บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะอาการและการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพด

สำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการของโรคจากแปลงปลูกข้าวโพด (ตาราง 2) และเก็บใบข้าวโพด ที่แสดงอาการ บันทึกอาการลักษณะโรคที่เห็นพร้อมบันทึกภาพ นำตัวอย่างใบข้าวโพดที่เกิดโรคมาแยกเชื้อราสาเหตุโรค โดยใช้วิธีการแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation technique) ตรวจสอบการเจริญของเส้นใยของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เลือกโคโลนีที่มีการเจริญดีนำไปเก็บในรูป paper disc ทำเป็น stock culture สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อสาเหตุโรค

นำเชื้อสาเหตุโรคที่แยกได้จากข้อ 1 จาก stock culture เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 4 วัน จึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดขอบโคโลนี แล้วย้ายชิ้นวุ้นวางตรงจุดกึ่งกลางของจานอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเจริญเต็มจานอาหาร สังเกตลักษณะรูปร่าง สีของโคโลนี ลักษณะของเส้นใย และลักษณะสปอร์ด้วยวิธีการเลี้ยงบนสไลด์ (slide culture technique) โดยตัดชิ้นวุ้นอาหาร PDA ให้มีขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร วางตรงกึ่งกลางสไลด์ แล้วนำสไลด์วางบนแท่งแก้วรูปตัววี ที่วางในจานอาหารที่มีกระดาษทิชชูแล้วบุด้วยกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว หยดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนกระดาษเพื่อให้ความชื้น ใช้เข็มเขี่ยที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อจนร้อนแดง รอให้เย็น จากนั้นย้ายเชื้อราสาเหตุโรคโดยเขี่ยเส้นใยแล้วนำมาแตะบริเวณขอบของชิ้นวุ้นอาหาร PDA จากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 3-4 วัน แล้วศึกษาลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 พื้นที่เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่เกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่

พื้นที่เก็บตัวอย่าง
1. อ. ฝาง จ. เชียงใหม่ (PG)
2. สถานีเกษตรหลวงปางดะ อ.สะเมิง จ. เชียงใหม่ (PD)
3. บ้านห้วยทราย ต. ท่าเหนือ อ. แม่ออน จ. เชียงใหม่ (TN)
4. บริษัทเจียไต๋ ต.หนองควาย อ.หางดง จ.เชียงใหม่ (JT)
5. สถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมเกษตรที่สูงขุนช่างเคี่ยน ต. สุเทพ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ (CK)
6. สถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมเกษตรแม่เหียะ ต. แม่เหียะ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ (MH)
7. บ้านห้วยเป้า ต. ทุ่งข้าวพวง อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่ (S-Hyp)
8. บ้านห้วยเป้า ต.ทุ่งข้าวพวง อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ (Hyp)
9. ต. แม่โจ้ อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ (MJ)
10. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงห้วยลึก ต. ปักโค้ง อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่ (HyL)
11. สถานีวิจัยเกษตรเขตชลประทาน ต. สุเทพ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ (MCC)
12. บ้านมหาพล อ. แม่แตง จ. ชียงใหม่ (MHP)

3. การทดสอบความสามารถของเชื้อในการก่อโรค

ทดสอบความสามารถในการเกิดโรค โดยวิธี Koch's postulation โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการยืนยันว่าเชื้อราที่แยกได้เป็นเชื้อสาเหตุของโรคที่แท้จริง มีขั้นตอนดังนี้ (ภาพ 2)

การเตรียมต้นกล้าข้าวโพด

การเตรียมต้นกล้าข้าวโพด ใช้เมล็ดข้าวโพดหวาน พันธุ์ไฮ-บริกซ์ 3 เริ่มจากฆ่าเชื้อที่ติดมากับเมล็ดข้าวโพด โดยการแช่เมล็ดในโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10% นาน 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง ดัดแปลงตามวิธีการของ Erarakhi *et al.* (2007) ผึ่งลมให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที ภายในตู้เขี่ยเชื้อ นำเมล็ดไปเพาะในกระบะเพาะ เมื่อต้นข้าวโพดมีอายุ 5 วัน ย้ายลงกระถาง จำนวน 3 ต้นต่อกระถาง ดูแลรดน้ำ และใส่ปุ๋ยสม่ำเสมอ เมื่อข้าวโพดมีอายุ 14 วันจึงนำมาทดสอบ

การเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

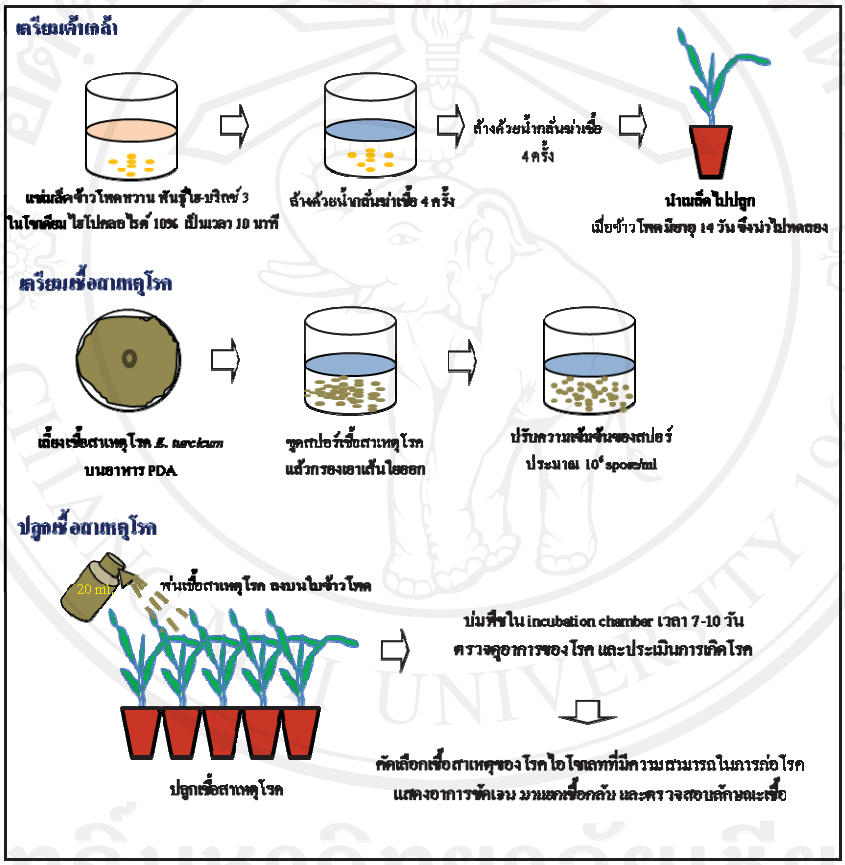
เลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคแต่ละไอโซเลท บนอาหาร PDA ในห้องปฏิบัติการ จนเจริญเต็มจานอาหาร เตรียม spore suspension ของเชื้อสาเหตุโรค โดยเทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่มีเชื้อราเจริญ ใช้สไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้วขูดลงบนเส้นใยของเชื้อให้สปอร์ของเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลุดจากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบางที่สะอาด เพื่อแยกเอาส่วนของเส้นใยที่ติดออก จากนั้นตรวจนับปริมาณสปอร์ด้วย hemacytometer ความเข้มข้นประมาณ 10^6 spore/ml

การปลูกเชื้อสาเหตุโรค

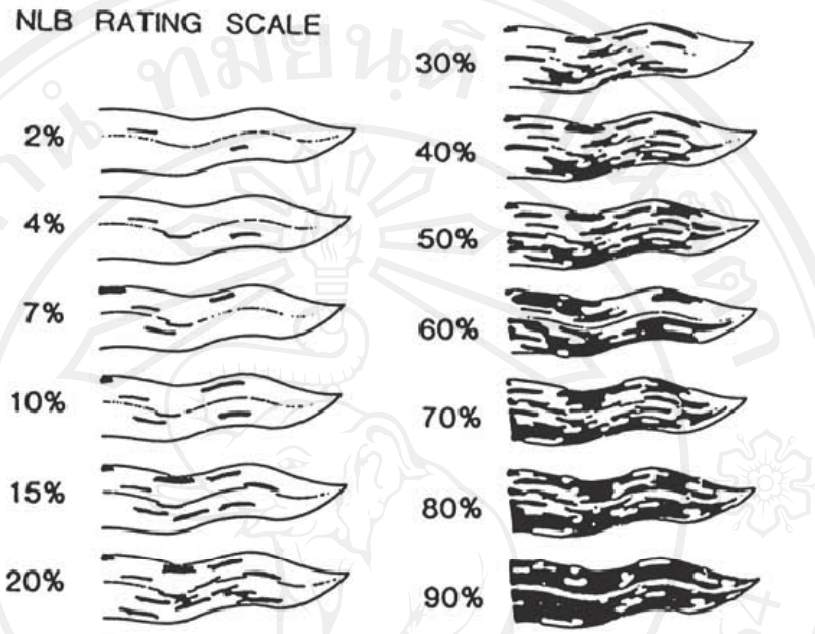
ปลูกเชื้อสาเหตุโรคบริเวณใบข้าวโพด โดยใช้ spore suspension ของเชื้อสาเหตุโรคแต่ละไอโซเลทที่เตรียมไว้ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรผสม Tween 20 จำนวน 4 หยด พ่นบริเวณใบ จากนั้นบ่มใน incubation chamber เวลา 7-10 วัน ตรวจดูอาการของโรคที่เกิดขึ้น



ภาพ 2 การทดสอบความสามารถของเชื้อสาเหตุโรคในการก่อโรค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจดูอาการของโรคดูจากพื้นที่ใบข้าวโพดที่ถูกทำลายหรือเกิดโรคที่พบแต่ละไอโซเลท และประเมินการเกิดโรคตามระดับต่างๆ ดังนี้ (ภาพ 3)



ภาพ 3 ลักษณะอาการของโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพด ที่ระดับความรุนแรงต่างๆ (Pataky, 1992)

ระดับที่ 0 = ไม่แสดงอาการของโรค, แสดงอาการเล็กน้อย
ระดับที่ 1 = ใบแสดงอาการเกิดโรค (ใบไหม้) ประมาณ 1 ใบ (อาการของโรค 2-10 %)
ระดับที่ 2 = ใบแสดงอาการเกิดโรค (ใบไหม้) ประมาณ 2-3 ใบ (อาการของโรค 10-15 %)
ระดับที่ 3 = ใบแสดงอาการเกิดโรค (ใบไหม้) ทุกใบ ยกเว้นส่วนยอด (อาการของโรค 30-40 %)
ระดับที่ 4 = ใบแสดงอาการเกิดโรค (ใบไหม้) ทุกใบ (อาการของโรค 50 %)
ระดับที่ 5 = พืชแสดงอาการเกิดโรค (ใบไหม้) ตายทั้งต้น (อาการของโรค 70-90 %)

จากนั้นคัดเลือกเชื้อสาเหตุของโรคไอโซเลทที่มีความสามารถในการก่อโรค ที่แสดงอาการชัดเจนและมีระดับการเกิดโรคที่สูง นำมาทำการทดลองต่อโดยตัดใบข้าวโพดที่แสดงอาการใบไหม้ที่ชัดเจนขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10% นาน 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อให้แห้ง วางบนจานอาหาร PDA จำนวน 4 จุด ต่อ 1 จาน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 4-5 วัน เมื่อพบเชื้อราเจริญจากชิ้นพืชแล้ว ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

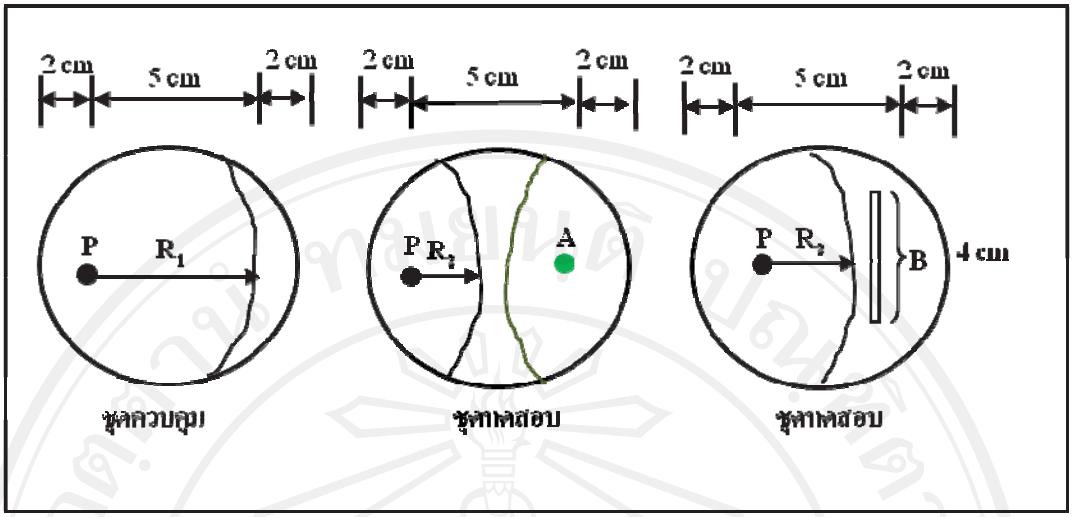
4. การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรค

เชื้อปฏิปักษ์สำหรับใช้ในการทดลองมี 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *T. harzianum* เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *S. phymuthica* (PBRC1) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มูลนิธิโครงการหลวง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ

ทดสอบโดยวิธี dual culture ในจานอาหารขนาด 9 เซนติเมตร โดยเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคบนอาหาร PDA เป็นเวลา 4 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อ จากนั้นย้ายเชื้อสาเหตุโรคลงบนอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบจานอาหาร 2 เซนติเมตร เลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคที่เจริญช้ากว่าเชื้อราปฏิปักษ์ก่อนเป็นเวลา 3 วัน ให้โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตรก่อน เพื่อให้การเจริญของเชื้อทั้งสองมีอัตราการเจริญที่ใกล้เคียงกัน จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อย้ายชิ้นวุ้นของเชื้อรา *T. harzianum* เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และใช้ห่วงถ่ายเชื้อ ที่แตะเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *S. phymuthica* (PBRC1) เลี้ยงบนอาหาร PDA โดยลากยาว 4 เซนติเมตร โดยเลี้ยงเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิดห่างจากจุดศูนย์กลางของเชื้อราสาเหตุโรค 5 เซนติเมตร ในแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง (ภาพ 4) วางแผนการทดลองแบบ Split Plot Design in Completely Randomized Design (CRD) (2 factor) โดยมีปัจจัย 2 ปัจจัย คือ เชื้อสาเหตุโรค 5 ไอโซเลท และเชื้อปฏิปักษ์ 3 ชนิด ทำการทดลอง 5 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคชนิดเดียว บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุมและชุดทดสอบทุกวันจนกว่าเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุมจะเจริญเต็มจานอาหาร และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญตามสูตร (เกษม, 2532 ก) แล้วคัดเลือกเชื้อปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใช้ในการทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 4 การวัดผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค *Exserohilum turcicum* โดยวิธี dual culture (P: pathogen, A: antagonistic fungi (*T. harzianum*), B: antagonistic bacteria (*B. subtilis* and *S. phymuthica* (PBRC1)) R: radial growth of pathogenic fungi)

สูตร คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent Inhibition of Radial: PIRG)

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

R_1= ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2= ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้

>75%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก
>60-75%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
>50-60%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
≤50%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การทดสอบผลของเชื้อปฏิปักษ์ต่อการงอกของสปอร์เชื้อสาเหตุโรค

เตรียม spore suspension ของเชื้อรา *E. turcicum* ความเข้มข้นประมาณ 10^6 spore/ml เตรียมสารกรองอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดัดแปลงตามวิธีการของ ศิรินทิพย์ และจิระเดช (2549) โดยนำโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของเชื้อแบคทีเรีย *S. phymuthica* (PBRC1) อายุ 24 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบน Rotary shaker ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman's No.1 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ความเร็วรอบ 5,000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที แล้วนำมากรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.22 ไมครอน จนได้สารกรองอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate medium)

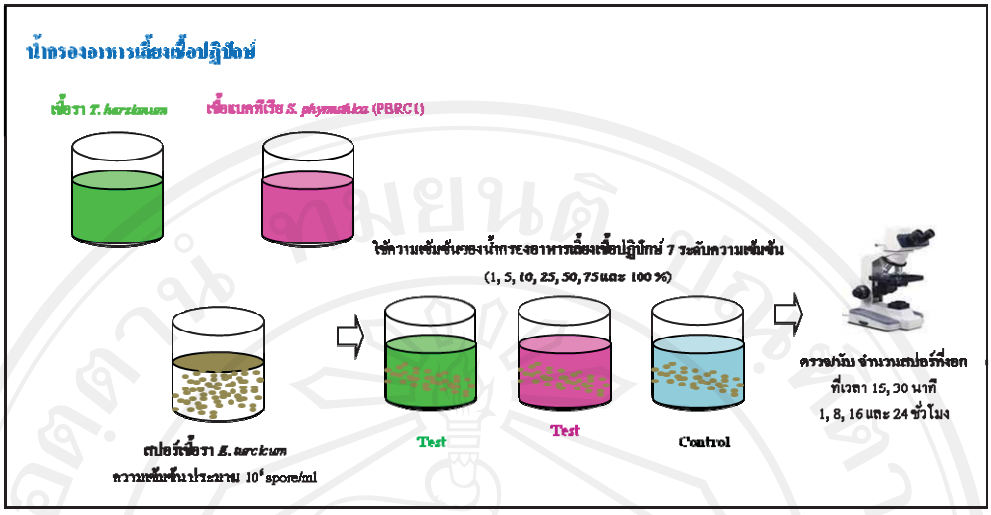
เตรียมสารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* ดัดแปลงตามวิธีการของ พรพรรณ (2543), จิระเดช และวรรณวิไล (2545) นำสปอร์ของเชื้อรา *T. harzianum* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA 200 กรัม ผสมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman's No.1 และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 750 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที นำน้ำส่วนใสด้านบนไปกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน จนได้สารกรองอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำสารกรองอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อปฏิปักษ์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 25, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ spore suspension ของเชื้อสาเหตุโรค แล้วตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคที่งอกที่เวลา 15, 30 นาที 1, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง และคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคตามสูตร เปรียบเทียบการงอกของสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคกับชุดควบคุม โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial Design in CRD มีปัจจัย 2 ปัจจัย ได้แก่ ระดับความเข้มข้นของสารกรองอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อปฏิปักษ์ 2 ชนิด และระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบการงอกของสปอร์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ (ภาพ 5)

สูตร คำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์

$$= \frac{\text{จำนวนสปอร์ที่งอกชุดควบคุม (น้ำกลั่น)} - \text{จำนวนสปอร์ที่งอกชุดทดสอบ}}{\text{จำนวนสปอร์ที่งอกในชุดควบคุม (น้ำกลั่น)}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 5 การทดสอบผลของเชื้อปฏิปักษ์ต่อการงอกของสปอร์เชื้อสาเหตุโรค

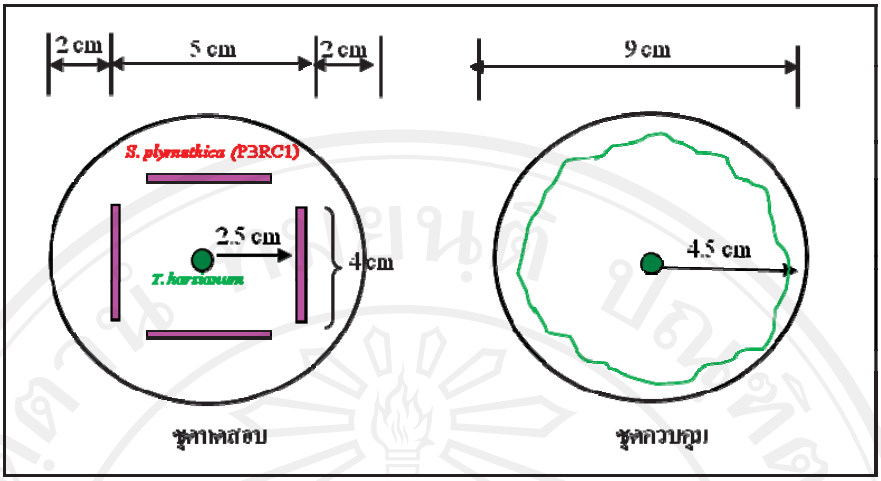
5. การทดสอบการความสามารถในการก่อโรคของเชื้อปฏิปักษ์

นำเมล็ดข้าวโพดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปลูกลงในดินฆ่าเชื้อที่บรรจุลงในกระถางปลูก เมื่อข้าวโพดอายุ 14 วัน พ่น cell suspensionของเชื้อแบคทีเรีย *S. phymuthica* (PBRC1) ที่ความเข้มข้น10^6 cfu/ml และspore suspensionของเชื้อรา *T. harzianum* ที่ความเข้มข้น 10^6 spore/ml บริเวณใบข้าวโพด ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สังเกตอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นบนใบพืชและต้นพืชทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 21 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งรดน้ำด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ หากไม่ปรากฏอาการผิดปกติใดๆ บนใบข้าวโพด จัดว่าเชื้อปฏิปักษ์ชนิดนั้นไม่ก่อโรคต่อพืช

6. การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ระหว่างเชื้อปฏิปักษ์

เลี้ยงแบคทีเรีย *S. phymuthica* (PBRC1) บนอาหาร PDA ก่อนเป็นเวลา 3 วัน โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อลากให้เป็นเส้นตรงยาว 4 เซนติเมตร ห่างจากขอบจานอาหาร 2 เซนติเมตรทั้ง 4 ด้าน จากนั้นนำเชื้อรา *T. harzianum* วางกึ่งกลางจานอาหาร ห่างจากแบคทีเรีย *S. phymuthica* (PBRC1) 2.5 เซนติเมตร (ภาพ 6) วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 5 ซ้ำ เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์ของชุดทดลองกับชุดควบคุมจนเชื้อราปฏิปักษ์เจริญเต็มจานอาหาร และสังเกตความผิดปกติของเชื้อปฏิปักษ์ที่เกิดขึ้นด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 6 ลักษณะการเลี้ยงเชื้อปฏิปักษ์ในการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ระหว่างเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิด

7. การตรวจสอบความมีชีวิตรอดของเชื้อปฏิปักษ์

พ่น spore suspension ของเชื้อรา *T. harzianum* ที่ความเข้มข้น10^6 spore/ml และ cell suspension ของเชื้อแบคทีเรีย *S. phymuthica* (PBRC1) ที่ความเข้มข้น10^6 cfu/ml ลงบนใบข้าวโพด หลังจากที่พ่นเชื้อปฏิปักษ์ เก็บใบข้าวโพดมาตรวจสอบความมีชีวิตรอดของเชื้อ ทุกๆ วัน เป็นเวลา 10 วันโดยนำใบข้าวโพดมาแช่ในนำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำน้ำที่แช่ใบข้าวโพด 500 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร PDA เพื่อแยกเชื้อราปฏิปักษ์ และอาหาร NA เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัววีเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ นับจำนวนเชื้อปฏิปักษ์ที่เจริญ และตรวจสอบลักษณะเชื้อปฏิปักษ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี ในการป้องกัน ควบคุมเชื้อสาเหตุของโรค

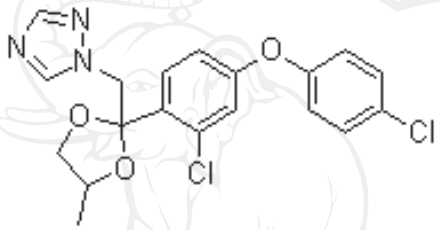
สารเคมีกำจัดเชื้อราที่ใช้ในการทดลองมี 3 ชนิด ได้แก่

1. ชื่อการค้า: Score 250 EC

   ชื่อสามัญ: difenoconazole

   ประเภทสาร: ดูดซึม

   สารออกฤทธิ์สำคัญ: cis-trans-3-chloro-4[4-methyl-2(1H-1, 2, 4-triazol-1ylmethyl)-1, 3-dioxolan-2-ylphenyl-4-chlorophenyl ether 25% W/V EC.



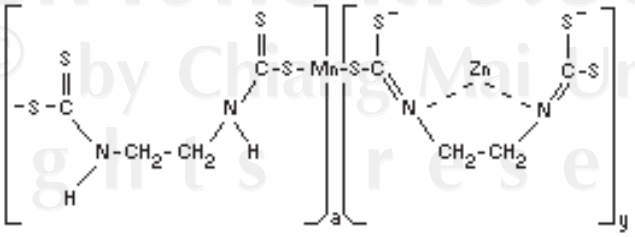
difenoconazole structure

2. ชื่อการค้า: Dithane M-45

ชื่อสามัญ: mancozeb

ประเภทสาร: สัมผัส

สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ: manganese ethylenebis (dithiocarbarmate) polymeric complex with zinc salt 80% WP



mancozeb structure

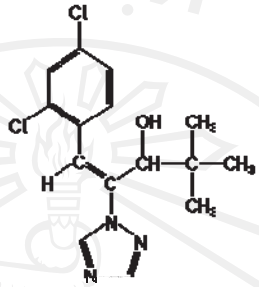
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ชื่อการค้า: Daconil

   ชื่อสามัญ: chlorothalonil

   ประเภทสาร: สัมผัส

   สารออกฤทธิ์สำคัญ: tetrachloroisophthalonitrile 75% WP



chlorothalonil structure

8.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อราในการยับยั้งการเจริญเชื้อสาเหตุของโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ

อัตราความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดเชื้อราที่ใช้มี 3 อัตรา คือ ต่ำกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า, อัตราแนะนำตามฉลาก และสูงกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า (ตาราง 3)

ตาราง 3 อัตราความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

สารกำจัดเชื้อรา	**อัตราความเข้มข้น (ppm)**		
	ต่ำกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า	อัตราแนะนำ	สูงกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า
1. difenoconazole	75	150	225
2. mancozeb	400	800	1,200
3. chlorothalonil	375	750	1,125

นำ stock solution ของสารเคมีกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดแต่ละอัตราความเข้มข้นผสมอาหาร PDA แล้วเลี้ยงเชื้อรา *E. turcicum* เปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ปกติ วางแผนการทดลองแบบ Split Plot Design in CRD (2 factor) โดยมีปัจจัย 2 ปัจจัย คือ เชื้อราสาเหตุ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

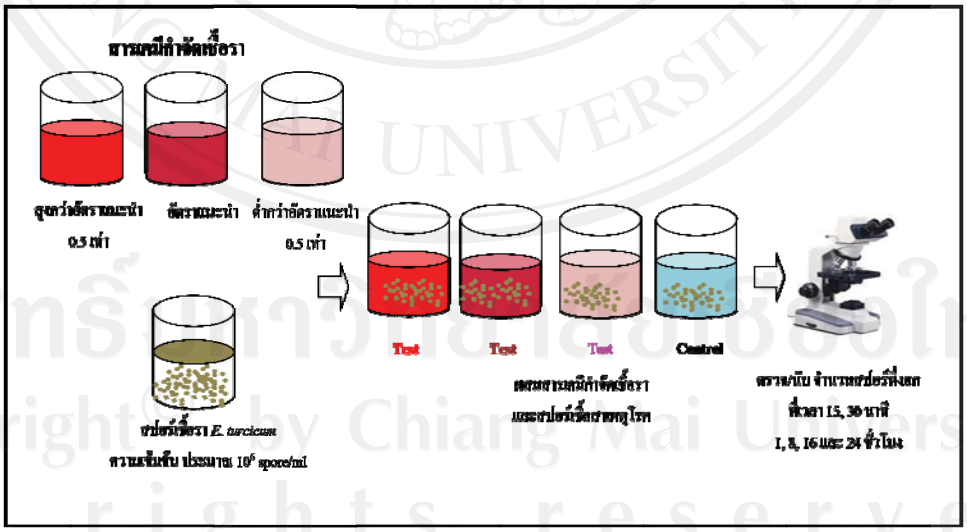
โรค 5 ไอโซเลท และชนิดของสารเคมีกำจัดเชื้อรา 3 ชนิด 3 อัตราความเข้มข้น ทำการทดลอง 5 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัดการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคและคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ

สูตร คำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ

$$= \frac{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางชุดควบคุม-ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางชุดทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางชุดควบคุม}} \times 100$$

8.2 การทดสอบผลของสารเคมีกำจัดเชื้อราต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค

เตรียม spore suspension ของเชื้อรา *E. turcicum* ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^6 spore/ml และสารละลายของสารเคมีกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดตามอัตราความเข้มข้นระดับต่างๆ จากนั้นแช่ spore suspension ของเชื้อรา *E. turcicum* ในสารละลายสารเคมีกำจัดเชื้อรา แล้วตรวจความงอกของสปอร์เชื้อสาเหตุโรค ที่เวลา 15, 30 นาที 1, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อและคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งความงอกของสปอร์ วางแผนการทดลองแบบ Factorial Design in CRD มีปัจจัย 2 ปัจจัย ได้แก่ ระดับความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดเชื้อราทั้ง 3 ชนิด และระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบการงอกของสปอร์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ (ภาพ 7)



ภาพ 7 การทดสอบผลของสารเคมีกำจัดเชื้อราต่อการงอกของสปอร์เชื้อสาเหตุโรค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ ในระยะเวลาที่ต่างกันในการป้องกันและควบคุมการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่ในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธีที่ทำการทดลองมีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ ในการป้องกันโรค

พ่นสารละลายสารเคมีกำจัดเชื้อราแต่ละชนิด แต่ละระดับความเข้มข้น และพ่น spore suspension ของเชื้อรา *T. harzianum* และ cell suspension เชื้อแบคทีเรีย *S. phymuthica* (PBRC1) ที่ผสม Tween 20 ลงบนใบข้าวโพด ที่เวลา 0 3 และ7 วัน จากนั้นพ่น spore suspension ของเชื้อสาเหตุโรค ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^6 spore/ml ลงบนใบข้าวโพด บ่มใน incubation chamber ต่อประมาณ 7-10 วัน แล้วประเมินการเกิดโรค กรรมวิธีในการทดลองมีดังนี้ (ภาพ 8)

กรรมวิธีที่ 1.1 ชุดควบคุมที่ 1 พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ
กรรมวิธีที่ 1.2 ชุดควบคุมที่ 2 พ่น spore suspension ของเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 1.3 พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา mancozeb 400 ppm +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 1.4 พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา mancozeb 800 ppm +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 1.5 พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา mancozeb 1,200 ppm +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 1.6 พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา chlorothalonil 375 ppm +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 1.7 พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา chlorothalonil 750 ppm +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 1.8 พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา chlorothalonil 1,125 ppm +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 1.9 พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา difenoconazole 75 ppm +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 1.10 พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา difenoconazole 150 ppm +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 1.11 พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา difenoconazole 225 ppm +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 1.12 พ่น spore suspension ของเชื้อรา *T. harzianum* ความเข้มข้น10^6 spore/ml + ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 1.13 พ่น cell suspension เชื้อแบคทีเรียแบคทีเรีย *S. phymuthica* (PBRC1) ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค

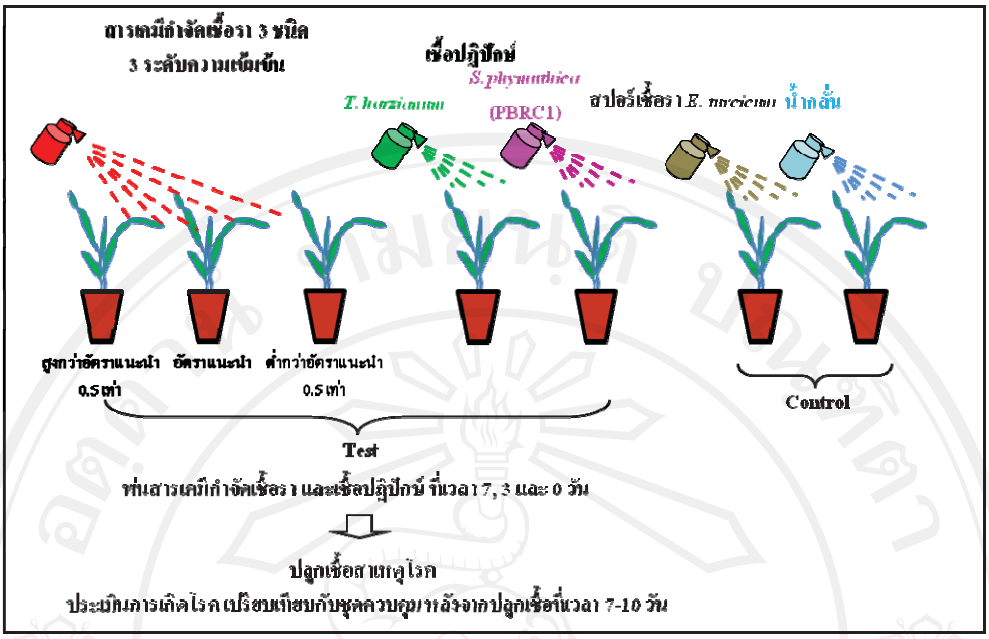
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ ในการยับยั้งการเกิดโรค

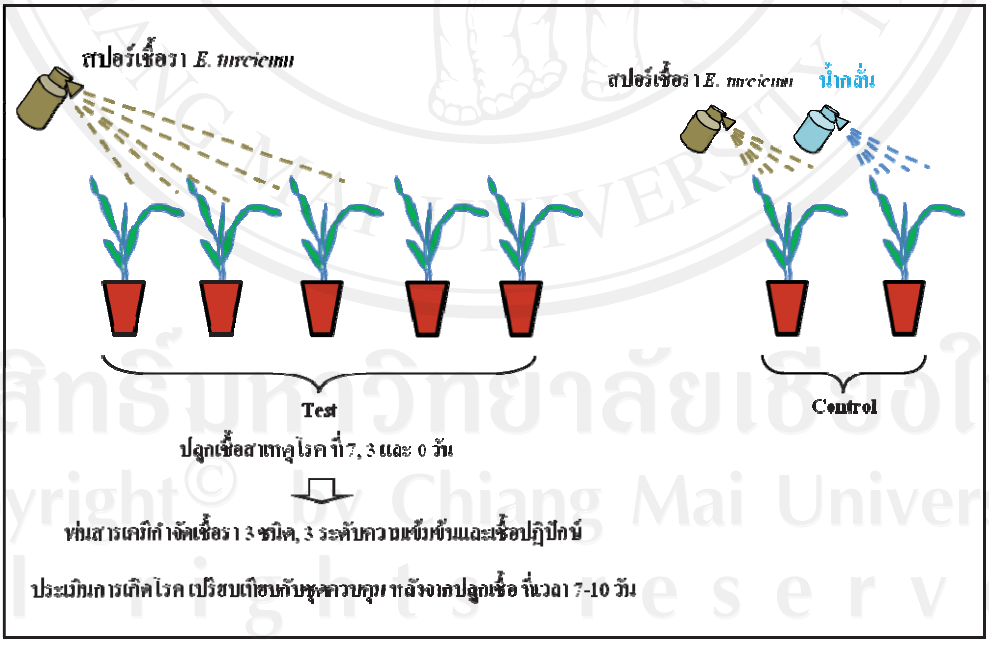
ปลูกเชื้อสาเหตุโรค โดยพ่น spore suspension ของเชื้อสาเหตุโรคที่ความเข้มข้นประมาณ 10^6spore/ml ผสม Tween 20 ลงบนใบข้าวโพด ที่เวลา 0 3 และ7 วัน จากนั้นพ่นสารละลายสารเคมีกำจัดเชื้อราแต่ละชนิด แต่ละระดับความเข้มข้นและพ่น spore suspension ของเชื้อรา *T. harzianum* ที่ความเข้มข้น10^6 spore/ml และ cell suspension ของเชื้อแบคทีเรีย *S. phymuthica* (PBRC1) ที่ความเข้มข้น10^6 cfu/ml และบ่มใน incubation chamber ประมาณ 7-10 วัน แล้วประเมินการเกิดโรค กรรมวิธีในการทดลองมีดังนี้ (ภาพ 9)

กรรมวิธีที่ 2.1 ชุดควบคุมที่ 1 พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ
กรรมวิธีที่ 2.2. ชุดควบคุมที่ 2 พ่น spore suspension ของเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 2.3 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค +พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา mancozeb 400 ppm
กรรมวิธีที่ 2.4 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค +พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา mancozeb 800 ppm
กรรมวิธีที่ 2.5 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค +พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา mancozeb 1,200 ppm
กรรมวิธีที่ 2.6 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค +พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา chlorothalonil 375 ppm
กรรมวิธีที่ 2.7 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค +พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา chlorothalonil 750 ppm
กรรมวิธีที่ 2.8 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค +พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา chlorothalonil 1,125 ppm
กรรมวิธีที่ 2.9 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค +พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา difenoconazole 75 ppm
กรรมวิธีที่ 2.10 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค +พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา difenoconazole 150 ppm
กรรมวิธีที่ 2.11 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค +พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา difenoconazole 225 ppm
กรรมวิธีที่ 2.12 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค +พ่น spore suspension ของเชื้อรา *T. harzianum* ความเข้มข้น 10^6 spore/ml
กรรมวิธีที่ 2.13 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค +พ่น cell suspension เชื้อแบคทีเรีย *S. phymuthica* (PBRC1) ความเข้มข้น10^6 cfu/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 8 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ ในการป้องกันโรค



ภาพ 9 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ ในการยับยั้งการเกิดโรค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประเมินการเกิดโรคของทั้งสองกรรมวิธี โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อและพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อราสาเหตุโรคเพียงชนิดเดียว ที่เวลา 0 3 และ7 วัน แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคตามกรรมวิธีของ สืบศักดิ์ (2540) และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรค วางแผนการทดลองแบบ Spilt Spilt Plot Design in Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยมีปัจจัยในการทดลอง 3 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 วิธีการพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ให้กับพืช 2 แบบ คือการพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุโรคลงบนพืช และการพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาที่พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ ลงบนพืช 3 เวลา คือ พ่นที่ระยะเวลา 0, 3 และ7 วัน ปัจจัยที่ 3 คือสารเคมีกำจัดเชื้อราทั้ง 3 ชนิด 3 อัตราและเชื้อปฏิปักษ์ 2 ชนิด การทดลองละ 5 ซ้ำ

$$\text{สูตร เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคในชุดทดสอบ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่ม}} \times 100$$

สูตร เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรค

$$= \frac{\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคชุดควบคุม (เชื้อสาเหตุโรค)} - \text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคชุดทดสอบ}}{\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคชุดควบคุม (เชื้อสาเหตุโรค)}} \times 100$$

10. การทดสอบการป้องกันโรคโดยสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ในสภาพแปลงทดลอง

นำสารเคมีกำจัดเชื้อรา อัตราความเข้มข้นของสารเคมี เชื้อปฏิปักษ์ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการป้องกันและควบคุมการเกิดโรค ที่คัดเลือกจากสภาพห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองแล้วมาทดสอบการป้องกันการเกิดโรคในสภาพแปลงทดลอง โดยเปรียบเทียบการเกิดโรคกับชุดควบคุมที่พ่นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อและเชื้อราสาเหตุโรคเพียงชนิดเดียว (ภาพ 10)

การเตรียมแปลง

ไถพรวนดิน และตากดินประมาณ 7 วัน จากนั้นเตรียมแปลงปลูกข้าวโพดจำนวน 42 แปลง ขนาดของแปลงปลูก กว้าง 2.25 เมตร ยาว 3.52 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลง 100 เซนติเมตร และระยะห่างขอบแปลง 100 เซนติเมตร เตรียมหลุมสำหรับหยอดเมล็ดระยะห่างระหว่างหลุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

25 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างแถว 75 เซนติเมตร จากนั้นรองก้นหลุมด้วยสารเคมีกำจัดแมลง สตาร์เกิล จี อัตรา 1-2 กรัมต่อหลุม และปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 อัตรา 3 กรัมต่อหลุม

การปลูกข้าวโพด

ปลูกข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮ-บริกซ์ 3 ในแปลงปลูก จำนวน 3 แถว แถวละ 12 ต้น หยอดเมล็ดข้าวโพดในหลุมปลูก หลุมละ 2 เมล็ด ดูแลรดน้ำสม่ำเสมอ เมื่อต้นข้าวโพดมีอายุประมาณ 7 วัน ถอนต้นข้าวโพดออกให้เหลือหลุมละ 1 ต้น เมื่อต้นข้าวโพดมีอายุ 20 วัน ใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 โดยใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 อัตรา 3 กรัมต่อต้นและกลบโคนต้นข้าวโพดและกำจัดวัชพืช หลังจากนั้นเป็นเวลา 3 วัน (ข้าวโพดอายุ 23 วัน) จึงทำการทดลอง

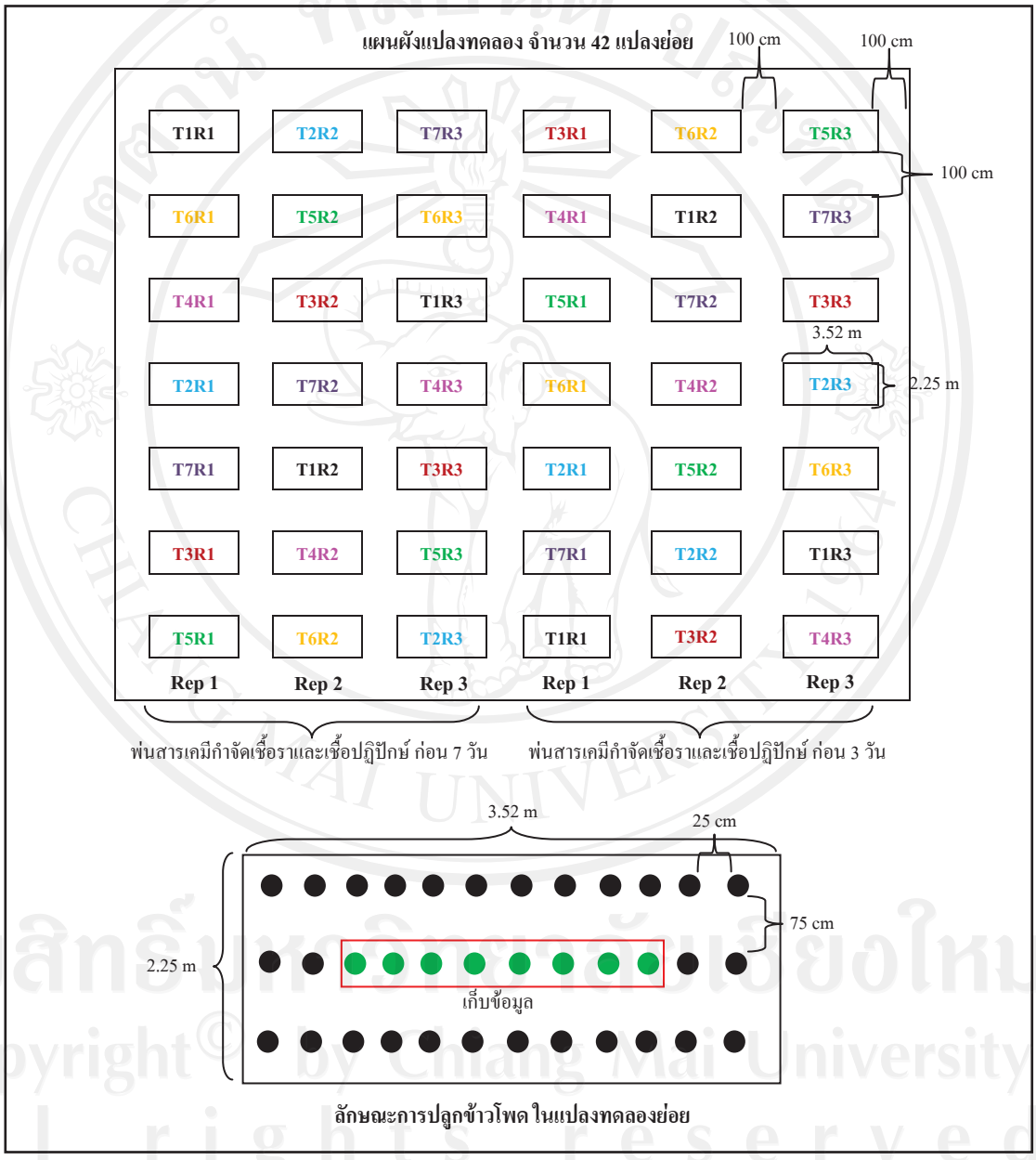
โดยพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ที่ผสม Tween 20 ลงบนใบข้าวโพดเป็นเวลา 37 วัน ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุโรค ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Split Plot Design in RCBD มีปัจจัย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 การพ่นสารสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ให้กับพืชก่อนปลูกเชื้อสาเหตุ ที่เวลา 3 และ 7 วัน ปัจจัยที่ 2 สารเคมีกำจัดเชื้อราทั้ง 3 ชนิด อัตราแนะนำและเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิด จากกนั้นจึงปลูกเชื้อสาเหตุโรค โดยพ่น spore suspension ของเชื้อสาเหตุโรค ความเข้มข้น 10^6 spore/ml และประเมินการเกิดโรค 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 ที่ระยะเวลา 10 วัน และครั้งที่ 2 ที่ระยะเวลา 20 วัน หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค และบันทึกข้อมูล นำข้อมูลมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรค มีวิธีการทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1. พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา mancozeb 800 ppm +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 2. พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา chlorothalonil 750 ppm +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 3. พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา difenoconazole 150 ppm +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 4. พ่น cell suspension เชื้อแบคทีเรีย *S. phymuthica* (PBRC1) ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 5. พ่น spore suspension เชื้อรา *T. harzianum* ความเข้มข้น 10^6 spore/ml +ปลูกเชื้อสาเหตุโรค
กรรมวิธีที่ 6. ชุดควบคุมที่ 1 พ่น spore suspension ของเชื้อสาเหตุโรค ความเข้มข้น 10^6 spore/ml
กรรมวิธีที่ 7. ชุดควบคุมที่ 2 พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และวัดปริมาณคลอโรฟิลด์ (Chlorophyll) ที่พืชสร้างขึ้นทุกกรรมวิธี จากใบข้าวโพด 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ใบล่าง (ใบที่7-8) ใบกลาง (ใบที่ 10-12) และใบบน(ใบที่ 15-16) โดยใช้เครื่องวัดปริมาณคลอโรฟิลด์ Chlorophyll meter SPAD-502 และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ วางแผนการทดลอง

แบบ Spilt Plot Design in RCBD โดยมีปัจจัยในการทดลอง 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 ระยะเวลาที่พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ ลงบนพืช 2 เวลา คือ พ่นที่เวลา 3 และ 7 วัน ปัจจัยที่ 2 คือ เชื้อปฏิปักษ์ 2 ชนิดและสารเคมีกำจัดเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้นในอัตราแนะนำ ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ



ภาพ 10 แผนผังแปลงทดลอง จำนวนแปลงทดลองย่อย และลักษณะการปลูกข้าวโพดในแปลงทดลองย่อย สำหรับการทดสอบการป้องกันโรคโดยสารเคมีกำจัดเชื้อราและเชื้อปฏิปักษ์ในสภาพแปลงทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สถานที่ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการสาขาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. เรือนทดลอง ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มูลนิธิโครงการหลวง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. แปลงทดลอง สถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เดือนเมษายน พ.ศ. 2551- เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved