บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่แปลงปลูกถั่วลิสงและถั่วหรั่ง ทั้งหมด 7 อำเภอ 5 จังหวัด จำนวนทั้งสิ้น 23 แปลง

2. ตัวอย่างวัสดุทดลอง

เมล็ดข้าวฟ่าง (sorghum)

กากใยปาล์ม (mesocarp fiber of oil palm) (จากบริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด)

3. สารเคมี

$MgSO_4.7H_2O$

K_2HPO_4

KCl

NH_4NO_3

glucose

chloramphenicol

Terrachlor 75 เปอร์เซ็นต์ WP

rose bengal

captan

mannitol

NaCl

yeast extract

congo red

$(NH_4)_2SO_4$

$CaCl_2$

carboxy methyl cellulose (CMC-Na)

agar

H_2SO_4

NaOH

สารฆ่าเชื้อรา iprodione

สารชีวภัณฑ์เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่มีขายทั่วไป

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมเองตามสูตร (ภาคผนวก ก) ได้แก่

Trichoderma selective media (TSM)

potato dextrose agar (PDA)

water agar (WA)

yeast manitol agar (YMA)

yeast manitol broth (YMB)

อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อทดสอบการหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส

5. สารละลายเตรียมเองตามสูตร (ภาคผนวก ข) ได้แก่

สารผสมเร่งปฏิกิริยา (catalyst mixture)

อินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator)

สารละลายกรดบอริกผสมอินดิเคเตอร์

อุปกรณ์

หลอดย่อยตัวอย่าง (digestion tube) ขนาด 100 มิลลิลิตร

ไมโครปิเปตต์ (micro pipette) ขนาด 100 และ 1,000 ไมโครลิตร

จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

บิวเรต (buret) ขนาด 50 มิลลิลิตร

ดีสเปนเซอร์ (dispenser) ขนาด 5 มิลลิลิตร

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmayer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

กระบอกตวง (measuring cylinder) ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร

หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)

กล้องจุลทรรศน์แบบ compound

เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (analytical balance)

เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

เครื่องเขย่าสารเคมี (table rotary shaker)

เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

เครื่องบดชิ้นส่วนพืช

เครื่องกลั่นไนโตรเจน (nitrogen distillation apparatus)

เตาย่อยตัวอย่าง (digestion block)

เครื่องแก้ว และอุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น

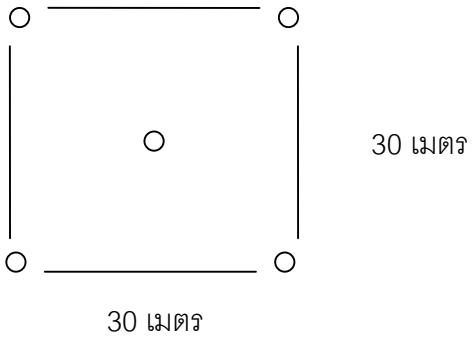
วิธีการ

1. **การเก็บตัวอย่างดิน และ การแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จากดินตัวอย่าง**

เก็บตัวอย่างดินจากทั้งหมด 7 อำเภอ 5 จังหวัด จำนวนทั้งสิ้น 23 แปลง คือ

- อำเภอรัตภูมิ จ. สงขลา จากพื้นที่ปลูกถั่วหรั่ง 8 แปลง
- อำเภอหาดใหญ่ จ. สงขลา จากพื้นที่ปลูกถั่วหรั่ง 2 แปลง และถั่วลิสง 2 แปลง
- อำเภอจะนะ จ. สงขลา จากพื้นที่ปลูกถั่วลิสง 1 แปลง
- อำเภอกงหรา จ. พัทลุง จากพื้นที่ปลูกถั่วลิสง 1 แปลง
- อำเภอทุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช จากพื้นที่ปลูกถั่วลิสง 1 แปลง
- อำเภอยะหา จ. ยะลา จากพื้นที่ปลูกถั่วหรั่ง 4 แปลง และถั่วลิสง 2 แปลง
- อำเภอรือเสาะ จ. นราธิวาส จากพื้นที่ปลูกถั่วหรั่ง 1 แปลง และถั่วลิสง 1 แปลง

ทำการเก็บดินจากแปลงปลูกถั่วลิสงหรือถั่วหรั่ง โดยใช้พลั่วขนาดเล็กตักดินบริเวณใต้ทรงพุ่มของถั่วในแปลงขนาดประมาณ 30 x 30 เมตร จำนวน 5 จุด โดยเดินสุ่มเก็บตัวอย่างดินในลักษณะเส้นทแยงมุม เก็บใส่ถุงพลาสติกถุงละประมาณ 500 กรัม/จุด (ภาพที่ 2) รัดปากถุงด้วยยางเส้น แล้วนำกลับห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไป



ภาพที่ 2 แผนผังการเดินสุ่มเก็บตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินที่เก็บมาทั้งสิ้น 23 แปลง แปลงละ 5 จุด รวม 115 ตัวอย่าง มาทำการแยกเชื้อราปฏิปักษ์จากดินตัวอย่างแต่ละจุด โดยวิธี soil plate technique (Elad and Chet, 1983) จุดละ 2 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ตัวอย่างดิน 0.2 กรัม นำมาใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ TSM ลงในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าบนพื้นเรียบเพื่อให้ดินกระจายทั่วทั้งอาหาร ตั้งบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) นาน 7 วัน ใช้เข็มเขี่ยแยกเอาเฉพาะกลุ่ม (colony) เดี่ยว ๆ ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ลงเลี้ยงใน PDA slant เพื่อเก็บเป็นเชื้อบริสุทธิ์ไว้ทำการศึกษาในขั้นต่อไป

2. การแยกเชื้อราสาเหตุ และการพิสูจน์การเกิดโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง

เก็บรวบรวมต้นถั่วหรั่งที่แสดงอาการของโรคใบไหม้จากศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา แล้วนำมาล้างเศษดินบนตัวอย่างใบพืชออกให้สะอาดโดยผ่านน้ำไหล 3 นาที แล้วตัดชิ้นเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 5 x 5 มิลลิเมตร นำไปแช่ใน chlorox 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที แล้วนำไปล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ซับให้แห้ง แล้ววางบนจานที่มีอาหารวุ้น WA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) นาน 3 - 4 วัน หลังจากนั้นตัดปลายเส้นใย (hyphal tip) นำไปวางบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้ออีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำเชื้อราสาเหตุที่แยกได้ไปตรวจสอบลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อรา *R. solani* หลังจากนั้นทำการพิสูจน์การเกิดโรคโดยเลี้ยงเส้นใยเชื้อรา *R. solani* บนเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อนาน 7 วัน โดยใส่เมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อราเจริญอยู่ประมาณ 10 กรัม ลงบนโคนก้านของต้นถั่วหรั่งอายุ 45 วันที่ปลูกในเรือนทดลองของคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หลังจากนั้นสังเกตและบันทึกผลการเกิดโรคทุกวันเป็นเวลา 7 วัน โดยตรวจสอบการเจริญของเส้น

ใยเชื้อราและลักษณะการเกิดโรคบริเวณโคนก้านและอาการเหี่ยวที่ใบของต้นถั่วหรั่ง และเมื่อเกิดโรคแล้วทำการแยกเชื้ออีกครั้ง

3. การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp.

3.1 การคัดเลือกโดยวิธี dual culture technique

คัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินในแปลงซึ่งตรวจพบเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. มากกว่า 25 สายพันธุ์ โดยการทดสอบความสามารถในการแข่งขันและยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ *R. solani* โดยวิธี dual culture technique ทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *R. solani* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร แล้วใช้ cork borrer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะชิ้นอาหารวุ้นบริเวณขอบโคโลนีที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่ วางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราแต่ละชนิดในทิศตรงกันข้าม และให้ห่างจากขอบของจานอาหารเลี้ยงเชื้อข้างละ 1 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) นาน 5-7 วัน สังเกตและบันทึกปฏิกิริยาตามมาตรฐานของ Bell และคณะ (1982) ซึ่งแบ่งปฏิกิริยาออกได้ 5 ลักษณะ ดังนี้

1. เส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์เจริญครอบคลุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโดยสมบูรณ์
2. เส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์เจริญครอบคลุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ 2 ใน 3
3. เส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุสามารถเจริญมาชนกันได้ ระยะทาง 1 ใน 2
4. เส้นใยของเชื้อราสาเหตุเจริญครอบคลุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์ 2 ใน 3
5. เส้นใยของเชื้อราสาเหตุเจริญครอบคลุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์โดยสมบูรณ์

ทำการคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์เฉพาะสายพันธุ์ที่มีปฏิกิริยาแบบที่ 1 เพื่อการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.2 การทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการพันรัด (coiling) เชื้อรา *R. solani*

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ผ่านการคัดเลือก จากข้อ 3.1 มาทำการทดสอบความสามารถในการพันรัดเชื้อรา *R. solani* โดยเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *R. solani* แบบ dual culture technique แบบเดียวกับข้อ 3.1 เมื่อเชื้อราทั้งสองชนิดเจริญมาชนกัน สังเกตดูการเป็นปฏิปักษ์โดยการพันรัดของเส้นใยเชื้อราทั้งสองชนิด โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อสุ่มตัดชิ้นวุ้นตรงบริเวณที่มีปลายของเส้นใยของเชื้อราทั้งสองชนิดเจริญมาชนกันให้มีขนาดประมาณ 1x1 มิลลิเมตร

จำนวน 2 จุด นำชิ้นวุ้นแต่ละจุดไปวางลงบนแผ่นสไลด์ที่มีหยดของ lactophenol แล้วปิดทับด้วย cover slip หลังจากนั้นนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound ที่กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีความสามารถในการพันรัด (coiling) เส้นใยของเชื้อราสาเหตุ *R. solani* และนำสายพันธุ์ที่มีความสามารถดังกล่าวไปทดสอบโดยวิธีการในข้อ 3.3

3.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ด้วยวิธี Congo red agar

นำเชื้อราปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.2 มาคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และเปรียบเทียบกับเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* โดยเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ (Carder, 1986) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ทิ้งไป ส่วนใสเก็บไว้ทดสอบ เตรียมอาหารวุ้นโดยใช้ carboxy methyl cellulose (CMC–Na) 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ผสมกับวุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เทบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อวุ้นแข็งตัว เจาะรูตรงกลางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร นำส่วนใสดังกล่าวปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยอดลงในรูที่เจาะ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย congo red 0.1 เปอร์เซ็นต์ ลงจนท่วมวุ้น ทิ้งไว้ 30 นาที เทสีออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นเติมสารละลาย NaCl 1 โมลาร์ ล้างวุ้นนาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ทำซ้ำ 2 ครั้ง ในกรณีที่มีเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เอนไซม์จะย่อย CMC–Na ทำให้เห็นเป็นวงใสรอบรูที่เจาะในขณะที่ส่วนของวุ้นที่ CMC–Na ไม่ถูกย่อยจะติดสีแดงของ congo red บันทึกและหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (วิไลวรรณ โชติเกียรติ และ อมรรัตน์ พงศ์ดารา, 2533) แล้วนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.4 การจำแนกและตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่ผ่านการคัดเลือก

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกในข้อ 3.3 โดยเลี้ยงในอาหาร PDA และทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) นาน 5 วัน แล้วนำมาตรวจสอบลักษณะของก้านชูสปอร์ (conidiophore) บันทึกขนาดและรูปร่างของ phialide, phialospore และ chlamydospore เปรียบเทียบกับ Rifai (1969)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของมวลชีวภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในการควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง

4.1 การเตรียมเชื้อราสาเหตุ *R. solani*

เตรียมโดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุ *R. solani* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) นาน 5-7 วัน แล้วตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อเจริญอยู่ด้วย cork borrer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ลงเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการต้มและนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 26-32 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

4.2 การเตรียมมวลชีวภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ในรูปแบบต่าง ๆ

โดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกข้างต้น นำมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) นาน 5-7 วัน แล้วตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อเจริญอยู่ด้วย cork borrer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ลงเลี้ยงในวัสดุอาหาร (ภาพที่ 3) ในรูปแบบต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

4.2.1 ข้าวฟ่างผสมโดโลไมท์

นำเมล็ดข้าวฟ่างไปต้มและนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที เขี่ยชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์ลงเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่าง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 26-32 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน แล้วผสมกับปูนโดโลไมท์ (325 mesh, pH 8.2) ในอัตราส่วน 2 : 1 โดยน้ำหนัก ปั่นผสมด้วยเครื่องปั่น นาน 3-5 นาที นำมาร่อนให้ได้ส่วนที่เป็นผงโดยใช้ตะแกรง ซึ่งมีช่องขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส)

4.2.2 กากใยปาล์มบดผสมโดโลไมท์

นำกากใยปาล์มที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ไปบดด้วยเครื่องบดชิ้นส่วนพืชซึ่งสามารถผ่านตะแกรง 40 mesh เติมน้ำโดยมีอัตราส่วนของกากใยปาล์มและน้ำ 2 : 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที เขี่ยชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์ลงเลี้ยงในกากใยปาล์มบดนาน 10 วัน แล้วผสมกับปูนโดโลไมท์ (325 mesh, pH 8.2) ในอัตราส่วน 2 : 1 โดยน้ำหนัก ปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นนาน 3-5 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส)

4.2.3 เมล็ดข้าวฟ่าง

นำเมล็ดข้าวฟ่างไปต้มและนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที เขี่ยชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์ลงเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่าง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) นาน 7 วัน

4.2.4 กากใยปาล์มบด

นำกากใยปาล์มที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง บดด้วยเครื่องบดชิ้นส่วนพืชซึ่งสามารถผ่านตะแกรง 40 mesh เติมน้ำโดยมีอัตราส่วนของกากใยปาล์มและน้ำ 2 : 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) นึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที เขี่ยชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์ลงเลี้ยงในกากใยปาล์มบด บ่มที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) นาน 10 วัน

4.3 การเตรียมเชื้อ *Rhizobium* sp. เพื่อใช้คลุกเมล็ดถั่วหรั่ง

โดยเลี้ยงเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ NC-92 (กรมวิชาการเกษตร ติดต่อส่วนตัว) ที่บริสุทธิ์ ลงในอาหาร YMB ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบประมาณ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 26-32 องศาเซลเซียส นาน 7-10 วัน จนกระทั่งปริมาณเชื้อไรโซเบียมมากกว่า 10^9 cfu/มิลลิลิตร และก่อนนำไปคลุกกับเมล็ดถั่วหรั่งเพื่อเตรียมปลูก นำอาหารดังกล่าวไปตรวจนับปริมาณเชื้อ โดยวิธี dilution plate technique (ภาคผนวก ค)

ภาพที่ 3 วัสดุซึ่งนำมาใช้ในการผลิตมวลชีวภาพ

ก เมล็ดข้าวฟ่าง

ข กากใยปาล์มบด

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54 เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง ในสภาพเรือนทดลอง

4.4.1 การทดสอบเพื่อคัดเลือกกรรมวิธีที่เหมาะสมเบื้องต้น

ทำการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งโดยมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์โดยทำการปลูกถั่วหรั่งในถุงเพาะชำซึ่งบรรจุดินผสม ถุงละ 1 เมล็ด ในเรือนทดลอง เมื่อต้นถั่วหรั่งมีอายุ 45 วัน จึงใส่มวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในรูปแบบต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design) จัดทรีตเมนท์แบบแฟกทอเรียล (factorial) มี 2 ปัจจัยการทดลอง ปัจจัยแรก คือ รูปแบบของมวลชีวภาพ และปัจจัยที่สอง คือ เวลาในการใส่เชื้อราสาเหตุ รวมทั้งสิ้น 14 กรรมวิธี ทำ 3 ซ้ำการทดลอง ปัจจัยแรกมี 8 กรรมวิธี คือ

1. มวลชีวภาพเมล็ดข้าวฟ่าง
2. มวลชีวภาพกากใยปาล์มบด
3. ชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีขายตามท้องตลาด
4. มวลชีวภาพข้าวฟ่างผสมโดโลไมท์
5. สารฆ่าเชื้อรา iprodione
6. ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อรา *R. solani* อย่างเดียว)

โดยกรรมวิธีที่ 1 - 4 กำหนดให้มีลักษณะเวลาในการปลูกเชื้อสาเหตุ 3 ลักษณะ ดังนี้คือ

1. ปลูกเชื้อรา *R. solani* ก่อน 2 วันแล้วตามด้วยมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์
2. ปลูกเชื้อรา *R. solani* พร้อมกับมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์
3. ปลูกมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ก่อน 2 วันแล้วตามด้วยเชื้อรา *R. solani*

กรรมวิธีที่ 5 กำหนดให้มีลักษณะการปลูกเชื้อสาเหตุโดยปลูกเชื้อรา *R. solani* ก่อน 2 วัน

การปลูกเชื้อราสาเหตุ และมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ อย่างละ 5 กรัมต่อกระถาง โดยหว่านเชื้อราบริเวณโคนก้านของต้นถั่วหรั่ง ในระหว่างการทดลองมีการให้น้ำแบบพ่นฝอยวันละ 3 ครั้ง (เช้า เที่ยง เย็น) และคลุมด้วยตาข่ายพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาระดับความชื้นซึ่งเป็นการส่งเสริมการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด สังเกตและบันทึกผลการทดลองเป็นเวลา 7 วัน การตรวจผลการควบคุมโรค กระทำโดยนับจำนวนก้านใบของต้นถั่วที่แสดงอาการของโรคใบไหม้ที่ถูกเชื้อรา *R. solani* เข้าทำลาย แล้วนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เพื่อคัดเลือกกรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพไปใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

4.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของมวลชีวภาพร่วมกับเชื้อ *Rhizobium* sp.

คัดเลือกกรรมวิธีการควบคุมโรคใบไหม้ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์จากขั้นตอน 4.3.1 ที่มีประสิทธิภาพดี นำมาทำการทดลองเพื่อตรวจสอบผลของการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ต่อการสร้างปมของถั่วหรั่ง และผลของเชื้อราปฏิปักษ์ร่วมกับเชื้อ *Rhizobium* sp. ในการควบคุมโรค ทำการทดลองโดยปลูกเมล็ดถั่วหรั่งในถุงเพาะชำ ซึ่งบรรจุดิน ทราย และขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 4:2:1 โดยปริมาตร ทำการวิเคราะห์สมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และปริมาณเชื้อ *Rhizobium* sp. ในดิน (ภาคผนวก ง ตารางที่ 1-1, 1-2, 1-5) และตรวจนับปริมาณเชื้อ *Rhizobium* sp. ที่เตรียมคลุกเมล็ดถั่วโดยวิธี dilution plate technique ในอาหาร YMA (ภาคผนวก ค) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ จัดทรีตเมนท์แบบแฟกทอเรียล การทดลองมี 2 ปัจจัย ปัจจัยแรก คือ การคลุกเมล็ดด้วยเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ NC-92 ปัจจัยที่สอง คือ กรรมวิธีการควบคุม จำนวน 5 ซ้ำการทดลอง เมื่อถั่วหรั่งอายุ 60 วัน ทำการทดสอบโดยหว่านเชื้อราสาเหตุ บริเวณโคนก้านของต้นถั่วหรั่ง ในอัตรา 5 กรัม/กอ หลังจากการปลูกเชื้อราสาเหตุ *R. solani* 1 วัน ทำการทดสอบการควบคุมการเกิดโรคโดยใช้กรรมวิธีต่าง ๆ โดยปริมาณของมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54 ที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 5 กรัม/ กอ ดังนี้

1. มวลชีวภาพกากใยปาล์มบด + เชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92
2. มวลชีวภาพกากใยปาล์มบด
3. มวลชีวภาพกากใยปาล์มบดผสมโดโลไมท์ + เชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92
4. มวลชีวภาพกากใยปาล์มบดผสมโดโลไมท์
5. มวลชีวภาพข้าวฟ่างผสมโดโลไมท์ + เชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92
6. มวลชีวภาพข้าวฟ่างผสมโดโลไมท์
7. ชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีขายทั่วไป +เชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92
8. ชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีขายทั่วไป
9. สารฆ่าเชื้อรา iprodione + เชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92
10. สารฆ่าเชื้อรา iprodione
11. ชุดควบคุม (เชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 อย่างเดียว)
12. ชุดควบคุม (เชื้อรา *R. solani* อย่างเดียว)

ในระหว่างการทดลองมีการให้น้ำแบบพ่นฝอย เช้า เที่ยง เย็น ของทุกวัน และคลุมด้วยตาข่ายพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ บันทึกผลการสร้างปมโดยการชั่งน้ำหนักและนับจำนวนปม แล้ววัดความรุนแรงของการเกิดโรค โดยนับจำนวนก้านของต้นถั่วหรั่งที่แสดงอาการใบไหม้ เมื่อเสร็จสิ้น

การทดลองนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธีการของจำเป็น อ่อนทอง (2544) (ภาคผนวก ข) แล้วนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ

4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54 เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง ในสภาพแปลงทดลองขนาดเล็ก

คัดเลือกชุดทดลองที่มีประสิทธิภาพ จากข้อ 4.3.2 ไปทำการทดสอบในสภาพแปลงทดลองขนาดเล็ก ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา อ.รัตภูมิ จ. สงขลา เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 4 เดือน ตั้งแต่เดือนมกราคม - พฤษภาคม พ.ศ. 2545 ทำการวิเคราะห์สมบัติทางเคมี ทางกายภาพ ของดิน ตรวจวัดอุณหภูมิ และเปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์ และตรวจนับปริมาณเชื้อ *Rhizobium* spp. ในดิน (ภาคผนวก ง ตารางที่ 1-1, 1-2, 1-4, 1-5) และตรวจนับปริมาณเชื้อ *Rhizobium* spp. ที่เตรียมคลุกเมล็ด โดยวิธี dilution plate technique ในอาหาร YMA (ภาคผนวก ค) เช่นเดียวกับในสภาพเรือนทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design) จำนวน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีขนาดพื้นที่แปลงเท่ากับ 3.6 X 4.8 ตารางเมตร โดยทำการปลูกพืชจำนวน 6 แถว ๆ ละ 8 ต้น โดยมีระยะการปลูกระหว่างต้นและแถวเท่ากับ 60 X 60 เซนติเมตร เก็บข้อมูลภายในพื้นที่ 2.4 X 3.6 ตารางเมตร เมื่อถั่วหรั่งอายุ 20 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0 อัตรา 30 กิโลกรัมต่อไร่ แล้วทำการพูนโคนโดยใช้จอบ เมื่อต้นถั่วหรั่งอายุ 60 วัน จึงทดสอบการควบคุมโรค โดยปลูกเชื้อราสาเหตุ *R. solani* ในอัตรา 20 กรัม/กอ บริเวณ รอบ ๆ โคนต้นถั่วหรั่ง หลังจากนั้น 2 วัน ทำการควบคุมการเกิดโรคใบไหม้โดยใส่มวลชีวภาพของเชื้อราปฏิปักษ์น้ำหนัก 20 กรัม/กอ โดยมีชุดทดลองดังนี้

1. ไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 + เชื้อรา *R. solani*
2. มวลชีวภาพกากใยปาล์มบด+ เชื้อรา *R. solani*
3. มวลชีวภาพกากใยปาล์ม+เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ NC-92 +เชื้อรา *R. solani*
4. สารฆ่าเชื้อรา iprodione + เชื้อรา *R. solani*
5. ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อรา *R. solani* อย่างเดียว)
6. ชุดตรวจสอบ (เชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 อย่างเดียว)
7. ชุดตรวจสอบ (พืชปกติ)

บันทึกผลการทดลองภายในระยะเวลา 30 วัน หลังจากทำการทดสอบเชื้อ ตรวจสอบผลการควบคุมโรคใบไหม้ในแต่ละกอของต้นถั่วหรั่งทุกวัน โดยวัดระดับการเกิดโรค ซึ่งมีเกณฑ์การวัดระดับโรค (ภาพที่ 4) ดังนี้

0 ไม่เป็นโรค

1 มีก้านเป็นโรค 1-20 เปอร์เซ็นต์

2 มีก้านเป็นโรค 21-40 เปอร์เซ็นต์

3 มีก้านเป็นโรค 41-60 เปอร์เซ็นต์

4 มีก้านเป็นโรค 61-80 เปอร์เซ็นต์

5 มีก้านเป็นโรค 81-100 เปอร์เซ็นต์

รวมทั้งเก็บผลผลิตเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้น และในเมล็ด แล้วนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ

5. การตรวจนับจำนวนประชากรของมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส)

ตรวจนับจำนวนประชากรของมวลชีวภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ที่ผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณในวัสดุข้าวฟ่างและกากใยปาล์มบด ซึ่งมีการผสมโดโลไมท์ทั้งที่ผ่านการอบและไม่อบฆ่าเชื้อปนเปื้อนตามกรรมวิธีการผลิตในข้อ 4.2 โดยตรวจนับปริมาณเชื้อครั้งแรกหลังจากการผลิต 1 เดือน และตรวจนับทุกเดือนเป็นระยะเวลานาน 8 เดือน โดยวิธี dilution plate technique ในอาหาร PDA (ภาคผนวก ค) บันทึกข้อมูลและเปรียบเทียบจำนวนประชากรของมวลชีวภาพที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) ในแต่ละเดือน

ภาพที่ 4 เกณฑ์การวัดระดับการเกิดโรค (แปลงทดลอง)

ก	ระดับ	0	ไม่เป็นโรค
ข	ระดับ	1	มีก้านเป็นโรค 1-20 เปอร์เซ็นต์
ค	ระดับ	2	มีก้านเป็นโรค 21-40 เปอร์เซ็นต์
ง	ระดับ	3	มีก้านเป็นโรค 41-60 เปอร์เซ็นต์
จ	ระดับ	4	มีก้านเป็นโรค 61-80 เปอร์เซ็นต์
ฉ	ระดับ	5	มีก้านเป็นโรค 81-100 เปอร์เซ็นต์