บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชสมุนไพรและพืชทดสอบ

1. ตะไคร้ต้น (*Litsea cubeba* Pers.)
2. คะน้า (*Brassica oleracea*)

สารเคมี

1. Agar
2. Ethanol
3. Ethyl acetate
4. Methanol
5. Silica gel 60G
6. Tween 20
7. Iodine
8. Lactic acid
9. Hexane

เชื้อราที่ใช้ทดสอบ

1. *Alternaria* sp.
2. *Cladosporium cladosporioides*

อาหารเลี้ยงเชื้อรา

1. Potato dextrose agar (PDA)
2. Potato dextrose broth (PDB)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์สำหรับทำโครมาโทกราฟี

1. กระจกขนาด 5 x 20 และ 20 x 20 เซนติเมตร
2. Chromatographic tank และ Iodine tank

อุปกรณ์อื่นๆ

1. ตู้อบอุณหภูมิสูง (Hot air oven)
2. ตู้เลี้ยงเชื้อ (Incubator)
3. ตู้ถ่ายเชื้อ (Transfer chamber)
4. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
5. เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
7. เครื่องวัดสี (Chromameter, Color reader)
8. เครื่องชั่งไฟฟ้า
9. กล้องจุลทรรศน์
10. กล้องถ่ายรูป

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อรา *Alternaria* sp.

ทำการแยกเชื้อรา *Alternaria* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดคะน้าโดยวิธี Tissue transplanting method (Dhingra and Sinclair, 1995) โดยการนำใบคะน้าที่เกิดโรคมาตัดเนื้อเยื่อบริเวณแผลโดยตัดให้ได้ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร มีส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคอยู่ในชิ้นเดียวกัน จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย Clorox เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นเนื้อเยื่อไปวางบนอาหาร PDA แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นเนื้อเยื่อ จึงตัดปลายเส้นใยเชื้อราไปเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้งหนึ่งเพื่อให้ได้เส้นใยเชื้อราที่บริสุทธิ์ เมื่อเส้นใยเชื้อราที่เลี้ยงเจริญจนได้เส้นใยเชื้อราบริสุทธิ์แล้ว จึงเลี้ยงเป็น Stock culture สำหรับไว้ใช้ในการทดสอบต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การสกัดสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้น

นำผลตะไคร้ต้นแก่ มาแช่ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยบรรจุลงในขวดโหล นาน 2-3 วัน จึงกรองเอาผลตะไคร้ต้นออก จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาทำการระเหยตัวทำละลายออกจนหมดด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สำหรับผลตะไคร้ต้นที่

กรองออก สามารถนำกลับไปแช่ในเอทานอลได้อีก 2 ครั้ง โดยทำการสกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธีดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เมื่อทำการระเหยตัวทำละลายออกจนหมดแล้วจะได้สารสกัดหยาบจากผลตะไคร้ต้น จึงนำสารสกัดหยาบดังกล่าวมาชั่งน้ำหนัก เพื่อที่จะนำค่าดังกล่าวมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบ (crude extract) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์สารสกัดหยาบ} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้}}{\text{น้ำหนักวัตถุดิบ}} \times 100$$

3. การแยกองค์ประกอบของสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (วนัสนันท์, 2548)

ทำการเตรียมแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) โดยชั่งซิลิกาเจล 60G 35 กรัม นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วทิ้งไว้จนกว่าซิลิกาเจลเย็น จึงนำมาเติมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จนไม่เกิดฟองอากาศขึ้น จากนั้นจึงนำมาเคลือบบนแผ่นกระจกขนาด 5 x 20 เซนติเมตร ให้มีขนาดความหนาของซิลิกาเจล 0.5 มิลลิเมตร จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

นำแผ่น TLC ที่ได้จากการเตรียมข้างต้น มาทำการหยดสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้น โดยใช้หลอดคาปิลารีขนาดเล็ก ทำการหยดเป็นแถบยาว ที่ห่างจากขอบด้านล่าง 2 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำไปใส่ในแท้งค์แก้วที่บรรจุด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ ซึ่งประกอบด้วย Hexane : Ethyl acetate : Methanol เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงระยะห่างจากจุดหยดสารสกัดหยาบเป็นระยะทาง 15 เซนติเมตร จึงนำแผ่น TLC ออกจากแท็งค์แก้ว แล้วทิ้งไว้ในตู้ดูดควันเพื่อไล่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ออก จากนั้นจึงนำมารมด้วยไอโอดีน เมื่อทำการรมด้วยไอโอดีนจะเกิดแถบสีปรากฏขึ้น จึงทำการวัดระยะการเคลื่อนที่ของสาร แล้วนำมาคำนวณหาค่า R_f (รัตนา, 2547)

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ตรวจสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโดยวิธี TLC-bioassay (Adicaran and Banda, 1998)

เตรียมแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบางเช่นเดียวกันกับการเตรียมเพื่อทำการแยกองค์ประกอบสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้น จากนั้นจึงนำโครมาโทกราฟีผิวบางที่ทำการหยดสารสกัดหยาบ มาแยกองค์ประกอบด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ เมื่อตัวทำละลายระเหยออกไปหมดแล้วจึงนำมาพ่นด้วยสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*

การเตรียมกล่องบ่มเชื้อ (Moist chamber)

นำกล่องพลาสติกขนาด 15 x 25 x 12 เซนติเมตร ที่มีฝาปิดสนิท มาล้างทำความสะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วเช็ดทำความสะอาดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำกระดาษทิชชูมาบุก้นกล่องพลาสติก จากนั้นพ่นน้ำกลั่นให้กระดาษทิชชูชื้น

การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*

นำเชื้อรา *C. cladosprioides* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นเทน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงบนสปอร์เชื้อรา มาทำการขูดสปอร์เชื้อราแล้ว นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อกรองเอาเส้นใยเชื้อราและอาหารวุ้นที่ติดมาด้วยออก จากนั้นนำไปนับจำนวนสปอร์ด้วยเครื่องนับ Haemacytometer ให้ได้เท่ากับ 25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติม Tween 20 ในอัตราส่วน 0.04 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร แล้วทำการดูดสปอร์แขวนลอยมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว PDB 25 มิลลิลิตร นำไปนับสปอร์อีกครั้งให้ได้ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

การทดสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* โดยวิธี TLC-bioassay

นำสปอร์เชื้อรา *C. cladosporioides* ที่ได้จากการเตรียมข้างต้นมาพ่นลงบนแผ่นโครมาโทกราฟฟีผิวบางที่ทำการแยกสารองค์ประกอบด้วยตัวทำละลาย Hexane : Ethyl acetate : Methanol แล้วนำไปใส่ลงในกล่องบ่มเชื้อ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 สัปดาห์ จึงทำการตรวจสอบตำแหน่งของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา โดยทำการวัดตำแหน่งวงสีขาวที่เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ จากนั้นจึงนำมาคำนวณหาค่า R_f ต่อไป

5. การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography – Mass Spectrometer, GC-MS)

เมื่อทำการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ด้วยวิธี TLC-bioassay ได้ค่า R_f ของสารที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ จึงนำค่าดังกล่าวมาเป็นค่าอ้างอิงในการที่จะแยกสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Thin Layer Chromatography อีกครั้งเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราในปริมาณที่มากเพียงพอที่จะนำมาทำการวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของสารและปริมาณด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งสภาวะในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรามีดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1. GC 6890 Agilent Technologies

Inlet : 260 ^{0}C

ปริมาณในการฉีด 0.1 µL split ratio 80 : 1

Oven : 60 ^{o}C—7^{o}C/min → 200^{o}C (1 min) → 4^{o}C/min → 220^{o}C (2 min)

10^{o}C/min → 250^{o}C (9 min)

Carrier : Helium 1.0 ml/min

Columr : HP-5MS 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm film thickness

2. MSD 5973(EI) Hewlett Packard

MS Quadrupole : 150 ^{o}C

MS Source : 230 ^{o}C

6. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุโรคใบจุดพืชผักด้วยวิธี poison food technique (Dhingra and Sinclair, 1986)

สำหรับการตรวจสอบฤทธิ์ควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธี Poison food technique วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) ทั้งหมด 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 6 ซ้ำ ซึ่งขั้นตอนการศึกษามีดังนี้ นำสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดแข็ง (PDA) แล้วปรับให้มีระดับความเข้มข้นเป็น 4 ระดับ คือ 500, 1,000, 2,500 และ 5,000 ส่วนต่อล้านส่วน เมื่อได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว จึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวไปเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และรอจนกว่าอาหารแข็งตัวจึงย้ายเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. ที่ทำการเจาะให้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารที่ผสมสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้น นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการย้ายเส้นใยเชื้อราเสร็จแล้วไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเส้นใยเชื้อราในชุดควบคุม (Control) เจริญจนเต็มจานอาหารจึงวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้ง ตามวิธีของธรรมศักดิ์ (2543) ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

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

A = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม (Control)

B = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดหยาบ

7. การพัฒนาสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้น

โดยนำสารสกัดหยาบจากผลตะไคร้ต้นมาพัฒนาเป็นสารชีวภาพกำจัดเชื้อรา โดยมุ่งเน้นให้สารชีวภาพกำจัดเชื้อราดังกล่าวมีความสามารถในการละลายได้ดีในน้ำโดยการลดแรงตึงผิวและมีประสิทธิภาพความคงตัวนาน ซึ่งมีวิธีการศึกษาดังนี้

การศึกษาการละลายของสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นในตัวทำละลาย

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. พบว่า สารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้สมบูรณ์ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้านส่วน ดังนั้นจึงทำการหาค่าการละลายจากระดับความเข้มข้นดังกล่าว โดยทำการบรรจุตัวทำละลายชนิดต่างๆ จำนวน 2 กรัม ลงในขวดแก้วมีฝาปิดสนิท ขนาด 10 มิลลิลิตร ซึ่งตัวทำละลายที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ได้แก่ น้ำ,เอทานอล, Propylene glycol และ Glycerin เมื่อทำการเตรียมตัวทำละลายแล้วจึงทำการเติมสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นจำนวน 0.002 กรัม ผสมให้เข้ากันกับตัวทำละลายด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex) เมื่อสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นละลายหมด จึงเติมสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นอีกครั้งละ 0.002 กรัม เพื่อศึกษาว่าสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นสามารถละลายในตัวทำละลายมากที่สุดในปริมาณเท่าไร จากนั้นบันทึกผลการทดลองจากการละลายของสารสกัดหยาบ

การศึกษาการใช้สารลดแรงตึงผิว

การศึกษาการใช้สารลดแรงตึงผิวเพื่อช่วยเพิ่มการละลายของสารสกัดหยาบให้มากขึ้น เนื่องจากการพัฒนาสารชีวภาพกำจัดเชื้อราต้องการเตรียมสารให้มีความเข้มข้นสูงเพื่อการนำสารดังกล่าวไปเจือจางเป็นสารพร้อมใช้ ทำการศึกษาโดยเลือกตัวทำละลายที่สามารถละลายสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นได้ดีที่สุดมาทำการเติมสารสกัดหยาบจนสารสกัดหยาบไม่สามารถละลายได้หมด จากนั้นเติมสารลดแรงตึงผิว เพื่อช่วยเพิ่มการละลาย บันทึกผลการทดลองจากลักษณะการละลาย

8. การทดสอบฤทธิ์ของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นในการควบคุมเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria* sp.

การทดสอบฤทธิ์ของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นในการควบคุมเส้นใยเชื้อรา

เมื่อได้สารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นจึงนำสารชีวภาพกำจัดเชื้อราแล้วจึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. โดยนำมาทดสอบด้วยวิธี Poison food technique ที่ระดับความเข้มข้น 500, 1,000, 2,500 และ 5,000 ส่วนต่อล้านส่วน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทั้งหมด 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 6 ซ้ำ เมื่อทำการเลี้ยงเส้นใยเชื้อราที่อุณหภูมิห้องจนเส้นใยเชื้อราในชุดควบคุม (Control) เจริญจนเติมจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จึงวัดค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราในแต่ละกรรมวิธี จากนั้นนำค่าดังกล่าวมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ตามวิธี ของธรรมศักดิ์ แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบฤทธิ์ของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นต่อการงอกของสปอร์เชื้อราได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) โดยมีทั้งหมด 6 กรรมวิธี ซึ่งทั้ง 6 กรรมวิธี มีระดับความเข้มข้นของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราแตกต่างกัน คือ 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 ส่วนต่อล้านส่วน ขั้นตอนการศึกษาเริ่มจากการนำเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp.มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (PDA) ที่อุณหภูมิห้องจนเกิดสปอร์เชื้อราขึ้น จากนั้นจึงนำสปอร์เชื้อราที่ทำการเลี้ยงได้มาเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (Spore suspension) โดยใช้น้ำกลั่นที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อราที่มีสปอร์ จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง ได้สารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา แล้วนำสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราดังกล่าวปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (PDA) ที่ทำการผสมสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นโดยปรับระดับความเข้มข้นเป็น 100, 200, 300, 400 และ 500 ส่วนต่อล้านส่วน จากนั้นใช้แท่งแก้วงอที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เกลี่ยสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราให้กระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งสปอร์เชื้อราที่จัดว่างอกนั้นจะต้องมีความยาวของส่วนที่งอกออกมายาวกว่าความกว้างของสปอร์ หรือยาวเป็นครึ่งหนึ่งของความกว้างของสปอร์ (ธรรมศักดิ์, 2543) สำหรับการนับจำนวนสปอร์เชื้อราที่งอกทำการสุ่มนับสปอร์จำนวน 200 สปอร์ จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ตามวิธีของ ธารทิพย์ (2540)

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

A = จำนวนสปอร์ที่งอกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม (Control)

B = จำนวนสปอร์ที่งอกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารชีวภาพกำจัดเชื้อรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

9. การศึกษาความคงสภาพของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้น

จากการพัฒนาสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นจนเป็นสารชีวภาพกำจัดเชื้อรา จึงนำสารชีวภาพกำจัดเชื้อราดังกล่าวมาทำการศึกษาความคงสภาพของสารกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้น โดยนำสารชีวภาพกำจัดเชื้อรามาทำการบรรจุในขวดสีชา แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับ คือ 4 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (30 ± 5 องศาเซลเซียส) และ 60 องศาเซลเซียส ทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน 4 เดือน สภาพการเก็บรักษาดังกล่าวเป็นการดัดแปลงมาจากการศึกษาความคงสภาพของ

ยาแบบเร่ง ซึ่งเป็นการศึกษาในทางเภสัชวิทยา โดยให้ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาคงที่ แล้วทำการตรวจสอบหาปริมาณตัวยาสำคัญที่เหลืออยู่ เพื่อใช้คำนวณหาอัตราเร็วของการเสื่อมสลายที่อุณหภูมิที่ต้องการเก็บรักษา เพื่อคำนวณหาอายุการใช้งาน (จุไรรัตน์, 2538) แต่ทั้งนี้ได้ทำการดัดแปลงมาใช้กับสารชีวภาพกำจัดเชื้อราเพื่อดูความคงสภาพของสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา โดยการคาดคะเนความคงสภาพของสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราจากการทดสอบฤทธิ์ในการควบคุมเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธี Poison food technique ซึ่งทำการศึกษาเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไปทุกๆ 1 เดือน ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา นอกจากการศึกษาฤทธิ์ในการควบคุมเส้นใยเชื้อราแล้ว ยังทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของสี และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

การทดสอบฤทธิ์ในการควบคุมเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp.

นำสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (30 ± 5 องศาเซลเซียส) และ 60 องศาเซลเซียส มาทำการทดสอบฤทธิ์ในการควบคุมเส้นใยเชื้อราโดยวิธี Poison food technique ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 500, 1,000, 2,500 และ 5,000 ส่วนต่อล้านส่วน ซึ่งวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD 3 x 5 โดยทำการศึกษา 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยทางด้านอุณหภูมิและระดับความเข้มข้นของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้น จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราที่เจริญมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

การวัดการเปลี่ยนแปลงสี

สำหรับการวัดการเปลี่ยนแปลงสีของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้น วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD 3 x 5 ซึ่งปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ปัจจัยในด้านอุณหภูมิและระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษา ซึ่งอุณหภูมิแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ 4 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (30 ± 5 องศาเซลเซียส) และ 60 องศาเซลเซียส สำหรับระยะเวลาการเก็บรักษานั้นจะทำการศึกษาเมื่อเริ่มทำการศึกษาและการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน 1, 2, 3 และ 4 เดือน การวัดการเปลี่ยนแปลงของสีสารชีวภาพกำจัดเชื้อราทำการวัดโดยใช้เครื่อง Color reader model CR-10 ของบริษัท Minolta ซึ่งค่าวัดได้จะแสดงเป็นค่า L, a* และ b* จากนั้นจะนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า Chroma และ ค่า Hue

L เป็นค่าความสว่าง (Lightness) มีค่าอยู่ในช่วง 0 – 100

a* เป็นค่าสีแดงและสีเขียว (Redness/Greenness)

a มีค่าบวก เป็นสีแดง

a มีค่าลบ เป็นสีเขียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

b* เป็นค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (Yellowness/Blueness)

b มีค่าบวก เป็นสีเหลือง

b มีค่าลบ เป็นสีน้ำเงิน

การคำนวณหาค่า Chroma

นำค่าที่ได้จากการวัดข้างต้นมาคำนวณหาค่า Chroma ที่เป็นค่าความเข้มของสี ดังสมการ

$$\text{Chroma } (C^*) = (a^2+b^2)^{1/2}$$

การคำนวณหาค่า Hue

นำค่าที่ได้จากการวัดสารชีวภาพกำจัดเชื้อรามาคำนวณหาค่า Hue ซึ่งเป็นค่ามุมของดังสมการ

$$\text{Hue angle } (H^o) = \tan^{-1}(b^*/a^*)$$

เมื่อ Theta คือ ค่าเฉดสีเมื่อ a และ b มีค่าเป็นบวก

ATAN คือค่า Arctangent

ถ้า $a > 0$ และ $b \geq 0$ ดังนั้นค่า Hue = Theta

ถ้า $a < 0$ และ $b \geq 0$ ดังนั้นค่า Hue = Theta + 180

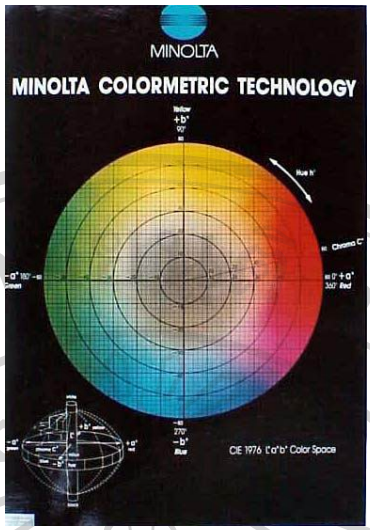
ถ้า $a < 0$ และ $b < 0$ ดังนั้นค่า Hue = Theta + 180

ถ้า $a > 0$ และ $b < 0$ ดังนั้นค่า Hue = Theta + 360

เมื่อได้ค่าช่วงสีจึงนำมาเปรียบเทียบกับแผ่นเทียบสีของ Minolta (CR-200)

0 – 45	องศาแสดงสีส้มถึงสีส้มแดง	180 - 225	องศาแสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงินเขียว
45 – 90	องศาแสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง	225 - 270	องศาแสดงสีน้ำเงินเขียวถึงสีน้ำเงิน
90 – 135	องศาสีเหลืองถึงสีเหลืองเขียว	270 - 315	องศาแสดงสีน้ำเงินถึงสีม่วง
135 - 180	องศาแสดงสีเหลืองเขียวถึงสีเขียว	315 - 360	องศาแสดงสีม่วงถึงสีม่วงแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 4 แผ่นเทียบสีของ Minolta (CR-200)

การวัดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

สำหรับการวางแผนการทดลองการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ทำการวางแผนการทดลองเช่นเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงสี คือ Factorial in CRD 3 x 5 ที่ทำการศึกษาปัจจัยทางด้านอุณหภูมิและระยะเวลาของการเก็บรักษา การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นนั้น ทำการศึกษาโดยใช้เครื่องวัดค่า pH (pH meter) ของ SUNTEX model SP-7

10. ทดสอบฤทธิ์ควบคุมโรคในระดับแปลงปลูก

สำหรับการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ควบคุมโรคในระดับแปลงปลูกนั้น แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 10.1 เป็นการทดสอบฤทธิ์ควบคุมโรคในระดับแปลงปลูก ที่ทำการปลูกเชื้อสาเหตุของโรค และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคด้วยสารแมนโคเซบ นอกจากการศึกษาฤทธิ์ควบคุมโรคแล้ว ยังทำการศึกษาในส่วนของการเจริญเติบโต, ผลผลิต, ผลกระทบที่มีต่อสรีรวิทยา และความเป็นพิษของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่มีต่อคะน้า

การทดลองที่ 10.2 เป็นการทดสอบฤทธิ์ควบคุมโรคโดยทำการปลูกเชื้อสาเหตุของโรคและทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคด้วยสารแมนโคเซบ เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 แต่ทำการปลูกคะน้าในถุงดำและไม่ได้ทำการศึกษาในส่วนของการเจริญเติบโต, ผลผลิต, ผลกระทบที่มีต่อสรีรวิทยา และความเป็นพิษของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่มีต่อคะน้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 10.3 เป็นการทดสอบฤทธิ์ควบคุมโรคในระดับแปลงปลูกเพื่อการค้า ที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุของโรค ซึ่งทำการศึกษาในแปลงปลูกพืชปลอดสารพิษ และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคด้วยสารลาร์มิน่า (ชื่อสามัญ บาซิลลัส ซับทีลิส) ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียในรูปผงสปอร์แห้ง สำหรับการศึกษาในแปลงปลูกผักปลอดสารพิษได้ทำการศึกษาในส่วนของการเจริญเติบโต, ผลผลิต, ผลกระทบที่มีต่อสรีรวิทยา และความเป็นพิษของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่มีต่อคะน้าด้วย

การทดลองที่ 10.1

1. การทดสอบฤทธิ์ในการควบคุมโรค

นำสารชีวภาพกำจัดเชื้อราธรรมชาติจากผลตะไคร้ต้นในกรรมวิธีที่สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ดีที่สุดมาทำการทดสอบในระดับแปลงปลูก คือ ที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้านส่วน แล้วทำการปรับระดับความเข้มข้นให้สูงขึ้นอีกสองระดับ วางแผนการทดลองแบบบล็อคสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) มีทั้งหมด 6 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำ

control = ชุดควบคุม (Control)

Inoc = พ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *Alternaria* sp

Li500 = พ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้านส่วน

Li1,000 = พ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้านส่วน

Li2,000 = พ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ส่วนต่อล้านส่วน

Manco = สารเคมีกำจัดเชื้อราแมนโคเซบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมแปลงทดลอง

เตรียมแปลงปลูกทั้งหมด 4 แปลง โดยแปลงปลูกมีขนาด 1.5 x 4 เมตร ทำการไถพรวนแปลงและใส่ปุ๋ยคอกก่อนการปลูกทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ ก่อนการย้ายต้นกล้า

การเตรียมกล้าคะน้า

นำเมล็ดคะน้า จากบริษัทเพื่อนเกษตร ลงเพาะในดินซึ่งบรรจุในถาดหลุม เมื่อต้นกล้าอายุได้ 20 วัน จึงทำการย้ายปลูก

การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *Alternaria* sp.

นำเชื้อรา *Alternaria* sp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งเพิ่มปริมาณโดยวิธี Flood Plate Technique จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วและผสม Tween 20 ในอัตราความเข้มข้น 0.2 ต่อน้ำ 1 ลิตร แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ขูดสปอร์เชื้อราให้หลุดจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อรา จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำมาวัดระดับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยด้วย Haemacytometer ให้ได้ปริมาตร 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

การปลูกเชื้อสาเหตุและการฉีดพ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้น

ทำการฉีดพ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นในต้นคะน้า ก่อนการพ่นสปอร์เชื้อรา *Alternaria* sp. ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดของคะน้า 1 วัน ด้วยเครื่องพ่นขนาดเล็ก (Foggy) จากนั้นปลูกเชื้อราสาเหตุของโรคที่ได้เตรียมไว้ โดยการพ่นลงบนใบคะน้าห่างประมาณ 30 เซนติเมตร จำนวน 50 มิลลิลิตรต่อกรรมวิธี จากนั้นคลุมด้วยพลาสติกใสเพื่อรักษาความชื้น ทิ้งไว้ 3 วัน จึงนำพลาสติกใสออก สำหรับการฉีดพ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นในครั้งต่อไปจะทำการพ่นในทุกๆ 5 วัน จนถึงระยะเก็บเกี่ยว

ประเมินความเสียหายที่เกิดจากโรค

สำหรับการบันทึกข้อมูลลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น และประเมินความเสียหายที่เกิดจากโรค (สุคนทิพย์, 2543) ดังนี้

1) การหาปริมาณของโรค (Disease intensity) โดยนับจำนวนต้นที่เป็นโรคแล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากจำนวนใบทั้งหมดภายในต้นนั้นแต่ละกรรมวิธี
2) ประเมินพื้นที่ใบที่เป็นโรคต่อต้น โดยแบ่งระดับของการเกิดโรคออกเป็น 11 ระดับ คือ 0 – 10 โดยที่

0 = ไม่มีอาการของโรค
1 = พื้นที่ใบเป็นโรค 10 เปอร์เซ็นต์
2 = พื้นที่ใบเป็นโรค 20 เปอร์เซ็นต์
3 = พื้นที่ใบเป็นโรค 30 เปอร์เซ็นต์
4 = พื้นที่ใบเป็นโรค 40 เปอร์เซ็นต์
5 = พื้นที่ใบเป็นโรค 50 เปอร์เซ็นต์
6 = พื้นที่ใบเป็นโรค 60 เปอร์เซ็นต์
7 = พื้นที่ใบเป็นโรค 70 เปอร์เซ็นต์
8 = พื้นที่ใบเป็นโรค 80 เปอร์เซ็นต์
9 = พื้นที่ใบเป็นโรค 90 เปอร์เซ็นต์
10 = พื้นที่ใบเป็นโรค 100 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นำค่าที่ได้มาแปลเป็นค่าความเสียหายของพืช โดยนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การถูกทำลาย หรือดัชนีการเข้าทำลาย ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลาย} = \frac{A}{B} \times \frac{100}{C}$$

A = ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ

B = จำนวนต้นพืชที่สุ่มจัด

C = ระดับสูงสุดของการเป็นโรค

2. การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นคะน้า (ปทุมพร, 2546)

การศึกษาการเจริญเติบโตของคะน้า ทำการศึกษาทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งทำการศึกษาเมื่อต้นคะน้าที่ทำย้ายปลูกสามารถตั้งตัวได้ โดยทำการวัดครั้งแรกเมื่ออายุ 30 วันหลังการเพาะเมล็ด และทำการวัดเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ จนถึงระยะเก็บเกี่ยว รวมทั้งหมด 3 ครั้ง

2.1 การวัดการเจริญเติบโตของคะน้าโดยการวัดการเปลี่ยนแปลงทางด้านความสูง โดยวัดจากโคนต้นจนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด หน่วยเป็นเซนติเมตร

2.2 จำนวนใบ สำหรับจำนวนใบจะนับจำนวนใบที่มีการคลีใบออกสมบูรณ์แล้ว

3. การศึกษาปริมาณผลผลิตคะน้า

สำหรับการศึกษาปริมาณผลผลิตคะน้านั้น ทำการศึกษาปริมาณผลผลิตสดและแห้ง โดยปริมาณผลผลิตสดทำการศึกษา ในส่วนเหนือดิน, ส่วนราก และส่วนที่บริโภคได้ สำหรับปริมาณผลผลิตแห้งทำการศึกษา ส่วนเหนือดินและส่วนราก เท่านั้น ซึ่งขั้นตอนการศึกษามีดังนี้ นำคะน้าที่ทำการเก็บเกี่ยวจากแปลงปลูกมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า จากนั้นนำต้นคะน้ามาชั่งน้ำหนักรวมทั้งต้น (หน่วยของน้ำหนักเป็น กรัม) เมื่อชั่งน้ำหนักรวมทั้งต้นเสร็จแล้ว จึงนำต้นคะน้ามาแยกส่วน ออกเป็น ส่วนเหนือดิน (ลำต้นและใบ) และส่วนราก จากนั้นทำการชั่งน้ำหนัก สำหรับการศึกษาในส่วนของน้ำหนักส่วนที่บริโภคได้ จะแยกจากส่วนเหนือดินโดยทำการตัดใบและก้านที่แก่ออก จากนั้นชั่งน้ำหนัก เมื่อศึกษาปริมาณผลผลิตสดแล้ว จึงนำผลผลิตสดที่ได้ดังกล่าวมาตากให้แห้งในโรงอบพืช เมื่อต้นคะน้าแห้งแล้วจึงนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง แยกเป็นส่วนเหนือดินและราก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การวัดผลของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่มีต่อสรีรวิทยาพืช

4.1 ทำการวัดค่าอัตราการสังเคราะห์แสง, ความต้านทานของปากใบ และอัตราการคายน้ำโดยใช้เครื่อง CIRAS-1 PORTABLE PHOTOSYNTHESIS SYSTEM TUTORAL (PP SYSTEMS) ซึ่งทำการวัดค่าดังกล่าวในช่วงเวลา 8.00, 10.00, 12.00, 14.00 และ 16.00 น.

4.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ ทำการวิเคราะห์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ตามวิธีการของ Procter (1981) อ้างอิงโดย ปทุมพร (2546)

การตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

นำใบพืชที่ต้องการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์มาเจาะด้วยที่เจาะกระดาษให้มีขนาด 0.32 ตารางเซนติเมตร จำนวน 8 ชิ้น แล้วแช่ในอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดระยะเวลาจึงนำสารละลายที่ได้ไปอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 642 และ 664 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์รวม ดังสมการ

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (mg m}^{-2}) = (7.12A_{664} + 16.8A_{642}) [(V \times 10^{4}) / N\P r^{2}]$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงที่กำหนด

V = ปริมาตรเป็นลิตร

N = จำนวนของแผ่นใบ

R = รัศมีของแผ่นใบ

4.3 ปริมาณ Total non-structural carbohydrate (TNC) ตามวิธีของ Nelson's reducing procedure (สุจริต, 2531) หน่วยวัดเป็น มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง

5. การศึกษาความเป็นพิษของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นต่อคะน้า

การศึกษาความเป็นพิษของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นต่อคะน้า ทำการศึกษาในส่วนของสีใบคะน้าที่ทำการพ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อรา โดยทำการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีชุดควบคุม ซึ่งทำการวัดสีของใบคะน้าด้วยเครื่อง Color reader model CR-10 ของบริษัท Minolta ซึ่งค่าวัดได้จะแสดงเป็นค่า L, a* และ b* จากนั้นจะนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า Chroma (C*) และ ค่า Hue (H^{o})

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 10.2

การศึกษาผลของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* sp. ซึ่งทำการศึกษากับคะน้าที่ทำการปลูกในถุงดำ โดยวางแผนการทดลองแบบบล็อคสุ่มสมบูรณ์ (Randomized complete block design, RCBD) มีทั้งหมด 6 กรรมวิธี ดังนี้

control = ชุดควบคุม (Control)
Inoc = พ่นสปอร์เชื้อรา *Alternaria* sp.
Li500 = พ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้านส่วน
Li1,000 = พ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้านส่วน
Li2,000 = พ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ส่วนต่อล้านส่วน
Manco = สารเคมีกำจัดเชื้อราแมนโคเซบ

เริ่มทำการศึกษาเมื่อต้นคะน้าอายุได้ 23 วันหลังการย้ายปลูก โดยทำการพ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 500, 1,000 และ 2,000 ส่วนต่อล้านส่วน และสารแมนโคเซบ และหลังจากพ่นสารหนึ่งวัน จึงทำการพ่นสปอร์เชื้อรา *Alternaria* sp. คลุมด้วยพลาสติกใสเพื่อรักษาความชื้น เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นจึงนำผ้าพลาสติกออก แล้วทำการตรวจสอบความเสียหายที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช และทำการตรวจสอบเมื่อระยะเวลาผ่านไป 7 วัน สำหรับการพ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นและสารแมนโคเซบจะทำการพ่นเมื่อระยะเวลาผ่านไปทุกๆ 5 วัน สำหรับการประเมินความเสียหายที่เกิดจากโรคนั้นทำการประเมินตามวิธีของ สุคนทิพย์ (2543) ซึ่งได้กล่าวไว้แล้วในการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 10.3

การศึกษาผลของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นในการควบคุมโรคใบจุดออลเทอนาเรียในคะน้า โดยทำการศึกษาในสภาพแปลงปลูกของสถานีวิจัยเกษตรเขตชลประทาน (MCC) ซึ่งเป็นสภาพแปลงปลูกคะน้าในระบบปลอดสารพิษ สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้ศึกษาผลของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นในการควบคุมโรคใบจุดออลเทอนาเรียที่เกิดจากสภาพธรรมชาติโดยไม่มีการปลูกเชื้อให้กับคะน้า และทำการศึกษาเช่นเดียวกันกับการทดสอบฤทธิ์ในระดับแปลงปลูกดังที่ได้กล่าวมาในข้างต้น ได้แก่ การศึกษาการเจริญเติบโต, ปริมาณผลผลิตและทำการศึกษาถึงผลของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารชีวภาพกำจัดเชื้อราที่มีต่อสรีรวิทยาของคะน้า การศึกษาในครั้งนี้ได้วางแผนการทดลองแบบบล็อคสุ่มสมบูรณ์ (Randomized complete block design, RCBD) มีทั้งหมด 5 กรรมวิธี ดังนี้

control = ชุดควบคุม (Control)

Li500 = พ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้านส่วน

Li1,000 = พ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้านส่วน

Li2,000 = พ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ส่วนต่อล้านส่วน

Larmina = สารลาร์มิน่า (ชื่อสามัญ บาซิลัส ซับทีลิส เป็น เชื้อแบคทีเรียในรูปผงสปอร์แห้ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved