บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะอาการและแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วย

1.1 การศึกษาลักษณะอาการโรคแอนแทรคโนสของกล้วย

โดยเก็บผลและใบกล้วยที่แสดงลักษณะอาการของโรค จากแปลงปลูกกล้วยไข่พันธุ์เกษตรศาสตร์2 อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ แปลงปลูกกล้วยศูนย์วิจัยพืชสวนแพร่ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ แปลงปลูกกล้วยไข่นายฉิ่ง เหนียวแน่น อำเภอเด่นชัย จังหวัดแพร่ และแปลงปลูกกล้วยศูนย์วิจัยสาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ทำการบันทึกภาพของผล ใบ และส่วนที่แสดงอาการผิดปกติด้วยกล้องถ่ายภาพ เพื่อให้เห็นลักษณะของแผลชัดเจนขึ้น บันทึกรูปร่าง ขนาด และสีของแผลที่เกิดจากโรคแต่ละแผลอย่างละเอียด นำตัวอย่างผลและใบกล้วยไปศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ

1.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วย

ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคโดยตรงจากส่วนที่เป็นโรค โดยการตัดชิ้นส่วนบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อที่เป็นโรค และเนื้อเยื่อที่ปกติ ขนาดประมาณ 3x3 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวพืชด้วย Clorox 10% เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้แห้ง นำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบชนิดของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร เลือกโคโลนีที่เจริญเติบโตดี โดยตัดปลายเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นเก็บเชื้อราสาเหตุที่แยกได้ใส่หลอดอาหารเอียง (PDA slant) เพื่อใช้เป็น stock culture

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุ

ทำการย้ายเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้ในข้อ 1.2 จาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดบริเวณที่เชื้อรากำลังเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องใกล้ขอบโคโลนี เพื่อให้ได้เส้นใยที่ยังอ่อน และมีความหนาแน่นสม่ำเสมอ ย้ายชิ้นวุ้นไปวางบนใบและผลกล้วยที่ทำแผล และไม่ทำแผล นำไปบ่มภายในถุงพลาสติกเป็นเวลา 7 วัน สังเกตอาการและความผิดปกติที่เกิดขึ้น บันทึกอาการเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การศึกษาชนิดและปริมาณเชื้อราบนผิวผลกล้วย

3.1 การติดตั้งกรวยดักสปอร์เชื้อรา (water-borne spore trap)

ศึกษาเชื้อราบนผิวผลกล้วยในแปลงปลูกกล้วยไข่ 2 พื้นที่ คือ อำเภอเด่นชัย จังหวัดแพร่ และอำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ วิธีการศึกษาประยุกต์มาจากการทดลองของ de Lapeyre de Bellaire and Mourichon (1997) ด้วยวิธีติดตั้งกรวย (water-borne spore trap) ใต้เครือกล้วยไข่ที่อยู่ในระยะติดผลอ่อนเพื่อรองรับน้ำฝนที่จะไหลผ่านเครือกล้วยไข่ โดยต่อสายยางเข้ากับกรวยและถังพลาสติกขนาด 5 ลิตร สำหรับเก็บน้ำที่ผ่านเครือกล้วย เติมสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา (fixing solution : ethanol 5 ส่วน, acetic acid 96 เปอร์เซ็นต์ 1 ส่วน, น้ำ 4 ส่วน) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อถัง (ภาพ 1) บันทึกปริมาตรของน้ำฝนทั้งหมดที่ไหลผ่านเครือกล้วยสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (สิงหาคม-ตุลาคม 2550) ทำการเก็บตัวอย่างน้ำฝนปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดพลาสติก เพื่อนำไปตรวจสอบสกุลและปริมาณของเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

ภาพ 1 การติดตั้งกรวยดักสปอร์เชื้อรา (water-borne spore trap)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การตรวจสอบสกุลและปริมาณเชื้อรา

การตรวจสอบสกุลและปริมาณเชื้อราโดยนำน้ำฝนที่ไหลผ่านเครือกล้วยในข้อที่ 3.1 มากรองผ่านผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ หยดสีย้อม lactophenol tryphan blue 5% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดตัวอย่างน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำตัวอย่างน้ำที่ได้ไปผ่านเครื่องกรองแบบสุญญากาศ (vacuum-filter) โดยใช้แผ่นกรอง (cellulosic membrane) ขนาดรู 0.45 ไมครอน เป็นตัวกรอง จากนั้นตัดแผ่นกรองบริเวณตรงกลางขนาด 1.0x1.0 เซนติเมตร วางบนแผ่นสไลด์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ หยด lactophenol ตรงบริเวณขอบกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจสอบสกุลและปริมาณภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound ที่กำลังขยาย 200 เท่า

3.3 ตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรากับกล้วยไข่

สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำที่ไหลผ่านเครือกล้วยในระยะต่างๆ ด้วยการฉีดพ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อผ่านเครือกล้วย โดยไม่ต้องใส่สาร fixing solution ปริมาตรน้ำรวม 500 มิลลิลิตร นำน้ำที่ได้มาแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) ที่ผสม rose bengal อัตราผสม 0.75 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร ด้วยวิธี spread plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ทำการเจาะชิ้นวุ้นบริเวณปลายโคโลนีแต่ละแบบมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA จานใหม่เพื่อให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ (pure culture) จากนั้นนำเชื้อราที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบและผลกล้วย

4. การแยกและบ่งชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์จากกล้วยไข่

4.1 การแยกเชื้อราเอนโดไฟต์

สุ่มเก็บตัวอย่างใบกล้วยไข่พันธุ์เกษตรศาสตร์2 และผลกล้วยไข่พันธุ์พื้นเมือง ที่มีลักษณะปกติ ไม่ปรากฏอาการของโรค จากแปลงปลูกกล้วยไข่ จังหวัดนครสวรรค์ ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ โดยนำส่วนใบ ก้าน และผลมาตัดให้มีขนาดประมาณ 2x2 เซนติเมตร นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการจุ่มชิ้นพืชลงในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 30 วินาที ย้ายลงแช่ใน Clorox 10% เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างชิ้นพืชด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง และซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ ทำการตัดชิ้นพืชให้มีขนาด 3x3 มิลลิเมตร นำชิ้นพืชวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อวาง 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อเจริญออกจากชิ้นพืช ทำการตัดบริเวณปลายเส้นใย (hyphal tip isolation) ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นเก็บใส่หลอดอาหารเอียง เพื่อใช้เป็น stock culture สำหรับการศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การตรวจสอบและบ่งชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์

ทำการตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเอนโดไฟต์บนอาหาร PDA และทำการตรวจลักษณะรูปร่าง และโครงสร้างของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่สร้างขึ้น โดยนำเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในข้อ 4.1 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อเจริญเต็มจานอาหารนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยหยด lactophenol ลงบนสไลด์ ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) ที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อราวางบนสไลด์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slip) ซับน้ำยาส่วนเกินออกแล้วผนึก (seal) ด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดใส จากนั้นตรวจดูลักษณะของสปอร์และเส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟต์ในแต่ละไอโซเทท เพื่อทำการจำแนกเชื้อราเอนโดไฟต์ในระดับจีนัส (genus) เทียบกับการจำแนกในหนังสืออ้างอิง ได้แก่ Introduction to fungi (Webster, 1980)

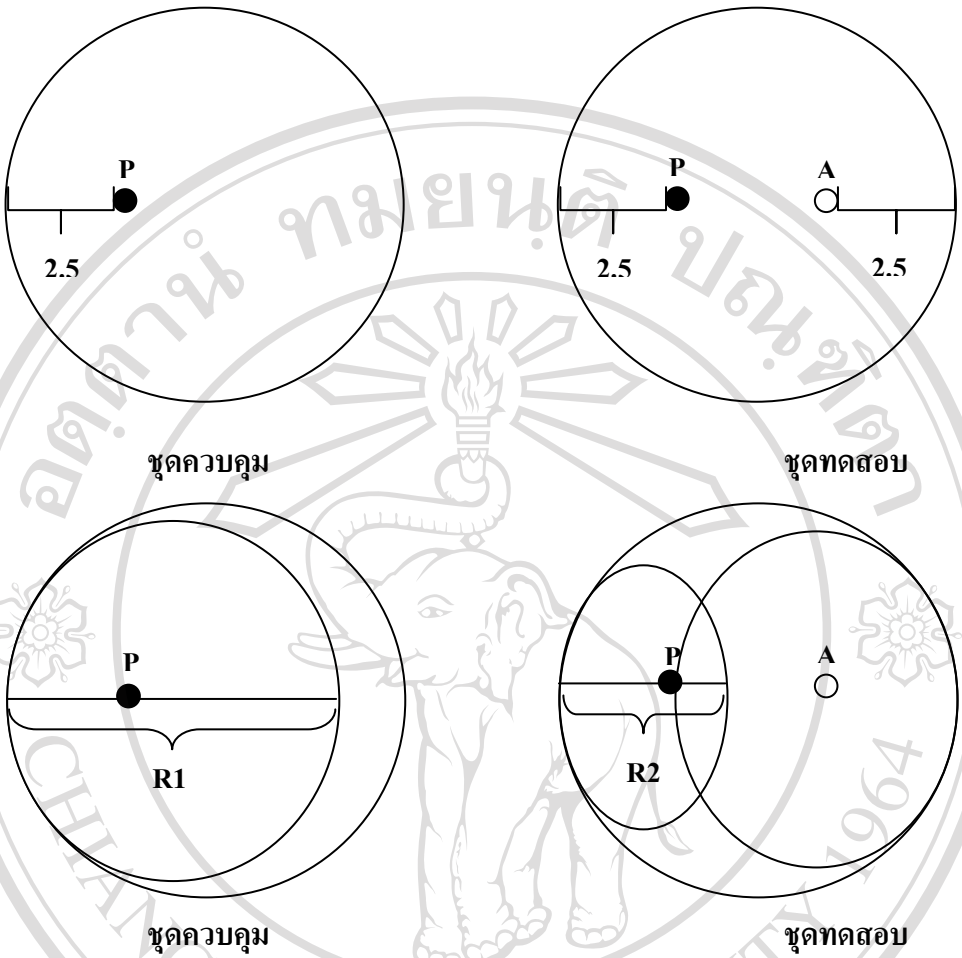
5. การเปรียบเทียบลักษณะเชื้อราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum* spp.

การศึกษาเชื้อราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากใบ ก้าน และผลกล้วยไข่ โดยนำ stock เชื้อรา *Colletotrichum* spp. มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ตรวจดูลักษณะของโคโลนี การเจริญของเส้นใย และทำการปลูกเชื้อราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum* spp. บริเวณใบและผลกล้วย เพื่อดูการเกิดโรค สังเกตอาการและความผิดปกติที่เกิดขึ้นบนใบและผลกล้วย ทำการวัดขนาดสปอร์ของเชื้อราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum* sp. ในไอโซเลทที่ทำให้เกิดโรค จำนวน 50 สปอร์ต่อไอโซเลท

6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา *C. musae* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วย ด้วยวิธี dual culture โดยนำ stock เชื้อราเอนโดไฟต์มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใย ทำการย้ายเชื้อราสาเหตุและเชื้อราเอนโดไฟต์วางลงบนจานอาหาร PDA ให้ห่างกัน 4 เซนติเมตร ในแนวเส้นผ่าศูนย์กลาง โดยวางเชื้อราที่เจริญช้าก่อนแล้วจึงวางเชื้อที่เจริญเร็วในวันถัดมา บันทึกการเจริญของเชื้อรา โดยทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ (จาน) (ภาพ 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2 ลักษณะการเลี้ยงเชื้อโดยวิธี dual culture หรือ biculture

บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบแล้วบันทึกผลการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคในจานชุดควบคุม และในจานชุดทดสอบ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อเชื้อราสาเหตุ ตามสูตร (เกษม, 2532)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (Percent inhibition of radial growth : PIRG)

$$PIRG = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

เมื่อ R1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในจานชุดควบคุม

R2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานชุดทดสอบ

P = เชื้อสาเหตุ

A = เชื้อราปฏิปักษ์

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)

7. การทดสอบเบื้องต้นของเชื้อราเอนโดไฟต์กับการเกิดโรคในกล้วย

เพื่อให้ทราบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง ไม่ทำให้เกิดโรคกับกล้วย จึงทำการปลูกเชื้อในกล้วย 3 ชนิด คือ กล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า และกล้วยหอม โดยวางชิ้นเชื้อรา และฉีดพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์แต่ละชนิดบนใบและผลกล้วยที่ทำแผลและไม่ทำแผล จากนั้นวางผลกล้วยไว้ในกล่องพลาสติก และคลุมต้นกล้วยด้วยถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้นหลังการปลูกเชื้อ สังเกตอาการและความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับใบและผลกล้วย

8. การชักนำให้เชื้อรา Mycelia Sterilia สร้างสปอร์ (induce sporulation)

ศึกษาวิธีชักนำให้เชื้อราสร้างสปอร์ ด้วยวิธีการขูดผิวหน้าอาหาร โดยเทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงบนจานอาหาร ใช้สไลด์ขูดเส้นใย จากนั้นเทน้ำและเส้นใยทิ้ง นำจานอาหารวางในกล่องพลาสติกและปิดฝาให้มิดชิดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น และอีกวิธีหนึ่ง คือ การเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 7 ชนิด คือ PDA, half PDA, PCA, MYA, MA, MU และ OMA เพื่อทดสอบว่าอาหารชนิดใดสามารถชักนำให้เชื้อรา Mycelia Sterilia สร้างสปอร์ โดยเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 7-10 วัน นำไปตรวจดูลักษณะสปอร์ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของกล้วยในกระถางทดลองสภาพโรงเรือน

9.1 การเตรียมต้นกล้วย

เตรียมต้นกล้วยทดลองจากวิธีผ่าหน่อ โดยนำหน่อกล้วยที่มีลักษณะสมบูรณ์มาตัดเอาเฉพาะส่วนที่อยู่ใต้ดิน หรือลำต้นแท้จริง นำมาล้างทำความสะอาด และผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใช้มีดผ่าหน่อให้มีขนาดเท่ากัน 4 ชิ้น ย้ายลงแช่ในสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราควินโทซีน+อีทริไดอะโซล (เทอร์ราคลอร์ ซุปเปอร์เอ็กซ์ อี) อัตรา 60-80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร เป็นเวลา 30 นาที นำออกผึ่งให้แห้ง ย้ายปลูกในกระถาง โดยวางหน่อคว่ำลงเพื่อป้องกันการกลับหัวของหน่อ กลบดินหนา 3 เซนติเมตร วางกระถางไว้ในที่ร่ม รดน้ำสม่ำเสมอเพื่อให้ความชื้น

9.2 การเตรียม spore suspension (inoculum) ของเชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อราเอนโดไฟต์

ทำการเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อราเอนโดไฟต์ 3 ชนิดที่ให้ประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. musae* ได้ดี และไม่ทำให้เกิดโรค ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ *Sarcopodium* sp., *Curvularia* sp. ไอโซเลท 4 และ *Alternaria* sp. นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อราเจริญเต็มจานอาหาร เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อราแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร ใช้สไลด์ขูดผิวหน้าอาหารเพื่อให้สปอร์ของเชื้อราหลุดออก จากนั้นเท inoculum ผ่านผ้าขาวบางที่สะอาดพับซ้อน 2 ชั้นลงในบีกเกอร์ เพื่อแยกเอาส่วนของเส้นใยที่ติดมาออก ทำการตรวจนับปริมาณความเข้มข้นของสปอร์ด้วย haemacytometer ปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผสม Tween 20 จำนวน 3 หยด เพื่อช่วยในการกระจายตัวของสปอร์ และการติดกับผิวใบพืช

9.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์โดยการฉีดพ่นด้วยสปอร์ก่อนและหลังการปลูกเชื้อ

เตรียมต้นกล้วยทดลอง และเตรียม spore suspension (inoculum) ตามที่กล่าวมาแล้วในข้อ 9.1 และ 9.2 แล้วทำการปลูกเชื้อโดยแบ่งการทดสอบเป็น 2 วิธีคือ

1. ทำการฉีดพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์ แต่ละชนิดลงบนผิวใบพืชก่อน จากนั้นประมาณ 24 ชั่วโมง จึงฉีดพ่นสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค
2. ทำการฉีดพ่นสปอร์เชื้อราสาเหตุ หลังจากนั้นประมาณ 24 ชั่วโมง จึงฉีดพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์ แต่ละชนิดลงบนใบพืชที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไว้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นใช้ถุงพลาสติกครอบต้นกล้วยเพื่อรักษาความชื้น โดยมีรายละเอียดของแต่ละกรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม 1 (ไม่ทำการปลูกเชื้อใดๆ)
กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม 2 (ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคเพียงชนิดเดียว)
กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยเชื้อรา *Sarcopodium* sp. ก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อราสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. ไอโซเลท 4 ก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อราสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยเชื้อรา *Alternaria* sp. ก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อราสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อราสาเหตุก่อน แล้วฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Sarcopodium* sp.
กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อราสาเหตุก่อน แล้วฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. ไอโซเลท 4
กรรมวิธีที่ 8 ปลูกเชื้อราสาเหตุก่อน แล้วฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Alternaria* sp.

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการทดลองกรรมวิธีละ 6 ซ้ำ สังเกตการเกิดโรค บันทึกอาการและประเมินความรุนแรงของโรค จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

การประเมินการเกิดโรคโดยให้ระดับต่างๆ ดังนี้
ระดับที่ 0 = ไม่แสดงอาการของโรค
ระดับที่ 1 = แสดงอาการของโรค 1-25% ของพื้นที่ใบที่สุ่ม
ระดับที่ 2 = แสดงอาการของโรค 26-50% ของพื้นที่ใบที่สุ่ม
ระดับที่ 3 = แสดงอาการของโรค 51-75% ของพื้นที่ใบที่สุ่ม
ระดับที่ 4 = แสดงอาการของโรค 76-100% ของพื้นที่ใบที่สุ่ม

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (สืบศักดิ์, 2540)

$$\text{ดรรชนีการทำลาย (\%)} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่ม}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของการเป็นโรค}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อรา (fungicide) ในการควบคุมเชื้อรา *C. musae*

สารเคมีกำจัดเชื้อราที่ใช้ในการทดลองมี 5 ชนิด ได้แก่ คอปเปอร์ออกซีคลอไรด์ แมนโคเซบ คาร์เบนดาซิม ไดฟีโนโคนาโซล และโปรคลอราซ โดยใช้ที่อัตราแนะนำต่ำสุด

อัตราแนะนำและวิธีการคำนวณสารกำจัดเชื้อราที่อัตราแนะนำต่ำสุดของ stock solution แสดงในภาคผนวก

นำอาหาร PDA ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วและหลอมจนกระทั่งอาหารละลายไม่แข็งตัว รอให้อาหารอุ่น ใช้ไมโครปิเปตดูดอาหาร PDA ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรทิ้ง นำ stock solution ของสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร PDA ให้เข้ากัน จากนั้นเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ 15 มิลลิลิตร ทำการย้ายชิ้นเชื้อราสาเหตุ โดยเตรียมจากนำ stock เชื้อรา *C. musae* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใย นำมาวางตรงตำแหน่งกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิด ส่วนชุดควบคุมให้วางบนอาหาร PDA แต่ละกรรมวิธีทำ 10 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) บันทึกผลการทดลอง โดยวัดขนาดโคโลนีของเชื้อราอายุ 5 วัน ของทุกซ้ำนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยสูตรดังนี้

$$\text{การยับยั้งการเจริญ (\%)} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหารชุดทดสอบ}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหารชุดควบคุม}} \times 100$$

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรรมวิธี โดยวิธี least significant difference (Lsd)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved