# บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

**1. การตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* และเชื้อราอื่นๆที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวผิวดำ**

เมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวผิวดำที่ใช้ในการทดลองมี 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พิษณุโลก 2 และพันธุ์ อู่ทอง 2 ซึ่งได้มาจากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท กรมวิชาการเกษตร สุ่มตัวอย่างเมล็ดถั่วเขียวผิวดำมาพันธุ์ละ 400 เมล็ด นำมาตรวจหาเชื้อราบนเมล็ดโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (blotter method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1967) โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ส่วนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด นำผลการทดลองมาวิเคราะห์แบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยนำเมล็ดถั่วเขียวผิวดำวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri-dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ซึ่งภายในบรรจุกระดาษกรอง Whatman No. 1 จำนวน 1 แผ่น ไว้ด้านบนและกระดาษฟาง 3 แผ่นที่ชุบน้ำจนชุ่มไว้ด้านล่าง จากนั้นวางเมล็ดถั่วเขียวผิวดำจานละ 10 เมล็ด ในการทดลองนี้ ถั่วเขียวผิวดำแต่ละพันธุ์ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด จากนั้นนำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ยกลางวัน 28 องศาเซลเซียส กลางคืน 25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด นำเมล็ดมาตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดภายใต้กล้อง Stereo microscope เชื้อรา *M. phaseolina* ที่พบบนเมล็ด ทำการแยกให้บริสุทธิ์เลี้ยงบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) และเก็บเป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

**2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* ต่อความงอก การเกิดโรคและความแข็งแรงของต้นอ่อนถั่วเขียวผิวดำ**

ทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคโดยวิธีต่อไปนี้

**2.1 การปลูกเชื้อบนเมล็ด (seed inoculation)**

ใช้เส้นใยแขวนลอย (mycelium suspension) ของเชื้อรา *M. phaseolina* เนื่องจากเชื้อรา *M. phaseolina* นั้น พบว่าไม่มีการสร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ดังนั้นจึงใช้เส้นใยแขวนลอยที่ผ่านการปั่นให้เส้นใยแตกหักเป็นท่อนๆและถือว่าเส้นใยแต่ละท่อนเป็น 1 สปอร์ (เรืองฤทธิ์, 2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นับจำนวนเส้นใยด้วย Hemacytometer ให้ได้ความเข้มข้น$10^6$ เส้นใย/ มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำเมล็ดถั่วเขียวผิวดำพันธุ์พิษณุโลก 2 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ตรวจพบปริมาณของเชื้อรา *M. phaseolina* มากที่สุดมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย sodium hypochlorite เข้มข้น 1 % นาน 2-3 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้งปล่อยให้แห้งแล้วจึงนำไปแช่ใน mycelium suspension ที่เตรียมไว้ ส่วนชุดควบคุมแช่เมล็ดในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยแช่เมล็ดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเมล็ดมาซับด้วยกระดาษกรองที่สะอาดผึ่งให้แห้งนาน 12 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเมล็ดออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปเพาะบนกระดาษชื้นและส่วนที่สองนำไปเพาะบนดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยเพาะเมล็ดกรรมวิธีละ 300 เมล็ด ซึ่งแบ่งเป็น 3 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD หลังจากนั้นทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอก การติดเชื้อของเมล็ดและต้นอ่อนผิดปกติจากการเพาะเมล็ดโดยกระดาษชื้น เปอร์เซ็นต์ความงอกโผล่พ้นดินและต้นอ่อนผิดปกติจากการเพาะในดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อต้นอ่อนอายุได้ 7 และ 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติและนำค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีต่างๆมาเปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least significant difference)

**2.2 การปลูกเชื้อในดิน (soil inoculation)**

ทำการเตรียม inoculum โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างไปต้มให้สุก จากนั้นผึ่งให้เย็น แล้วนำไปบรรจุลงในถุงพลาสติกทนร้อน อุดจุกด้วยสำลี หุ้มด้วยกระดาษกันสำลีเปียก จากนั้นนำไปเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 $C^0$ ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วจึงนำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *M. phaseolina* เจริญที่ตัดด้วย cork borer จากนั้นใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นเชื้อราใส่ลงในถุงพลาสติก บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนเชื้อเจริญเต็มถุง (ภาพ3) จึงนำไปผสมกับดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว ในอัตรา 2 % W/W (น้ำหนัก inoculum / น้ำหนักดินแห้ง ) (มัทนาและคณะ, 2540) คลุมด้วยถุงพลาสติก ทิ้งให้เชื้อเจริญ 3 วัน ส่วนชุดควบคุมไม่ใส่เชื้อลงไปในดิน จากนั้นนำเมล็ดถั่วเขียวผิวดำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย sodium hypochlorite เข้มข้น 1 % นาน 2-3 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง แล้วนำไปปลูกลงในดินที่ผสม inoculum ซึ่งบรรจุอยู่ในตะกร้าพลาสติก โดยทำ 3 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกโผล่พ้นดิน การตายก่อนงอก การตายหลังงอกและต้นอ่อนผิดปกติ เมื่อต้นอ่อนอายุได้ 7 และ 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ และนำค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีต่างๆมาเปรียบเทียบโดยวิธี LSD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ภาพ 3 เมล็ดข้าวฟ่างที่ฆ่าเชื้อแล้ว (ก) และเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* เจริญอยู่ (ข)**

**3. การทดสอบเบื้องต้นในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อรา *Macrophomina phaseolina***

**3.1 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. phaseolina* บนอาหาร PDA โดยวิธี dual culture**

นำเชื้อรา *M. phaseolina* จากการทดลองที่ 2 มาทำการศึกษาการยับยั้งการเจริญกับเชื้อราปฏิปักษ์ (antagonistic fungi) ที่ได้จากฝ่ายอารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวงและสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ซึ่งมี 4 ชนิดดังนี้

*Trichoderma harzianum* I 103 (isolate 103)

*Trichoderma harzianum*

*Trichoderma virens* I G10 (isolate G10)

*Trichoderma virens* I G2 (isolate G2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทดสอบโดย เลี้ยงเชื้อรา *M. phaseolina* และเชื้อราปฏิปักษ์บนอาหาร PDA จนเชื้อราเจริญเต็มอาหาร ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราทั้งสองอายุ 3 วัน จากนั้นใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นเชื้อรา *M. phaseolina* มาทดสอบกับเชื้อราปฏิปักษ์ โดยนำเชื้อราทั้งสองมาวางบนอาหาร PDA ให้ห่างกัน 5 เซนติเมตร ซึ่งเชื้อราทั้งสองจะห่างจากขอบจาน 2 เซนติเมตร ในแต่ละกรรมวิธีทำ 7 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบCRD จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกผลการเจริญของเชื้อราสาเหตุโดยวัดขนาดความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *M. phaseolina* ในด้านที่เจริญเข้าหาเชื้อราปฏิปักษ์และวัดขนาดความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *M. phaseolina* จากชุดควบคุม (ภาพ 4) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อรา ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *M. phaseolina* จากค่าเฉลี่ย 7 ซ้ำ โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (Percent Inhibition of Radial Growth: PIRG)

$$PIRG = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100$$

โดย $R_1$ = รัศมีโคโลนีของเชื้อรา *M. phaseolina* ชุดควบคุม

$R_2$ = รัศมีโคโลนีของเชื้อรา *M. phaseolina* ที่เจริญร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

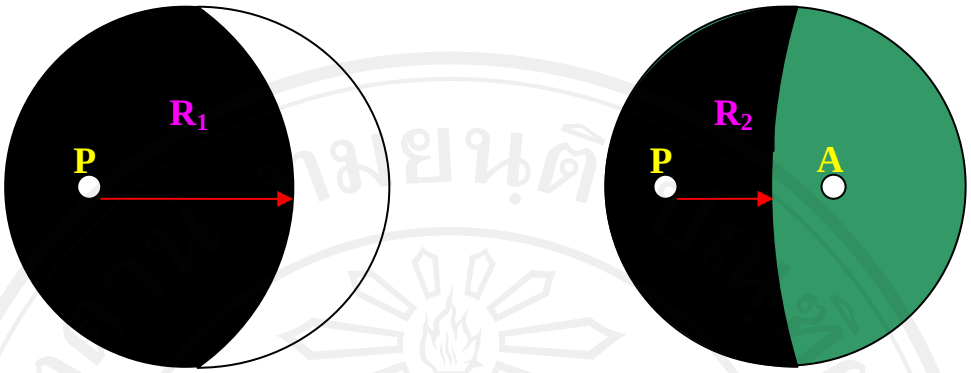
> 75 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (very high antagonists activity)

61-75 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง (high antagonists activity)

51-60 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (moderate antagonists activity)

< 50 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ (low antagonists activity)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




**ชุดควบคุม** **ชุดทดสอบ**

P = เชื้อราสาเหตุ (*M. phaseolina*)

A = เชื้อราปฏิปักษ์ (*Trichoderma* spp.)

$R_1$= รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุในจานชุดควบคุม

$R_2$= รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุด้านที่เจริญไปทางเชื้อราปฏิปักษ์

**ภาพ 4 การวางเชื้อราสาเหตุและรัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยวิธี dual culture**

**3.2 ศึกษาการยับยั้งการเจริญและการเข้าทำลายของเชื้อรา *M. phaseolina* โดยเชื้อราปฏิปักษ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์**

ทดสอบโดยวิธี slide dual culture โดยนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 และวางยางรัดบนกระดาษกรองและวางแผ่นสไลด์สะอาดบนยางรัด นำชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 5 × 5 มิลลิเมตร วางกลางแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ ใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นเชื้อรา *M. phaseolina* แตะที่ขอบข้างชิ้นวุ้นอาหาร PDA แล้วใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นเชื้อราปฏิปักษ์ที่ขอบด้านข้างของชิ้นวุ้นในด้านตรงกันข้ามที่ได้แตะเชื้อ *M. phaseolina* ไว้ ให้ความชื้นแก่จานอาหารด้วยการหยดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อให้กระดาษกรองชื้นและปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อรักษาความชื้น เมื่อเชื้อราปฏิปักษ์เจริญคลุมเชื้อรา *M. phaseolina* ปิดด้วย cover glass แล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจดูลักษณะเส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งและการเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุโรค

**3.3 การศึกษาผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการเข้าทำลายเมล็ด ความงอกของเมล็ดและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในระยะต้นอ่อนของถั่วเขียวผิวดำ**

นำเชื้อราปฏิปักษ์มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหาร PDA จากนั้นนำมาทำ spore suspension วัดความเข้มข้นโดยใช้ Haemacytometer ให้ได้ความเข้มข้น $10^6$-$10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเมล็ดถั่วเขียวผิวดำพันธุ์พิษณุโลก 2 มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย sodium hypochlorite เข้มข้น 1 % นาน 2-3 นาทีแล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ด มาแช่ลงใน spore suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์แต่ละชนิดนาน 1 ชั่วโมง ผึ่งเมล็ดให้แห้งบนกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อนาน 12 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบ จากนั้นนำเมล็ดไปปลูกในถาดหลุมขนาด 104 หลุมซึ่งบรรจุดินที่ผสม inoculum ของเชื้อรา *M. phaseolina* โดยแต่ละกรรมวิธีแบ่งเป็น 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยในแต่ละกรรมวิธีมีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม หรือ control (ไม่ปลูกเชื้อ)
กรรมวิธีที่ 2 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*)
กรรมวิธีที่ 3 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*) + เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* I 103
กรรมวิธีที่ 4 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*) + เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum*
กรรมวิธีที่ 5 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*) + เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma virens* I G10
กรรมวิธีที่ 6 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*) + เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma virens* I G2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกโผล่พ้นดิน การตายก่อนงอก การตายหลังงอกและต้นอ่อนผิดปกติเมื่อต้นอ่อนอายุได้ 7 และ 14 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อต้นอ่อนถั่วเขียวผิวดำอายุครบ 14 วันแล้วนำมาวัดความยาวลำต้น ความยาวราก ชั่งน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง จากต้นอ่อนถั่วเขียวผิวดำกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 25 ต้น การชั่งน้ำหนักสดทำโดยนำต้นอ่อนถั่วเขียวผิวดำมาล้างทำความสะอาดแล้วนำไปผึ่งไว้ประมาณ 30 นาที จึงนำมาชั่งน้ำหนัก ส่วนการชั่งน้ำหนักแห้ง โดยนำต้น

อ่อนถั่วเขียวผิวดำที่ผ่านการชั่งน้ำหนักสดมาอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จึงบันทึกผลน้ำหนักแห้งที่ได้ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ และนำค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีต่างๆมาเปรียบเทียบโดยวิธี LSD

**4. การศึกษาประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในการควบคุมเชื้อรา *Macrophomina phaseolina***

**4.1 การทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *M. phaseolina* บนอาหาร PDA**

สารกำจัดเชื้อราที่ใช้ในการทดลองมี 5 ชนิด ได้แก่ benomyl (Benlate OD), captan (Orthocide 50), metalaxyl (Apron 35), mancozeb + metalaxyl (Ridomil MZ 72) และ thiram (Thysan)

| ชื่อสามัญ | ชื่อการค้า | สารออกฤทธิ์ |
|---|---|---|
| 1. benomyl | Benlate OD | ODmethyl -1- (butyl carbomoyl) -2-benzimidazole-2- ylcarbamate 50 % WP |
| 2. captan | Orthocide 50 | N-(trichloromethylthiocyclohex-4-ene-1, 2-dicarboximide 50%WP |
| 3. metalaxyl | Apron 35 | methyl N- (2-methoxyacetyl)- N-(2,6-xylyl- DL-alaninate 35 %DS |
| 4. mancozeb + metalaxyl | Ridomil MZ 72 | metyl N- (2-methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)- DL- alaninate 8 % |
| 5. thiram | Thysan | tetrametylenethiuram disulfide 80 % WP |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อัตราความเข้มข้นกำหนดไว้ 3 อัตรา คือ ต่ำกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า อัตราแนะนำตามฉลาก และสูงกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า ดังนี้

| | ระดับความเข้มข้น (ppm) | | |
|---|---|---|---|
| 1. benomyl | 250 | 500 | 750 |
| 2. captan | 500 | 1000 | 1500 |
| 3. metalaxyl | 350 | 700 | 1050 |
| 4. mancozeb + metalaxyl | 720 | 1440 | 2160 |
| 5. thiram | 200 | 400 | 600 |

อัตราแนะนำและวิธีการคำนวณสารกำจัดเชื้อราแต่ละความเข้มข้นของ stock solution แสดงในภาคผนวก นำ stock solution ของสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 15 มิลลิลิตรผสมกับอาหาร PDA ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตร 150 มิลลิลิตร และหลอมจนกระทั่งอาหารอุ่นและยังไม่แข็งตัว ผสมให้เข้ากันจากนั้นเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อรา *M. phaseolina* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 4 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นโดยรอบ ใช้ เข็มเขี่ยลนไฟแตะชิ้นวุ้นวางคว่ำลงบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดในแต่ละความเข้มข้น ส่วนชุดควบคุมใช้อาหาร PDA แต่ละกรรมวิธีทำ 6 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ Split plot design in CRD วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีทุกวันเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางชิ้น inoculum บนอาหาร PDA ปกติจนกว่าชุดควบคุมจะเจริญเต็มจานอาหาร จากนั้นนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยสารกำจัดเชื้อรา โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{การยับยั้ง (\%)} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม-เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดทดสอบ}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

นำข้อมูลของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแต่ละซ้ำนำไปวิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีต่างๆ โดยวิธี LSD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**4.2 การศึกษาผลของสารป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการเข้าทำลายเมล็ด ความงอกของเมล็ดและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในระยะต้นอ่อน**

สุ่มเมล็ดถั่วเขียวผิวดำพันธุ์พิษณุโลก 2 มาคลุกสารกำจัดเชื้อรา โดยใช้สารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดในอัตรา 3 กรัม/เมล็ด 1 กิโลกรัมด้วยวิธี คลุกแบบแห้ง (dust treatment) โดยนำเมล็ดใส่ในถุงพลาสติก เทสารกำจัดเชื้อราที่ชั่งแล้วตามอัตราส่วนข้างต้นลงในถุงพลาสติกรวบปากถุงแล้วเขย่าถุงให้เมล็ดคลุกเคล้ากับสารทั่วทุกเมล็ด สำหรับชุดควบคุมไม่คลุกสารเคมีใดๆ แต่ละกรรมวิธีใช้ 400 เมล็ด ทำทั้งหมด 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จากนั้นนำเมล็ดไปปลูกลงในถาดหลุม ขนาด 104 หลุมซึ่งบรรจุดินที่ผสม inoculum ของเชื้อรา *M. phaseolina* โดยแต่ละกรรมวิธีมีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม หรือ control (ไม่ปลูกเชื้อ)
กรรมวิธีที่ 2 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*)
กรรมวิธีที่ 3 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*) + คลุกสาร benomyl
กรรมวิธีที่ 4 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*) + คลุกสาร captan
กรรมวิธีที่ 5 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*) + คลุกสาร metalaxyl
กรรมวิธีที่ 6 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*) + คลุกสาร mancozeb + metalaxyl
กรรมวิธีที่ 7 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*) + คลุกสาร thiram

บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกโผล่พ้นดิน การตายก่อนงอก การตายหลังงอกและต้นอ่อนผิดปกติเมื่อต้นอ่อนอายุได้ 7 และ 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อต้นอ่อนถั่วเขียวผิวดำอายุครบ 14 วันแล้วนำมาวัดความยาวลำต้น ความยาวราก ชั่งน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งโดยทำการเก็บต้นอ่อนถั่วเขียวผิวดำกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 25 ต้น การชั่งน้ำหนักสดทำโดยนำต้นอ่อนถั่วเขียวผิวดำมาล้างทำความสะอาดแล้วนำไปผึ่งไว้ประมาณ 30 นาที จึงนำมาชั่งน้ำหนัก ส่วนการชั่งน้ำหนักแห้งโดยนำต้นอ่อนถั่วเขียวผิวดำที่ผ่านการชั่งน้ำหนักสดมาอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จึงบันทึกผลน้ำหนักแห้งที่ได้ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีต่างๆ โดยวิธี LSD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**5. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์และสารกำจัดเชื้อราในการควบคุมเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* สาเหตุโรคเน่าดำในสภาพโรงเรือน**

เตรียม inoculum เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.2 มาทดสอบกับเชื้อราปฏิปักษ์และสารกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดจากการทดลองในข้อ 3 และ 4 มาทดสอบในการยับยั้งการเกิดโรคเน่าดำของถั่วเขียวผิวดำในระยะต้นอ่อน โดยนำเมล็ดถั่วเขียวผิวดำพันธุ์พิษณุโลก 2 ปลูกลงในถาดหลุมขนาด 104 หลุม ที่ผสม inoculum ของเชื้อรา *M. phaseolina* โดยแต่ละกรรมวิธีใช้ 400 เมล็ด ทำทั้งหมด 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD การทดลองแบ่งออกเป็น 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่1 ชุดควบคุม หรือ control (ไม่ปลูกเชื้อ)
กรรมวิธีที่2 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*)
กรรมวิธีที่3 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*) + แช่เมล็ดด้วยเชื้อราปฏิปักษ์
กรรมวิธีที่4 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*) + คลุกเชื้อราปฏิปักษ์ลงในดิน (ในอัตรา 1:1)
กรรมวิธีที่5 ชุดปลูกเชื้อสาเหตุ (*M. phaseolina*) + คลุกเมล็ดด้วยสารกำจัดเชื้อรา

บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกโผล่พ้นดิน การตายก่อนงอก การตายหลังงอกและต้นอ่อนผิดปกติเมื่อต้นอ่อนอายุได้ 7 และ 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อต้นอ่อนถั่วเขียวผิวดำอายุครบ 14 วันแล้วนำมาวัดความยาวลำต้น ความยาวราก ชั่งน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง โดยทำการเก็บต้นอ่อนถั่วเขียวผิวดำกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 25 ต้น การชั่งน้ำหนักสดทำโดยนำต้นอ่อนถั่วเขียวผิวดำมาล้างทำความสะอาดแล้วนำไปผึ่งไว้ประมาณ 30 นาที จึงนำมาชั่งน้ำหนัก ส่วนการชั่งน้ำหนักแห้งโดยนำต้นอ่อนถั่วเขียวผิวดำที่ผ่านการชั่งน้ำหนักสดมาอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จึงบันทึกผลน้ำหนักแห้งที่ได้ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีต่างๆ โดยวิธี LSD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved