บทที่3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะอาการของโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพดและการแยกเชื้อราสาเหตุ

1.1 การศึกษาลักษณะอาการของโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพด

ศึกษาลักษณะอาการโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพด โดยเก็บใบข้าวโพดหวานที่แสดงอาการของโรค จากแปลงปลูกศูนย์พัฒนาโครงการหลวงปางดะ อ. สะเมิง จ. เชียงใหม่ โดยใช้กรรไกรตัดที่บริเวณก้านใบของข้าวโพดหวาน พันธุ์สองสี บันทึกภาพของใบ และส่วนที่แสดงอาการผิดปกติด้วยกล้องถ่ายภาพ เพื่อให้เห็นลักษณะของแผลชัดเจนยิ่งขึ้น บันทึกรูปร่างลักษณะขนาด และสีของแผลที่เกิดจากโรคแต่ละแผลอย่างละเอียด นำตัวอย่างใบข้าวโพดไปศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ

1.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ของของข้าวโพด

ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธีการแยกสปอร์เดี่ยว (Single Spore Isolation Technique) โดยนำใบข้าวโพดที่แสดงอาการใบไหม้ มาล้างทำความสะอาด ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเช็ดใบด้วยแอลกอฮอล์ 70% ล้างต่อด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10% (10% sodium hypochlorite) เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วซับด้วยกระดาษทิชชู่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีกครั้ง ตัดส่วนที่เป็นโรคใส่โหลชื้น (moist chamber) เพาะบ่มที่อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส) นาน 4 วัน จากนั้นใช้สไลด์สะอาดปลอดเชื้อ กดทับแผลเพื่อให้สปอร์ของเชื้อราติดกับสไลด์ จากนั้นใช้ capillary needle ย้ายสปอร์เดี่ยววางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) จำนวน 5 จุดต่อจาน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ตรวจสอบลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร เลือกโคโลนีที่เจริญเติบโตดี จากนั้นเก็บเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้ใส่หลอดอาหารเอียง (PDA slant) เพื่อใช้เป็น stock culture สำหรับศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพด

2.1 รูปร่างลักษณะของเชื้อราสาเหตุโรคและการจำแนกชนิด

ศึกษาลักษณะรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างสืบพันธุ์ที่เชื้อราสร้างขึ้น โดยเทคนิคการเลี้ยงบนสไลด์ (Slide Culture Technique) ตัดชิ้นวุ้นอาหาร PDA ให้มีขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตรวางตรงกลางสไลด์แก้วในจานแก้ว (Petridish) ที่บุด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยสไลด์วางอยู่บนแท่งแก้วรูปตัววี ทำให้กระดาษกรองชื้นด้วยน้ำกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายเชื้อราสาเหตุโรคโดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) ที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะที่ส่วนริมชิ้นวุ้น บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 3-4 วันไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope กำลังขยาย 400 เท่า (เลนส์ใกล้วัตถุ 40X)

2.2 การเจริญเติบโตและลักษณะทั่วไปของเชื้อราสาเหตุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการย้ายเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้ในข้อ 1.2 จาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จนเชื้อราเจริญเกือบเต็มจาน จึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดบริเวณที่เชื้อรากำลังเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องใกล้ขอบของโคโลนี เพื่อให้ได้เส้นใยที่ยังอ่อน และมีความหนาแน่นสม่ำเสมอ ย้ายชิ้นวุ้นไปวางตรงจุดตัดกึ่งกลางของจานอาหาร PDA ที่เตรียมใหม่ (Culture Disc Technique) โดยให้ด้านที่เชื้อราเจริญอยู่สัมผัสกับอาหาร จานละ 1 ชิ้น ทำ 5 ซ้ำ(จาน) เพื่อวัดอัตราการเจริญเติบโต โดยขั้นตอนทั้งหมดทำภายในตู้ถ่ายเชื้อ (transfer chamber) วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดอัตราการเจริญเติบโตทุก 2 วัน จนเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. การแยกและบ่งชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบข้าวโพด

3.1 การตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราเอนโดไฟท์

สุ่มเก็บตัวอย่างใบข้าวโพดหวานที่ไม่ปรากฏอาการของโรค จากพื้นที่ 3 แหล่ง ได้แก่ 1. แปลงปลูกพืชเกษตรกร อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่ 2. แปลงปลูกพืชทดลองมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ และ 3. แปลงปลูกพืชทดลองมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม นำมาทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ด้วยวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิว 3 ขั้นตอน (Triple Surface Sterilization) โดยนำมาล้างน้ำให้สะอาดใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตัดใบเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร ห่อด้วยผ้าขาวบางแล้วนำมาแช่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลานาน 30 วินาที ย้ายลงแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10% (10% sodium hypochlorite) เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 30 วินาที และซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูนึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีกครั้ง จากนั้นนำชิ้นพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนี้วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Rose Bengal Agar (RBA) โดยแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อวาง 5 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 3 วันตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช จากนั้นแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ โดยตัดบริเวณปลายเส้นใย (hyphal tip isolation) ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA สังเกตการเจริญเติบโตนำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญเติบโตดีไปเลี้ยงในหลอดอาหารเอียง (PDA slant) เพื่อใช้เป็น stock culture สำหรับการศึกษาต่อไป

การหาอัตราการเกิดโคโลนี (Taylor *et al.*, 1999)

นับจำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อราเอนโดไฟท์เจริญออกมาและชิ้นพืชที่ทำการแยกเชื้อเพื่อคำนวณหาค่าปริมาณของเชื้อราที่แยกได้ (isolation prevalence) หรืออัตราการเกิดโคโลนี (colonization rate) ดังสูตร

$$\text{อัตราการเกิดโคโลนี} = \frac{\text{จำนวนของโคโลนีของเชื้อราที่ปรากฏจากชิ้นพืช}}{\text{จำนวนชิ้นพืชทั้งหมดที่ทำการแยก}} \times 100$$

3.2 การตรวจสอบและบ่งชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์

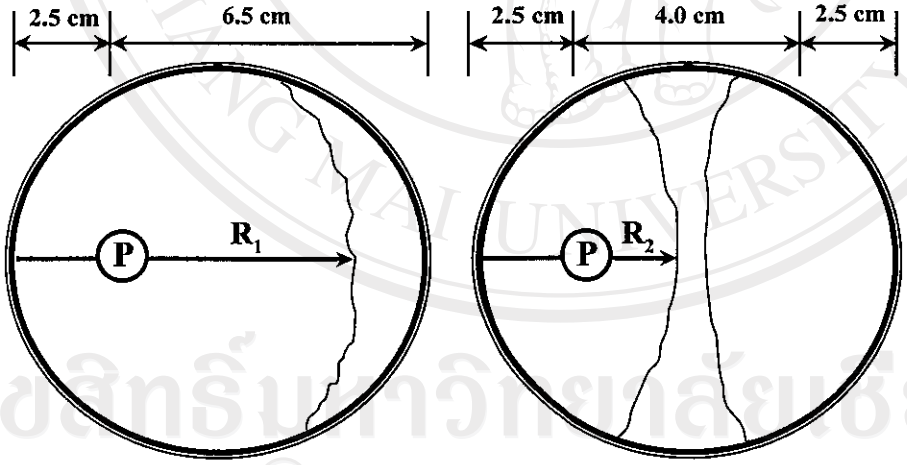
ทำการตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเชื้อราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA และทำการตรวจลักษณะรูปร่าง ขนาดของสปอร์ และโครงสร้างของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สร้างขึ้น ด้วยเทคนิค Slide Culture โดยการเตรียมอาหาร PDA ในจานอาหารให้หนาประมาณ 0.2 มิลลิเมตร เมื่อแข็งตัวใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดชิ้นวุ้นให้มีขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร วางบนสไลด์ที่อยู่บนแท่งแก้วรูปตัววี (V) ใน Petridish ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ตามข้อ 2.1) ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) ที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ไปแตะที่ด้านข้างของชิ้นวุ้น ปิดทับด้วย cover slip ที่ปลอดเชื้อโดยให้ชิ้นวุ้นอยู่ตรงกลางพอดี บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน หรือนานกว่านั้นขึ้นอยู่กับการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิด จากนั้นเปิด cover slip คีบชิ้นวุ้นทิ้งไปจะได้ตัวอย่างเชื้อรา 2 ส่วน คือ ส่วนที่เจริญอยู่บน cover slip และอีกส่วนอยู่ที่สไลด์ จากนั้นหยด lactophenol ลงตรงบริเวณที่มีเชื้ออยู่ ปิดทับด้วย cover slip ใหม่ โดยระวังมิให้มีฟองอากาศ ซับน้ำยาส่วนเกินออกด้วยกระดาษทิชชู ใช้ cover slip ปิด แล้วผนึก (seal) ด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดใส จากนั้นตรวจดูลักษณะของสปอร์ และเส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟท์ ในแต่ละไอโซเลท (isolate) เพื่อการจำแนกเชื้อรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอนโดไฟท์ในระดับ genus เทียบกับระบบการจำแนก (key) ในหนังสืออ้างอิง ได้แก่ Ellis (1971, 1976), Dennis (1978), Carmichael *et al.* (1980), Sutton (1980), Barnett and Hunter (1987), Hawksworth *et al.* (1995), Hanlin (1998) ฯลฯ

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา สาเหตุในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา *E.turcicum* สาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพด ด้วย Dual Culture Technique หรือ Bi-culture Technique ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อใน transfer chamber โดยนำ stock เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้อ 4 มาเลี้ยงบนอาหารPDA เป็นเวลา 7 วัน แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณใกล้ขอบโคโลนีที่มีการเจริญของเชื้อราสม่ำเสมอ ทำการย้ายเชื้อราสาเหตุกับชิ้นเชื้อราเอนโดไฟท์วางบนจานอาหาร PDA ให้ห่างกัน 4 เซนติเมตร ในแนวเส้นผ่าศูนย์กลาง โดยวางเชื้อราที่เจริญช้าก่อน แล้วจึงวางเชื้อราที่เจริญเร็วในวันถัดมา เพื่อให้เชื้อรามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตรเท่ากัน จึงเริ่มบันทึกผลโดยทำการทดลองคู่ละ 4 ซ้ำ (จาน) ในแต่ละกรรมวิธี (ภาพที่ 2)



เมื่อ **P** = เชื้อราสาเหตุโรคพืช (pathogen), **A** = เชื้อราเอนโดไฟท์ปฏิปักษ์ (antagonistic endophytic fungi)

ภาพที่ 2 : ไดอะแกรมการวัดการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในจานชุดควบคุมเปรียบเทียบกับ ชุดทดลองด้วย Dual Culture (Bi-culture) Technique

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบและบันทึกผลการเจริญของเชื้อราสาเหตุ โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคในจานชุดควบคุม และในจานชุดทดสอบ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อเชื้อราสาเหตุโรค ตามสูตร (เกษม, 2532)

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (Percent inhibition of radial growth: PIRG)

$$PIRG = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} X100$$

เมื่อ R_1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในจานชุดควบคุม

R_2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานชุดทดสอบ

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

มากกว่า 75	=	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (very high antagonistic activity)
60-75%	=	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง (high antagonistic activity)
51-60%	=	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (moderate antagonistic activity)
น้อยกว่า 50%	=	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ (low antagonistic activity)

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพดในกระถางทดลองสภาพโรงเรือน

5.1 การเตรียมเมล็ด

เมล็ดข้าวโพดที่ใช้ในการทดลองเป็นข้าวโพดหวาน พันธุ์สองสี จากบริษัท หจก. พืชพันธุ์ตราสิงห์ มาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่เมล็ดในโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10% เป็นเวลานาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง นำไปผึ่งให้แห้งแล้วนำไปปลูกลงในกระถางทดลองที่ล้างสะอาด (Desjardins *et al.*, 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การเตรียมดินปลูก

นำดินร่วนมาผสมกับวัสดุปลูกอื่นๆ ได้แก่ แกลบ และมูลวัวแห้ง ในอัตราส่วน 2:1:1 คลุกเคล้าให้เข้ากัน นำไปบรรจุลงในถุงพลาสติก 2 ชั้น มัดปากถุงให้แน่น แล้วนำไปนึ่ง ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อดินเย็นตัวลงแล้วจึงบรรจุลงในกระถางปลูกขนาด 8 นิ้ว กระถางละ 800 กรัม

5.3 การเตรียม spore suspension (inoculum) ของเชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อราเอนโดไฟท์

ทำการเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อราเอนโดไฟท์ 5 ชนิดที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Exserohilum turcicum* ได้ดี ซึ่งเลือกได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Nigrospora* sp. และ *Phomopsis* sp. มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในห้องปฏิบัติการด้วย Culture Disc Technique (CDT) รอจนเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำน้ำกรองปลอดเชื้อเทลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ที่ฆ่าเชื้อแล้วถูให้สปอร์ของเชื้อราหลุดออก จากนั้นเท inoculum ลงในบีกเกอร์ผ่านผ้าขาวบางที่สะอาดพับซ้อน 2 ชั้น กรองเพื่อแยกเอาส่วนของเส้นใยที่ติดมาด้วยออก ทำการตรวจนับปริมาณความเข้มข้นของสปอร์ด้วย haemacytometer ปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

5.4 ทดสอบเบื้องต้นเชื้อราเอนโดไฟท์กับการเกิดโรคในข้าวโพด

เพื่อให้ทราบว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ ไม่ทำให้เกิดโรคกับข้าวโพด จึงนำเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดแล้ว (ข้อที่ 5.2) มาปลูกลงในดิน (ข้อที่ 5.2) ซึ่งบรรจุในกระถางทดลองที่ล้างสะอาด ดูแลรดน้ำอย่างสม่ำเสมอ เมื่อเมล็ดข้าวโพดงอกได้ 1 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ครั้งละ 5 กรัมต่อน้ำ 5 ลิตร จนต้นข้าวโพดอายุ 3 สัปดาห์ จึงทำการฉีดพ่นด้วย spore suspension โดยใช้เครื่องพ่นด้วยมือ (ยี่ห้อ Original Europet'91) ขนาดบรรจุ 650 มิลลิลิตร ของเชื้อราเอนโดไฟท์แต่ละชนิด จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Nigrospora* sp. และ *Phomopsis* sp. คลุมถุงพลาสติก เพื่อรักษาความชื้นไว้ 48 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ สังเกตดูอาการและความผิดปกติที่จะเกิดขึ้นต่อข้าวโพด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

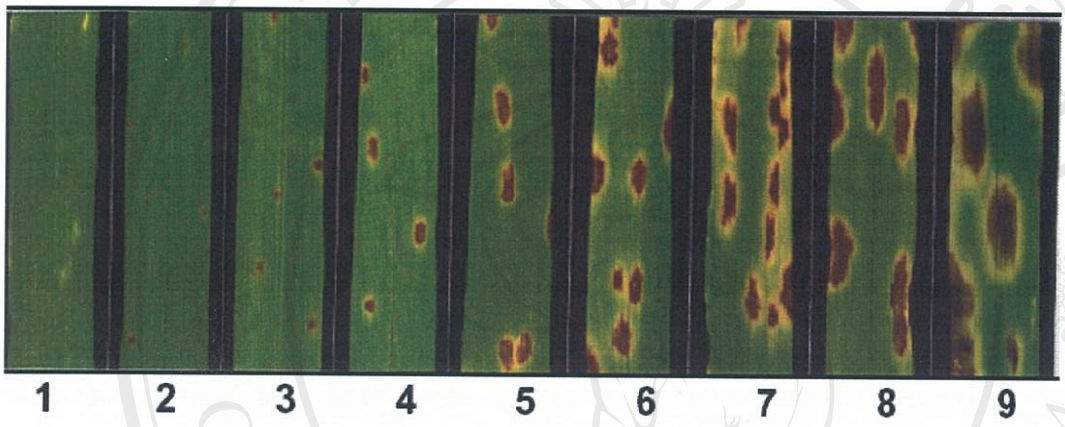
5.5 การประเมินการเกิดโรค และการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Fetch & Steffenson, 1999)

การประเมินการเกิดโรคของพืช โดยให้ระดับต่างๆ ดังนี้

เกิดโรคระดับต่ำ (low compatibility) = ระดับ1-3

เกิดโรคปานกลาง (intermediate compatibility) = ระดับ 4-5

เกิดโรคระดับสูง (high compatibility) = ระดับ 6-9 (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 : ระดับความเสียหายของการเกิดโรคใบจุดสีน้ำตาลในระยะต้นกล้า
(Fetch & Steffenson, 1999)

ระดับ 1 เกิดแผลจุดขนาดเล็ก รูปร่างกลม สีน้ำตาล

ระดับ 2 แผลรูปร่างสีเหลี่ยม ขนาด 0.3-0.5 x0.3-0.7 มิลลิเมตร สีน้ำตาล

ระดับ 3 แผลรูปร่างกลมหรือเหลี่ยม ขนาด 0.5-0.7x0.8-1.3 มิลลิเมตร เกิด chlorosisรอบแผล

ระดับ 4-5 แผลรูปร่างกลมรี ขนาด 0.3-0.7x0.7-1.3 มิลลิเมตร สีน้ำตาล
ระดับ 5 ขนาดแผลใหญ่กว่า และเกิด chlorosis อย่างชัดเจน

ระดับ 6-9 แผลรูปร่างรียาวขยายออก สีน้ำตาล ขนาดประมาณ 1.4-3.2x0.4-0.8 มิลลิเมตร เกิด chlorosis ชัดเจน มีความกว้าง 0.5-1.0 เซนติเมตร เนื้อเยื่อใบจะสว่าง ปรากฏล้อมรอบแผล บ่อยครั้งพบว่าแผลที่อยู่ใกล้กันจะเชื่อมต่อกันจนมีขนาดใหญ่ขยายทั่วทั้งใบ

$$\text{ระดับความเสียหาย} = \frac{\text{ค่าระดับความรุนแรงของโรคที่ประเมินในแต่ละต้น}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่ทำการทดลอง}} \times \text{จำนวนต้นที่เป็นโรค}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.6 การเปรียบเทียบผลการแช่เมล็ดข้าวโพดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ก่อนปลูกด้วยเชื้อราสาเหตุโรค

ทำการเตรียม spore suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้ง 5 ชนิด (5.3) จากนั้นนำเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว (5.1) มาแช่ใน spore suspension เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปลูกข้าวโพดลงในกระถางขนาด 8 นิ้ว ที่เตรียมไว้แล้ว กระถางละ 10 เมล็ด โดยใช้ดินที่นึ่ง ฆ่าเชื้อแล้ว (5.2) ปริมาตร 800 กรัมต่อกระถาง ดูแลรดน้ำอย่างสม่ำเสมอ และใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ครั้งละ 5 กรัมต่อน้ำ 5 ลิตร จึงทำการปลูกเชื้อลงบนต้นข้าวโพดที่อายุ 3 สัปดาห์ โดยการฉีดพ่นด้วย inoculum (spore suspension) ที่เตรียมของเชื้อราสาเหตุโรคที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่ผสมกับ Tween 20 จำนวน 3 หยด เพื่อช่วยในการกระจายตัวของสปอร์ และการติดกับผิวใบพืชใช้ถุงพลาสติกขนาด 12x18 นิ้ว ครอบต้นข้าวโพดเพื่อรักษาความชื้น โดยมีรายละเอียดของแต่ละกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม 1 (ไม่มีการปลูกเชื้อใด ๆ)
กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม 2 (ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว)
กรรมวิธีที่ 3 แช่เมล็ดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Acremonium* sp. และปลูกเชื้อสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 4 แช่เมล็ดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Alternaria* sp. และปลูกเชื้อสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 5 แช่เมล็ดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Curvularia* sp. และปลูกเชื้อสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 6 แช่เมล็ดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Nigrospora* sp. และปลูกเชื้อสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 7 แช่เมล็ดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Phomopsis* sp. และปลูกเชื้อสาเหตุ

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยทำการทดลองกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ (กระถาง) ซ้ำละ 5 ต้น สังเกตการเกิดโรค บันทึกอาการและประเมินความรุนแรงของโรค (5.5) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

5.7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์โดยการฉีดพ่นด้วยสปอร์ก่อนและหลังการปลูกเชื้อ

เตรียมต้นข้าวโพดทดลอง และเตรียม inoculum (spore suspension) ตามที่กล่าวมาแล้วในข้อ 5.1, 5.2 และ 5.3 แล้วทำการปลูกเชื้อตามข้อ 5.4 โดยแบ่งการทดสอบแบ่งเป็น 2 วิธีคือ

1. ทำการฉีดพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์แต่ละชนิดลงบนผิวใบพืชก่อน จากนั้นประมาณ 1 ชั่วโมง จึงฉีดพ่นสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ดังวิธีที่กล่าวมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ทำการฉีดพ่นสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นประมาณ 1 ชั่วโมง จึงฉีดพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์ แต่ละชนิดลงบนผิวใบพืชที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไว้ในแต่กรรมวิธี

จากนั้นใช้ถุงพลาสติกขนาด 12x18 นิ้ว ครอบต้นข้าวโพดเพื่อรักษาความชื้น โดยมีรายละเอียดของแต่ละกรรมวิธี มีดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม 1 (ไม่ทำการปลูกเชื้อใด ๆ)
กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม 2 (ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว)
กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยเชื้อรา *Acremonium* sp. ก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อราสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยเชื้อรา *Alternaria* sp. ก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อราสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยเชื้อรา*Curvularia* sp. ก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อราสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยเชื้อรา *Nigrospora* sp. ก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อราสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยเชื้อรา *Phomopsis* sp. ก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อราสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 8 ปลูกเชื้อราสาเหตุก่อน แล้วฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Acremonium* sp.
กรรมวิธีที่ 9 ปลูกเชื้อราสาเหตุก่อน แล้วฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Alternaria* sp
กรรมวิธีที่ 10 ปลูกเชื้อราสาเหตุก่อน แล้วฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.
กรรมวิธีที่ 11 ปลูกเชื้อราสาเหตุก่อน แล้วฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Nigrospora* sp.
กรรมวิธีที่ 12 ปลูกเชื้อราสาเหตุก่อน แล้วฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Phomopsis* sp.

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยทำการทดลองกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ (กระถาง) ซ้ำละ 5 ต้น สังเกตการเกิดโรค บันทึกอาการและประเมินความรุนแรงของโรค (5.5) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved