บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. การตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และจากดินในแปลงปลูกกระเจี๊ยบเขียว

1.1 การตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

โดยนำเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียว 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ 695 และ สายพันธุ์ 9701 สุ่มเมล็ดกระเจี๊ยบเขียวแต่ละสายพันธุ์ๆ ละ 400 เมล็ด ตรวจหาเชื้อราบนเมล็ดโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter Method) และวิธีเพาะบนอาหาร PDA (Agar Method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1999)

สุ่มตัวอย่างเมล็ดกระเจี๊ยบเขียวในแต่ละสายพันธุ์มาจำนวนหนึ่งแล้วแบ่งออกเป็นสองชุด ชุดที่หนึ่งนำไปเพาะบนกระดาษชื้น วางในจานแก้ว (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ซึ่งภายในประกอบด้วยกระดาษฟาง 3 แผ่น และกระดาษกรอง Whatman No. 1 จำนวน 1 แผ่น ที่ชุบน้ำจนชุ่ม วางเมล็ดกระเจี๊ยบเขียวจานละ 10 เมล็ด ในการทดลองนี้กระเจี๊ยบเขียวแต่ละพันธุ์ทำการทดลอง 4 ซ้ำ (replication) ซ้ำละ 100 เมล็ดจากนั้นนำไปบ่มเพาะ (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ยกลางวัน 30 องศาเซลเซียส กลางคืนประมาณ 25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดมาตรวจหาชนิดและความถี่ของเชื้อราที่เกิดขึ้นบนเมล็ดภายใต้กล้อง stereo microscope เชื้อรา *F. oxysporum* ที่พบบนเมล็ด ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เลี้ยงบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) และเก็บเป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

เมล็ดชุดที่สองนำไปฆ่าเชื้อที่ผิวก่อนด้วยสารละลาย Sodium hypochlorite 1 % นาน 2 นาที แล้ว ล้างน้ำฆ่าเชื้อ ซับให้แห้งบนกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำไปเพาะบนอาหาร PDA โดยนำเมล็ดกระเจี๊ยบเขียวแต่ละสายพันธุ์ วางลงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ จานละ 10 เมล็ด ในแต่ละพันธุ์ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด จากนั้นนำไปบ่มเพาะ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้ว ทำการบันทึกข้อมูลเช่นเดียวกับวิธีเพาะบนกระดาษชื้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 การตรวจหาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่ติดมากับดินในแปลงปลูกกระเจี๊ยบเขียว

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกกระเจี๊ยบเขียวที่สาขาพืชผัก ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยเก็บจากบริเวณรอบรากต้นกระเจี๊ยบเขียวที่ความลึกจากผิวหน้าดิน 15-50 เซนติเมตร จำนวน 3 จุด จุดละประมาณ 200 กรัม นำดินที่เก็บมาได้ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Soil Dilution Plate บนอาหาร PDA ที่เติม Rose Bengal โดยชั่งดิน 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าดินให้เข้ากับน้ำนาน 15 นาที แล้วทำให้เจือจางความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-4} แล้วนำเฉพาะความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-4} มาแยกโดยใช้ปิเปตดูดสารละลายดินแขวนลอย (soil suspension) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารที่เตรียมไว้แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อพบการเจริญของเชื้อลักษณะโคโลนีเดี่ยวๆ จึงย้ายเชื้อจากแต่ละโคโลนีไปเลี้ยงและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Hyphal Tip เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การศึกษาลักษณะและการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*

นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการทดลองที่ 1 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาของเชื้อรา *F. oxysporum* แต่ละไอโซเลท (Isolate) โดยเตรียม inoculum ของเชื้อรา *F. oxysporum* แต่ละไอโซเลท บนอาหาร PDA อายุ 3 วัน แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะรอบๆ โคโลนี จากนั้นย้ายชิ้น inoculum ไปวางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9เซนติเมตร) ที่บรรจุอาหาร PDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จานละ 1 ชิ้น วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 จานต่อเชื้อราแต่ละชนิด นำจานอาหารทั้งหมดไป incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา รวมทั้งการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีทุกวัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ต่อความงอก การเกิดโรคและความแข็งแรงของต้นกล้ากระเจี๊ยบเขียวโดยวิธีต่างๆ

ทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคโดยวิธีต่อไปนี้

3.1 การปลูกเชื้อบนเมล็ด (Seed Inoculation)

นำเมล็ดกระเจี๊ยบเขียวมาแช่ในสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร การเตรียม inoculum ทำได้โดยเตรียม spore suspension จากเชื้อรา *F. oxysporum* แต่ละไอโซเลท จากการทดลองที่ 1 ที่เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 10 มิลลิลิตร ขูดผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล (L) กรอง suspension ด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของ inoculum โดย hemacytometer ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ หลังจากนั้นจึงนำเมล็ดกระเจี๊ยบเขียวสายพันธุ์ 9701 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ตรวจพบปริมาณเชื้อรา *F. oxysporum* มากที่สุด มาฆ่าเชื้อที่ผิว ปล่อยให้แห้งแล้วจึงนำไปแช่ใน spore suspension ที่เตรียมไว้ โดยใช้เมล็ดกระเจี๊ยบเขียว 400 เมล็ด ต่อเชื้อรา *F. oxysporum* แต่ละไอโซเลท ส่วนชุดควบคุมแช่เมล็ดในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยแช่เมล็ดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเมล็ดมาซับด้วยกระดาษกรองที่สะอาดผึ่งให้แห้งนาน 24 ชั่วโมง นำเมล็ดไปเพาะในตะกร้าพลาสติกที่บรรจุดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว รดน้ำให้ชุ่ม ตามกรรมวิธีต่างๆดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม หรือ control (ไม่ปลูกเชื้อ)
กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อ *F. oxysporum* ไอโซเลท 1 (แยกได้จากเมล็ด)
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อ *F. oxysporum* ไอโซเลท 2 (แยกได้จากดิน)

หลังจากนั้นทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดและลักษณะอาการต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้า เมื่ออายุได้ 7 และ 14 วัน บันทึกอาการเปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดควบคุม

3.2 การปลูกเชื้อในดิน (Soil Inoculation)

ทำการเตรียม inoculum เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1 โดยราดสปอร์แขวนลอย เชื้อรา *F. oxysporum* แต่ละไอโซเลท ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^6 มิลลิลิตร/สปอร์ ในตะกร้าพลาสติกที่มีดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จึงนำเมล็ดกระเจี๊ยบเขียวไปเพาะตามกรรมวิธีต่างๆ หลังจากนั้นทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดและลักษณะอาการ ดังที่อธิบายไว้ในข้อที่ 3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การปลูกเชื้อที่ราก (Root Inoculation)

ทำการเตรียม inoculum เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1 แต่ทำการเพาะเมล็ดกระเจี๊ยบเขียวในกระบะเพาะที่มีดินฆ่าเชื้อแล้ว นำมาทดสอบโดยวิธี root-dipped ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Robert (1998) นำต้นกล้ากระเจี๊ยบเขียวที่เพาะไว้ที่มีอายุได้ 7 วัน จำนวน 100 ต้น ล้างรากให้สะอาดแล้วจุ่มรากไว้ใน spore suspension ที่เตรียมไว้แล้ว 3 ชั่วโมง แล้วนำไปปลูกในกระถางที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว กระถางละ 10 ต้น จำนวน 10 กระถาง โดยใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว พร้อมทั้งชุดควบคุมที่แช่ในน้ำกลั่นแทน spore suspension สังเกตการเกิดอาการ บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกและลักษณะอาการต่างๆ ดังที่อธิบายไว้ในข้อที่ 3.1 แล้วประเมินการเกิดโรคโดยให้ระดับต่างๆ ที่อายุ 7 และ 14 วัน ตามวิธีการของสืบศักดิ์ (2540) คือ

ระดับที่ 0 = ไม่แสดงอาการของโรค
ระดับที่ 1 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 1 ใบ
ระดับที่ 2 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 2-3 ใบ
ระดับที่ 3 = ทุกใบแสดงอาการเหี่ยว
ระดับที่ 4 = พืชเหี่ยวแห้ง ตายทั้งต้น

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่ม}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของการเป็นโรค}}$$

4. การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *Gliocladium virens* ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum*

4.1 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* บนอาหาร PDA โดยวิธี Dual Culture

นำเชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลท ที่สามารถทำให้เกิดโรครุนแรงจากการทดลองที่ 2 มาทำการศึกษาการยับยั้งการเจริญกับเชื้อราปฏิปักษ์ที่ได้จากฝ่ายอารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง 4 ชนิด ดังนี้ *Trichoderma hamatum, Trichoderma harzianum, Trichoderma viride* และ *Gliocladium virens* โดยวิธี Dual Culture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อรา *F. oxysporum* และเชื้อราปฏิปักษ์บนอาหาร PDA จนเชื้อราเจริญเต็มจานอาหาร ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราทั้งสอง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อรา *F. oxysporum* มาทดสอบกับเชื้อราปฏิปักษ์ โดยนำเชื้อทั้งสองมาวางบนอาหาร PDA ซึ่งจะวางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้านละ 2 เซนติเมตร (ภาพที่ 2) ในแต่ละกรรมวิธีทำ 10 ซ้ำ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิห้อง บันทึกการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* โดยวัดรัศมีของโคโลนีของ *F. oxysporum* ในด้านที่เจริญเข้าหาเชื้อปฏิปักษ์ หลังจากนั้นนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{Percent inhibition} = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100$$

โดย R_1 = รัศมีโคโลนีของเชื้อรา *F. oxysporum* ชุดควบคุม

R_2 = รัศมีโคโลนีของเชื้อรา *F. oxysporum* ที่เจริญร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์

โดยประมาณค่าดังนี้ (เกษม, 2532)

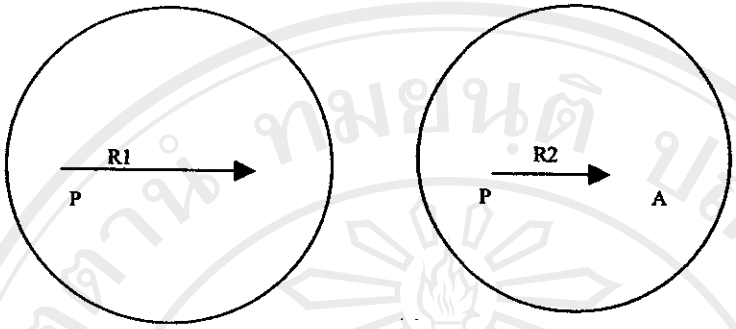
> 75 % = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (very high antagonistic activity)

61- 75 % = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง (high antagonistic activity)

51-60 % = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (moderate antagonistic activity)

< 50 % = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ (low antagonistic activity)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



จานควบคุม จานทดสอบ

P = Pathogen (*Fusarium oxysporum*)

A = Antagonistic fungi

R1 = รัศมีโคโลนีของเชื้อรา *F. oxysporum* ชุดควบคุม

R2 = รัศมีโคโลนีของเชื้อรา *F. oxysporum* ที่เจริญร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์

ภาพที่ 2 การวางเชื้อราทดลองโดยวิธี Dual Culture

4.2 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* โดยวิธี Slide Culture

ทำ Slide Culture โดยวิธี Dual Slide Culture โดยนำจานอาหารที่อบฆ่าเชื้อรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 และวางยางรัดบนกระดาษกรองและวางแผ่นสไลด์สะอาดบนยางรัด นำชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 5 x 5 มิลลิลิตร วางกลางแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ ใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อรา *F. oxysporum* แตะที่ขอบข้างชิ้นวุ้นอาหาร PDA แล้วใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อราปฏิปักษ์ที่ขอบด้านข้างของชิ้นวุ้น ในด้านข้างที่แตะเชื้อรา *F. oxysporum* ไว้ แล้วปิดด้วย cover glass ให้ความชื้นแก่จานอาหารด้วยการหยดน้ำฆ่าเชื้อให้กระดาษกรองชื้นและปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อรักษาความชื้น เมื่อเชื้อราปฏิปักษ์เจริญคลุมเชื้อรา *F. oxysporum* นำมาศึกษาดูลักษณะการเข้าทำลายโดยนำมาศึกษาและตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การศึกษาประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์ (Bioproduct) และสารกำจัดเชื้อรา (Fungicide) ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum*

5.1 การทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* โดยสารชีวภัณฑ์ ในการทดสอบใช้สารชีวภัณฑ์ 5 ชนิดได้แก่

ลาร์มิน่า	สารออกฤทธิ์	*Bacillus subtilis*
โรตารี่	สารออกฤทธิ์	*B. subtilis* AP-04
ไตรซาน	สารออกฤทธิ์	*Trichoderma viride* และ *T. harzianum*
ยูนิกรีน ยูเอ็น –1	สารออกฤทธิ์	*T. harzianum*
พรีโตเมี่ยม	สารออกฤทธิ์	*Chaetomium cupreum*

นำเมล็ดกระเจี๊ยบเขียวมาทำการคลุกในสารชีวภัณฑ์ โดยวิธีคลุกแบบแห้ง (dust treatment) ในอัตรา 3 กรัมต่อเมล็ด 1 กิโลกรัมโดยทำการคลุกเมล็ดในถุงพลาสติกเขย่าถุงให้เมล็ดคลุกเคล้ากับสารชีวภัณฑ์แต่ละชนิดให้เข้ากัน แล้วนำไปเพาะบนกระดาษชื้น และเพาะในดินที่ฆ่าเชื้อ สำหรับชุดควบคุม (control) ไม่คลุกสารใดๆ จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ไปทำการทดสอบทั้ง 2 กรรมวิธี (treatment) ซึ่งแต่ละกรรมวิธีใช้คลุกเมล็ดพันธุ์ 400 เมล็ด ดังนี้

5.1.1 การเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter Method)

สุ่มเมล็ดพันธุ์ที่คลุกด้วยสารชีวภัณฑ์แต่ละชนิดๆละ 400 เมล็ด และเมล็ดที่ไม่ได้คลุกสาร 400 เมล็ด ไปเพาะบนกระดาษชื้นเหมือนการทดลองที่ 1 หลังจากนั้นนำจานเพาะไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการตรวจหาปริมาณเชื้อรา *F. oxysporum* ทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอก ลักษณะการงอกของเมล็ดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.1.2 การเพาะในดินฆ่าเชื้อ (Soil Test)

สุ่มเมล็ดพันธุ์ที่คลุกด้วยสารชีวภัณฑ์แต่ละชนิดๆละ 400 เมล็ดและเมล็ดที่ไม่ได้คลุกสาร 400 เมล็ด ไปเพาะในตะกร้าเพาะที่มีดินที่อบฆ่าเชื้อ โดยแต่ละกรรมวิธีแบ่งเป็น 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด แบ่งเป็นแต่ละกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม หรือ control (ไม่ปลูกเชื้อ)
กรรมวิธีที่ 2 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*F. oxysporum*)
กรรมวิธีที่ 3 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*F. oxysporum*) + คลุกสารชีวภัณฑ์ลาร์มิน่า
กรรมวิธีที่ 4 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*F. oxysporum*) + คลุกสารชีวภัณฑ์โรตารี่
กรรมวิธีที่ 5 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*F. oxysporum*) + คลุกสารชีวภัณฑ์ไตรซาน
กรรมวิธีที่ 6 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*F. oxysporum*) + คลุกสารชีวภัณฑ์ยูนิกรีน ยูเอ็น-1
กรรมวิธีที่ 7 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*F. oxysporum*) + คลุกสารชีวภัณฑ์พรีโตเมี่ยม

เมื่อต้นกล้าอายุ 7 และ 14 วัน ทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอก ต้นกล้าที่งอกปกติ (normal seedling) และต้นกล้าที่งอกผิดปกติ (abnormal seedling)

5.2 การทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* โดยสารกำจัดเชื้อรา

ในการทดสอบใช้สารกำจัดเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่

Trade name	Common name	Active ingredient
1. Benlate OD	benomyl	metyl-1-(butylcarbomyl) -2-benzimidazole-2-yl carbamate 50%WP
2. Thysan	thiram	Tetramethylenethiram disulfide 80%WP
3. Vitavax	carboxin	5,6-dihysol-2-methyl-1-1,4-oxanthi-ine-3-carboxannilide 75%WP

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2.1 การทดสอบการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* โดยใช้สารกำจัดเชื้อรา บนอาหาร PDA

คำนวณสารกำจัดเชื้อราแต่ละความเข้มข้นเป็น stock solution (แสดงในภาคผนวก ก.) นำ stock solution ของสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดแต่ละความเข้มข้นผสมอาหาร PDA ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อและหลอมจนกระทั่งอาหารอุ่นและยังไม่แข็งตัว เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมชิ้น inoculum โดยการเลี้ยงเชื้อรา *F. oxysporum* บนอาหาร PDA เมื่อเชื้อราอายุได้ 7 วัน ตัดเจาะชิ้น inoculum โดย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำชิ้น inoculum วางบนจุดกึ่งกลางจานอาหารที่ผสมสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิด ทำการทดลองความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีทุกวันเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางชิ้น inoculum บนอาหาร PDA ปกติจนกว่าเชื้อบนอาหารเจริญเต็มจานอาหาร

5.2.2 การทดสอบการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* โดยใช้สารกำจัดเชื้อรา คลุกเมล็ด

สุ่มเมล็ดกระเจี๊ยบเขียวมาคลุกสารกำจัดเชื้อรา นำมาทดสอบเช่นเดียวกับการทดลองที่ 5.1.2 โดยใช้สารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดในอัตรา 3 กรัม/เมล็ด 1 กิโลกรัม แต่ละกรรมวิธีใช้ 400 เมล็ด ทำทั้งหมด 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด จากนั้นทำการบันทึก เปอร์เซ็นต์ความงอก ลักษณะการงอกของต้นกล้า ซึ่งแบ่งเป็นกรรมวิธีได้ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (control)
กรรมวิธีที่ 2 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*F. oxysporum*)
กรรมวิธีที่ 3 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*F. oxysporum*) + คลุกสาร Benlate OD
กรรมวิธีที่ 4 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*F. oxysporum*) + คลุกสาร Thysan
กรรมวิธีที่ 5 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*F. oxysporum*) + คลุกสาร Vitavax

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์ และสารกำจัดเชื้อราในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในสภาพโรงเรือน

เตรียม inoculum เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1 มาทดสอบกับเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์ และสารกำจัดเชื้อราที่มีประะสิทธิภาพสูงที่สุดจากการทดลองในข้อ 4 และ 5 มาทดสอบในการยับยั้งการเกิดโรคของเชื้อรา *F. oxysporum* ในระยะต้นกล้า โดยแบ่งเมล็ดออกเป็น 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธี 1 ชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อ (control)
กรรมวิธี 2 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*F. oxysporum*)
กรรมวิธี 3 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุและคลุกเมล็ดด้วยเชื้อราปฏิปักษ์
กรรมวิธี 4 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุและคลุกเมล็ดด้วยสารชีวภัณฑ์
กรรมวิธี 5 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุและคลุกเมล็ดด้วยสารกำจัดเชื้อรา

โดยนำเมล็ดกระเจี๊ยบเขียวไปปลูกในตะกร้าพลาสติก โดยใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูแลรดน้ำเป็นประจำทุกวัน สังเกตการเกิดโรคบันทึกผลเปอร์เซ็นต์ความงอก ลักษณะการงอกของต้นกล้า และอาการที่ผิดปกติ ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 7 และ 14 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved