอาดลงบนอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ขูดผิวหน้าของอาหารเบาๆ เพื่อให้สปอร์หลุดออกแล้วนำสปอร์แขวนลอยที่ได้จากทุกจานมาเทรวมกันในบีกเกอร์

ที่สะอาด นำสปอร์แขวนลอยมากรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยของรา Trichoderma แต่ละชนิดมาวัดและปรับให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก stock culture มาเลี้ยงในอาหาร NB (Nutrient Broth) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยให้มีความเข้มข้นที่ 10^8 แล้วนำไปเทียบกับความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียด้วย Optical Density (OD) เทียบค่าได้เท่ากับ 10^8 cfu/ml.

การเตรียมชีวภัณฑ์ชื่อการค้า Larminar

นำสารชีวภัณฑ์ที่มีชื่อการค้าว่า Larminar (*Bacillus subtilis*) จากบริษัทแอพพลายเด็ม ประเทศไทย (จำกัด) มาเตรียมสารแขวนลอยโดยใช้อัตรากลางที่ระบุไว้บนฉลาก อัตราที่บริษัทแนะนำคือ 30-50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราที่ใช้คือ 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

การเตรียมสารกำจัดเชื้อราชื่อการค้า Antracol

นำสารกำจัดเชื้อราชื่อการค้า Antracol (propineb) จากบริษัทไบเออร์ ประเทศไทย (จำกัด) มาเตรียมเป็นสารละลายแขวนลอยโดยใช้อัตรากลางที่ระบุไว้บนฉลาก อัตราที่บริษัทแนะนำคือ 30-40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราที่ใช้คือ 35 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร

ก่อนการนำไปฉีดพ่น เติมสารจับใบ (APSA 80 ของบริษัท แอมเวย์ ประเทศไทย จำกัด) ในอัตราความเข้มข้น 0.2 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร

การทดลองที่ 1 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดตานก

ทำการฉีดพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์, ชีวภัณฑ์ และสารเคมีที่ได้เตรียมไว้ดังอธิบายแล้วลงบนต้นกล้าสตรอเบอรี่พันธุ์ Nyoho โดยใช้เครื่องพ่นขนาดเล็กยี่ห้อ Foggy ขนาดจุ 1 ลิตร โดยใช้ 160 มิลลิลิตรต่อกรรมวิธี (20 มิลลิลิตร / ต้น) ด้วยน้ำหนักกดที่สม่ำเสมอ เพื่อให้ได้ปริมาณของ สปอร์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีที่ตกลงบนผิวพืชมีปริมาณที่เท่ากัน หลังจากปลูกเชื้อราปฏิปักษ์ได้ 1 วัน จึงทำการปลูกเชื้อราสาเหตุที่ความเข้มข้นของ inoculum คือ 3.15×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงบนต้นสตรอเบอรี่ การฉีดพ่นราปฏิปักษ์และราสาเหตุพยายามให้ทั่วถึงโดยฉีดทั้งทางด้านบนและด้านข้างของต้นสตรอเบอรี่อย่างสม่ำเสมอโดยให้หัวฉีดห่างจากต้นประมาณ 1 ฟุต ปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเกิดโรค โดยพยายามรักษาความชื้นให้พอเหมาะโดยการพ่นฝอยน้ำเช้าเย็น และทำการฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของ

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ชีวภัณฑ์และสารเคมี หลังการปลูกเชื้อทุก 5 วัน รวม 4 ครั้ง วางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 2 ต้น ต่อกรรมวิธีประกอบด้วยหน่วยทดลองดังนี้

กรรมวิธี

1. ชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อ (Control)
2. ปลูกเชื้อสาเหตุอย่างเดียว
3. ปลูกเชื้อสาเหตุและฉีดพ่นราปฏิปักษ์ *Trichoderma viride* (ไอโซเลท CMU 2000-9)
4. ปลูกเชื้อสาเหตุและฉีดพ่นราปฏิปักษ์ *T.harzianum* (ไอโซเลท CMU 2000-14)
5. ปลูกเชื้อสาเหตุและฉีดพ่นราปฏิปักษ์ *T.hamatum* (ไอโซเลท CMU 2000-16)
6. ปลูกเชื้อสาเหตุและฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ CMUb 2000 – 1
7. ปลูกเชื้อสาเหตุและฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ CMUb 2000 – 6
8. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นชีวภัณฑ์ Larminar (*Bacillus subtilis*)
9. ปลูกเชื้อสาเหตุและฉีดพ่นสารกำจัดเชื้อรา Antracol (propineb)

การทดลองที่ 2 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบไหม้โฟมอพซิส

ทำการฉีดพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์, ชีวภัณฑ์ และสารเคมีลงบนต้นกล้าสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทาน 70 ก่อนทำการปลูกเชื้อสาเหตุ 1 วัน จากนั้นปลูกเชื้อราสาเหตุ *Phomopsis obscurans* ที่ความเข้มข้นของ inoculum คือ 2.87×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และครอบด้วยพลาสติกใสขนาดกว้าง 1.5 เมตร ยาว 2 เมตร สูง 1 เมตร เพื่อรักษาความชื้น (ภาพที่ 2) ทิ้งไว้ 5 วันแล้วจึงเปิดพลาสติกออก ต่อมาทำการฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชีวภัณฑ์ และสารเคมีหลังการปลูกเชื้อทุก 5 วันจำนวน 4 ครั้ง โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 2 ต้นต่อกรรมวิธี ประกอบด้วยหน่วยทดลองคือ

กรรมวิธี

1. ชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อ (Control)
2. ปลูกเชื้อสาเหตุอย่างเดียว
3. ปลูกเชื้อสาเหตุและฉีดพ่นราปฏิปักษ์ *Trichoderma viride* (ไอโซเลท CMU 2000-9)
4. ปลูกเชื้อสาเหตุและฉีดพ่นราปฏิปักษ์ *T.harzianum* (ไอโซเลท CMU 2000-14)

5. ปลูกเชื้อสาเหตุและฉีดพ่นราปฏิปักษ์ *T.hamatum* (ไอโซเลท CMU 2000-16)
6. ปลูกเชื้อสาเหตุและฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ CMUb 2000 – 1
7. ปลูกเชื้อสาเหตุและฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ CMUb 2000 – 6
8. ปลูกเชื้อสาเหตุและฉีดพ่นชีวภัณฑ์ Larminar (*Bacillus subtilis*)
9. ปลูกเชื้อสาเหตุและฉีดพ่นสาร Antracol (propineb)

สถานที่ทำการทดลอง

เรือนทดลองภาควิชาโรคพืชคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.6 การทดสอบในแปลงปลูก

ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบไหม้โฟมอพซิสในสภาพแปลงปลูก

การเตรียมแปลงปลูกและการปลูกกล้าสตรอเบอรี่

เตรียมแปลง ขนาด กว้าง x ยาว x สูง 0.5 x 4 x 0.3 เมตรจำนวน 14 แปลงโดยมีระยะห่างระหว่างแปลง 50 เซนติเมตร จากนั้นขุดดินตากแดดเป็นเวลา 7 วัน และวัด pH ดินได้ 6.50 การเตรียมแปลงทำการผสมปุ๋ยหมักในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อตารางเมตร และปุ๋ยเคมีสูตร 16 – 16 – 16 อัตรา 50 กรัมต่อตารางเมตร ผสมคลุกเคล้ากับดินให้ทั่ว จากนั้นคลุมแปลงด้วยใบตองตึง เจาะหลุมปลูกให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร จำนวน 30 หลุมต่อแปลง โดยมีระยะห่างระหว่างหลุม 30 x 30 เซนติเมตร

การเตรียมกล้าสตรอเบอรี่

ใช้กล้าสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทาน 70 ซึ่งผ่านการปลูกเนื้อเยื่อภายใต้สภาพปลอดเชื้อแล้วนำไปชำในถุง จนมีอายุ 30 วัน นำมาล้างราก และปลูกในหลุมที่เตรียมไว้ (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 2 ต้นสตรอเบอรี่หลังการปลูกเชื้อสาเหตุแล้วคลุมด้วยพลาสติกใสเพื่อรักษาความชื้น

ภาพที่ 3 แปลงปลูกสตรอเบอรี่ บริเวณศูนย์พัฒนาโครงการหลวงอินทนนท์ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

การฉีดพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในแปลงปลูก

ทำการฉีดพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสภาพแปลงเมื่อสตรอเบอรี่มีอายุได้ 1 เดือน ทำการฉีดพ่นทุกสัปดาห์ จำนวน 8 ครั้ง โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น ต่อกรรมวิธีประกอบด้วยหน่วยทดลองดังนี้

กรรมวิธี

1. ชุดควบคุม (control) พ่นด้วยน้ำกรอง
2. พ่นราปฏิปักษ์ *Trichoderma viride* (ไอโซเลท CMU 2000-9)
3. พ่นราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (ไอโซเลท CMU 2000-14)
4. พ่นราปฏิปักษ์ *T. hamatum* (ไอโซเลท CMU 2000-16)
5. พ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ CMUb2000 –1
6. พ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ CMUb2000 –6
7. พ่นชีวภัณฑ์ Larminar (*Bacillus subtilis*)

สถานที่ทำการทดลอง

ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น และการประเมินความเสียหายที่เกิดจากโรค โดยแบ่งออกเป็น

การหาปริมาณของโรค (disease intensity) โดยการนับจำนวนใบที่เป็นโรคต่อต้น- แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค จากจำนวนทั้งหมดในแต่ละกรรมวิธี

การประเมินผล

ประเมินพื้นที่ใบที่เป็นโรคต่อต้น ในแต่ละการทดลอง โดยแบ่งปริมาณของโรคเป็น 11 ระดับ คือ 0 – 10 โดยที่ 0 = ใบไม่มีอาการของโรค และ 10 = พื้นที่ใบที่เป็นโรค 100% รวมถึงอาการใบร่วงที่เกิดจากโรคด้วย นำค่าที่ได้จากการประมาณของโรคมาแปลงเป็นค่าความเสียหายของพืช (crop loss) การประเมินความเสียหาย กระทำโดยการนำผลที่ได้จากการหาปริมาณของโรคมาคำนวณเปอร์เซ็นการถูกทำลาย หรือดัชนีการเข้าทำลายโดยมีสูตร (สืบศักดิ์, 2540)

$$\% \text{ ดัชนีการเข้าทำลาย} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่มวัด}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของระดับความรุนแรง}}$$