

คู่มือปฏิบัติงาน



เรื่อง

การประเมินศักยภาพกระบวนการผลิต
และขั้นตอนผลิตเชื้อราก็อโรคแก้มลง

โดย

รศ.ดร. ประกายจันทร์ นิ่มกิ่งรัตน์ และคณะ

สาขาชีววิทยาและโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

คำนำ

ปัจจุบันกระแสการบริโภคอาหารสุขภาพกำลังได้รับความนิยมในกลุ่มผู้บริโภคเกือบทุกประเภท ส่งผลให้หน่วยงานราชการที่เกี่ยวข้องกับการเกษตรและเกษตรกรจำเป็นต้องปรับตัวและเปลี่ยนแปลงให้กระบวนการผลิตพืชนั้นได้ผลลัพธ์ที่ตอบโจทย์ผู้บริโภคยุคใหม่ การส่งเสริมให้เกษตรกรลดการใช้สารฆ่าแมลงได้อย่างเป็นรูปธรรมนั้นจำเป็นต้องมีแนวทางปฏิบัติหรือวิธีการที่สามารถทดแทนที่ยังคงให้ประสิทธิภาพเทียบเท่าหรือดีกว่าสารฆ่าแมลงเพื่อใช้เป็นแรงจูงใจให้เกษตรกรหันมาลดการพึ่งพาสารฆ่าแมลงเพียงอย่างเดียว ดังนั้นแนวทางการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยการใช้ศัตรูธรรมชาติจึงเป็นอีกหนึ่งวิธีการที่เกษตรกรจากทั่วโลกผู้มุ่งเน้นการผลิตพืชอินทรีย์ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย การป้องกันกำจัดโดยชีววิธี คือการนำสิ่งมีชีวิตที่เรียกว่า “ศัตรูธรรมชาติ” อาทิเช่น ตัวห้ำ ตัวเบียน ไล่เดือน ผอยศัตรูแมลง และเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแก่แมลง มาควบคุมประชากรแมลงศัตรูพืชให้ต่ำกว่าค่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ และส่งเสริมให้เกษตรกรสามารถเพาะเลี้ยงได้เอง ด้วยวิธีที่ไม่ซับซ้อนและต้นทุนต่ำ ซึ่งข้อดีของเชื้อราก่อโรคแก่แมลงไม่เพียงแต่สามารถนำมาใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลากหลายวัยและชนิด และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ยังสามารถเพิ่มปริมาณได้เองในธรรมชาติ ส่งผลให้การควบคุมปริมาณแมลงเป็นไปอย่างต่อเนื่องและยั่งยืน ถึงแม้ว่าองค์ความรู้ในการผลิตเชื้อราก่อโรคแก่แมลง จะมีความจำเป็นอย่างยิ่ง แต่บางครั้งกระบวนการผลิตจากแหล่งผลิตบางที่ไม่ยึดหลักวิชาการ รวมถึงกระบวนการเก็บรักษาที่ไม่ถูกต้องอาจทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ขาดประสิทธิภาพได้ ส่งผลให้การควบคุมศัตรูพืชได้ผลไม่แน่นอน และเกิดการไม่ยอมรับชีวภัณฑ์ ดังนั้นขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพของเชื้อราก่อโรคแก่แมลง ก่อนการนำไปใช้ เพื่อให้ได้คุณภาพและมาตรฐานจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งยวด ดังนั้นการอบรมครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะขยายองค์ความรู้ทางด้านเทคนิควิธีการเพิ่มปริมาณ และการตรวจสอบคุณภาพเชื้อราก่อโรคแก่แมลง แก่บุคคลที่สนใจเพื่อผลิตบุคคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ สามารถนำความรู้นี้ไปปฏิบัติงานและถ่ายทอดแก่ผู้ใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

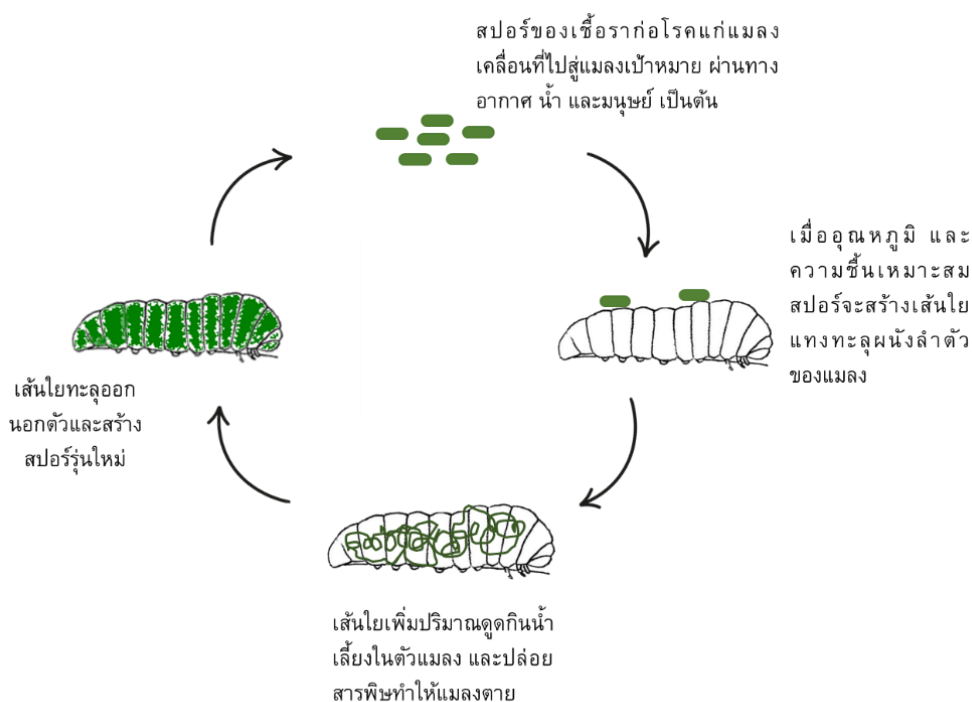
ประกายจันทร์ นิมกักรัตน์ และคณะ
กุมภาพันธ์ 2565

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
แบบประเมินศักยภาพกระบวนการผลิตเชื้อราก็โรดแก่แมลง	2
บทที่ 1: โครงสร้างและลักษณะสปอร์ของเชื้อราก็โรดแก่แมลง	8
- แบบบันทึกที่ 1	9
บทที่ 2: การเพิ่มปริมาณเชื้อราก็โรดแก่แมลง	
- วิธีการผลิตและเพิ่มปริมาณเชื้อราก็โรดแก่แมลง	13
- การเก็บรักษา	16
- การคำนวณจุดคุ้มทุนในการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อราก็โรดแก่แมลง	17
- แบบบันทึกที่ 2	19
บทที่ 3: เทคนิคการตรวจสอบคุณภาพเชื้อราก็โรดแก่แมลง	
วิธีการและเทคนิคในการตรวจสอบคุณภาพเชื้อราก็โรดแก่แมลง	
- การเตรียมสปอร์แขวนลอยหัวเชื้อเชื้อราก็โรดแก่แมลงเพื่อใช้ในการตรวจสอบคุณภาพ	21
- การทดสอบการงอกของสปอร์	22
- แบบบันทึกที่ 3	23
- ความสามารถในการก่อโรค	24
- แบบบันทึกที่ 4	25
- การตรวจสอบความเข้มข้นของสปอร์	26
- แบบบันทึกที่ 5	27
บทที่ 4: การนำเชื้อจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์	28

บทนำ

เชื้อราก่อโรคแมลงเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ สามารถเข้าทำลายแมลงได้หลากชนิด ไม่ว่าจะเป็นแมลงปากกัด หรือปากดูด มีกลไกการก่อโรค โดยเริ่มจากสปอร์ของเชื้อรา ลอยตามลมหรือน้ำมาติดบนผนังลำตัวแมลง จากนั้นเส้นใยจะงอกและแทงทะลุผนังลำตัวแมลงเข้าสู่ช่องว่างกลางลำตัว เมื่อเส้นใยเจริญเติบโตทั่วลำตัวของแมลง จะขัดขวางกระบวนการหายใจ ย่อยอาหาร และปล่อยสารพิษออกมา ส่งผลให้แมลงตายในที่สุด (ภาพที่ 1) ประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดนั้น นอกจากขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพแล้วยังขึ้นกับ ชนิด สายพันธุ์ และอัตราความเข้มข้นของเชื้อราที่พ่น ชนิด ขนาดของแมลงอาศัย และระยะเวลาการเจริญเติบโต ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับอัตราความเข้มข้นของสปอร์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นการทดสอบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายศัตรูพืชของเชื้อราก่อโรคแมลง จึงจำเป็นต้องทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะสามารถนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อนั้นได้ว่าเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ทำให้จุลินทรีย์เจริญ และเพิ่มปริมาณได้ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน การรู้จักเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์นั้น จะทำให้เพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ได้ในปริมาณที่ต้องการ และเพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ นอกจากนี้ เทคนิคและขั้นตอนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกต้องและให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิดอื่น และการตรวจสอบคุณภาพ ก็มีความสำคัญอย่างยิ่งเช่นกัน



ภาพที่ 1 วงจรการเข้าทำลายแมลงของเชื้อรา

แบบสำรวจศักยภาพภาพกระบวนการผลิตเชื้อราก่อโรคแก่แมลง

ส่วนที่ 1: บุคลากร

1. เจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบต่อการผลิต
เชื้อราขาวบิวเวอร์เรีย (ถ้ามี)...คน โดยใช้เวลาในการเลี้ยงต่อการผลิต...ชม. /วัน ...ครั้ง/เดือน
เชื้อราเขียวเมตาโรเซียม (ถ้ามี)...คน โดยใช้เวลาในการเลี้ยงต่อการผลิต...ชม. /วัน ...ครั้ง/เดือน
เชื้อราไตรโคเดอร์มา (ถ้ามี)...คน โดยใช้เวลาในการเลี้ยงต่อการผลิต...ชม. /วัน ...ครั้ง/เดือน
2. ประสบการณ์ด้านการผลิต
 1-2 ปี จำนวน...คน 3-5 ปี จำนวน...คน มากกว่า 5 ปี จำนวน...คน
3. เจ้าหน้าที่ที่ได้รับการพัฒนาความรู้ด้านชีววิธี (เฉลี่ย)
 1 ครั้ง/ปี 2 ครั้ง/ปี มากกว่า 2 ครั้ง/ปี

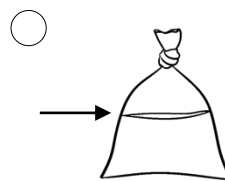
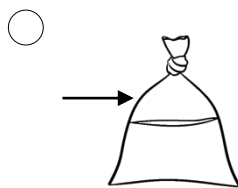
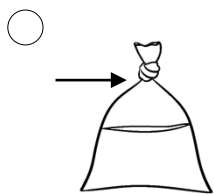
ส่วนที่ 2: การเตรียมวัสดุเพาะเลี้ยง

4. วัสดุสำหรับเพาะเลี้ยง
เชื้อราขาวบิวเวอร์เรีย คือ.....
เชื้อราเขียวเมตาโรเซียม คือ.....
5. แหล่งซื้อวัตถุดิบ
 ห้างสรรพสินค้า ตลาดนัด โรงสีข้าว อื่นๆ โปรดระบุ.....
6. การเก็บวัสดุเพาะเลี้ยง
 ในถุง/กระสอบปิดปากมิดชิด ในกล่องพลาสติกมีฝาปิด ในกล่องพลาสติกไม่มีฝาปิด
 อื่นๆ โปรดระบุ.....
7. มีการเตรียมวัสดุเพาะเลี้ยงอย่างไร
 นำไปหนึ่งเลยโดยไม่แช่น้ำ แช่น้ำนาน..... ชม.

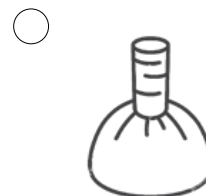
ส่วนที่ 3: การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ

8. อัตราส่วนในการผสมน้ำลงในวัสดุเลี้ยงเชื้อ..... (ข้าว : น้ำ)
 1:1 1:2 2:1 2:2 อื่น ๆ
9. ปริมาณข้าว.....กรัม
ขนาดถุง/ภาชนะในการบรรจุวัสดุเลี้ยงเชื้อ.....
10. ปริมาณการบรรจุวัสดุเลี้ยงเชื้อลงถุง
 1/1 1/2 1/3

11. ตำแหน่งในการเจาะเข็มหมุด



12. ตำแหน่งในการมัดปากถุง



13. จำนวนรูที่เจาะทั้งหมด

- 5 10 15 20 อื่นๆ โปรดระบุ.....

14. ช่วงเวลาในการเจาะรู

- ก่อนหนึ่ง หลังหนึ่ง ก่อนและหลังหนึ่ง ตอนไหนก็ได้ อื่นๆ โปรดระบุ.....

15. วัสดุเสียดซึ่งเชื่อให้สึกโดยอุปกรณ์

- ลังถึง หม้อหุงข้าวไฟฟ้าขนาด.....ลิตร หม้อหนึ่งความดันไอน้ำ อื่นๆ โปรดระบุ.....

16. ระยะเวลาในการนี้

- 10 นาที 15 นาที 30 นาที อื่นๆ โปรดระบุ.....

17. ปริมาตรหัวเชื้อที่ใส่ในการเพิ่มปริมาณข้าว 1 ถุง

- 1 กรัม 10 กรัม 100 กรัม 1,000 กรัม อื่นๆ โปรดระบุ.....

18. รูปแบบหัวเชื้อที่ใช้เพิ่มปริมาณ

- สปอร์ในน้ำ สปอร์ในข้าว สปอร์ในวุ้น อื่น ๆ โปรดระบุ.....

19. แหล่งตั้งต้นหัวเชื้อได้มาจาก

- หน่วยงานราชการที่ผ่านการรับรอง ร้านขายชีวภัณฑ์ทั่วไป เพาะเลี้ยงขึ้นมาจาก อื่นๆ โปรดระบุ.....

20. การเลี้ยงเพิ่มปริมาณสต็อกหัวเชื้อใน

ธัญพืช/ข้าวสุก

หากใช้หัวเชื้อจากธัญพืช/ข้าวสุก สามารถเพิ่มปริมาณได้กี่รอบ ต่อหัวเชื้อ 1 ถัง (Subculture)....
รอบ/....ถัง

อาหารเทียมวัน

หากใช้หัวเชื้อจากอาหารเทียมวัน สามารถเพิ่มปริมาณได้กี่รอบ ต่อหัวเชื้อ 1 เฟลท
(Subculture)...รอบ/.....ถัง

หนอน

อื่นๆ โปรดระบุ.....

21. มีการตรวจสอบคุณภาพหัวเชื้อทุกระยะการผลิตหรือไม่

มี โปรดระบุ วัน/ครั้ง

ไม่มี

22. มีการทำความสะอาดพื้นที่การผลิตเชื้อราหรือไม่

มีการทำความสะอาด

ความถี่ในการทำความสะอาด ครั้ง /วัน /สัปดาห์ /เดือน

ไม่มีทำความสะอาด

ส่วนที่ 4: การเก็บรักษา

23. ลักษณะห้องที่ใช้สำหรับบ่มเชื้อรา

ห้องโถง โลง ระบายอากาศ

ห้องควบคุมอุณหภูมิที่.....องศาเซลเซียส

อื่นๆ โปรดระบุ....

24. มีการขยับเชื้อรารายในถุงข้าวสุกหรือไม่

ขยับเชื้อทุกที่ วัน

ไม่ขยับ

25. วางถุงเชื้อราในลักษณะใด

แนวตั้ง

แนวนอน

อื่น ๆ โปรดระบุ.....

26. วางอะไรร่วมกับเชื้อราหรือไม่

มี โปรดระบุ.....

ไม่มี

27. ระยะเวลาในการบ่มเชื้อราก่อนนำไปใช้

5 วัน

10 วัน

15 วัน

อื่นๆ โปรดระบุ

28. เมื่อเชื้อราเจริญเต็มวัสดุเพาะเลี้ยง หากยังไม่นำไปใช้มีการจัดการอย่างไร

เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ.....องศาเซลเซียส

ไม่มีการจัดการ (เก็บไว้ที่เดิม)

อื่นๆ โปรดระบุ.....

29. โดยปกติแล้วเชื้อที่ผลิตใช้ระยะเวลาที่วันถึงจะแทงเส้นใยและสปอร์ปกคลุมเต็มถุงเลี้ยง วัน

ส่วนที่ 5: การนำไปใช้ และการตรวจสอบคุณภาพ

30. ตรวจสอบคุณภาพ (การปนเปื้อน การงอก ความเข้มข้นของสปอร์ และประสิทธิภาพในการเข้าทำลาย) เชื้อราก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง

- 1.1 ปนเปื้อน
 1.2 งอก
 1.3 ความเข้มข้นของสปอร์
 1.4. ประสิทธิภาพในการเข้าทำลาย

หากมีวิธีการตรวจสอบ ให้อธิบาย

.....
 ไม่มี

31. ความเข้มข้นของสปอร์ที่นำไปใช้

- $10^3 - 10^4$ $10^5 - 10^7$ $10^8 - 10^{10}$ อื่นๆ โปรดระบุ.....

32. ศัตรูพืชที่สำคัญในพื้นที่ และศัตรูธรรมชาติที่ต้องใช้

ลำดับที่	ชนิดแมลงศัตรูพืช	ชนิดเชื้อรา	การใช้		
			อัตรา	ขนาดพื้นที่ที่ใช้รวม/ปี (ไร่)	ความถี่ในการใช้

ส่วนที่ 6: กำลังการผลิต

33. ปริมาณชนิดเชื้อราที่ผลิตได้ต่อรอบการผลิต

- เชื้อราขาวบิวเวอร์เรีย.....กิโลกรัม / วัน/ สัปดาห์/ เดือน
 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียม.....กิโลกรัม / วัน/ สัปดาห์/ เดือน
 เชื้อราไตรโคเดอร์มา.....กิโลกรัม / วัน/ สัปดาห์/ เดือน

34. ความถี่ในแต่ละรอบการผลิตทุก..... วัน/ สัปดาห์/ เดือน

35. ระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละรอบการผลิต.....ชั่วโมง/ วัน/ สัปดาห์

36. กำลังการผลิตที่ต้องการ.....กก./ เดือน กิโลกรัม/1 รอบการผลิต

เพิ่มเติม : ใส่ขี้วัวที่ลิตร/หม้อ ลิตร

หุงข้าว 1 หม้อ ได้กี่ถุงถุง และใส่ถุงละกี่กรัม กรัม

ทำกี่หม้อ/วัน.....หม้อ

เกณฑ์การประเมินศักยภาพศักยภาพกระบวนการผลิตเชื้อร่าก่อโรคแก่แมลง

ส่วนที่	ข้อที่	ค่าคะแนน			
		3	2	1	0
1	1	มากกว่า 3	3	2	1
		1	2	3	มากกว่า 4
		มากกว่า 3	3	2	1
	2	มากกว่า 5	3-5	1-2	ตอบอย่างอื่น
	3	มากกว่า 2	2	1	ตอบอย่างอื่น
2	4	ข้าวเหนียว (ราชาว) ข้าวเจ้า (ราเขียว)	ข้าวเหนียวหัก (ราชาว) ข้าวเจ้าหัก (ราเขียว)	ธัญพืชอื่น	ตอบอย่างอื่น
	5	โรงสีข้าว	ห้างสรรพสินค้า	ตลาดนัด	ตอบอย่างอื่น
	6	กล่องพลาสติกปิดมิดชิด	ถุง/กระสอบปิดมิดชิด	ถุง/กระสอบเปิดฝา	ตอบอย่างอื่น
	7	ไม้แซ่ (ราเขียว) แซ่ มากกว่า 6 ซม. (ราชาว)	-	-	ตอบอย่างอื่น
3	8	2:1	-	-	ตอบอย่างอื่น
	9	250 กรัม	-	-	ตอบอย่างอื่น
		8*12 นิ้ว	-	-	ตอบอย่างอื่น
	10	1/3	-	1/2	ตอบอย่างอื่น
	11	ก	-	ข	ค
	12	ข	ก	-	ค
	13	15	10	-	ตอบอย่างอื่น
	14	ก่อนและหลัง (หนึ่ง หลัง (หม้อหุงข้าว)	-	-	ตอบอย่างอื่น
	15	หม้อหนึ่งความดันไอน้ำ	หม้อหุงข้าว	ลังถึง	ตอบอย่างอื่น
	16	15	-	-	ตอบอย่างอื่น
	17	10 กรัม	-	-	ตอบอย่างอื่น
	18	สปอร์ในน้ำ	สปอร์ในหุ่น	สปอร์ในข้าว	ตอบอย่างอื่น
	19	หน่วยงานรับรอง	-	-	ตอบอย่างอื่น
	20	หนอน	อาหารเทียม	ธัญพืช	ตอบอย่างอื่น
21	มี	-	-	ตอบอย่างอื่น	
22	มี	-	-	ตอบอย่างอื่น	
4	23	ห้องควบคุมอุณหภูมิ	โถง โส่ง ระบายอากาศ	-	ตอบอย่างอื่น
	24	ขยา	-	-	ตอบอย่างอื่น
	25	แนวนอน	-	-	ตอบอย่างอื่น
	26	ไม่มี	-	-	ตอบอย่างอื่น
	27	15 วัน	-	-	ตอบอย่างอื่น

	28	เก็บในตู้เย็น			ตอบอย่างอื่น
	29	15 วัน			ตอบอย่างอื่น
5	30	กาทั้งสี่ข้อครบ			ตอบอย่างอื่น
	31	10^8-10^{10}			ตอบอย่างอื่น
	32	ไม่นำมาประเมิน			
6	33	50 กก./วัน (หม้อ 5 ลิตร)			ตอบอย่างอื่น
	34	ทุกวัน			ตอบอย่างอื่น
	35	45 นาที-1 ชั่วโมง			ตอบอย่างอื่น
	36	ไม่นำมาประเมิน			

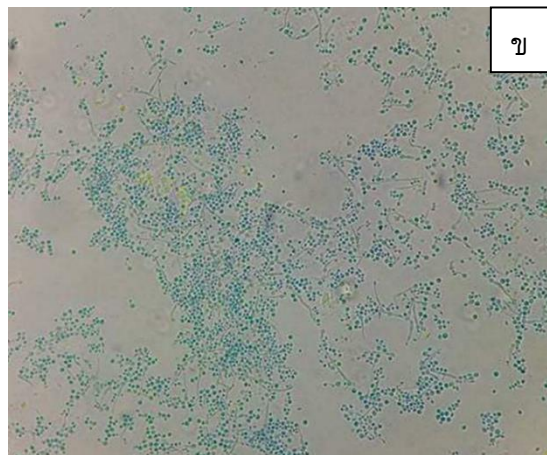
หากได้ค่าคะแนนมากกว่า 111 คะแนน = มาตรฐาน

0-110 = ต่ำกว่ามาตรฐาน

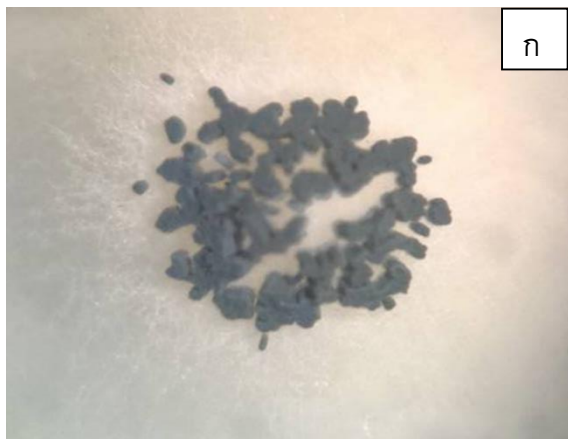
บทที่ 1: โครงสร้างและลักษณะสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแก่แมลง

เชื้อราขาวบิวเวอร์เรีย (*Beauveria bassiana*) และ เชื้อราเขียวเมตาไรเซียม (*Metarhizium anisopliae*)

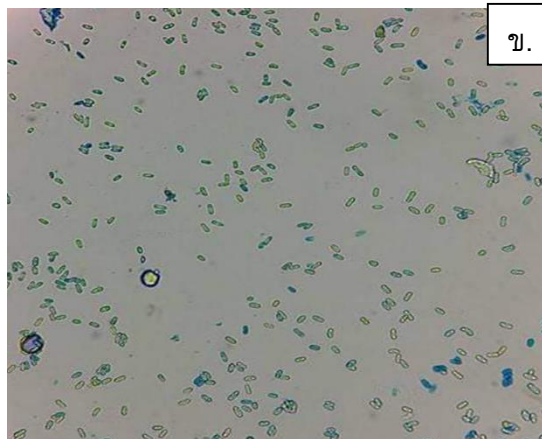
เชื้อราทั้งสองชนิดมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เราจะเห็นลักษณะรูปร่างสปอร์ของเชื้อราขาว เป็นเม็ดสีขาว กลมๆ เป็นฝุ่นคล้ายผงแป้งหรือคล้ายซอล์ก บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ภาพที่ 2 ก.) และเมื่อส่องสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X และจะเห็นก้านชูสปอร์ตั้งขึ้นเป็นเส้นยาว เรียงเป็นสายเดี่ยวหรือเป็นกิ่งก้าน กลุ่มของสปอร์อยู่กันเป็นสาขามารวมกันคล้ายรูปจาน เส้นใยทรงกระบอก สีใส มีผนังกัน โคโลนี เรียบ สปอร์มีลักษณะกลม (ภาพที่ 2 ข.) ขณะที่เชื้อราเขียว จะเห็นโคโลนีเตี้ยต่อกันเป็นชั้นๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 3 ก.) และเมื่อดูสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นลักษณะสปอร์เป็นรูปยาวรี หัวท้ายมน เป็นแท่ง (ภาพที่ 3 ข.) เส้นใยมีผนังกันเป็นปล้องๆ ไม่มีสี เส้นใยจะแผ่ขยายเจริญเติบโตสร้างสปอร์ เป็นลูกโซ่ต่อกันตรงรอยคอคอด เราเรียกว่าโคโลนีเตี้ยม แต่ละโคโลนีเตี้ยมที่เกิดใหม่จะมีสีขาว ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวคล้ำ จึงเป็นชื่อเรียกของราชินีนี้ (มาลี, 2551)



ภาพที่ 2 โครงสร้างสปอร์เชื้อราขาวบิวเวอร์เรีย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ก.)
และโครงสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ข.)



ก



ข.

ภาพที่ 3 โครงสร้างสปอร์เชื้อราเขียวเมตาโรเซียม บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ก.)
และโครงสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ข.)

แบบบันทึกที่ 1

กิจกรรม
1. ศึกษาตัวอย่าง โครงสร้างและลักษณะสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแก่แมลง
2. ร่วมสรุปผลการทดลอง และเปิดโอกาสให้ถาม-ตอบ

1. ศึกษาและอธิบายลักษณะโครงสร้างของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

1.1 เชื้อราขาว *Beauveria* sp.



.....

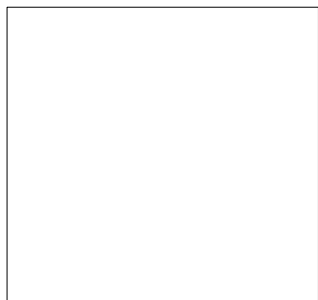
.....

.....

.....

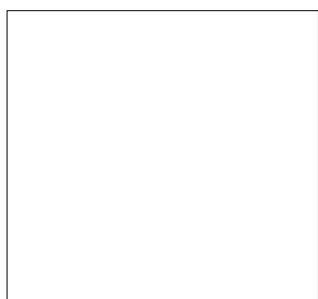
.....

1.2 เชื้อราเขียว *Metarhizium* sp.



.....
.....
.....
.....
.....

1.3 เชื้อรา *Trichoderma* sp.



.....
.....
.....
.....
.....

2. ศึกษาและอธิบายลักษณะสปอร์ของเชื้อแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.1 เชื้อราขาว *Beauveria* sp.



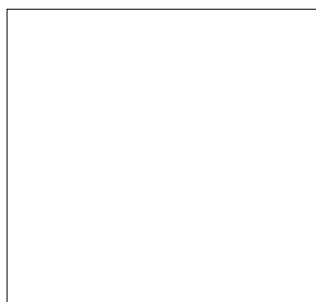
.....
.....
.....
.....
.....

2.2 เชื้อราเขียว *Metarhizium* sp.



.....
.....
.....
.....
.....

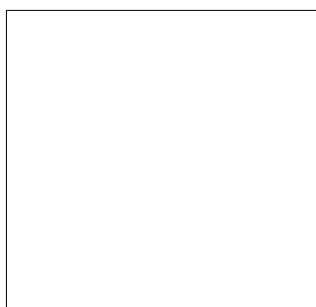
2.3 เชื้อรา *Trichoderma* sp.



.....
.....
.....
.....
.....

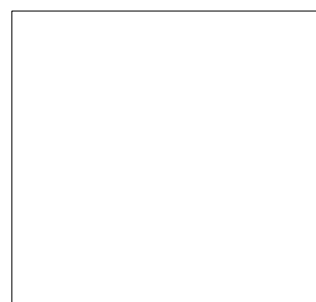
3. ศึกษาและอธิบายลักษณะแมลงที่ถูกทำลายโดยเชื้อแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.1 เชื้อราขาว *Beauveria* sp.



.....
.....
.....
.....
.....

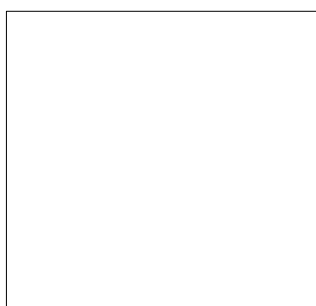
3.2 เชื้อราเขียว *Metarhizium* sp.



.....
.....
.....
.....
.....

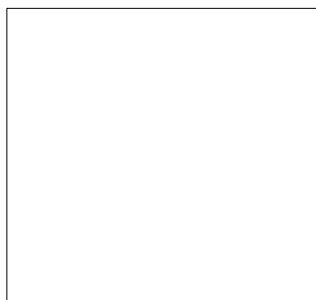
4. ศึกษาและอธิบายลักษณะของเชื้อราต่างชนิดจากถุงหัวเชื้อสด

4.1 เชื้อราขาว *Beauveria* sp.



.....
.....
.....
.....
.....

4.2 เชื้อราเขียว *Metarhizium* sp.



.....

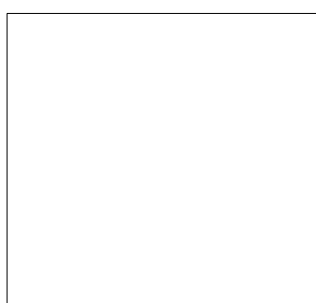
.....

.....

.....

.....

4.3 เชื้อรา *Trichoderma* sp.



.....

.....

.....

.....

.....

บทที่ 2: การเพิ่มปริมาณเชื้อราก่อโรคแก่แมลง

กิจกรรม
1. ผีกเพิ่มปริมาณเชื้อราก่อโรคแก่แมลง จากวัสดุที่เตรียมไว้
2. ร่วมสรุปผลการทดลอง และเปิดโอกาสให้ถาม-ตอบ

2.1 วิธีการผลิตและเพิ่มปริมาณเชื้อราก่อโรคแก่แมลง

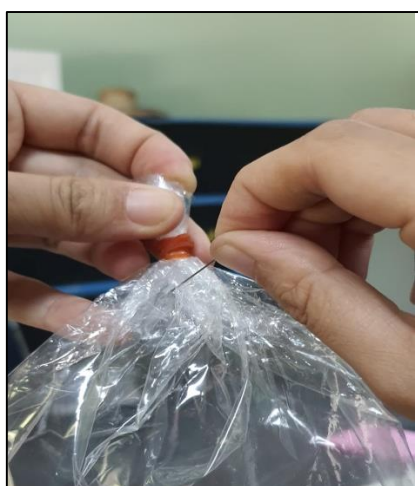
2.1.1 เชื้อสด



1. ทำความสะอาดโต๊ะ และมือด้วยแอลกอฮอล์ 70%

เชื้อราเขียว *Metarhizium* sp. ตักข้าวสารจ้าว (ข้าวเสาไห้) ใส่ถุงพลาสติกขนาด 8×12 นิ้ว ถุงละ 500 กรัม จากนั้นเติมน้ำลงไป 250 มิลลิลิตร (อัตราส่วนข้าว 2 ส่วนต่อน้ำ 1 ส่วน) แล้วขยำข้าวกับน้ำให้เข้ากัน

เชื้อราขาว *Beauveria* sp. ใช้ข้าวเหนียวที่ผ่านการแช่ด้วยน้ำสะอาด ไม่ต่ำกว่า 2 ชม. ตักออกมาพักให้สะเด็ดน้ำ จากนั้นจึงตักใส่ถุงพลาสติกขนาด 8×12 นิ้ว ถุงละ 500 กรัม โดยไม่ต้องเติมน้ำอีก



2. ใช้หนังยางรัดส่วนปลายปากถุงให้สนิท และเจาะรูบริเวณใต้หนังยาง 1 เซนติเมตร จำนวน 10 รูโดยรอบถุง ด้วยเข็มหมุดที่ผ่านการลนไฟมาเชื้อแล้ว เพื่อให้อากาศถ่ายเทสะดวก



3. นำถุงข้าวไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือ นึ่งด้วยลังถึงหรือหม้อหุงข้าว นาน 15 นาที



4. นำถุงข้าวออกมาผึ่งให้เย็นในแนวระนาบ ที่ อุณหภูมิห้อง และขยำข้าวในถุงเพื่อไม่ให้เปียกก่อน แข็งติดกัน



5. จากนั้นใช้ช้อนสแตนเลสที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อ แล้ว ตักเชื้อรา 1 ช้อนโต๊ะ (ปริมาตร 10 กรัม) ใส่ ถุงข้าวที่นึ่งไว้ แล้วคลุกเคล้าหัวเชื้อให้กระจายทั่ว ถุงข้าว

6. เจาะรูด้วยเข็มหมุดที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เพิ่มอีก 10 รู เพื่อเชื้อมีอากาศเพียงพอในการ หายใจ



7. นำถุงเชื้อไปวางบ่มบนชั้นในแนวระนาบในห้อง ที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก อุณหภูมิห้อง 25 ± 2 องศา เซลเซียส ขยำถุงเชื้อทุก 3 วันเพื่อส่งเสริมให้เชื้อมีการสร้างสปอร์เพิ่ม หลังจากนั้น 10 วัน จะ สังเกตเห็นสปอร์ของเชื้อราขึ้นหุ้มเมล็ดข้าว จึง สามารถนำไปใช้ในการควบคุมแมลงได้

2.1.2 เชื้อแห้ง

นำเชื้อราก่อโรคแก่แมลงที่เลี้ยงเพิ่มปริมาณบนข้าวฉ่ำนาน 14 วัน มาบรรจุใส่ภาชนะแบนเลทที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว และผึ่งในห้องปลอดเชื้อที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก จนกระทั่งความชื้นบนเมล็ดข้าวลดลงเหลือ 30% RH) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อราแบบแห้ง

2.1.3 แบบผงสปอร์

นำเชื้อราก่อโรคแก่แมลง (แบบสด) ปริมาตร 100 กรัม บรรจุใส่ตะแกรงขนาด 0.25 มม. จากนั้นนำไปร่อนด้วยเครื่องร่อนแบบมีมอเตอร์ความถี่สูง (ภาพที่ 5) นาน 5 นาที



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อราแบบผงสปอร์

2.1.4 แบบน้ำ

นำ Tween 80 ความเข้มข้น 0.05% บรรจุลงในเครื่องล้างความถี่สูง (Ultrasonic cleaner) (ภาพที่ 6) ร่วมกับ เชื้อสด อัตราส่วน 1.5:1 นาน 10 นาที จากนั้นใช้ผ้าขาวบางกรองเศษวัสดุเลี้ยงเชื้อทิ้ง จะได้สารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา สามารถนำไปใช้ได้



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อราแบบน้ำ

2.2 การเก็บรักษา

เชื้อราที่ขยายแล้วเป็นเชื้อราชนิดสด ควรเก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่เกิน 12 - 15 °C มีอายุการเก็บรักษานาน 1 เดือน หากภายใน 1 เดือน ใช้ไม่หมดให้ตัดถุงพลาสติกแล้วแผ่ข้าวในถุง ผึ่งในที่ร่มจนเมล็ดข้าวแห้ง และนำไปเก็บรักษาในรูปแบบเชื้อราแห้งที่อุณหภูมิ 4 - 8 °C อยู่ได้ประมาณ 8 - 12 เดือน

ตารางคำนวณจุดคุ้มทุนในการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อร่าก่อโรคแก่แมลงต่อรอบการผลิต

รูปแบบเชื้อ	กำลังผลิต/ รอบการ ผลิต	เวลา/รอบ การผลิต (ชั่วโมง)	แรงงาน/รอบ การผลิต (คน)	ต้นทุน
เชื้อสด	18 ลิตร	5	1	ข้าวสาร 18 กก. X 20 บาท = 360 บาท
				หัวเชื้อ = 300 บาท /ครั้ง
				ค่าน้ำ-ไฟ = 100 บาท/ครั้ง
				ค่าเสื่อมอุปกรณ์ = 100 บาท/ครั้ง
				ค่าบรรจุภัณฑ์ = 72 บาท/ครั้ง
แรงงาน = 218.75 บาท				
ผงสปอร์	5 กก.	5	1	เชื้อสด 500 บาท /ครั้ง (กก. ละ 100 บาท)
				ค่าน้ำ-ไฟ = 200 บาท/ครั้ง
				ค่าเสื่อมอุปกรณ์ = 200 บาท/ครั้ง
				ค่าบรรจุภัณฑ์ = 20 บาท/ครั้ง
แรงงาน = 218.75 บาท				
น้ำ	10 กก.	6	1	เชื้อสด 1,000 บาท /ครั้ง (กก. ละ 100 บาท)
				ค่าน้ำ-ไฟ 200 บาท/ครั้ง
				ค่าเสื่อมอุปกรณ์ 200 บาท/ครั้ง
				ค่าบรรจุภัณฑ์ 40 บาท/ครั้ง
แรงงาน = 262.50 บาท				
แห้ง	1.5 กก.	0.5	1	เชื้อสด 1.5 กก. /ถาด (กก. ละ 100 บาท) = 150 บาท
				ค่าน้ำ-ไฟ 50 บาท/ครั้ง
				ค่าเสื่อมอุปกรณ์ 10 บาท/ครั้ง
				ค่าบรรจุภัณฑ์ 6 บาท/ครั้ง
แรงงาน = 21.88 บาท				

แบบบันทึกที่ 2

เทคนิคการเพิ่มปริมาณเชื้อร่ากอโรคให้มีประสิทธิภาพ

1. ระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่ข้าวสารเหนียวในน้ำสะอาด

- 30 นาที
- 45 นาที
- 1 ชม.
- ไม่ต่ำกว่า 2 ชม.

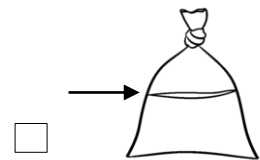
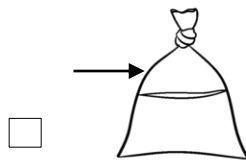
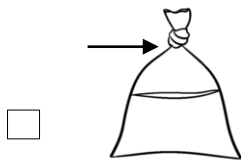
2. อัตราส่วนในการผสมน้ำลงในวัสดุเลี้ยงเชื้อ (ข้าว : น้ำ)

- 1:1
- 1:2
- 2:1
- 2:2

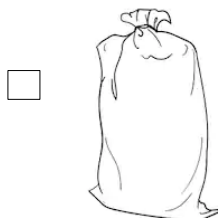
3. ปริมาณการบรรจุวัสดุเลี้ยงเชื้อลงถุงขนาด 8 X12 นิ้ว

- 1/1
- 1/2
- 1/3
- 1/4

4. ตำแหน่งในการเจาะเข็มหมุด



5. ระยะในการมัดปากถุง



6. จำนวนรูปที่เจาะทั้งหมด

- 5
 10
 15
 20

7. ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเจาะรู

- ก่อนนี้
 หลังนี้
 ก่อนและหลังนี้
 ตอนไหนก็ได้

8. วัสดุชนิดใดที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ

ราเขียว =

ราขาว =

9. ขั้นตอนในการเตรียมข้าวจ้าวก่อนนี้

- แช่น้ำทิ้งไว้
 ไม่ต้องแช่น้ำ

10. ขั้นตอนในการเตรียมข้าวเหนียวก่อนนี้

- แช่น้ำทิ้งไว้
 ไม่ต้องแช่น้ำ

11. ความเข้มข้นในการพ่นที่เหมาะสม

- $10^1 - 10^2$
 $10^3 - 10^4$
 $10^5 - 10^7$
 $10^8 - 10^{10}$

12. ใช้หัวเชื้อปริมาตรกี่กรัมในการเพิ่มปริมาณข้าว 1 ถุง (300 กรัม)

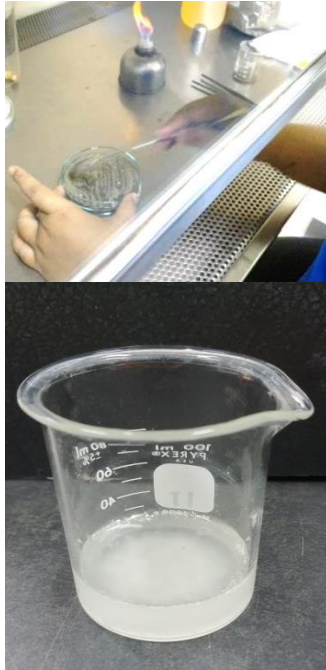
- 1 กรัม
 10 กรัม
 100 กรัม
 1,000 กรัม

บทที่ 3: เทคนิคการตรวจสอบคุณภาพเชื้อราก่อโรคแก่แมลง

กิจกรรม
ฝึกเทคนิคและวิธีการในการตรวจสอบคุณภาพ
1.1 การทดสอบการงอก
1.2 ทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อรา

3.1 วิธีการและเทคนิคในการตรวจสอบคุณภาพเชื้อราก่อโรคแก่แมลง

3.1.1. การเตรียมสปอร์แขวนลอยหัวเชื้อเชื้อราก่อโรคแก่แมลงเพื่อใช้ในการตรวจสอบคุณภาพ

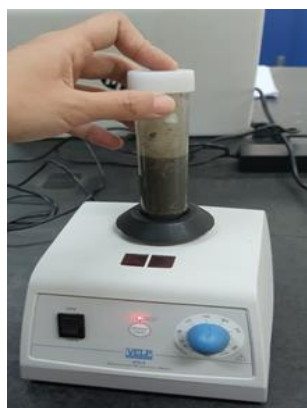


หัวเชื้อจากอาหารเทียมวัน

- นำเชื้อราที่เจริญจนเต็มผิวหน้าอาหารเทียมวัน มาชุดสปอร์ด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล
- นำแท่งแก้วซึ่งมีสปอร์ติดอยู่ไปกวนในบีกเกอร์ที่มี Tween 80 ความเข้มข้น 0.05% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุอยู่
- คนสปอร์ในสารละลาย 0.05% Tween 80 ให้เข้ากัน เพื่อใช้ในการนับปริมาณ



หัวเชื้อจากข้าว



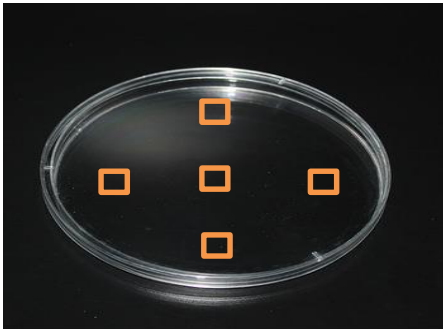
- ชั่งเมล็ดข้าวที่มีสปอร์เชื้อราหุ้มอยู่ ปริมาตร 5 กรัม ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่บรรจุ Tween 80 ความเข้มข้น 0.05% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
- นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex จนกระทั่งสปอร์หลุดจากวัสดุเลี้ยงจนหมด
- ใช้ผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วกรองเอาสารละลายสปอร์ออกจากวัสดุเลี้ยง จะได้สารแขวนลอยสปอร์สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป

ขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพเชื้อราด้วยวิธีต่าง ๆ

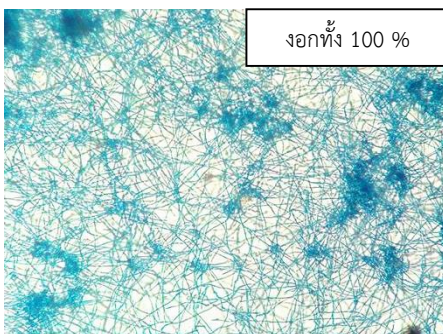
3.1.3. การทดสอบการงอกของสปอร์: เทอาหารวุ้น (วุ้น 15 กรัม: น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีลงบนจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ให้บางที่สุด เพื่อให้ง่ายต่อการตรวจนับและสังเกตทิศทางการงอกของเส้นใย



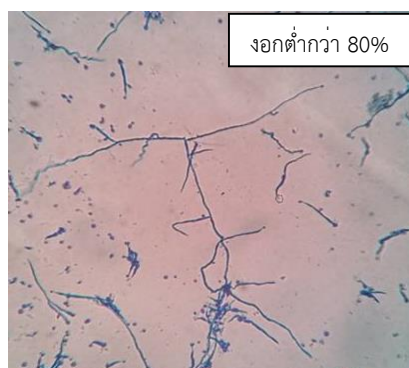
2. ร่อนอาหารวุ้นเย็นและแข็งตัว ใช้ไมโครปิเปตดูดสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่ได้จากหัวข้อการเตรียมสปอร์แขวนลอยหัวเชื้อเชื้อราก่อโรคแก่แมลง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วนำแท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีลนไฟ แล้วเกลี่ยสารละลายที่มีสปอร์แขวนลอยให้ทั่วผิวหน้าอาหารวุ้น จากนั้นนำไปบ่มไว้ในห้องมืดควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C นาน 12-24 ชั่วโมง



3. สุ่มตัดวุ้น เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ดังภาพ และนำไปวางลงบนแผ่นสไลด์



5. ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกและสังเกตทิศทางการงอกของเส้นใยเชื้อราจำนวน 100 สปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาเปอร์เซ็นต์การงอก ถ้างอกหมด 100 % หรือไม่งอกไม่ต้องนับ



หมายเหตุ: 1. ความงอกที่ยอมรับได้คือ 90 - 95% ขึ้นไป
2. ถ้างอกได้ 2 ทิศทางถือว่าเชื้อรามีประสิทธิภาพสูง

แบบบันทึกที่ 3

ตารางบันทึกผลการตรวจสอบคุณภาพของเชื้อราก่อโรคแมลง จำนวน 100 สปอร์

ชนิดเชื้อราก่อโรคแมลง		ซ้ำ	จำนวนสปอร์ที่ งอก (conidia)	จำนวนสปอร์ที่ไม่งอก (conidia)
เชื้อราขาว		1		
		2		
		3		
		4		
ผลรวม				
ค่าเฉลี่ย				
เชื้อราเขียว		1		
		2		
		3		
		4		
ผลรวม				
ค่าเฉลี่ย				

$$\text{สูตรการงอก (\%)} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ที่งอก}}{\text{จำนวนสปอร์ทั้งหมด*}} \times 100$$

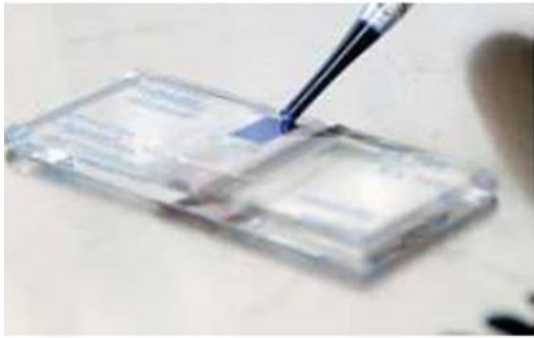
หมายเหตุ * จำนวนสปอร์ทั้งหมด = ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ที่งอก + ไม่งอก ;

n = จำนวนสปอร์ที่สุ่มนับทั้งหมด

คำตอบ ตัวอย่างที่ศึกษามีเปอร์เซ็นต์การงอก =% (ราเขียว)

ตัวอย่างที่ศึกษามีเปอร์เซ็นต์การงอก =% (ราขาว)

3.1.4. ความสามารถในการก่อโรค



1. นำสปอร์แขวนลอยหัวเชื้อเชื้อราก็โรดแก่แมลงที่ได้จากการเตรียมในข้อ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาหยดลงบน Haemacytometer



2. ตรวจสอบจำนวนสปอร์ต่อมล. และปรับให้ได้ระดับความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์/มล.



3. ฟันสปอร์แขวนลอยหัวเชื้อเชื้อราก็โรดแก่แมลงนำมาลงบนหนอนนกบนกระดาษกรองที่บรรจุอยู่ในจานทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. จำนวน 10 ตัว/ชนิดแมลง/จานทดลองจำนวน 4 ซ้ำ และบันทึกจำนวนตัวตายที่ได้ นาน 10 วันหลังจากฟัน เพื่อนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การตายจากสูตร

$$\text{สูตรการตาย (\%)} = \frac{\text{จำนวนตัวตาย}}{\text{จำนวนตัวทั้งหมด}^*} \times 100$$

หมายเหตุ * จำนวนตัวตายทั้งหมด = จำนวนตัวตาย + จำนวนตัวที่รอดชีวิต ;

n = จำนวนที่สุ่มนับทั้งหมด

แบบบันทึกที่ 4

ตารางบันทึกผลการทดสอบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายศัตรูพืชของเชื้อราก่อโรคแมลง

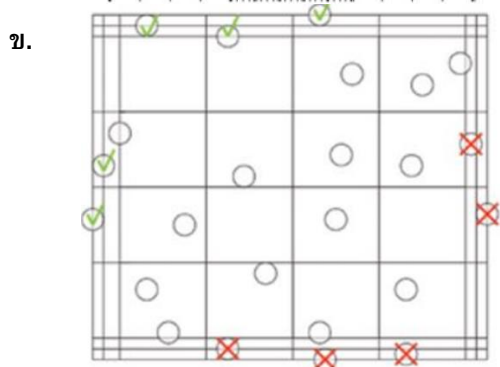
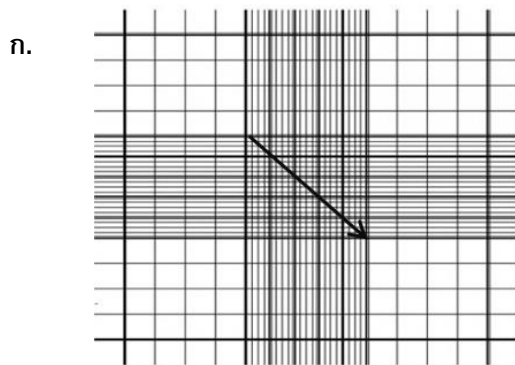
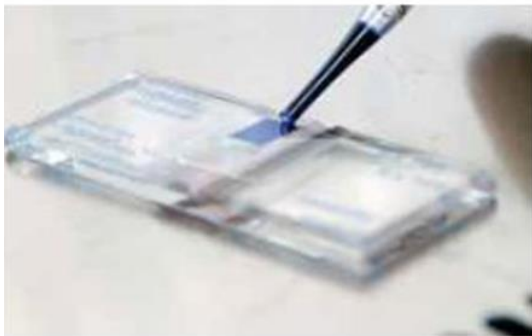
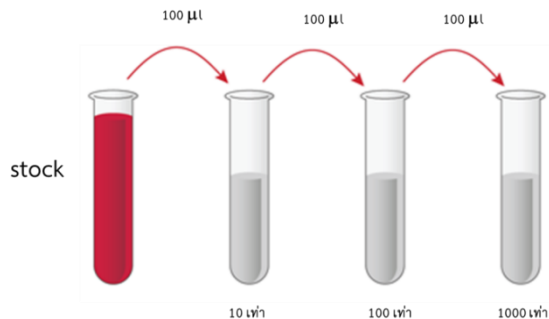
ความเข้มข้นของเชื้อราก่อโรคแมลง (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนแมลงที่ใช้ ในการทดสอบ (ตัว)	จำนวนตัว ตาย (ตัว)	จำนวนตัวมี ชีวิต (ตัว)	จำนวนตัว ตาย (%)
0 (ควบคุม)				
1×10^1				
1×10^3				
1×10^5				
1×10^7				
1×10^9				

คำตอบ ตัวอย่างที่ศึกษามีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการก่อโรค =% (ราเขียว)

ตัวอย่างที่ศึกษามีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการก่อโรค =% (ราขาว)

3.1.5 การตรวจสอบความเข้มข้นของสปอร์

1. นำหัวเชื้อที่ผสมร่วมกับ Tween 0.05% มาผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex) (ที่ได้จากหัวเชื้อการเตรียมสปอร์แขวนลอยหัวเชื้อเชื้อราก่อโรคแก่แมลง)



2. คูดสปอร์แขวนลอยหัวเชื้อเชื้อราก่อโรคแก่แมลง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ Tween 80 ความเข้มข้น 0.1% ในปริมาตร 900 ไมโครลิตร (หลอดที่ 1 เจือจาง 10 เท่า) จากนั้นคูดสารแขวนลอยสปอร์จากหลอดที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ Tween 80 ความเข้มข้น 0.1% ในปริมาตร 900 ไมโครลิตร (หลอดที่ 2 เจือจาง 100 เท่า)

3. ใช้ไมโครปิเปตคูดสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (เริ่มจากหลอดที่ 1) นำมาหยดลงบน Hemacytometer แล้วนำไปนับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 40X

4. การนับให้นับจากช่องตรงกลางในแต่ละด้าน นับจำนวน 5 ช่อง (แต่ละช่องมี 16 ช่องเล็ก) ในแนวทแยงมุม ดังภาพ ก. และให้นับเฉพาะเซลล์ที่อยู่ภายในช่อง จะไม่นับเซลล์ใดก็ตามที่แตะหรือทับเส้นกรอบของสี่เหลี่ยมจัตุรัส (ภาพ ข.)

หมายเหตุ: ในกรณีตัวอย่างแรก มีจำนวนสปอร์ น้อยกว่า 10 ให้คูดตัวอย่างจากหลอดที่มีความเข้มข้นมากกว่า แต่ถ้ามีจำนวนสปอร์มากกว่า 50 ให้คูดตัวอย่างจากหลอดที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า (จำนวนความเข้มข้นของเชื้อ)

ราที่ยอมรับได้ คือ 10 – 50 สปอร์ต่อสเกล 16
ช่องเล็ก)

5. นำจำนวนสปอร์ที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และนำมาคำนวณความเข้มข้นของสปอร์เชื้อราจากสูตร
ความเข้มข้นของเชื้อรา = ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ $\times 2.5 \times 10^5 \times$ ระดับการเจือจางที่ใช้นับ

แบบบันทึกที่ 5

ตารางบันทึกจำนวนสปอร์ของเชื้อราก่อโรคแก่แมลง

ซ้ำ	จำนวนสปอร์	
	เชื้อราขาว	เชื้อราเขียว
1		
2		
3		
4		
ผลรวม		
ค่าเฉลี่ย		

สูตรความเข้มข้นของเชื้อรา = ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ $\times 2.5 \times 10^5 \times$ ระดับการเจือจางที่ใช้นับ

คำตอบ ตัวอย่างที่ศึกษามีจำนวนความเข้มข้นสปอร์ =โคნიเดีย/มล. (ราเขียว)

ตัวอย่างที่ศึกษามีจำนวนความเข้มข้นสปอร์ =โคნიเดีย/มล. (ราเขียว)

บทที่ 4: เทคนิคการนำเชื้อจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์

1) ผสมน้ำพ่นบนใบพืชหรือราด

ใช้เชื้อรา 100 กรัม ผสมน้ำ 1 ลิตร (หัวเชื้อสด) คนให้สปอร์หลุดออกจากวัสดุเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้ผ้าขาวบางกรองเอาวัสดุเลี้ยงเชื้อออก จากนั้นผสมสารจับใบหรือน้ำยาล้างจาน และสามารถนำไปพ่นโดยการราดหรือใช้หัวพ่นแบบฝอยละเอียดเพื่อให้ครอบคลุมทั่วทั้งต้นพืชเน้นบริเวณใต้ใบและให้ถูกตัวแมลงมากที่สุด ควรพ่นเวลาเย็น เพื่อไม่ให้เชื้อราถูกแสงแดด สามารถพ่นได้ทุกสัปดาห์ตลอดระยะเวลาการเจริญเติบโตของพืช แต่หากพบการระบาดของแมลงศัตรูพืชสามารถพ่นวันเว้นวันได้ตามต้องการจนประชากรแมลงลดลง

2) การใช้ทางดิน

ใช้เชื้อรา 200 กรัม/ตรม. โรยรอบโคนต้นให้ทั่วบริเวณทรงพุ่ม พรวนดินกลบ และใช้ฟางข้าว คลุมดินเพื่อป้องกันแสงแดด พื้นที่ที่หว่านเชื้อลงไปควรมีความชื้น และใช้เชื้อราเดือนละหนึ่งครั้ง เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อราในดิน