บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. ดินจากแหล่งปลูกผักที่ต่างกัน 4 แหล่ง แหล่งละ 5 แปลง แปลงละ 1 กิโลกรัม รวมปริมาณดิน 20 กิโลกรัม
2. ดินจากแหล่งที่มีประวัติการเกิดโรคเน่าคอดินของผัก ที่เกิดจากเชื้อ *Pythium aphanidermatum* ปริมาณ 1 กิโลกรัม
3. อาหารเลี้ยงเชื้อรา และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), V-8 juice Agar, *Trichoderma* Selective Media (TSM), Nutrient Agar (NA), Potato Dextrose Broth (PDB), Water Agar (WA)
4. สารฆ่าเชื้อราแบนเลท (ชื่อสามัญ คือ benomyl), สารฆ่าเชื้อราออโธไซด์ (ชื่อสามัญ คือ captan), สารฆ่าเชื้อราโอฟาแทน (ชื่อสามัญ คือ metalaxyl)
5. สารที่ใช้จำแนกเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ beef extract, peptone, sodium chloride, agar, hydrogen peroxide 3%, safranin O, crystal violet, iodine solution
6. เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 %
7. วัสดุเพื่อใช้ในการผลิตมวลชีวภาพเชื้อรา *Trichoderma* sp. ได้แก่ กากใยปาล์ม (mesocarp fiber), กะลาปาล์ม (oilpalm shell), เมล็ดข้าวฟ่าง (sorghum grain), ยูเรีย
8. methyl cellulose
9. ผลแตงกวา ปริมาณ 1 กิโลกรัม

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250, 500 มิลลิลิตร ขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตร บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 200, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร หลอดทดลอง แท่งแก้วรูปตัววี
2. ตะเกียงแอลกอฮอล์
3. เครื่องเขย่าหลอด (mixer)
4. เครื่องเขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อ (shaker)
5. ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)

6. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
7. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
8. ตู้ปรับอุณหภูมิ (incubator)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
10. เครื่องผสมอาหาร (blender)
11. กล้องจุลทรรศน์และอุปกรณ์ประกอบ เช่น เลนส์วัดขนาดเซลล์ เครื่องนับเซลล์
12. กระป๋องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นิ้ว
13. ตะกร้าพลาสติกขนาด กว้าง 8.5 นิ้ว ยาว 11 นิ้ว สูง 2 นิ้ว
14. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
15. กล่องพลาสติกขนาดยาว 12 นิ้ว กว้าง 10 นิ้ว สูง 5 นิ้ว

วิธีการ

1. เชื้อสาเหตุโรคเน่าคอดิน เชื้อ *Pythium aphanidermatum*

1.1 การเก็บตัวอย่างดินและการแยกเชื้อ

เก็บตัวอย่างดินน้ำหนัก 1 กิโลกรัม จากแปลงเพาะกล้าของภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งเป็นแปลงที่เคยมีประวัติของการเกิดโรคเน่าคอดิน (damping-off) โดยเชื้อ *P. aphanidermatum* มาก่อน นำมาแบ่งใส่กล่องพลาสติกขนาดยาว 12 นิ้ว กว้าง 10 นิ้ว สูง 5 นิ้ว ที่ทำความสะอาดเช็ดฆ่าเชื้อด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70% จำนวน 2 กล่อง กล่องละ 0.5 กิโลกรัม เกลี่ยหน้าดินให้เสมอ จากนั้นใช้เหยื่อล่อในการแยกเชื้อโดยวิธีของ Quimio (1978) และ Watanabe (1981a,b) โดยวางผลแตงกวาที่เช็ดฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย clorox 10% บนดินในกล่องชั้นในลักษณะปักด้านปลายผลลงไปในดิน จำนวนกล่องละ 3 ผล โดยมีการทำแผลที่ผลแตงกวาแต่ละผล ใช้เข็มสะอาดทำให้เกิดแผลก่อนนำไปวาง แล้วฉีดพ่นน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงบนดินเพื่อให้ความชื้น และฉีดพ่นน้ำกลั่นทุกวัน วางกล่องพลาสติกในที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) นาน 5 วันจะสังเกตเห็นแตงกวาแสดงอาการช้ำ แผลเน่า และมีเส้นใยสีขาวของเชื้อสาเหตุโรคเจริญคลุมผลแตงกวา นำผลที่แสดงอาการมาทำการแยกเชื้อเพื่อให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยวิธี tissue transplanting บนอาหาร WA

1.2 การจำแนกเชื้อ *P. aphanidermatum* สาเหตุโรคเน่าคอดิน

นำเชื้อราที่แยกได้ไปตรวจสอบเพื่อยืนยันว่าเชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อ *P. aphanidermatum* สาเหตุโรคเน่าคอดินหรือไม่ โดยตัดชิ้นส่วนเส้นใยที่เจริญบนอาหารวุ้น V-8 juice agar ไปวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปให้ท่วมชิ้นวุ้น พร้อมทั้งใส่ชิ้นใบหญ้าที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหารดังกล่าว เพื่อชักนำให้เชื้อสร้าง sporangium และตรวจดูการปลดปล่อย zoospore (Quimio, 1978) นำไปวางที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้ววางที่อุณหภูมิห้อง นาน 90 นาที สังเกตการปลดปล่อย zoospore ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเส้นใย ขนาด oospore และลักษณะสัณฐานวิทยาของ sporangium ลักษณะการเกาะติดของ antheridium และอัตราการเจริญบนอาหาร PDA โดยเปรียบเทียบลักษณะต่างๆของเชื้อที่ศึกษากับคู่มือการจำแนกชนิดเชื้อรา *Pythium* ของ Plaats-Niterink (1981) และ ประไพพร ศิริคติธรรม (2537)

2. เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

2.1 การเก็บตัวอย่างดิน

สำรวจและเก็บตัวอย่างดินเพื่อนำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อนำไปทดสอบศักยภาพความเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *P. aphanidermatum* โดยเลือกเก็บดินจากแหล่งดินเกษตรกรรมที่เคยปลูกผักมาก่อนและไม่มีการระบาดของโรคเน่าคอดินจากแหล่งดิน 4 แหล่งคือ ในจังหวัดสตูล 3 แหล่ง และจังหวัดสงขลา จำนวน 1 แหล่ง แหล่งละจำนวน 5 แปลงโดยแต่ละแปลงมีขนาดกว้าง 5 เมตร และยาว 10 เมตร รวมเป็น 20 แปลง เลือกเก็บจากดินรอบโคนต้นผักบริเวณมุมแปลงทั้ง 4 มุม จำนวน 4 จุด และบริเวณกลางแปลงจำนวน 1 จุด รวม 5 จุดโดยเก็บดินจุดละ 200 กรัม รวมเป็นแปลงละ 1 กิโลกรัม ใช้พลั่วขนาดเล็กขุดลงไปให้ลึกประมาณ 5 เซนติเมตร ตักใส่ถุงพลาสติกขนาด 5x10 นิ้ว (Nelson and Craft, 1992) ปิดปากถุงให้สนิท ซึ่งสถานที่ที่เก็บตัวอย่างดินจำนวน 4 แหล่ง ดังนี้คือ

แหล่งที่ 1 แปลงผักในเขตหมู่ที่ 5 ต.แประ อ.ท่าแพ จ.สตูล
แหล่งที่ 2 แปลงผักในเขตหมู่ที่ 3 ต.บางเหรียง อ.ควนเนียง จ.สงขลา
แหล่งที่ 3 แปลงผักในเขตหมู่ที่ 5 ต.นาแค อ.เมือง จ.สตูล
แหล่งที่ 4 แปลงผักในเขตหมู่ที่ 1 ต.ทุ่งนุ้ย และหมู่ 1 ต.ควนกาหลง อ.ควนกาหลง จ.สตูล

นำดินที่สุ่มเก็บจากแหล่งต่าง ๆ มาแยกเชื้อจุลินทรีย์ดินต่อไป

2.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

2.2.1 การแยกเชื้อ *Trichoderma* sp.

ใช้วิธี soil plate technique บนอาหาร *Trichoderma* Selective Medium (TSM) (Elad *et al.*, 1981) โดยนำดินแต่ละแหล่งจำนวน 0.1 กรัม ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเทอาหาร TSM ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 15 มิลลิลิตร แล้วเขย่าเคลื่อนไหวจานเลี้ยงเชื้อไปมา เพื่อให้ดินกระจายทั่วจานเลี้ยงเชื้อ แล้วตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็ง นำไปบ่มเลี้ยงในที่มืดนาน 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส จะสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* sp. เจริญขึ้นมา ตัดปลายเส้นใยที่เจริญไปเลี้ยงและเก็บไว้เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไปใน PDA slant

2.2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรีย

นำดิน จากแหล่งที่เก็บแต่ละแหล่ง จำนวน 1 กรัมต่อแหล่ง ไปใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการผสมดินและน้ำให้เข้ากันด้วยเครื่อง เขย่าหลอด จากนั้นทำการเจือจาง (serial dilution) ไปจนถึงความเข้มข้นของสารแขวนลอยดินที่ 10^{-6} นำสารแขวนลอยดินที่แต่ละความเข้มข้นไปหยดลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ King's B Medium ด้วย micropipette ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) เกลี่ยสารแขวนลอยดินให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 วัน จะสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเจริญบนผิวหน้าอาหาร แยกเอาเฉพาะโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงและเก็บไว้เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไปบน NA slant

ส่วนแบคทีเรียกลุ่มที่ทนร้อนเช่น แบคทีเรีย จำพวก *Bacillus* spp. ทำการแยกเชื้อโดยนำเอาสารแขวนลอยดินที่เหลือจากการแยกตามข้างต้น ไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อกำจัดแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ทนความร้อนออกไป แล้วนำมาแยกเชื้อ โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thornton's Standardized Medium บ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน แยกเอาเฉพาะโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงและเก็บไว้เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไปบนอาหาร NA slant

3. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *P. aphanidermatum*

3.1 การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์

ใช้วิธีการทดสอบการเจริญแข่งขันกันของเชื้อ *Trichoderma* spp. กับเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยวิธี dual culture technique บนอาหารวุ้น PDA โดยเทอาหารวุ้นลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ

15 มิลลิลิตร วางไว้ให้อาหารแข็ง จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบซึ่งเลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 3 วัน ตัดส่วนเส้นใยด้วยที่เจาะจุกคอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำไปวางชิดขอบจานด้านใดด้านหนึ่ง จากนั้นตัดชิ้นส่วนของเส้นใยเชื้อ *P. aphanidermatum* อายุ 3 วันที่เจริญบนอาหาร PDA ด้วยที่เจาะจุกคอร์ก ขนาดเดียวกันย้ายไปวางบนจานอาหารวุ้น PDA อีกด้านหนึ่ง โดยเชื้อราที่ทดสอบและเชื้อสาเหตุโรคอยู่ห่างกัน 6 เซนติเมตร บ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส คัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการเจริญเข้าไปในบริเวณเชื้อสาเหตุมากที่สุดโดยใช้มาตรฐานของ Bell และคณะ (1982) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกผลหลังการทดลอง 6 วัน และ 8 วันตามลำดับ เมื่อได้เชื้อราที่มีศักยภาพเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *P. aphanidermatum* นำไปคัดเลือกต่อโดยเปรียบเทียบอัตราการเจริญบนอาหาร PDA โดยการตัดเส้นใยเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน ด้วยที่เจาะจุกคอร์ก ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำไปวางบนอาหาร PDA ทำการทดลอง 5 ซ้ำ บันทึกผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราปฏิปักษ์ที่เจริญ นำไปหาค่าเฉลี่ย เพื่อนำสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญมากที่สุดไปทดสอบต่อไป

3.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

มีกระบวนการทดสอบเพื่อคัดเลือกเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

3.2.1 ใช้วิธีการทดสอบโดยวิธี dual culture technique บนอาหารวุ้น PDA

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ จำนวน 418 สายพันธุ์ บนอาหาร NA แล้วใช้ loop แตะเชื้อแบคทีเรียอายุ 1 วัน ไป streak ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ชิดขอบด้านใดด้านหนึ่งของจานอาหาร จากนั้นตัดเส้นใยเชื้อ *P. aphanidermatum* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 3 วัน โดยใช้ที่เจาะจุกคอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำไปวางในจานอาหารอีกด้านหนึ่งห่างกัน 6 เซนติเมตร บ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองหลังการทดลอง 3 วัน และ 7 วัน โดยสังเกตลักษณะการแข่งขันการเจริญเติบโตของเชื้อและความสามารถในการทำให้เส้นใย ของ *P. aphanidermatum* ยุบลง คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีไปทดสอบในขั้นตอน (3.2.2) ต่อไป

3.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของ เส้นใยเชื้อ *P. aphanidermatum*

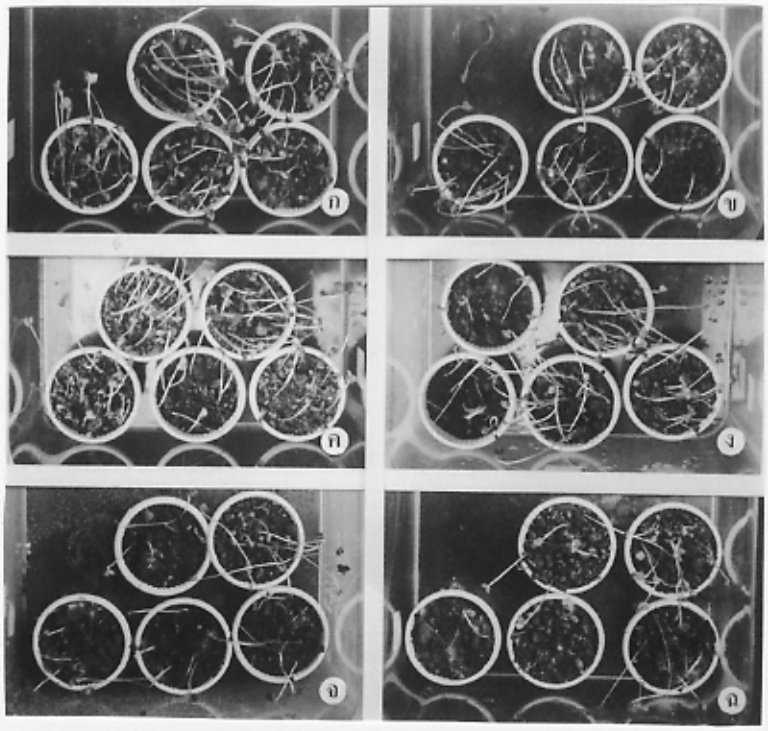
เตรียมเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 3.2.1 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDB ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร โดยการย้ายเชื้อที่เจริญบนอาหาร NA ปริมาณ 1 loop ต่ออาหาร PDB 100 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) พร้อมเขย่าวนด้วยเครื่องเขย่า นาน 3 วัน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยเชื้อ

แบคทีเรียที่เจริญมีระดับความขุ่นตามมาตรฐานของ McFarland (Lennette, 1985) ระดับ No.10 (3×10^9 cfu/ml) จากนั้นนำ bacterial suspension ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วน supernatant ไปทดสอบต่อไปโดยแบ่งใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก หลอดละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด (5 ซ้ำ) ต่อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ นำส่วน supernatant นี้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที แล้วนำไปเทลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร หลอดละ 1 จาน แล้วนำอาหาร PDA ที่เตรียมไว้เทลงไปผสมกับ supernatant จานละ 10 มิลลิลิตร เขย่าวนให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นและอาหารแข็งตัว ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อ *P. aphanidermatum* เจริญบนอาหาร PDA อายุ 3 วันด้วยที่เจาะจุกคอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำไปวางบริเวณกลางจานอาหาร บ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง และบันทึกผลการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. aphanidermatum* โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในวันที่ 3 หลังการทดลอง แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ยเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อสาเหตุตามวิธีของ Gamliel และคณะ (1989) เปรียบเทียบกันโดยใช้อาหาร PDA ที่ไม่ผสม supernatant เป็นชุดควบคุม วิเคราะห์ผลทางสถิติ นำผลการทดลองที่ได้โดยคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีไปทดสอบกับเมล็ดพันธุ์คะน้าในห้องปฏิบัติการในขั้นตอนที่ 3.2.3 ต่อไป

3.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์บนเมล็ดพันธุ์คะน้าในห้องปฏิบัติการด้วยเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหารเหลวและสารที่แบคทีเรียผลิตขึ้น

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.2 ในอาหาร PDB โดยการย้ายเชื้อที่เจริญบน PDA ปริมาณ 1 loop ลงใน PDB ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที นาน 3 วัน จากนั้นแบ่งเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว ออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็น supernatant ไปทดสอบ ส่วนที่ 2 ใช้เซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลวทดสอบ โดยนำเมล็ดพันธุ์คะน้าไปแช่ในแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ คือ แช่ในส่วนของ supernatant และเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว เปรียบเทียบกับการแช่เมล็ดพันธุ์ในอาหาร PDB และใช้น้ำเป็นชุดควบคุม แช่เมล็ดพันธุ์นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการแช่ไปจุ่มลงใน zoospore suspension ของเชื้อ *P. aphanidermatum* นาน 20 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา จึงปลูกลงในดินจากสภาพไร่นาที่บรรจุในกระป๋องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นิ้ว จำนวน 20 เมล็ด/กระป๋อง ทำการทดลอง 5 ซ้ำ และนำไปบรรจุไว้ในกล่องพลาสติก (ขนาดยาว 12 นิ้ว กว้าง 10 นิ้ว สูง 5 นิ้ว) เพื่อรักษาความชื้น ตรวจความงอกของเมล็ดคะน้าในดินหลังปลูก 7 วัน (ภาพที่ 2) เชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดสอบนี้ นำไปจำแนกสกุล

โดยการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การย้อมสีแกรม การทดสอบ motility test และทดสอบ catalase test (Mac Faddin, 1980)



ภาพที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของ แบคทีเรียปฏิปักษ์ ต่อการควบคุมโรคเน่าคอดินของกล้าคะน้าในห้องปฏิบัติการเมื่อจุ่มแช่เมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกด้วย

ก. เซลล์แบคทีเรีย B10-2 ในอาหารเหลว ข. Supernatant ของ B10-2

ค. เซลล์แบคทีเรีย B07-2 ในอาหารเหลว ง. Supernatant ของ B07-2

จ. PDB (control) ฉ. น้ำ (checked)

4. การเพิ่มปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ T 01-22 เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมโรคเน่าคอดินของกะน้า

นำเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ T01-22 ที่ผ่านการคัดเลือกในข้อ 3.1 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร นาน 7 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงบนวัสดุต่างๆ เพื่อเพิ่มปริมาณมวลชีวภาพ โดยมีวิธีการเตรียมมวลชีวภาพของเชื้อราปฏิปักษ์บนวัสดุต่างๆ (ภาพที่ 3) ดังนี้ คือ

4.1 การเพิ่มปริมาณบนเมล็ดข้าวฟ่าง (sorghum: SG)

นำเมล็ดข้าวฟ่างมาล้างให้สะอาด แช่ในน้ำสะอาดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำไปต้มจนเมล็ดข้าวฟ่างนิ่ม แล้วใช้ตะแกรงกรองเอาน้ำออกให้หมด นำไปบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาณ 200 กรัม ปิดจุกด้วยสำลีสะอาดและปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ย้ายเส้นใยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ T01- 22 ที่เจริญบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 7 วันโดยใช้ที่เจาะจุกคอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้นใส่ลงไปในขวดที่บรรจุเมล็ดข้าวฟ่างที่เตรียมไว้ บ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

4.2 การเพิ่มปริมาณโดยใช้กะลาปาล์ม (oilpalm shell: S)

นำกะลาปาล์มไปคั่วด้วยไฟความร้อนอ่อน เพื่อให้กะลาปาล์มมีความกรอบง่ายต่อการนำไปบดให้ละเอียดในขั้นตอนต่อไป วิธีการบดกะลาปาล์มทำได้โดยการใช้เครื่องบดอาหารสัตว์ขนาดใหญ่ แล้วนำไปร่อนกรองด้วยตะแกรงที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 เซนติเมตร ชั่งกะลาปาล์มบดที่ผ่านการร่อนแล้ว อัตรา 100 ส่วน ผสมยูเรียอัตรา 1 ส่วนโดยน้ำหนัก แล้วนำไปผสมกันโดยใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณพอเหมาะที่ทำให้วัสดุมีความเปียกพอดีไม่แฉะจนเกินไป คลุกเคล้าเข้ากันให้สม่ำเสมอ จากนั้นนำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลีและใช้อลูมิเนียมฟอยล์ปิดทับอีกครั้ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ย้ายเส้นใยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ T01-22 ที่เจริญบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 7 วัน ด้วยที่เจาะจุกคอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้นใส่ลงไปในขวดที่บรรจุกะลาปาล์มบดที่เตรียมไว้ บ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.3 การเพิ่มปริมาณโดยใช้กากใยปาล์ม (mesocarp fiber: M)

นำกากใยปาล์มที่แห้งแล้วจากโรงงาน ไปบดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ขนาดใหญ่ แล้วนำไปร่อนกรองด้วยตะแกรงที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 เซนติเมตร ชั่งกากใยปาล์มบดที่ผ่านการร่อนแล้ว 100 ส่วนผสมยูเรีย 1 ส่วนโดยน้ำหนัก แล้วนำไปผสมกันโดยใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณพอเหมาะที่ทำให้วัสดุมีความเปียกพอดีไม่แฉะจนเกินไป คลุกเคล้าเข้ากันให้สม่ำเสมอ จากนั้นนำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลีและใช้อลูมิเนียมฟอยล์ปิดทับอีกครั้ง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ย้ายเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ T01-22 ที่เจริญบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 7 วัน โดยใช้ที่เจาะจุกคอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้นใส่ลงไปในขวดที่บรรจุกากใยปาล์มบดที่เตรียมไว้ บ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.4 การเพิ่มปริมาณโดยใช้ส่วนผสมของกะลาปาล์มและกากใยปาล์ม(oilpalmshell +mesocarp fiber: S+M)

นำกะลาปาล์มและกากใยปาล์มที่ผ่านการบดและร่อนด้วยตะแกรงแล้ว มาผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก แล้วนำส่วนผสมของกะลาปาล์มบดและกากใยปาล์มบด 100 ส่วนผสมยูเรีย 1 ส่วนโดยน้ำหนัก แล้วนำไปผสมกันโดยใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณพอเหมาะที่ทำให้วัสดุมีความเปียกพอดีไม่แฉะจนเกินไป คลุกเคล้าเข้ากันให้สม่ำเสมอ แล้วนำไปผสมกับกากใยปาล์มบดให้สม่ำเสมอ จากนั้นนำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลีและใช้กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ปิดทับอีกครั้งหนึ่ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ย้ายเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ T01-22 ที่เจริญบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 7 วัน โดยใช้ที่เจาะจุกคอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้นใส่ลงไปในขวดที่บรรจุกะลาปาล์มบดและกากใยปาล์มบดที่เตรียมไว้ วางเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ภาพที่ 3 วัสดุที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ T 01-22

ก. กากใยปาล์มก่อนบด

ข. กะลาปาล์มก่อนบด

ค. เมล็ดข้าวฟ่าง

Central Library
Prince of Songkla University

5. การทดสอบประสิทธิภาพมวลชีวภาพเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสภาพเรือนทดลอง (greenhouse)

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยมีการทดสอบ 2 ขั้นตอน โดยมีวิธีการเตรียมเชื้อ *P. aphanidermatum* เพื่อใช้ในการทดสอบทั้งสองขั้นตอน ดังนี้ คือ ตัดเส้นใยเชื้อ *P. aphanidermatum* อายุ 7 วันที่เจริญบนอาหาร PDA ด้วยที่เจาะจุกคอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด duran ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวนขวดละ 2 ชิ้น และเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที นาน 10 วัน จากนั้นกรองเอาเฉพาะเส้นใยเชื้อ นำไปชั่งให้ได้ปริมาณ 36 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้เป็นเวลา 10 วินาที เพื่อให้เส้นใยเชื้อมีการกระจายตัวและแตกเป็นชิ้นเล็กๆ (ประไพพร ศิริคติธรรม, 2537) นำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

5.1 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพมวลชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และสารฆ่าเชื้อราเบนเลท ต่อจำนวนการรอดตายของต้นกล้าคะน้า

คลุกเมล็ดคะน้าก่อนนำไปปลูกด้วยมวลชีวภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ T01-22 ในอัตราเมล็ดคะน้า 1 กรัม/มวลชีวภาพ 0.3 กรัม (ปริมาณเชื้อแสดงในตารางภาคผนวก ค) ผสมให้เข้ากันอย่างสม่ำเสมอในจานแก้วที่อบฆ่าเชื้อแล้วโดยมีชุดทดลอง ดังนี้ คือ

1. คลุกเมล็ดคะน้าด้วย T01-22 ที่เลี้ยงบนกะลาปาล์มบดผสมยูเรีย 1 %
2. คลุกเมล็ดคะน้าด้วย T01-22 ที่เลี้ยงบนกากใยปาล์มบดผสมยูเรีย 1 %
3. คลุกเมล็ดคะน้าด้วย T01-22 ที่เลี้ยงบนกะลาปาล์มบดผสมกากใยปาล์มบดผสมยูเรีย 1 %
4. คลุกเมล็ดคะน้าด้วย T01-22 ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่าง (กนิษฐา สังคะหะ และคณะ, 2536)
5. คลุกเมล็ดคะน้าด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B10-2 ที่เลี้ยงใน NA slant อายุ 1 วัน จำนวน 1 หลอด/เมล็ดพันธุ์ 1 กรัม และใช้สาร methylcellulose เป็นตัวช่วยในการเกาะติดของ เชื้อแบคทีเรีย บนผิวเมล็ดในอัตรา 5 % โดยน้ำหนัก
6. คลุกเมล็ดคะน้าด้วยสารฆ่าเชื้อราเบนเลท อัตรา 0.003 กรัม/เมล็ดพันธ์ 1 กรัม
7. ไม่คลุกเมล็ดคะน้าด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือสารเคมีใดๆ เป็นตัวชุดควบคุม (control)
8. ไม่คลุกเมล็ดคะน้าด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือสารเคมีใดๆ ปลูกลงในดินที่อบฆ่าเชื้อ โดยไม่มีการปลูกเชื้อสาเหตุ เป็นชุดตรวจสอบ (checked)

เตรียมดินที่ใช้ปลูกเมล็ดคะน้าโดยการบรรจุดินจากสภาพไร่นาที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ลงในกระป๋องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นิ้ว สูง 1.5 นิ้ว (ปริมาณ 100 กรัม) และปลูกเชื้อ

สาเหตุ *P. aphanidermatum* ที่เตรียมไว้ตามวิธีการเตรียมข้างต้น โดยการราดเชื้อ *P. aphanidermatum* ปริมาตร 3 มิลลิลิตรบนผิวหน้าดิน แล้วบ่มเชื้อที่ปลูกลงบนดินไว้ที่อุณหภูมิในสภาพเรือนทดลอง (26-33 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงปลูกเมล็ดคะน้าที่คลุกเมล็ดคะน้าด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ T 01-22 และสิ่งทดลองเปรียบเทียบ ลงในกระป๋องพลาสติก กระป๋องละ 10 เมล็ด วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ/สิ่งทดลอง ในสภาพเรือนทดลองที่อุณหภูมิ 26-33 องศาเซลเซียส

บันทึกผลหลังการทดลอง 7 และ 10 วัน โดยนับจำนวนต้นกล้าคะน้าที่เจริญสมบูรณ์ วิเคราะห์ผลทางสถิติ เปรียบเทียบผลโดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)

5.2 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ T01-22 และสารฆ่าเชื้อราในการควบคุมโรคเน่าคอดินของกล้าคะน้าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium aphanidermatum*

นำเชื้อสาเหตุ *P. aphanidermatum* ที่เตรียมตามวิธีการข้างต้น ปลูกเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงบนดินที่บรรจุในตะกร้าพลาสติก (ขนาด กว้าง 8.5 นิ้ว ยาว 11 นิ้ว สูง 2 นิ้ว) โดยการตักราดรดบนผิวหน้าดิน บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) นาน 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ในสภาพเรือนทดลองที่อุณหภูมิ 26-33 องศาเซลเซียส โดยการคลุกเมล็ดคะน้าก่อนปลูก ดังนี้

1. คลุกเมล็ดคะน้าด้วยมวลชีวภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ T 01-22 ที่เพาะเลี้ยงด้วยกากใยปาล์มบดผสมยูเรีย 1 % อัตรา 0.3 กรัม/เมล็ดคะน้า 1 กรัม
2. คลุกเมล็ดคะน้าด้วยสารฆ่าเชื้อราออโธไซด์ อัตรา 0.003 กรัม/เมล็ดคะน้า 1 กรัม
3. คลุกเมล็ดคะน้าด้วยสารฆ่าเชื้อราโอฟาแทน อัตรา 0.003 กรัม/เมล็ดคะน้า 1 กรัม
4. คลุกเมล็ดคะน้าด้วยสารฆ่าเชื้อราเบนเลท อัตรา 0.003 กรัม/เมล็ดคะน้า 1 กรัม
5. ชุดควบคุม ไม่คลุกเมล็ดคะน้าด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือสารเคมี

ปลูกเมล็ดคะน้าลงบนดินที่เตรียมไว้ ตะกร้าละ 400 เมล็ด ทำการทดลอง สิ่งทดลองละ 5 ซ้ำ รวม 25 หน่วยทดลอง

บันทึกผลหลังการทดลอง 14 วัน โดยนับจำนวนต้นกล้าคะน้าที่เจริญสมบูรณ์ วิเคราะห์ผลทางสถิติ เปรียบเทียบผลโดย DMRT (Duncan Multiple Range Test)

6. ตรวจสอบปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ T 01-22 ในรูปมวลชีวภาพที่ผลิตต่างกันภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ตรวจนับจำนวนเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ T 01-22 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุที่ต่างกันตามข้อ 4 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาปริมาณของเชื้อทุกๆเดือน โดยตรวจนับครั้งแรกหลังการเพาะเลี้ยง 1 เดือน เป็นเวลา 7 เดือน จำนวน 7 ครั้ง ด้วยวิธี dilution plate technique โดยชั่งมวลชีวภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ T 01-22 ปริมาณ 1 กรัม นำไปทำ serial dilution และหยดลงบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการเกลี่ยให้สม่ำเสมอด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจนับปริมาณเชื้อที่เจริญอายุ 5 วัน บันทึกผลการทดลอง เปรียบเทียบปริมาณเชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุต่างกัน