บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การตรวจหาเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดซิกาโตก้าของกล้วย

3.1.1 การเก็บตัวอย่างใบกล้วยที่แสดงอาการใบจุด

การเก็บตัวอย่างใบกล้วยที่แสดงอาการใบจุดในแปลงปลูกและในเขตภาคเหนือตอนบน (เชียงใหม่ แพร่ เชียงราย และ น่าน) โดยทำการบันทึกลักษณะอาการของโรคที่ปรากฏอย่างละเอียด และนำตัวอย่างใบกล้วยไปศึกษาในห้องปฏิบัติการ

3.1.2 การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดซิกาโตก้า

3.1.2.1 การจัดจำแนกชนิดเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

ตัดชิ้นพืชบริเวณที่เป็นแผลวางในจานอาหารที่มีกระดาษกรองชุ่มน้ำเพื่อกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา หลังจาก 24 ชั่วโมงทำการตรวจหาโครงสร้างของเชื้อราบนบริเวณเนื้อเยื่อพืชที่เป็นแผลภายใต้กล้อง stereo microscope ทั้งด้านหน้าและด้านหลังของใบพืช ทำการสะกิดโครงสร้างเชื้อราวางบนสไลด์ที่มี lactic acid เป็น mounting solution จากนั้นปิดทับด้วย cover slip ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งวัดขนาดของโครงสร้างต่างๆ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า บันทึกข้อมูลที่ปรากฏอย่างละเอียด เพื่อให้ทราบลักษณะของเชื้อราในเบื้องต้นและเลือกวิธีแยกเชื้อที่เหมาะสม คือ

วิธีที่ 1 กรณีพบโครงสร้าง ascomata ของเชื้อราฝังอยู่ใต้เนื้อเยื่อพืช (immersed หรือ semi-immersed) และมีถุง ascus ที่บรรจุ ascospore อยู่ภายใน จะใช้วิธีของ Crous (1998) เพื่อให้เชื้อราปลดปล่อยสปอร์โดยการยิงสปอร์ออกมาทางช่องเปิดของ ascomata ที่เรียกว่า ostiole โดยตัดชิ้นพืชบริเวณแผลที่พบ ascomata เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 5x4 มิลลิเมตร แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางบนใต้ฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่วนฐานมีอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) หรือ Malt Extract Agar (MEA) จานละ 5 ชิ้น ปิดส่วนฝากับส่วนฐานจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจดูการยิงสปอร์ของเชื้อลงบนอาหารภายใต้กล้อง stereo microscope และดูการงอก (germination) ของสปอร์โดยเขี่ยชิ้นวุ้นที่มีสปอร์มาวางลงบนสไลด์ที่มี lactic acid เป็น mounting solution แล้วปิดทับด้วย cover slip และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน หากพบว่ากลุ่มสปอร์ที่งอกมีลักษณะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คล้ายสปอร์ของเชื้อรา *Mycosphaerella* คือเป็นรูปทรงกระสุน สองเซลล์ หัวและท้ายสปอร์เรียว และไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น จึงทำการย้ายสปอร์ที่งอกจากอาหารเลี้ยงเชื้อทีละสปอร์ (single spore isolation) ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ใหม่ เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 สัปดาห์ เมื่อเชื้อราเจริญจนมีขนาดโคโลนีกว้างประมาณ 2 เซนติเมตร จึงแบ่งเก็บใส่หลอดอาหารเอียง (PDA slants) ในการเก็บรักษาเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

วิธีที่ 2 กรณีพบโครงสร้างของเชื้อราในกลุ่ม Hyphomycetes หรือ Coelomycetes ทั้งบนผิวพืช (superficial) และในเนื้อเยื่อพืช (ไม่พบถุง ascus) จะทำการแยกตามวิธีของ Crous and Mourichon (2002) โดยใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทำการเขี่ยกลุ่มสปอร์ (conidium) ที่เจริญอยู่บนผิวพืช (ทำภายใต้กล้องสเตอริโอ) ไปวางลงบนหยดน้ำกลั่นที่เตรียมไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเกลี่ยกลุ่มสปอร์ให้ทั่วโดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล จากนั้นคว่ำจานอาหารให้ด้านฝาหงายอยู่ด้านล่าง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์ ตามลำดับ หากพบว่าสปอร์ของเชื้อรางอกจึงทำการย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ เช่นเดียวกับวิธีที่ 1 และบันทึกลักษณะการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแต่ละชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 1 เดือน ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี สีและลักษณะของเส้นใย รวมทั้งขนาดของสปอร์ที่สร้างบนอาหารเพื่อใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อราต่อไป

3.1.2.2 การจัดจำแนกชนิดเชื้อราโดยอาศัยเทคนิคทางโมเลกุล (Molecular technique)

การจัดจำแนกเชื้อราจีนัส Mycosphaerella (teleomorph) และเชื้อราในกลุ่ม Cercosporoid (anamorph) ในระดับสปีชีส์ทำได้ยากเนื่องจากเชื้อรากลุ่มดังกล่าวมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันมากจึงนำเทคนิคทางอณูโมเลกุลมาใช้ร่วมในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อรากลุ่มดังกล่าว โดยได้จัดส่งตัวอย่างเชื้อราที่มีลักษณะคล้ายเชื้อราในจีนัส Mycosphaerella และกลุ่ม Cercosporoid ที่แยกได้จากใบกล้วยที่แสดงอาการใบจุด จำนวน 9 ไอโซเลท (YSD 1, YSD 2, YSD 4, YSD 5, YSD 6, YSD 7, YSD 9, YSD 10 และ YSD 11) ไปยังสถาบัน Centraalbureau voor Schimmelcultures (Fungal Diversity Center) ประเทศเนเธอร์แลนด์ เพื่อทำการวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางโมเลกุล คือ หาและเปรียบเทียบการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ในบางส่วนของสายพันธุกรรม (DNA sequencing) โดยความร่วมมือของ Prof. Dr. Pedro W. Crous ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราและเพิ่มปริมาณตามวิธีที่เสนอใน Cheewangkoon *et al.* (2008) โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนท้ายของ18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1 (ITS1), 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2 (ITS2) และส่วนต้นของ 28S ribosomal

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

RNA gene โดยใช้ไพรเมอร์ V9G (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') (De Hoog and Gerrits van den Ende, 1998) และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.,* 1990) และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของเชื้อราชนิดอื่นใน GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม PAUP 4.0

3.1.3 การพิสูจน์สาเหตุของโรคใบจุดซิกาโตก้าของกล้วย

เลือกเชื้อราไอโซเลท *M. eumusae* (ไอโซเลท YSD 1) ที่แยกได้จากแปลงทดลองกล้วยไข่ในสถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตร ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ที่เกิดการระบาดของโรคใบจุดซิกาโตก้า เพื่อใช้เป็นเชื้อที่ปลูกลงไปบนพืช (inoculums) ในการพิสูจน์โรคในสภาพโรงเรือนทดลอง โดยนำเชื้อราจาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร V-8 เพื่อกระตุ้นการสร้างสปอร์ โดยวิธี spread plate ให้ทั่วบนอาหาร เก็บภายใต้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำเชื้อที่ปลูกลงไปบนพืช (inoculums) ในรูปแบบของ spore suspension โดยเขี่ยกลุ่มสปอร์ใส่ลงในน้ำกลั่น ปรับความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

เตรียมต้นกล้วยไข่พันธุ์ KU2 และ SK อายุประมาณ 2 เดือนเพื่อทำการปลูกเชื้อ คลุมต้นกล้วยด้วยถุงพลาสติกก่อนทำการปลูกเชื้อ 2 วัน เพื่อเพิ่มความชื้นแก่บรรยากาศรอบต้นกล้วยและส่งเสริมให้ปากใบเปิด จากนั้นนำ spore suspension ผสมกับสารจับใบ (Tween 20) 1 หยด โดยเท suspension ของเชื้อราที่ได้ใส่ในกระบอกฉีดพ่นขนาดเล็ก เพื่อเตรียมใช้ในการปลูกเชื้อแบ่งการปลูกเชื้อออกเป็น 8 กรรมวิธี ดังนี้

1. ปลูกเชื้อโดยด้วยการทำแผลด้วยผง carborundum ด้านหน้าใบ และพ่น spore suspension
2. ปลูกเชื้อโดยด้วยการทำแผลด้วยผง carborundum ด้านหลังใบ และพ่น spore suspension
3. ปลูกเชื้อโดยไม่ทำแผล พ่น spore suspension ด้านหน้าใบ
4. ปลูกเชื้อโดยไม่ทำแผล พ่น spore suspension ด้านหลังใบ
5. ชุดควบคุม ทำแผลด้วยผง carborundum ด้านหน้าใบ และพ่นน้ำกลั่น
6. ชุดควบคุม ทำแผลด้วยผง carborundum ด้านหลังใบ และพ่นน้ำกลั่น
7. ชุดควบคุม ไม่ทำแผล และพ่นน้ำกลั่นด้านหน้าใบ
8. ชุดควบคุม ไม่ทำแผล และพ่นน้ำกลั่นด้านหลังใบ

สังเกตอาการและความผิดปกติที่เกิดขึ้นทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 1 เดือน ทำการตรวจหาโครงสร้างของเชื้อราที่สร้างขึ้นบริเวณแผล เปรียบเทียบกับลักษณะของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใบกล้วยครั้งแรก จากนั้นทำการแยกเชื้อและเลี้ยงบนอาหารใหม่เพื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้ออีกครั้งหนึ่ง

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดซิกาโตก้าสีเหลืองของกล้วยไข่ในสภาพห้องปฏิบัติการ

3.2.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรค

สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่ใช้ในการทดลองมี 4 ชนิด คือ โปรพิโคนาโซล 25% EC คาร์เบนดาซิม 50% SC ไดฟีโนโคนาโซล 25% EC และแมนโคเซบ 80% WP โดยทดสอบระดับความเข้มข้น 7 ระดับในแต่ละสารเคมี ดังนี้

1. ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำสูงสุดตามฉลาก
2. ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำกลางตามฉลาก
3. ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำต่ำสุดตามฉลาก
4. ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ของอัตราแนะนำต่ำสุด
5. ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ของอัตราแนะนำต่ำสุด
6. ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ของอัตราแนะนำต่ำสุด
7. ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ของอัตราแนะนำต่ำสุด

อัตราแนะนำของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดและวิธีการคำนวณความเข้มข้นของสารแต่ละความเข้มข้นเพื่อเตรียม stock solutions แสดงในภาคผนวก ก ข้อ 3

เตรียมอาหาร PDA ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราโดยใช้ stock solutions ของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ข้างต้น ใช้ปริมาตรสารเคมีความเข้มข้นละ 1.5 มิลลิลิตร ผสมลงใน PDA ปริมาตร 148.5 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลายรวมปริมาตร 150 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ 20 มิลลิลิตร รอให้อาหารเย็นลงและแข็งตัวเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

เตรียมเชื้อราเพื่อใช้ในการทดสอบโดยย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของ *M. eumusae* (ไอโซเลท YSD 1) จาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อเพิ่มปริมาณโดยการวิธี spread plate ให้ทั่วบนอาหาร เก็บภายใต้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงไปบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ย้ายมาวางตรงตำแหน่งกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละชนิด โดยชุดควบคุม คืออาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารเคมี โดยวางชิ้นวุ้นใน 2 แบบ คือ วางด้านที่มีเชื้อไว้ด้านบน และวางด้านที่มีเชื้อไว้ด้านล่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวน 5 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) บันทึกข้อมูลจำนวนวันที่เชื้อราเริ่มเจริญจนเห็นเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีและลักษณะรูปร่างของโคโลนี วัดขนาดของโคโลนีภายหลังการเลี้ยงเชื้อ 4 สัปดาห์

คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Percent inhibition of radial growth: PIRG) โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

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

เมื่อ R_1 = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนชุดควบคุม

R_2 = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนชุดทดสอบ

วิเคราะห์ข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของแต่ละซ้ำการทดลองและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) โดยใช้โปรแกรม Statistix Version 8

3.2.2 ผลของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการสร้างและการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค

3.2.2.1 ผลของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราเช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยใช้อาหาร V-8 ในการเตรียมแทน PDA และใช้ความเข้มข้นของสารเคมีในการทดสอบ (ภาคผนวก ก ข้อ 3) โดยเลือกความเข้มข้นของสารเคมีสูงสุดในข้อ 2.1 ที่เชื้อราสามารถเจริญบนอาหารได้ ดังนี้

1. ไดฟีโนโคนาโซล 25% EC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ของอัตราแนะนำต่ำสุด
2. คาร์เบนดาซิม 50% SC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ของอัตราแนะนำต่ำสุด
3. แมนโคเซบ 80% WP ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ของอัตราแนะนำต่ำสุด
4. โปรพิโคนาโซล 25% EC ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ของอัตราแนะนำต่ำสุด
5. ชุดควบคุมไม่ผสมสารเคมี

เตรียมเชื้อราเพื่อใช้ในการทดสอบโดยย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของ *M. eumusae* (ไอโซเลท YSD 1) จาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อเพิ่มปริมาณโดยการวิธี spread plate ให้ทั่วบนอาหาร เก็บภายใต้อุณหภูมิห้อง 2 สัปดาห์ จากนั้นขูดเส้นใยของเชื้อรามาบดในโกร่งในน้ำกลั่นปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อให้เส้นใยแตกออกจากกัน ปรับปริมาตรรวมโดยการเติมน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการดูด suspension ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ spread ลงบนอาหาร V-8 ที่ผสมสารเคมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ป้องกันกำจัดเชื้อราข้างต้นให้มีความสม่ำเสมอ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 สัปดาห์ ทำการตรวจสอบการสร้างสปอร์ของเชื้อรา โดยบันทึกการสร้าง ลักษณะ และขนาดของเส้นใยและสปอร์

3.2.2.2 ผลของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค

เตรียมเชื้อราเพื่อใช้ในการทดสอบโดยย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของ *M. eumusae* (ไอโซเลท YSD 1) จาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร V-8 เพื่อกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อราโดยการวิธี spread plate ให้ทั่วบนอาหาร เก็บภายใต้อุณหภูมิห้อง 2 สัปดาห์ จากนั้นเตรียม spore suspension จากสปอร์เชื้อราที่เจริญบนอาหาร V-8 โดยเขี่ยกลุ่มสปอร์ใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็น spore suspension จากนั้นจึงใช้ไมโครปิเปตดูด suspension ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร spread บนอาหาร PDA ที่ผสมสารเคมีป้องกันและกำจัดเชื้อราเพื่อใช้ในการทดสอบการงอกของสปอร์เชื้อรา *M. eumusae* โดยมีความเข้มข้น (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ดังนี้

1. ไดฟีโนโคนาโซล 25% EC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ของอัตราแนะนำต่ำสุด
2. คาร์เบนดาซิม 50% SC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ของอัตราแนะนำต่ำสุด
3. แมนโคเซบ 80% WP ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ของอัตราแนะนำต่ำสุด
4. โปรพิโคนาโซล 25% EC ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ของอัตราแนะนำต่ำสุด
5. ชุดควบคุมไม่ผสมสารเคมี

ทำการทดสอบสารเคมีละ 3 จานอาหาร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบการงอกของสปอร์ โดยแบ่งพื้นที่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละจานออกเป็น 9 ส่วน (2 x 2 เซนติเมตร) สุ่มเลือกพื้นที่เก็บข้อมูล 2 ส่วน ในแต่ละจานอาหาร (รวม 6 ซ้ำในแต่ละสารเคมีป้องกันและกำจัดเชื้อรา) บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เปรียบเทียบในแต่ละความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด

3.3 การศึกษาการเกิดโรคใบจุดซิกาโตก้าในกล้วยไข่ และการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการควบคุมโรคในสภาพแปลงทดลอง

สถานที่ทดลองคือ แปลงทดลองที่สถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ และแปลงทดลองศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแพร่ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ โดยใช้พื้นที่ปลูก 2 งาน และ 1 ไร่ ตามลำดับ ทำการปลูกกล้วยไข่สองสายพันธุ์ คือ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 2 (KU2) และพันธุ์สุโขทัย (พันธุ์พื้นเมือง, SK)

การเตรียมดิน ทำการเก็บตัวอย่างดินในแปลงก่อนปลูกกล้วยไข่เพื่อนำไปวิเคราะห์ธาตุอาหาร และได้ปลูกกล้วยไข่ ที่สถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วันที่ 8 พฤษภาคม พ.ศ. 2552 และ 11 พฤษภาคม พ.ศ. 2553 ที่แปลงทดลองศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแพร่ จังหวัดแพร่ ก่อนปลูกใช้ปุ๋ยหมักรองก้นหลุม ประมาณ 5 กิโลกรัม/ต้น

ระบบการให้น้ำ ให้น้ำกล้วยไข่โดยใช้ระบบน้ำหยด ซึ่งหัวน้ำหยดสามารถจ่ายน้ำได้ในอัตรา 4 ลิตรต่อชั่วโมง ให้น้ำ 3 ครั้งต่อสัปดาห์ ครั้งละประมาณ 6 ชั่วโมง

การกำจัดวัชพืช ทำการตัดหญ้าด้วยเครื่องตัดหญ้า 2 ครั้งต่อเดือน

การตัดใบกล้วย ทำการตัดใบล่างของกล้วยไข่ไปกำจัดนอกแปลงทดลอง

การใส่ปุ๋ย ให้ปุ๋ยโดยการหว่านทางดินตามค่าวิเคราะห์ดิน

3.3.1 การเปรียบเทียบการเกิดโรคใบจุดซิกาโตก้าในกล้วยไข่พันธุ์เกษตรศาสตร์ 2 (KU2) และพันธุ์สุโขทัย (SK) ในแปลงทดลองจังหวัดเชียงใหม่และแพร่

ใช้ใบกล้วยจำนวน 12 ใบต่อต้นในการเก็บข้อมูล โดยนับจากใบที่คลี่ออกแล้วด้านบนลงด้านล่าง 12 ใบ โดยใบกล้วยที่มีพื้นที่ใบที่แสดงอาการของโรคตั้งแต่ 5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปนับว่าในกล้วยนั้นๆ เป็นโรค แปลงทดลองที่จังหวัดเชียงใหม่ใช้พันธุ์ละ 80 ซ้ำ (80 ต้น) และแปลงทดลองที่จังหวัดแพร่ใช้พันธุ์ละ 50 ซ้ำ (50 ต้น) คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่อต้น ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่อต้น} = \frac{\text{จำนวนใบที่เป็นโรคต่อต้น}}{\text{จำนวนใบทั้งหมดต่อต้น (12 ใบ)}} \times 100$$

วิเคราะห์ข้อมูลหาความแตกต่างทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในแต่ละพันธุ์โดยวิธี Least Significant Difference (LSD)

3.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบจุดซิกาโตก้าในกล้วยไข่พันธุ์เกษตรศาสตร์ 2 (KU2) และพันธุ์สุโขทัย (SK) ของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในแปลงทดลองจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดแพร่

3.3.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในแปลงทดลองสถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตร ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

ทำการทดสอบสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 3 ชนิด หรือ 3 กรรมวิธี ซึ่งเมื่อรวมกับชุดควบคุม (control) แล้วมีทั้งหมด 4 กรรมวิธี ในกล้วยไข่พันธุ์เกษตรศาสตร์ 2 (KU2) และพันธุ์สุโขทัย (SK) โดยวางแผนการทดลองแบบ Split Plot Design (ภาพ 3.1) ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 (T1) ชุดควบคุม (control)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 2 (T2) พ่นโปรพิโคนาโซล 25% EC สลับกับแมนโคเซบ 80% WP
กรรมวิธีที่ 3 (T3) พ่นคาร์เบนดาซิม 50% SC สลับกับแมนโคเซบ 80% WP
กรรมวิธีที่ 4 (T4) พ่นแมนโคเซบ 80% WP

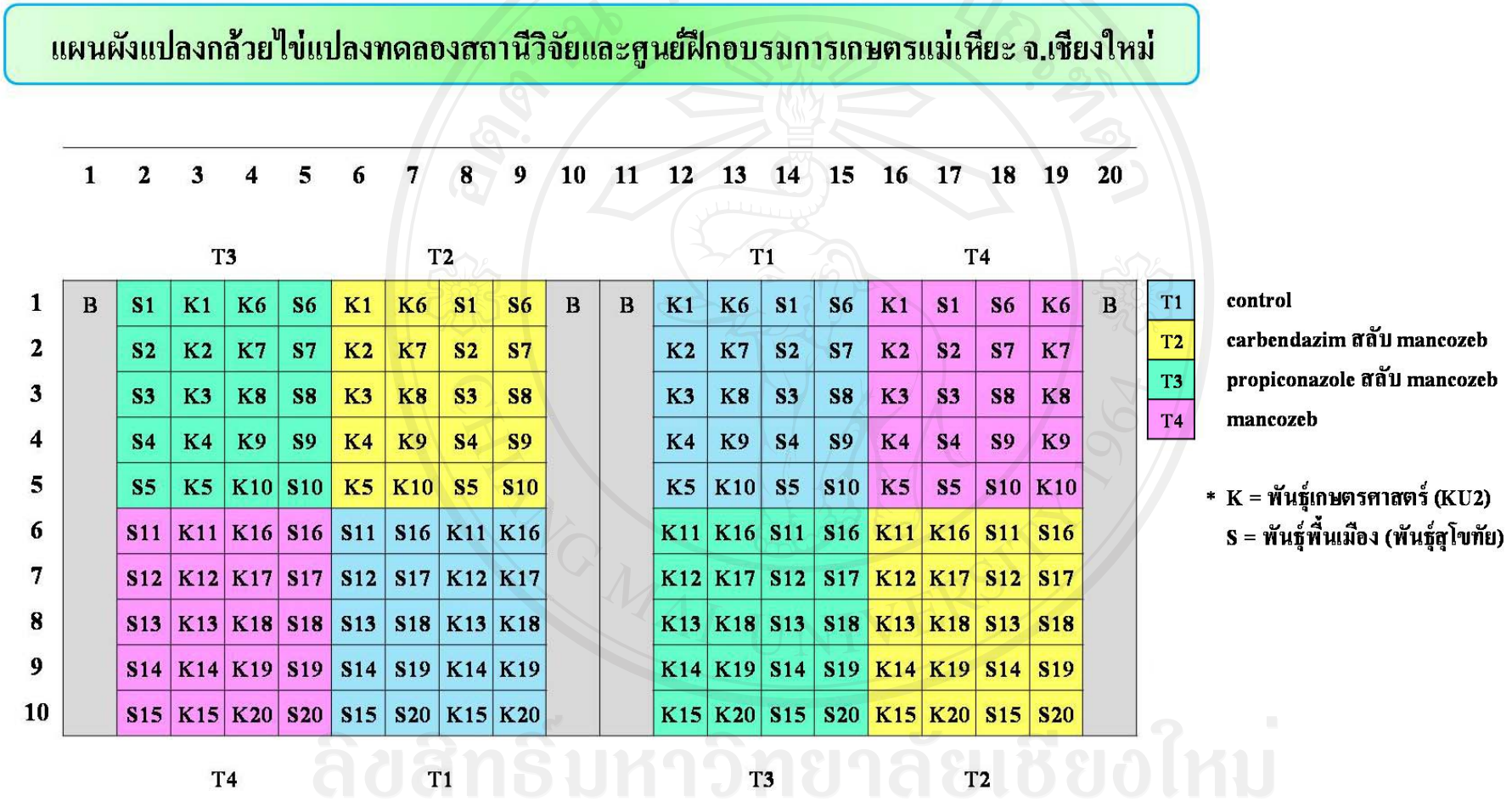
การฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราใช้อัตราแนะนำบนฉลากสูงสุด โดยแต่ละกรรมวิธีใช้ต้นกล้วยไข่จำนวน 20 ต้น ฉีดพ่นทุก ๆ 7 วัน ติดต่อกัน 4 ครั้ง โดยทำการพ่นสารกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึม (systemic fungicide) ซึ่งได้แก่ โปรพิโคนาโซล 25% EC และคาร์เบนดาซิม 50% SC สลับกับแมนโคเซบ 80%WP ซึ่งแมนโคเซบ 80% WP เป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดสัมผัส (contact fungicide) (ตาราง 3.1)

บันทึกข้อมูลโดยการประเมินความรุนแรงของโรคบนใบกล้วยด้วยสายตาก่อนการพ่น และหลังจากพ่นครั้งสุดท้ายไป 7 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่อต้นโดยประเมินพื้นที่ใบที่เป็นโรคต่อพื้นที่ใบทั้งหมดเป็นเปอร์เซ็นต์ (ภาพ 3.2) และบันทึกข้อมูลการเกิดโรคต่อต้นก่อนและหลังจากฉีดพ่นครั้งสุดท้าย คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคดังอธิบายในข้อ 3.3.1 วิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์โดยวิธี Least Significant Difference (LSD)

ตาราง 3.1 กรรมวิธีในการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในแปลงทดลองสถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตร ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

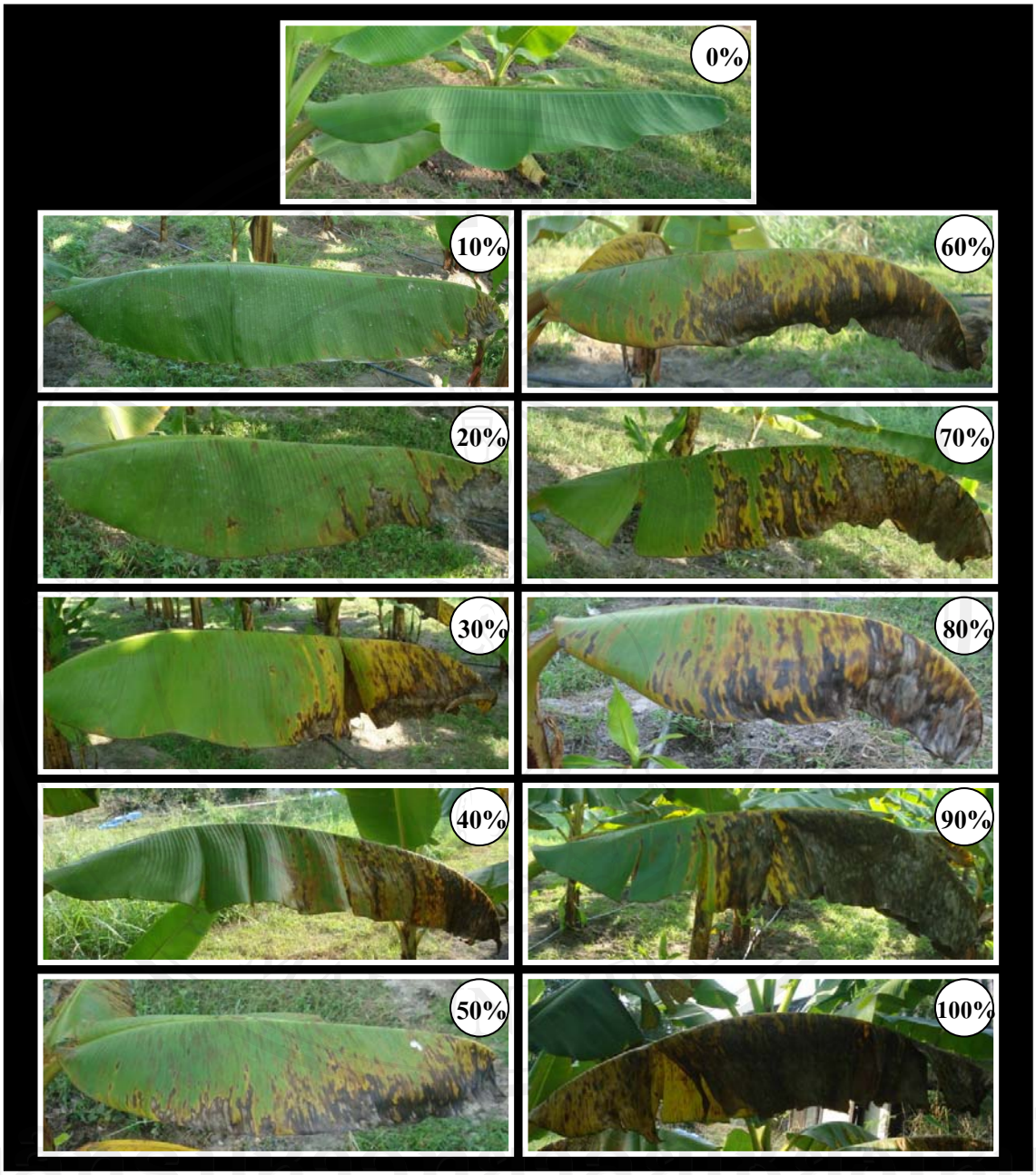
กรรมวิธีที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4
1	ไม่ฉีดพ่น	ไม่ฉีดพ่น	ไม่ฉีดพ่น	ไม่ฉีดพ่น
2	โปรพิโคนาโซล	แมนโคเซบ	โปรพิโคนาโซล	แมนโคเซบ
3	คาร์เบนดาซิม	แมนโคเซบ	คาร์เบนดาซิม	แมนโคเซบ
4	แมนโคเซบ	แมนโคเซบ	แมนโคเซบ	แมนโคเซบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.1 ผังการทดลองสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดซิกาโตก้า แปลงทดลองสถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.2 การประเมินเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคใบจุดซิกาโตก้าบนใบกล้วย โดยใช้การประเมินพื้นที่ใบที่เป็นโรคต่อพื้นที่ใบทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในแปลงทดลองศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแพร่ ตำบลวังหงษ์ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่

ทำการทดสอบสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 4 ชนิด หรือ 4 กรรมวิธี ซึ่งเมื่อรวมกับชุดควบคุม (control) แล้วมีทั้งหมด 5 กรรมวิธี ในกล้วยไข่พันธุ์เกษตรศาสตร์ 2 (KU2) และพันธุ์สุโขทัย (SK) โดยวางแผนการทดลองแบบ Split Plot Design (ภาพ 3.3) ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 (T1) ชุดควบคุม (control) ไม่ฉีดพ่น
กรรมวิธีที่ 2 (T2) พ่นโปรพิโคนาโซล 25% EC สลับกับ แมนโคเซบ 80% WP
กรรมวิธีที่ 3 (T3) พ่นคาร์เบนดาซิม 50% SC สลับกับ แมนโคเซบ 80% WP
กรรมวิธีที่ 4 (T4) พ่นไดฟีโนโคนาโซล 25% EC สลับกับ แมนโคเซบ 80% WP
กรรมวิธีที่ 5 (T5) พ่น แมนโคเซบ 80% WP

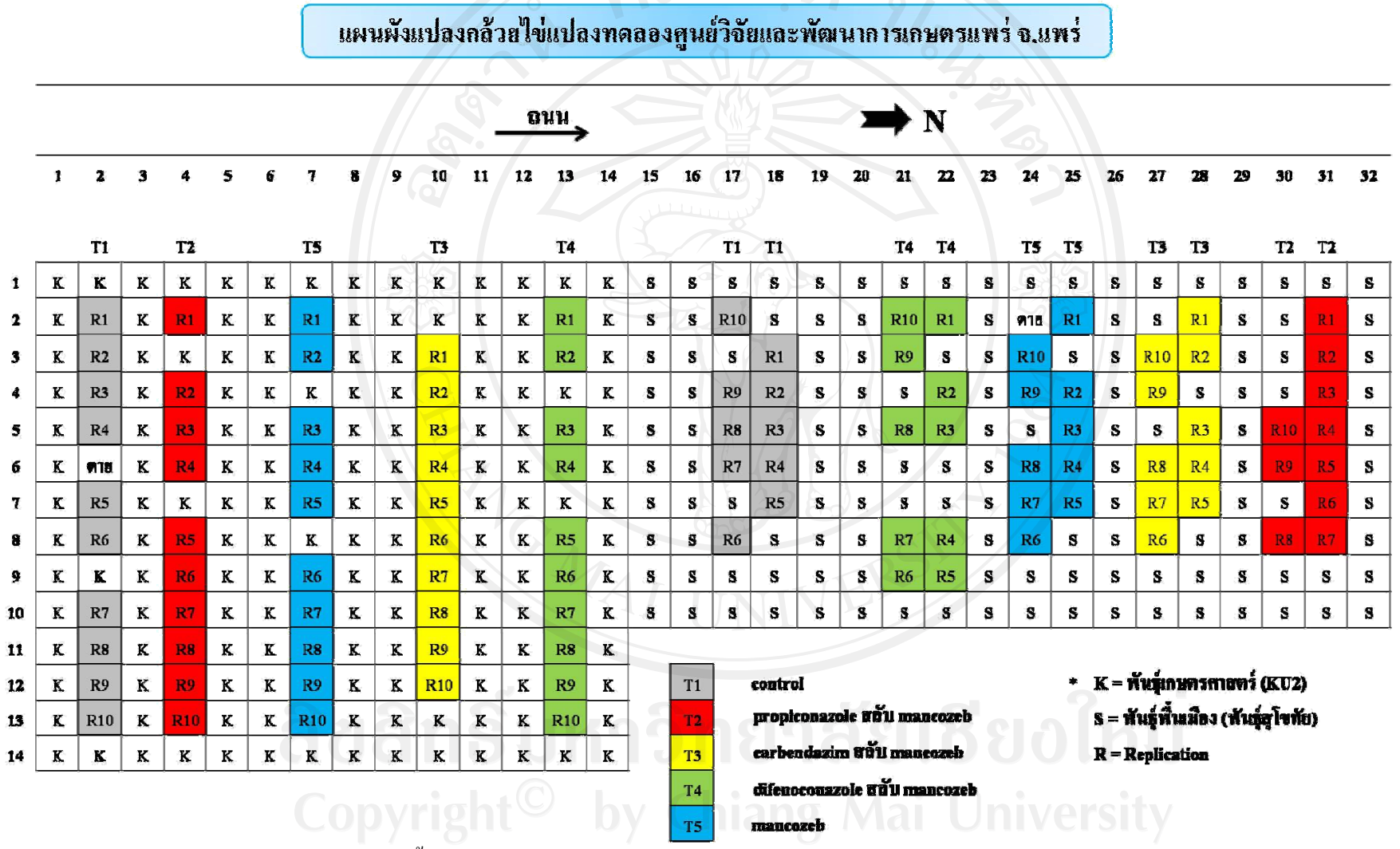
แต่ละกรรมวิธีจะใช้ต้นกล้วยไข่จำนวน 10 ต้น ฉีดพ่นทุกๆ 14 วัน ตามอัตราแนะนำบนฉลากสูงสุด ติดต่อกัน 3 ครั้ง โดยทำการพ่นสารกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึม (systemic fungicide) ซึ่งได้แก่ โปรพิโคนาโซล 25% EC คาร์เบนดาซิม 50% SC และไดฟีโนโคนาโซล 25% EC สลับกับแมนโคเซบ 80% WP ซึ่งเป็นสารกำจัดเชื้อราชนิดสัมผัส (contact fungicide) (ตาราง 3.2)

บันทึกข้อมูลโดยการประเมินความรุนแรงโรคบนใบกล้วยด้วยสายตาก่อนการพ่น และหลังจากพ่นครั้งสุดท้ายไป 7 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่อต้นโดยประเมินพื้นที่ใบที่เป็นโรคต่อพื้นที่ใบทั้งหมดเป็นเปอร์เซ็นต์ (ภาพ 3.2) และข้อมูลการเกิดโรคต่อต้นก่อนและหลังจากฉีดพ่นครั้งสุดท้าย คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคดังอธิบายในข้อ 3.3.1 วิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์โดยวิธี Least Significant Difference (LSD)

ตาราง 3.2 กรรมวิธีในการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในแปลงทดลองศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแพร่ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่

กรรมวิธีที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	ไม่ฉีดพ่น	ไม่ฉีดพ่น	ไม่ฉีดพ่น
2	โปรพิโคนาโซล	แมนโคเซบ	แมนโคเซบ
3	คาร์เบนดาซิม	แมนโคเซบ	แมนโคเซบ
4	ไดฟีโนโคนาโซล	ไดฟีโนโคนาโซล	ไดฟีโนโคนาโซล
5	แมนโคเซบ 80	แมนโคเซบ	แมนโคเซบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.3 ผังการทดลองสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดซิกาโตก้าสีเหลือง แปลงทดลองศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแพร่ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved