บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *Phomopsis longicolla* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์หลัก

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลองมี 4 พันธุ์ คือ พันธุ์เชียงใหม่ 2 เชียงใหม่ 60 สจ. 4 และ สจ. 5 สุ่มเลือกเมล็ดถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ ๆ ละ 400 เมล็ด ตรวจหาเชื้อราบนเมล็ดโดยการเพาะเมล็ดถั่วเหลืองด้วยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1976) โดยนำเมล็ดถั่วเหลืองวางในจานแก้ว (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ซึ่งภายในบรรจุกระดาษฟาง 3 แผ่น และกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จำนวน 1 แผ่น ที่ชุบน้ำจนชุ่ม วางเมล็ดถั่วเหลืองจานละ 10 เมล็ด ในการทดลองนี้ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ทำการทดลอง 4 ซ้ำ (replication) ซ้ำละ 100 เมล็ด จากนั้นนำไปบ่มเพาะ (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดมาตรวจหาชนิดและความถี่ของเชื้อราที่เกิดขึ้นบนเมล็ดภายใต้กล้อง stereo microscope เชื้อ *P. longicolla* ที่พบบนเมล็ด ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เลี้ยงบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) และเก็บเป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. ศึกษาอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis longicolla*

2.1 ศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Phomopsis longicolla*

ทดสอบเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารวุ้นชนิดต่างๆ เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อราภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ อาหารวุ้นที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด 6 ชนิด คือ Malt Agar (MA), Potato Carrot Agar (PCA), Potato Dextrose Agar (PDA), Soybean Seed Dextrose Agar (SSDA), V-8 Juice Agar (VA) และ Water Agar (WA) สูตรอาหารต่าง ๆ แสดงในภาคผนวก ข.

ทำการ Subculture เชื้อ *P. longicolla* จาก stock culture ที่ได้จากการทดลองที่ 1 นำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA เมื่ออายุได้ 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดเจาะปลายเส้นใย นำชิ้นวุ้น inoculum ที่ได้ วางกึ่งกลางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารชนิดต่าง ๆ ทำการทดลองอาหารละ 10 ซ้ำ (จานอาหาร) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งหมดเก็บในสภาพห้องปฏิบัติการ วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราทุกวันจนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารชนิดใดชนิดหนึ่ง

2.2 ศึกษาสภาพแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis longicolla*

สภาพแสงที่ใช้ทดสอบมี 6 สภาพ คือ

1. มืดตลอดเวลา
2. สภาพห้องปฏิบัติการ
3. Near Ultraviolet (NUV) 24 ชั่วโมง
4. Near Ultraviolet (NUV) 12 ชั่วโมง สลับ Fluorescent
5. Fluorescent 24 ชั่วโมง
6. Fluorescent 12 ชั่วโมง สลับมืด

การเตรียม inoculum ทำวิธีการเดียวกับการทดลองที่ 2.1 โดยใช้อาหาร PDA ในการทดลองนี้ ทำกรรมวิธี (treatment) ละ 10 ซ้ำ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อเก็บในสภาพต่าง ๆ วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราและสังเกตการสร้าง pycnidia โดยวิธีการเดียวกับการทดลอง 2.1

3. ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราต่อความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า

3.1 ผลต่อความงอกของต้นกล้า (Germination test)

เตรียมเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ ๆ ละ 800 เมล็ด ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.1 % เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แบ่งเมล็ดถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก 400 เมล็ด ปลูกเชื้อโดยการแช่เมล็ดด้วยสารแขวนลอยของ conidia ของเชื้อ *P. longicolla* ความเข้มข้น 10^4 conidia / ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เหลืออีกพันธุ์ละ 400 เมล็ด ใช้เป็นชุดควบคุมโดยแช่ในน้ำฆ่าเชื้อนาน 1 ชั่วโมง เช่นกัน เมื่อครบตามกำหนดเวลาผึ่งเมล็ดให้

แห้งโดยทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำเมล็ดที่ได้ทดสอบโดยวิธี Standard germination test แบบ between paper method ตามวิธีการของ ISTA (1979) นำไปวางเรียงในตู้เพาะที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดการตรวจนับครั้งแรก (5 วัน หลังเพาะ) นำม้วนกระดาษมาเปิดออก ตรวจนับเฉพาะต้นกล้าปกติแล้วม้วนกระดาษวางคืนไว้ในตู้เพาะ จนถึงกำหนดตรวจนับครั้งสุดท้าย (8 วัน หลังเพาะ) ประเมินผลการทดสอบโดยนับต้นกล้าปกติ ต้นกล้าผิดปกติ เมล็ดแข็ง และเมล็ดตาย

3.2 การทดสอบความแข็งแรงของต้นกล้า (Seedling Vigor Test)

3.2.1 อัตราการเจริญของต้นกล้า (Seedling Growth Rate Test)

เตรียมเมล็ดถั่วเหลืองเช่นเดียวกับการทดสอบความงอก แต่ใช้เมล็ดถั่วเหลืองชุดละ 300 เมล็ด เพาะบนกระดาษเพาะ วางเมล็ดถั่วเหลือง 2 แถว ๆ ละ 25 เมล็ด วางห่างจากขอบด้านข้าง 2 เซนติเมตร ห่างจากขอบด้านบน 6 เซนติเมตร และระยะห่างระหว่างแถว 9 เซนติเมตร นำกระดาษเพาะที่เปียกอีกแผ่นปิดทับอีกชั้น ม้วนกระดาษ เช่นเดียวกับการทดสอบความงอก นำม้วนกระดาษไปไว้ใน ตู้เพาะที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องให้แสง เมื่อครบกำหนด 7 วัน นำเมล็ดออกมาตรวจนับความงอก นำต้นกล้าที่งอกปกติมาตัดเอาเฉพาะส่วนของยอดอ่อนและราก บรรจุใส่ถุงกระดาษ อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อนแล้วคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าจากสูตรต่อไปนี้

อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (SGR) = $\frac{\text{น้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและราก}}{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}}$

(Seedling Growth Rate :SGR)

อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้ามีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อต้น

3.2.2 อัตราการเจริญเติบโตของราก (Root Growth Rate Test)

เตรียมเมล็ดถั่วเหลืองเช่นเดียวกับการทดสอบความงอก แต่ใช้เมล็ดถั่วเหลืองชุดละ 200 เมล็ด เพาะเมล็ดถั่วเหลืองจำนวน 20 เมล็ด เรียงให้เป็นแถวยามตามความยาวของกระดาษเพาะ ให้แถวห่างจากขอบด้านบน 5 เซนติเมตร ปิดทับด้วยกระดาษเพาะเปียกอีกชั้นและม้วนกระดาษเช่นเดียวกับการทดสอบความงอก วางม้วนกระดาษไว้ในตู้เพาะประเมินผลโดยการวัดความยาวของส่วนที่งอกเป็นราก โดยความยาวของรากถั่วเหลืองวัดจากข้อของใบเลี้ยงไปถึงปลายราก (จวงจันทร์, 2529)

4. การป้องกันกำจัดเชื้อรา *Phomopsis longicolla* โดยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา

4.1 ทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *Phomopsis longicolla* ในห้องปฏิบัติการ

สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่ใช้ 4 ชนิด ได้แก่ Benlate OD, Daconil, Facine F และ Orthocide อัตราความเข้มข้นที่ใช้ 3 อัตรา คือ ต่ำกว่าอัตราแนะนำตามฉลาก 0.5 เท่า อัตราแนะนำตามฉลาก และสูงกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า ดังนี้

	ระดับความเข้มข้น (ppm)		
1. Benlate OD	281.25	562.5	834.75
2. Daconil	937.5	1875	2812.5
3. Facine F	100	200	300
4. Orthocide	437.5	875	1312.5

อัตราแนะนำและสารออกฤทธิ์แสดงในภาคผนวก ก.

คำนวณสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละความเข้มข้นเป็น stock solution (วิธีการคำนวณและการเตรียม stock solution แสดงในภาคผนวก ข.) นำ stock solution ของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดแต่ละความเข้มข้นผสมอาหาร PDA ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อและหลอม รอจนกระทั่งอาหารอุ่นและยังไม่แข็งตัวเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียม inoculum เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ตัดเจาะชิ้น inoculum โดย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำชิ้น inoculum วางบนกึ่งกลางจานอาหารที่มีอาหาร PDA ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดและแต่ละความเข้มข้น ทำการทดลองความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีทุกวันเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางชิ้น inoculum บนอาหาร PDA ปกติ จนกว่าเชื้อบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหาร

4.2 ทดสอบความสามารถของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Phomopsis longicolla*

เตรียมสารแขวนลอย conidia ของเชื้อ *P. longicolla* ที่ความเข้มข้น 10^5 conidia / ml หยดลงบนแผ่นสไลด์หลุม และหยดสารละลายของสารเคมีป้องกันกำจัด เชื้อราแต่ละความเข้มข้นลงไปในหลุมแผ่นสไลด์นั้นด้วย ให้ความชื้นแก่แผ่นสไลด์ โดยวางแผ่นสไลด์ในจานอาหารที่วางด้วยกระดาษกรองและยางรัดฆ่าเชื้อวางอยู่ วางแผ่น สไลด์บนยางรัด ให้ความชื้นแก่จานอาหารด้วยการหยดน้ำฆ่าเชื้อให้กระดาษกรองชื้น และปิดฝาจานอาหารเพื่อรักษาความชื้น จนครบเวลา 4 ชั่วโมง หยด lactophenol cotton blue ลงไป นำแผ่นสไลด์ตรวจดูความงอกของ conidia ของเชื้อ *P. longicolla* ในแต่ละชุดที่ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดลอง 4.1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่สารแขวนลอยของ conidia ผสมกับน้ำฆ่าเชื้อ

4.3 ทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *Phomopsis longicolla* โดยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในสภาพแปลง

ผลจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่าสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราทุกชนิดและทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. longicolla* ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับ ชุดควบคุม. จึงนำสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราทุกชนิดและทุกความเข้มข้นทดสอบการป้องกันกำจัดในสภาพแปลง

-การเตรียมแปลงปลูก

เตรียมแปลงขนาด 1.4 x 6.65 เมตร จำนวน 8 แปลง โดยมีระยะห่างระหว่างแปลง 30 เซนติเมตร พรวนดินให้ร่วน

-การเตรียม inoculum ของเชื้อราสาเหตุ

เตรียมสารแขวนลอยของ conidia ของเชื้อราสาเหตุ นำเชื้อราสาเหตุจาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ผสม lactic acid ในสภาพห้องปฏิบัติการ 45 วัน เชื้อราจะสร้าง pycnidia เจริญบนผิวอาหาร ใช้แผ่นสไลด์สะอาดขูด pycnidia ลงในโกร่ง บด บดให้ pycnidia แตก นำน้ำฆ่าเชื้อเทผสมกับ pycnidia กรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น

เพื่อแยกเส้นใยและกากของ pycnidia ออก นำมาปรับปริมาตรและความเข้มข้นของ conidia ให้ได้ประมาณ 10^5 conidia / ml

-การเตรียมเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

เตรียมเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ โดยแต่ละพันธุ์แบ่งเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ฆ่าเชื้อที่ผิวอย่างเดียวพันธุ์ละประมาณ 100 เมล็ด และชุดที่ฆ่าเชื้อที่ผิวและปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยของ conidia ที่เตรียมไว้ พันธุ์ละประมาณ 800 เมล็ด การฆ่าเชื้อที่ผิวโดยนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เตรียมไว้แช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.1 % นาน 3 นาที ล้างด้วยน้ำฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง ในส่วนของเมล็ดที่ต้องปลูกเชื้อนำไปแช่ในสารแขวนลอยของ conidia ที่เตรียมไว้ โดยแช่นาน 1 ชั่วโมง ผึ่งให้แห้ง เพื่อนำไปปลูกต่อไป

-การเตรียมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา

อัตราความเข้มข้นของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่ใช้ ใช้ตามการทดลองในห้องปฏิบัติการ แต่ในการฉีดพ่นใช้น้ำ 200 มิลลิลิตรต่อกรรมวิธี

-การปลูกและฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา

ปลูกถั่วเหลืองโดยแต่ละหลุมมีระยะปลูก 25 x 25 เซนติเมตร แต่ละกรรมวิธีปลูก 10 หลุมหรือกอ (replication) โดยหยอดเมล็ดถั่วเหลืองหลุมละ 5-6 เมล็ด เมื่อต้นถั่วอายุ 14 วัน ถอนต้นกล้าให้เหลือหลุมละ 3 ต้น เมื่อถั่วเหลืองเจริญถึงระยะการเจริญเติบโต R3 และ R5 (ภาพที่ 1) ฉีดพ่นสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ในแปลงของแต่ละพันธุ์ ชุดควบคุมที่เป็นต้นถั่วเหลืองที่ปลูกจากเมล็ดที่ฆ่าเชื้อที่ผิวอย่างเดียว ใช้น้ำฆ่าเชื้อฉีดพ่น

เมื่อเก็บเกี่ยวนำเมล็ดถั่วเหลืองจากแต่ละกรรมวิธีแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก 100 เมล็ด นับจำนวนเมล็ดผิดปกติ และนำไปเพาะด้วยวิธี Blotter method เพื่อตรวจหาเชื้อ *Phomopsis longicolla* ต่อไป

ภาพที่ 1 แปลงปลูกต้นถั่วเหลืองในระยะการเจริญ R5 ที่ใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

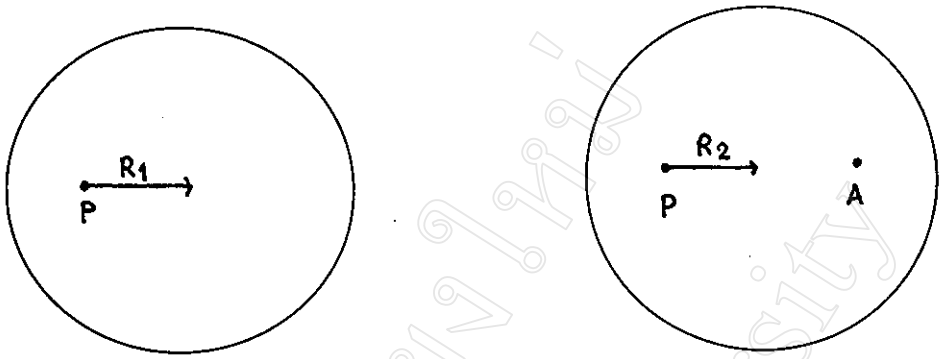
5. การทดสอบเบื้องต้นการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *Gliocladium* sp. ต่อเชื้อรา *Phomopsis longicolla*

5.1 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis longicolla* บนอาหาร PDA โดยวิธี Dual Culture

เชื้อราปฏิปักษ์ (antagonistic fungi) ที่ใช้ทดสอบการควบคุมเชื้อ *P. longicolla* ได้จากฝ่ายอารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวงและ สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง สถาบันเทคโนโลยี ซึ่งมี 4 ชนิดดังนี้

Trichoderma hamatum
Trichoderma harzianum
Trichoderma viride
Gliocladium virens

ทดสอบโดย เลี้ยงเชื้อรา *P. longicolla* บนอาหาร PDA จนอายุ 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดเจาะบริเวณปลายเส้นใยนำชิ้น inoculum วางบนจานอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2.5 เซนติเมตร และวางชิ้น inoculum ของเชื้อปฏิปักษ์ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 3 วัน โดยวางบนจานอาหารด้านตรงข้ามกับเชื้อ *P. longicolla* โดยวางห่างจากขอบจานอาหาร เลี้ยงเชื้อเป็นระยะ 2.5 เซนติเมตร เช่นกัน ในแต่ละกรรมวิธี ทำ 10 ซ้ำ วัดรัศมีโคโลนีของ *P. longicolla* ในด้านที่เจริญเข้าหาเชื้อราปฏิปักษ์ ดังภาพที่ 2 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราจากสูตร (R1 - R2)/R1 x 100 โดย R1 เป็นรัศมีโคโลนีของเชื้อ *P. longicolla* ชุดควบคุม และ R2 คือ รัศมีโคโลนีของเชื้อ *P. longicolla* ที่เจริญร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์



จานควบคุม จานทดสอบ

P = Pathogen (*P. longicolla*)

A = Antagonistic fungi

R1 = รัศมีโคโลนีของเชื้อ *P. longicolla* ชุดควบคุม

R2 = รัศมีโคโลนีของเชื้อ *P. longicolla* ที่เจริญร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์

ภาพที่ 2 การวางเชื้อราทดลองโดยวิธี Dual culture

5.2 ศึกษาการยับยั้งและการเข้าทำลายเชื้อรา *Phomopsis longicolla* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทำ slide culture โดยวิธี Dual slide culture โดยนำจานอาหารที่อบฆ่าเชื้อรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และวางยางรัดบนกระดาษกรอง และวางแผ่นสไลด์สะอาดวางบนยางรัด นำชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 5 x 5 มิลลิเมตร วางกลางแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ ใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อรา *P. longicolla* แตะที่ขอบด้านข้างชิ้นวุ้นอาหาร PDA และใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อราปฏิปักษ์แต่ละชนิดที่ขอบด้านข้างของชิ้นวุ้น ในด้านตรงข้ามที่ได้แตะเชื้อ *P. longicolla* ไว้ ปิดด้วย cover glass ให้ความชื้นแก่จานอาหารด้วยการหยดน้ำฆ่าเชื้อให้กระดาษกรองชื้น และปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อรักษาความชื้น เมื่อเชื้อราปฏิปักษ์เจริญปกคลุม เชื้อรา *P. longicolla* นำมาศึกษาดูลักษณะการเข้าทำลาย โดยนำมาศึกษาและตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5.3 การศึกษาผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการงอกสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis longicolla*

วิธีการทดลองเช่นเดียวกับการทดลอง 4.2 แต่ใช้สารแขวนลอยของสปอร์เชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง ความเข้มข้น 10^5 conidia / ml แทนสารละลายของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา

5.4 การศึกษาผลของเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีต่อความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Phomopsis longicolla*

นำเชื้อรา *Phomopsis longicolla* เลี้ยงพร้อมกับเชื้อราปฏิปักษ์ บนอาหาร PDA โดยวิธี Dual Culture เช่นเดียวกับการทดลองที่ 5.1 เมื่อเส้นใยของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด เจริญชนกัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดเจาะเส้นใยของเชื้อรา *P. longicolla* ที่เจริญชนเชื้อราปฏิปักษ์ นำไปปลูกเชื้อลงบนใบถั่วเหลืองที่ล้างผ่านน้ำไหลนาน 1 ชั่วโมง และทำแผลด้วยเข็มเล็กๆ เก็บในสภาพ moist chamber ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลการเกิดโรคบนใบถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อรา *P. longicolla* ปกติ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University