

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 โครงการย่อยที่ 1 การปรับปรุงรูปแบบสารชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืชสำคัญบนพื้นที่สูงสำหรับการผลิตในโรงงาน

วิธีการผลิตสารชีวภัณฑ์เชื้อรากำจัดแมลง 2 ชนิด ในรูปแบบผงละลายน้ำเพื่อลดการเกิดคราบบนต้นหลังฉีดพ่นสาร ลดการอุดตันหัวฉีด ลดอัตราการใช้ต่อครั้ง และเพิ่มอายุเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ได้แก่

1) สารชีวภัณฑ์ผงละลายน้ำที่ผลิตจากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท 4849 กำจัดหนอนศัตรูพืช

2) สารชีวภัณฑ์ผงละลายน้ำที่ผลิตจากเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท 5335 กำจัดเพลี้ย โดยสูตรการผลิตต้นแบบสารชีวภัณฑ์ที่คัดเลือกจากปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 สรุปดังนี้

เชื้อราสาเหตุโรคของแมลง	สูตรตำรับที่	ส่วนประกอบต้นแบบสารชีวภัณฑ์ (1 kg)
<i>M. anisopliae</i> ไอโซเลท 4849	5	ทิลคัม 600 g และ guar gum 100 g
	8	20% spores และ 80% kaolin
	10	แป้งข้าวเจ้า 800 g และ Kaolin 200 g
<i>B. bassiana</i> ไอโซเลท 5335	2	ทิลคัม 900 g, oil palm 60 ml และ น้ำกลั่น 40 ml
	4	Pumice 990 g, oil palm 5 ml น้ำกลั่น 5 ml
	8	20% spores และ 80% kaolin

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 เป็นการดำเนินต่อเนื่อง ประกอบด้วย

กิจกรรมวิจัยที่ 1 ศึกษาผลการปลูกหัวเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลท บนสิ่งอาศัย (host) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดแมลงศัตรูพืช โดยนำสารแขวนลอยเชื้อราความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ฉีดพ่นลงบนแมลงเป้าหมาย อย่างน้อย 10 ตัว แต่ละชุดทดสอบฉีดพ่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสปอร์ที่เจริญบนสิ่งอาศัยมาเลี้ยงจนเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทำซ้ำอย่างน้อย 3 รุ่น หรือจนกว่าเชื้อราจะมีการเจริญเติบโตและสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA) ระยะเวลาไม่เกิน 7 วัน ที่ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 10^{11} สปอร์/มิลลิลิตร รวมทั้งมีประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชเป้าหมาย ไม่ต่ำกว่า 90% หลังฉีดพ่นสารแขวนลอยเชื้อราไม่เกิน 5 วัน ทั้งนี้ต้องดำเนินการภายใต้เทคนิคการกีดกันเชื้อ (aseptic technique) หรือวิธีการอื่นที่

เหมาะสม เพื่อลดความเสี่ยงการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของต้นแบบสารชีวภัณฑ์ 3 สูตร ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช เพื่อศึกษาอายุเก็บรักษาในห้องปฏิบัติการ ณ อุณหภูมิห้อง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD)

1) นำสารละลายสารชีวภัณฑ์เชื้อรา *M. anisopliae* และ *B. bassiana* สาเหตุโรคหนอนกระทุ้ง และเพลี้ย ตามลำดับ ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 10^8 spores/ml ฉีดพ่นที่แมลงศัตรูพืช 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว แต่ละชุดทดสอบฉีดพ่น 1 ml บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงศัตรูพืช หลังฉีดพ่น 3, 5 และ 7 วัน

2) นำผงแต่ละชนิดต้นแบบสารชีวภัณฑ์ 0.1 g ละลายใน Tween 80 ที่ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 1 ml เกลี่ยสารแขวนลอยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ WA บ่มเชื้อ 1 คืน จากนั้นตรวจดูการงอกของสปอร์บนชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 100 spores ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเชื้อรา *M. anisopliae* และ *B. bassiana* ในต้นแบบสารชีวภัณฑ์แต่ละสูตร (spores/g) ระยะหลังเก็บรักษาทุก 2 เดือน

กิจกรรมวิจัยที่ 2 คัดเลือกต้นแบบสารชีวภัณฑ์ 2 สูตร ที่มีแนวโน้มให้ผลดีจากกิจกรรมวิจัยที่ 1 มาศึกษาวิธีการใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ อัตรา และระยะเวลาการใช้

นำสารละลายสารชีวภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นของเชื้อรา *M. anisopliae* และ *B. bassiana* ไม่น้อยกว่า 10^8 spores/ml ฉีดพ่นที่ตัวแมลงศัตรูพืชเป้าหมาย ได้แก่ หนอนกระทุ้งอายุวัย 2 หรือ 3 และเพลี้ยตามลำดับ จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว แต่ละชุดทดสอบฉีดพ่น 1 ml วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) แบ่งเป็น 12 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ฉีดพ่นสาร)

กรรมวิธีที่ 2 สารเคมีการค้า อัตราการใช้ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์

กรรมวิธีที่ 3 สารชีวภัณฑ์การค้า อัตราการใช้ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์

กรรมวิธีที่ 4 สารชีวภัณฑ์จากผลงานวิจัยสูตรเดิม (พีพี-เมทา และ พีพี-เบ็บ)

กรรมวิธีที่ 5 ต้นแบบสารชีวภัณฑ์ ชนิดที่ 1 อัตรา 30 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 6 ต้นแบบสารชีวภัณฑ์ ชนิดที่ 1 อัตรา 50 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 7 ต้นแบบสารชีวภัณฑ์ ชนิดที่ 1 อัตรา 70 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 8 ต้นแบบสารชีวภัณฑ์ ชนิดที่ 1 อัตรา 100 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 9 ต้นแบบสารชีวภัณฑ์ ชนิดที่ 2 อัตรา 30 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 10 ต้นแบบสารชีวภัณฑ์ ชนิดที่ 2 อัตรา 50 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 11 ต้นแบบสารชีวภัณฑ์ ชนิดที่ 2 อัตรา 70 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 12 ต้นแบบสารชีวภัณฑ์ ชนิดที่ 2 อัตรา 100 g/น้ำ 20 l

เปรียบเทียบระยะเวลาการฉีดพ่นทุก 3 และ 7 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงศัตรูพืชเป้าหมาย หลังฉีดพ่น 3, 5 และ 7 วัน

สำหรับวิธีการผลิตสารชีวภัณฑ์เชื้อแอคติโนมัยซิส *Streptomyces* sp. ไอโซเลท GAR 1 ป้องกันโรคโคนเน่ารากเน่าในรูปแบบเม็ดละลายน้ำ จำนวน 1 ชนิด เพื่อเพิ่มการออกฤทธิ์ให้ยาวนาน ลดต้นทุนการผลิต และเพิ่มอายุเก็บรักษา โดยสูตรการผลิตต้นแบบสารชีวภัณฑ์ที่คัดเลือกจากปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 ดังนี้

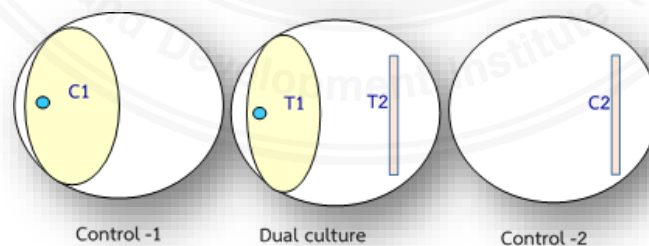
สูตรตำรับที่	ส่วนประกอบต้นแบบสารชีวภัณฑ์ (1 kg)
7	starch 700 g, soybean powder 208 g, glucose 50 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 23 g, K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O 14 g และ NaCl 5 g
9	Citric acid 588 g, PVP 232 g, แป้งข้าวโพด 50 g, talcum powder 100 g, Magnesium stearate 10 g และสารก่อฟองฟู 20 g
12	แป้งทัลคัม 800 g, kaolin 100 g และกลูโคส 100 g

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 เป็นการดำเนินต่อเนื่อง ประกอบด้วย

กิจกรรมวิจัยที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพของต้นแบบชีวภัณฑ์ 3 สูตร ในการป้องกันโรคโคนเน่ารากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* เพื่อศึกษาอายุเก็บรักษาในห้องปฏิบัติการ อนุกรมวิธาน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) 3 ซ้ำ

1) บันทึกปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ (cfu/g) ในต้นแบบสารชีวภัณฑ์ ระยะหลังเก็บรักษาทุกเดือน โดยวิธี drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2

2) ทดสอบความสามารถของต้นแบบสารชีวภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางดิน โดยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 บันทึกเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังการทดสอบ (ขึ้นอยู่กับผลการเจริญของเชื้อ) ตามสูตรการคำนวณของ Mokhtar and Aid (2013)



Percentage of fungal growth inhibition:

$$\text{PIRG} = \frac{C1 - T1}{C1} \times 100$$

C1= Growth of the pathogen in control

C2= Antagonistic bacteria in control

T1= Growth of the pathogen in treatment

T2= Antagonistic bacteria in treatment

กิจกรรมวิจัยที่ 2 คัดเลือกต้นแบบชีวภัณฑ์ 2 สูตร ที่มีแนวโน้มให้ผลดีจากกิจกรรมวิจัยที่ 1 มาศึกษาวิธีการใช้ในห้องปฏิบัติการและโรงเรือนทดสอบ ได้แก่ อัตรา และระยะเวลาการใช้

1) สภาพห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี dual culture และวิธี Poison Food (เฉพาะกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) แบ่งเป็นอย่างน้อย 7 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบอัตราการใช้ เช่น 30 50 และ 70 g/หน่วยวัด บันทึกเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคของแต่ละกรรมวิธี โดยคำนวณตามสูตร (Mokhtar and Aid, 2013) ระยะ 1, 3 และ 5 วัน หรือ 3, 5 และ 7 วัน (ขึ้นอยู่กับผลการเจริญของเชื้อ)

2) สภาพโรงเรือนทดสอบ โดยคัดเลือกปริมาณการใช้ต้นแบบชีวภัณฑ์ที่ให้ผลดีที่สุดในห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 3 อัตรา วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) แบ่งเป็น 32 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ

- | | |
|----------------|---|
| กรรมวิธีที่ 1 | ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อสาเหตุโรค) |
| กรรมวิธีที่ 2 | ชุดควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค) |
| กรรมวิธีที่ 3 | สารเคมีการค้า เมทาแลกซิล อัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร |
| กรรมวิธีที่ 4 | สารชีวภัณฑ์จากผลงานวิจัยสูตรเดิม (พีพี-สเตอริบโต) อัตรา 1 กรัม/ต้น |
| กรรมวิธีที่ 5 | สารชีวภัณฑ์การค้า ไตรซาน อัตรา 150 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร |
| กรรมวิธีที่ 6 | รองก้นหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 7 อัตรา 1 เม็ด/หลุม |
| กรรมวิธีที่ 7 | รองก้นหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 7 อัตรา 2 เม็ด/หลุม |
| กรรมวิธีที่ 8 | รองก้นหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 7 อัตรา 3 เม็ด/หลุม |
| กรรมวิธีที่ 9 | รองก้นหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 7 อัตรา 1 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 7 วัน |
| กรรมวิธีที่ 10 | รองก้นหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 7 อัตรา 2 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 7 วัน |
| กรรมวิธีที่ 11 | รองก้นหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 7 อัตรา 3 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 7 วัน |
| กรรมวิธีที่ 12 | รองก้นหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 7 อัตรา 1 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 14 วัน |
| กรรมวิธีที่ 13 | รองก้นหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 7 อัตรา 2 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 14 วัน |
| กรรมวิธีที่ 14 | รองก้นหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 7 อัตรา 3 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 14 วัน |
| กรรมวิธีที่ 15 | รองก้นหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 9 อัตรา 1 เม็ด/หลุม |
| กรรมวิธีที่ 16 | รองก้นหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 9 อัตรา 2 เม็ด/หลุม |

- กรรมวิธีที่ 17 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 7 อัตรา 3 เม็ด/หลุม
- กรรมวิธีที่ 18 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 9 อัตรา 1 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 7 วัน
- กรรมวิธีที่ 19 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 9 อัตรา 2 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 7 วัน
- กรรมวิธีที่ 20 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 9 อัตรา 3 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 7 วัน
- กรรมวิธีที่ 21 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 9 อัตรา 1 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 14 วัน
- กรรมวิธีที่ 22 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 9 อัตรา 2 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 14 วัน
- กรรมวิธีที่ 23 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 9 อัตรา 3 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 14 วัน
- กรรมวิธีที่ 24 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 12 อัตรา 1 เม็ด/หลุม
- กรรมวิธีที่ 25 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 12 อัตรา 2 เม็ด/หลุม
- กรรมวิธีที่ 26 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 12 อัตรา 3 เม็ด/หลุม
- กรรมวิธีที่ 27 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 12 อัตรา 1 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 7 วัน
- กรรมวิธีที่ 28 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 12 อัตรา 2 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 7 วัน
- กรรมวิธีที่ 29 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 12 อัตรา 3 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 7 วัน
- กรรมวิธีที่ 30 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 12 อัตรา 1 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 14 วัน
- กรรมวิธีที่ 31 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 12 อัตรา 2 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 14 วัน
- กรรมวิธีที่ 32 รองกันหลุมด้วยต้นแบบชีวภัณฑ์สูตร 12 อัตรา 3 เม็ด/หลุม และใช้ซ้ำบริเวณโคนต้น 1 เม็ด หลังย้ายปลูก 14 วัน

บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคทุก 7 และ 14 วัน หลังย้ายปลูก และวัดการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นพืชหลังเสร็จสิ้นการทดสอบ

3.2 โครงการย่อยที่ 2 การเพิ่มประสิทธิภาพและอายุการเก็บรักษาต้นแบบผลิตภัณฑ์ชีวภาพกำจัดวัชพืชชนิดสำคัญบนพื้นที่สูง

กิจกรรมวิจัยที่ 1 คัดเลือกสารเติมแต่งเพื่อรักษาสภาพหรือสารเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์

1) เตรียมต้นแบบผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบจากต้นสาระแหน่ โดยนำต้นสาระแหน่ล้างทำความสะอาดและอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 h จากนั้นสับเป็นชิ้น และใส่ตัวทำละลาย 30% Ethanol ให้ท่วมพืชที่อบแห้ง แช่นาน 7 วัน เมื่อครบเวลาให้กรองชิ้นพืชออก และนำของเหลวที่ได้มาทำให้เข้มข้นโดยเครื่อง Rotary evaporator ที่ 60°C

2) นำสารสกัดที่ได้แยกเติมสารรักษาสภาพหรือสารเพิ่มประสิทธิภาพแต่ละชนิด เช่น วิตามินซี, วิตามินอี, Butylated hydroxytoluene, Beta hydroxy acid, 95% Ethyl alcohol, น้ำส้มสายชู เปรียบเทียบสัดส่วนการผสม เช่น 0.1, 0.5, 1 และ 5% โดยมวล

3) บันทึกลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของต้นแบบสารชีวภัณฑ์ เช่น สี กลิ่น การละลายน้ำ ความเป็นกรดต่าง

4) ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดวัชพืชของต้นแบบสารชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการกับวัชพืช 3 ชนิด ได้แก่ ผักโขม (*Amaranthus viridis*), ตีนตุ๊กแก (*Tridaxpro cumbens*) และหญ้าตีนกา (*Eleusine indica*) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) แบ่งเป็น 25 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 เมล็ด

- ระยะก่อนเมล็ดงอก โดยนำเมล็ดพืชวางในเพลท/กล่องที่มีกระดาษกรอง จากนั้นฉีดพ่นสาร ปริมาตร 5 mL/ชุดทดสอบ (Cavalieri and Caporali, 2010) บนเมล็ดพืช (ชุดควบคุมใช้น้ำ) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดวัชพืช หลังการทดสอบ 7 วัน

- ระยะหลังเมล็ดงอก (พืชมีใบจริงคู่แรก) โดยเพาะต้นกล้าวัชพืชในถาดหลุม/กล่องทดสอบ จากนั้นฉีดพ่นสารปริมาตร 5 mL/ชุดทดสอบ บนต้นพืช (ชุดควบคุมใช้น้ำ) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของต้นวัชพืช (ยับยั้งการเจริญ) หลังการทดสอบ 7 วัน

กิจกรรมวิจัยที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของต้นแบบสารชีวภัณฑ์ในการกำจัดวัชพืชหลังการผลิตทันที และหลังการผลิตทุก 2 เดือน เพื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการทดสอบตามขั้นตอนในกิจกรรมที่ 1 (ระยะก่อนเมล็ดงอกและระยะหลังเมล็ดงอก) จากนั้นคัดเลือกต้นแบบชีวภัณฑ์ที่ให้ผลดีที่สุด อย่างน้อย 2 สูตร ไปทดสอบในกิจกรรมวิจัยต่อไป โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพ มีอายุการเก็บรักษา อย่างน้อย 4 เดือน และต้นทุนการผลิต

กิจกรรมวิจัยที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดวัชพืชของต้นแบบชีวภัณฑ์ที่คัดเลือกจากกิจกรรมที่ 2 ในโรงเรือนทดสอบ (ถุงทดสอบ) โดยเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์การค้าที่มีคุณสมบัติในกลุ่มเดียวกัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) 5 ซ้ำ แบ่งเป็น 3 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ฉีดพ่นสารใด)

กรรมวิธีที่ 2 สารเคมีการค้า อัตราการใช้ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์

กรรมวิธีที่ 3 สารต้นแบบชีวภัณฑ์กำจัดวัชพืช ชนิดที่ 1 ความเข้มข้น 5% ปริมาณ 200 ml

บันทึกเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของเมล็ดวัชพืช หลังการทดสอบ 7 วัน หรือการตายของต้นวัชพืชหลังการทดสอบ 14 วัน และลักษณะความผิดปกติของต้นพืชทดสอบ

3.3 โครงการย่อยที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพต้นแบบชีวภัณฑ์สูตรสำเร็จที่มีฤทธิ์ในการควบคุมโรคทางดินและเพิ่มผลผลิตพืชบนพื้นที่สูง

กิจกรรมวิจัยที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพต้นแบบสารชีวภัณฑ์ 1 สูตร ในการป้องกันโรคทางดิน 4 เชื้อสาเหตุของคะน้าและมะเขือเทศ เพื่อศึกษาอายุเก็บรักษาในห้องปฏิบัติการ ณ อุณหภูมิห้อง ซึ่งดำเนินการต่อเนื่องจากปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 โดยต้นแบบสารชีวภัณฑ์ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ คือ FT2, MTR13 และ HRS8 เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร กากน้ำตาลผสมแร่ธาตุ yeast 2 g/l ผสม KH_2PO_4 0.5 g/l ผสม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/l นำไปผสมกับวัสดุรองรับหัวเชื้อ 4 สูตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 3 ซ้ำ

1) บันทึกปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ (cfu/g) ในต้นแบบสารชีวภัณฑ์ ระยะหลังเก็บรักษาทุก 2 เดือน โดยวิธี drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA รวมทั้งศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของต้นแบบผงชีวภัณฑ์ ได้แก่ สี การละลายน้ำ การแขวนลอยในน้ำ และค่าความเป็นกรดต่าง

2) ทดสอบความสามารถของต้นแบบสารชีวภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางดิน

- วิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บันทึกเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังการทดสอบ 1, 3 และ 5 วัน หรือ 3, 5 และ 7 วัน (ขึ้นอยู่กับอาการเจริญของเชื้อ) ตามสูตรการคำนวณของ Mokhtar and Aid (2013)

- วิธี paper disc บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บันทึกรัศมีความกว้างของวงใส (clear zone) รอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* หลังการทดสอบ 7 วัน

กิจกรรมวิจัยที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันกำจัดของต้นแบบสารชีวภัณฑ์ในสภาพแปลงปลูกพืช

คัดเลือกวิธีการใช้ที่ให้ผลดีที่สุดจากผลการวิจัยปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของเชื้อหลังการผลิตทันที ต้นทุนการผลิต อายุการเก็บรักษา อย่างน้อย 6 เดือน และความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชทางดิน 4 ชนิด ภายในโรงเรือนทดสอบ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCBD) แบ่งเป็น 6 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ (โรงเรือน)

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (วิธีของเกษตรกร)

กรรมวิธีที่ 2 ชุตควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค)

กรรมวิธีที่ 3 สารเคมีการค้า อัตราการใช้ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์

กรรมวิธีที่ 4 สารชีวภัณฑ์การค้า อัตราการใช้ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์

กรรมวิธีที่ 5 การคลุกเมล็ดด้วยต้นแบบสารชีวภัณฑ์ และโรยรอบโคนต้นหลังย้ายปลูก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 6 การคลุกต้นแบบสารชีวภัณฑ์กับวัสดุเพาะกล้า อัตรา 40 g/วัสดุเพาะกล้า 1 kg

หมายเหตุ กรรมวิธีที่ 5 และ 6 เป็นวิธีการใช้ที่ให้ผลดีที่สุดจากผลการวิจัยปีงบประมาณ พ.ศ. 2563

บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคทุก 7 หลังการทดสอบ ปริมาณและคุณภาพผลิตผล (kg/พื้นที่ทดสอบ)

ต้นทุนการใช้งาน/ฤดูกาล (บาท/ฤดูกาล) และลักษณะความผิดปกติของต้นพืชทดสอบ

3.4 โครงการย่อยที่ 4 การประเมินประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ทดแทนสารเคมีเกษตรจากผลงานวิจัยที่ผลิตจากพืชท้องถิ่นและสายพันธุ์จุลินทรีย์ปฏิกิริยาบนพื้นที่สูง

ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ร่วมกับเกษตรกรและเจ้าหน้าที่ของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหรือโครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงเพื่อเตรียมขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายทางการเกษตร จำนวน 4 ชนิด โดยคัดเลือกร่วมกับศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง

- 1) ชี้แจงรายละเอียดวิธีการวิจัยกับเจ้าหน้าที่และเกษตรกร
- 2) สำรวจพื้นที่ และคัดเลือกแปลงปลูกพืชเป้าหมาย 2 แปลง/พื้นที่
- 3) วางแผนและเริ่มดำเนินการทดสอบ ดังตาราง

รายการผลิตภัณฑ์	พืชทดสอบ	พื้นที่ดำเนินงาน
1. เชื้อรา <i>Beauveria bassiana</i> กำจัดมอดเจาะผลกาแฟ (พีพี-เบ็บ)	กาแฟ	สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด
2. สารล่อดึงดูดเพลี้ยไฟ	พริก	ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงที่พบการระบาดของ
3. ชีวภัณฑ์ลดความเป็นกรดและความเป็นพิษของโลหะหนักอาซิโนในดิน	ผักไผ่	ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่โถ
4. ชีวภัณฑ์ป้องกันโรคผลเน่าของเสาวรส	เสาวรส	ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงที่พบการระบาดของ

กิจกรรมวิจัยที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *Beauveria bassiana* กำจัดมอดเจาะผลกาแฟ (พีพี-เบ็บ)

วางแผนการทดสอบแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) เปรียบเทียบ 6 กรรมวิธี 3 ซ้ำ โดยฉีดพ่นสารในแต่ละกรรมวิธีให้ทั่วทั้งต้นทุก 7 วัน จนเก็บเกี่ยวผลผลิต

กรรมวิธีที่ 1 วิธีเกษตรกร (กับดักร่วมกับสารล่อ)

กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นเชื้อราบูเวเรีย (พีพี-เบ็บ) อัตรา 100 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นเชื้อราบูเวเรีย (ฟิฟเบ็บ) อัตรา 200 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 4 ฉีดพ่นเชื้อราบูเวเรีย (ฟิฟเบ็บ) อัตรา 300 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 5 ฉีดพ่นผลิตภัณฑ์การค้า (บูเวริน) อัตรา 100 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 6 วิธีควบคุม (ไม่มีการจัดการใด)

บันทึกเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย ทำเครื่องหมายที่ต้นและกิ่งเดิม โดยทำการนับผลกาแฟจากต้นในระดับความสูงจากพื้น 1-1.5 เมตร (เป็นระดับที่มอดเจาะผลกาแฟเข้าทำลายมากที่สุด) จำนวน 4 กิ่ง/ต้น นับผลกาแฟทั้งหมดและผลกาแฟที่ถูกมอดเจาะผลกาแฟทำลายในกิ่งที่เลือกไว้ จากนั้นติดตามการเข้าทำลายอย่างต่อเนื่องในต้นและกิ่งเดิมทุก 14 วัน จนกระทั่งเก็บเกี่ยว คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของการเข้าทำลายของมอดเจาะผลกาแฟก่อนและหลังเก็บเกี่ยวผลิตผล จากนั้นวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

กิจกรรมวิจัยที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพสารล่อดึงดูดเพลี้ยไฟในพืชตระกูลพริก วางแผนการทดสอบแบบ T-Test จำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบ 2 กรรมวิธี 2 แปลง

กรรมวิธีที่ 1 สารล่อดึงดูดเพลี้ยไฟร่วมกับกับดักกาวเหนียวถุงพลาสติกสีน้ำเงิน ระยะติดตั้ง 4 เมตร

กรรมวิธีที่ 2 กับดักกาวเหนียวถุงพลาสติกสีเหลือง ระยะติดตั้ง 4 เมตร

บันทึกจำนวนเพลี้ยไฟที่เข้าไปติดกับดักกาวเหนียว จากนั้นวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

กิจกรรมวิจัยที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพสารชีวภัณฑ์ลดความเป็นกรดและความเป็นพิษของโลหะหนักอาซิโนในดิน วางแผนการทดสอบแบบ T-test จำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบ 2 กรรมวิธี 2 แปลง

กรรมวิธีที่ 1 แปลงควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 วิธีการจากผลงานวิจัย โดยรองกันหลุมก่อนปลูกต้นกล้าด้วยผงชีวภัณฑ์ลดปริมาณโลหะหนักในดินที่ผลิตจากไดอะตอมไมท์และปูน อัตรา 1 ช้อนชา (3 g/หลุม) และ ราดสารละลาย 0.1% ของเฟอร์รัสซัลเฟต (Fe^{2+}) ลงดินบริเวณต้นกล้า

เก็บตัวอย่างดินช่วงก่อนและหลังการทดสอบ สำหรับตัวอย่างพืชเก็บช่วงหลังการทดสอบ และตัวอย่างปัจจัยการผลิตเก็บช่วงก่อนการทดสอบ ส่งตัวอย่างวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณโลหะหนักอาซิโน จากนั้นวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

กิจกรรมวิจัยที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพผงชีวภัณฑ์ป้องกันโรคผลเน่าของเสาวรส

ปรับปรุงวิธีการผลิตต้นแบบสารชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดโรคผลเน่า *Phytophthora* sp. ของเสาวรสในห้องปฏิบัติการ เพื่อลดต้นทุนการผลิตและอัตราการใช้

1) เพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ TChC2 (*Alcaligenes faecalis*) ในอาหารเหลวสูตรแบ่งแก้วเหลืองละลายในน้ำกลั่นเติม $MgCl_2$ 20.3 g, $CaCl_2$ 10.2 g และ $MnCl_2$ 1.0 g/l ซึ่งได้ความเข้มข้นเชื้อ 10^{10} cfu/ml อายุ 3 วัน และมีต้นทุนอาหาร 3.88 บาท/l (สุมาลี และคณะ, 2558, 2559)

2) ผลิตต้นแบบสารชีวภัณฑ์ เปรียบเทียบสูตรวัสดุรองรับหัวเชื้อและสัดส่วนการผสมหัวเชื้อต่อวัสดุรองรับ 25% 35% และ 50% โดยน้ำหนักของวัสดุรองรับ จากนั้นนำไปทำให้แห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 35-40°C จนเหลือความชื้น 15-20% จึงนำไปดัดเป็นผงละเอียดและใส่ในถุงบรรจุภัณฑ์ แบ่งเป็น 7 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธี	ส่วนประกอบของวัสดุรองรับ น้ำหนัก 1 kg
1	แป้งข้าวเจ้า 800 g ผสมน้ำมันถั่วเหลือง 5 ml และซูโครส 100 g (สูตรเดิม)
2	แป้งข้าวโพด 300 g และ talcum 700 g
3	Carboxymethyl cellulose (CMC) 20 g และ Talcum 980 g
4	แป้งมันสำปะหลัง 900 g ผสมน้ำตาลทราย 100 g
5	แป้งข้าวโพด 795 g ผสม 125 ml Tween 20 และเอทานอล 80 ml
6	แป้งข้าวเจ้า 990 g และ CMC 10 g
7	น้ำมันถั่วเหลือง 1 l ผสมซูโครส 75 g และ Tween 20 0.75 ml

3) ทดสอบประสิทธิภาพของต้นแบบสารชีวภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค โดยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังการทดสอบ 1, 3 และ 5 วัน หรือ 3, 5 และ 7 วัน (ขึ้นอยู่กับความเจริญของเชื้อ) ตามสูตรการคำนวณของ Mokhtar and Aid (2013)

4) ศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของต้นแบบชีวภัณฑ์ จากนั้นคัดเลือก อย่างน้อย 3 สูตร มาศึกษาปริมาณการใช้ในห้องปฏิบัติการด้วยเชื้อราสาเหตุโรคบนผลเสาวรสซึ่งปลูกเชื้อรา *Phytophthora* sp. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) แบ่งเป็น 9 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ฉีดพ่นสารใด)

กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค)

กรรมวิธีที่ 3 สารเคมีที่จำหน่ายทั่วไป อัตราการใช้ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์

กรรมวิธีที่ 4 วุ้นสูตรเดิม อัตรา 200 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 5 ต้นแบบชีวภัณฑ์สูตรใหม่ อัตรา 50 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 6 ต้นแบบชีวภัณฑ์สูตรใหม่ อัตรา 70 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 7 ต้นแบบชีวภัณฑ์สูตรใหม่ อัตรา 100 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 8 ต้นแบบชีวภัณฑ์สูตรใหม่ อัตรา 150 g/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 9 ต้นแบบชีวภัณฑ์สูตรใหม่ อัตรา 200 g/น้ำ 20 l

บันทึกผล

- เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคผลเน่า ระยะ 3, 5 และ 7 วัน
- ความสามารถในการละลายน้ำของต้นแบบชีวภัณฑ์และการเกิดตะกอนตามหน่วยวัดของมาตรฐานค่าการละลายน้ำของสาร โดยใช้อัตราการผสมที่เมื่อผสมแล้วได้ความเข้มข้นของเชื้อระหว่าง 10^9 - 10^{10} cfu/ml
- รูปร่างลักษณะภายนอกของต้นแบบชีวภัณฑ์ เช่น สี ความร่วนซุย ผงละเอียด
- ค่าอื่นที่ระบุในข้อกำหนดการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย ประเภทที่ 2 เช่น ค่าความเป็นกรดต่าง กลิ่น ตัวทำละลายอินทรีย์

5) คัดเลือกวิธีการผลิตต้นแบบสารชีวภัณฑ์และวิธีการใช้ที่ให้ผลดีที่สุดจากข้อ 4) มาทดสอบประสิทธิภาพในแปลงปลูกพืช วางแผนการทดสอบแบบ (Completely Randomized Design; CRD) เปรียบเทียบ 6 กรรมวิธี 3 ซ้ำ (10 ต้น/ซ้ำ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนต้นในแปลงปลูก) โดยฉีดพ่นสารในแต่ละกรรมวิธีให้ทั่วทั้งต้น ตั้งแต่เสาวรสอยู่ในระยะติดดอกจนถึงระยะติดผล

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่มีการจัดการใด)

กรรมวิธีที่ 2 สารเคมีที่จำหน่ายทั่วไป อัตราการใช้ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์

กรรมวิธีที่ 3 ชีวภัณฑ์สูตรเดิม อัตรา 200 g/น้ำ 20 l ฉีดพ่นทุก 5 วัน

กรรมวิธีที่ 4 ต้นแบบชีวภัณฑ์สูตรใหม่ อัตราที่คัดเลือก ฉีดพ่นทุก 5 วัน

กรรมวิธีที่ 5 ต้นแบบชีวภัณฑ์สูตรใหม่ อัตราที่คัดเลือก ฉีดพ่นทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 6 ต้นแบบชีวภัณฑ์สูตรใหม่ อัตราที่คัดเลือก ฉีดพ่นทุก 14 วัน

บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคหลังการฉีดพ่น ระยะ 7 และ 14 วัน จากนั้นวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง
กิจกรรมวิจัยที่ 5 ประเมินความพึงพอใจของเกษตรกรและเจ้าหน้าที่ หลังการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โดยการสัมภาษณ์

การยื่นจดทรัพย์สินทางปัญญาเพื่อคุ้มครองสิทธิประโยชน์จากผลงานวิจัย

1) พิจารณารายละเอียดผลงานวิจัยที่ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้วในปีงบประมาณ พ.ศ. 2563-2564 ได้แก่ ด้านประสิทธิภาพ ด้านความเป็นไปได้ในการลงทุนและการแข่งขันทางการตลาด จากนั้นคัดเลือกผลงานวิจัย จำนวน 2 รายการ

2) ดำเนินการตามขั้นตอนการยื่นจดทรัพย์สินทางปัญญา ประเภทอนุสิทธิบัตร ประกอบด้วย (1) การดำเนินงานวิจัยและสรุปเทคนิคการประดิษฐ์ที่เกี่ยวข้อง (2) ยกร่างคำขอยื่นจดทรัพย์สินทางปัญญา (3) จัดเตรียมเอกสารประกอบ (4) ยื่นขอจดแจ้ง/จดทะเบียน

3.5 สถานที่ดำเนินงานวิจัย

- 1) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่เฒ่า อ.ฮอด จ.เชียงใหม่
- 2) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงห้วยส้มป่อย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่
- 3) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงห้วยโป่ง อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย
- 4) สถานีวิจัยพัฒนาโครงการหลวงแม่หลอด อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่
- 5) สถานีวิจัยเกษตรหลวงอินทนนท์ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่
- 6) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่
- 7) โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงป่ากล้วย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่
- 8) ห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยา สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)

