ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **สูตรอาหาร water agar (WA)**

agar	17	g
distilled water	1,000	ml

2. **สูตรอาหาร potato dextrose agar (PDA)**

potato	200	g
dextrose	20	g
agar	17	g
distilled water	1,000	ml

3. **สูตรอาหาร *Trichoderma* selective medium (TSM)**

$MgSO_4.7H_2O$	0.20	g
K_2HPO_4	0.90	g
KCl	0.15	g
NH_4NO_3	1.00	g
glucose	3.00	g
chloramphenical	0.25	g
terrachlor 75 เปอร์เซ็นต์ WP	0.20	g
rose bengal	0.15	g
agar	20.00	g
captan*	20.00	mg
distilled water	1,000.00	ml

* ใส่หลัง autoclave เมื่ออาหารเย็นลง

4. **สูตรอาหาร yeast mannitol broth (YMB)**

mannitol	10.0	g
K_2HPO_4	0.5	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	g
NaCl	0.1	g
yeast extract	0.5	g
distilled water	1,000.0	ml
pH 6.8		

5. **สูตรอาหาร yeast mannitol agar (YMA)**

mannitol	10.0	g
K_2HPO_4	0.5	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	g
NaCl	0.1	g
yeast extract	0.5	g
congo red	10.0	ml
agar	15.0	g
distilled water	1,000.0	ml
pH 6.8		

6. **อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อทดสอบการหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส**

$(NH_4)_2SO_4$	0.5	g
K_2HPO_4	1.0	g
$MgSO_4$	0.2	g
KCl	0.5	g
$CaCl_2$	0.1	g
yeast extract	0.5	g
carboxy methyl cellulose (CMC-Na)	10.0	g
distilled water	1,000.0	ml

ภาคผนวก ข

1. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณธาตุไนโตรเจนในพืช

1.1 สารผสมเร่งปฏิกิริยา (catalyst mixture)

ผสม Na_2SO_4, $CuSO_4$ และ Se อัตราส่วน 100 : 10 : 1 โดยน้ำหนัก

1.2 อินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator)

ละลายเมธิล เรด (methyl red) 0.066 กรัม และโบรโมกรีซอล กรีน (bromocresol green) 0.099 กรัม ในเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ประมาณ 80 มิลลิลิตร ค่อย ๆ หยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ ลงไปเพื่อปรับให้เป็นสีเขียว แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายกรดบอริกผสมอินดิเคเตอร์

ละลาย H_3BO_3 40 กรัม ในน้ำร้อนประมาณ 1,800 มิลลิลิตร รอให้เย็นจึงเติมอินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator) ลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายผสมสีม่วงแดง (หากเป็นสีชมพูให้ค่อย ๆ ปรับด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์) จากนั้นจึงปรับปริมาตรเป็น 2 ลิตร โดยประมาณ

2. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในต้นถั่วหรั่ง

วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในต้นถั่วหรั่งหลังจากการทดสอบเชื้อในขั้นตอนการคัดเลือกมวลชีวภาพที่เหมาะสมขั้นที่ 2 ในสภาพเรือนทดลอง และในสภาพพื้นที่แปลงทดลองขนาดเล็ก โดยวิธีการของ จำเป็น อ่อนทอง (2544) ดังนี้

2.1 การบดตัวอย่างพืช

สุ่มตัวอย่างพืชของแต่ละกรรมวิธีและแต่ละซ้ำเพื่อเป็นตัวแทนของประชากร อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำมาบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืช หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างที่บดแล้วไว้ใน dessicator เพื่อไม่ให้มีความชื้น

2.2 การย่อย

ชั่งตัวอย่างพืชที่ผ่านการบดตัวอย่างละ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดย่อยตัวอย่างขนาด 100 มิลลิลิตร ตักสารเร่งปฏิกิริยาผสมใส่ลงไปประมาณ 1 กรัม แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยค่อย ๆ เทกรดข้าง ๆ ขวดและเขย่าให้เข้ากับ (ทำภายในตู้ดูดควัน) ทำแบลงค์โดยนำหลอดไปเติมสารและย่อยเช่นเดียวกับตัวอย่างพืช หลังจากนั้นนำไปย่อยด้วยเตาย่อยตัวอย่างจนกระทั่งตัวอย่างใส วางไว้ให้เย็น

2.3 การกลั่นไนโตรเจน

นำตัวอย่างที่ย่อยเสร็จแล้ว เติมน้ำกลั่นประมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าจนเข้ากัน เข้าเครื่องกลั่นไนโตรเจน แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ประมาณ 15 มิลลิลิตร กลั่นไนโตรเจนโดยรองรับด้วยกรดบอริกผสมอินดิเคเตอร์ 5 มิลลิลิตร กลั่นจนได้ปริมาตรประมาณ 30 มิลลิลิตร

2.4 การไทเทรต

นำตัวอย่างที่กลั่นแล้วไปไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก 0.01 โมลาร์ จนสารละลายเปลี่ยนสีจากใสเป็นสีม่วงแดง

คำนวณปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในพืช (กรัม/กิโลกรัม) = $28.01 \times M(V-B)/W$

เมื่อ W = น้ำหนักพืชที่ชั่ง(กรัม)

M = จำนวนโมลาร์ของกรดซัลฟิวริกที่นำไปไทเทรต (โมลาร์)

V = ปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่นำไปไทเทรต (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรแบลงค์ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ค

1. การตรวจนับจำนวนประชากรของมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ โดยวิธี dilution plate technique

โดยทำการชั่งมวลชีวภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ ปริมาณ 1 กรัม นำไปทำ serial dilution ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-28} แล้วใช้ไมโครปิเปต (micropipette) ดูดสารละลายแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ180 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วเทอาหาร PDA ลงในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าบนพื้นเรียบให้เข้ากัน ทำ 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) นานประมาณ 7 วัน ตรวจนับปริมาณเชื้อ (cfu/กรัม)

2. การตรวจนับจำนวนประชากรของเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ NC-92 โดยวิธี dilution plate technique

โดยทำ seriel dilution ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-15} แล้วใช้ไมโครปิเปตดูด suspension แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วเทอาหาร YMA ลงในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าบนพื้นเรียบให้เข้ากัน ทำ 3 ซ้ำนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) นาน 7-14 วัน แล้วตรวจนับปริมาณเชื้อ (cfu/มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ง

ตารางที่ 1-1 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%), อินทรียวัตถุ (%), ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (mg/kg), โพแทสเซียม (mgq/100g) และค่าความเป็นกรดด่างในดินที่ใช้ทดลองในสภาพเรือนทดลอง และแปลงทดลองขนาดเล็ก

Source	Total N (%)	O.M. (%)	Available P (mg/kg)	K (mgq/100g)	pH
No. 1	0.03	0.88	2.88	0.13	5.17
No. 2	0.05	0.83	27.60	0.15	5.52

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดย หน่วยปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

No. 1 คือ ดินที่ใช้ทดลองในสภาพเรือนทดลอง 2

No. 2 คือ ดินที่ใช้ทดลองในสภาพแปลงทดลองขนาดเล็ก

ตารางที่ 1-2 ลักษณะอนุภาคดินและโครงสร้างของดินที่ใช้ทดลองในสภาพเรือนทดลอง และแปลงทดลองขนาดเล็ก

Source	Particle size			Texture
	% clay	% silt	% sand	
No. 1	17.80	7.04	75.17	Sandy loam
No. 2	18.62	19.24	62.14	Sandy loam

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดย หน่วยปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

No. 1 คือ ดินที่ใช้ทดลองในสภาพเรือนทดลอง

No. 2 คือ แปลงทดลองขนาดเล็ก

ตารางที่ 1-3 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%), ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ (%), อินทรีย์คาร์บอน(%), C/N ratio(%) และค่าความเป็นกรดด่างของวัสดุกากใยปาล์ม

Sample	Percent on received basis				Percent	pH
	Total N	P	K	OC.	C/N	
กากใยปาล์ม	1.30	0.13	0.56	50.65	38.96	5.07

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดย หน่วยปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตารางที่ 1-4 รายงานอุตุนิยมวิทยาระหว่างเดือนมกราคม-เมษายน 2545 ณ. ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา อ. รัตภูมิ จ. สงขลา

ประจำเดือน	ปริมาณน้ำฝน (มม.)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			เปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์
		สูงสุด	ต่ำสุด	เฉลี่ย	
ม.ค./2545	-	33.81	22.68	28.24	90.00
ก.พ./2545	-	35.45	23.35	29.40	90.00
มี.ค./2545	29.40	35.05	23.40	29.22	90.40
เม.ย./2545	26.63	36.17	24.35	30.26	91.00

ตารางที่ 1-5 ปริมาณเชื้อไรโซเบียมที่ตรวจนับได้ในดินที่ทำการทดลองในสภาพเรือนทดลอง 2 และแปลงทดลองขนาดเล็ก

แหล่งดิน	ปริมาณเชื้อไรโซเบียม (cfu/กรัม)
No. 1	$2.3x10^3$
No. 2	$6.8x10^3$

หมายเหตุ : No. 1 คือ ดินที่ใช้ทดลองในสภาพเรือนทดลอง 2
No. 2 คือ ดินที่ใช้ทดลองในสภาพแปลงทดลองขนาดเล็ก

ภาคผนวก จ

ตารางที่ 2-1 วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ด้วยวิธี congo red agar

Source	df	SS	MS	F
Treatments	15	14.2697	0.9513	432.41**
Error	16	0.0350	0.0022	
Total	31	14.3047		

C.V. 3.40 %

** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

ตารางที่ 2-2 วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนก้านใบปกติ (เรือนทดลอง 1)

Source	df	SS	MS	F
Treatments	13	6481.026	498.540	125.60**
Antagonist + fungicideVS control	1	2162.5728	2162.5728	544.87**
Antagonist VS fungicide	1	977.8310	977.8310	246.37**
Among Factorial set	11	3340.6230	303.6930	76.52**
A	3	518.6845	172.8948	43.56**
B	2	738.9240	369.4620	93.09**
AB	6	2083.0145	347.1691	87.47**
Error	28	111.146	3.969	
Total	41	6592.172		

C.V. 3.05 %

** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

ตารางที่ 2-3 วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนก้านใบปกติ (เรือนทดลอง 2)

Source	df	SS	MS	F
Treatments	11	1386.0274	126.0025	4.38**
A	5	1226.1574	245.2315	8.53**
B	1	3.7851	3.7851	0.13^{ns}
AB	5	156.0849	31.2170	1.09^{ns}
Error	48	1380.7250	28.7651	
Total	59	2766.7524		

C.V. 5.75 %

** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 2-4 วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยจำนวนปม (เรือนทดลอง 2)

Source	df	SS	MS	F
Treatments	11	8569.7833	779.0712	2.05*
A	5	4495.0833	899.0167	2.37^{ns}
B	1	1372.8167	1372.8167	3.62^{ns}
AB	5	2701.8833	540.3767	1.42^{ns}
Error	48	18211.2000	379.4000	
Total	59	26780.9833		

C.V. 45.10 %

* แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 2-5 วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยน้ำหนักปม (เรือนทดลอง 2)

Source	df	SS	MS	F
Treatments	11	1.1830	0.1075	2.15*
A	5	0.7932	0.1586	3.17*
B	1	0.0094	0.0094	0.19^{ns}
AB	5	0.3804	0.0761	1.52^{ns}
Error	48	2.4014	0.0500	
Total	59	3.5844		

C.V. 44.69 %

* แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 2-6 วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยปริมาณ ไนโตรเจนทั้งหมด (เรือนทดลอง 2)

Source	df	SS	MS	F
Treatments	11	87.6842	7.9713	37.09**
A	5	62.7753	12.5551	58.43**
B	1	11.8336	11.8336	55.07**
AB	5	13.0753	2.6151	12.17**
Error	24	5.1573	0.2149	
Total	35	92.8415		

C.V. 2.20 %

** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

ตารางที่ 2-7 วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรค (แปลงทดลอง)

Source	df	SS	MS	F
Blocks	2	0.0041	0.0020	0.02^{ns}
Treatments	6	3.8607	0.6434	5.52**
Error	12	1.3991	0.1166	
Total	20	5.2639		

C.V. 43.04 %

** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 2-8 วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตฝักสด (แปลงทดลอง)

Source	df	SS	MS	F
Blocks	2	5163.2007	2581.6004	2.31^{ns}
Treatments	6	13269.4650	2211.5775	1.98^{ns}
Error	12	13429.0764	119.0897	
Total	20	31861.7421		

C.V. 22.68 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 2-9 วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตฝักแห้ง (แปลงทดลอง)

Source	df	SS	MS	F
Block	2	463.3254	231.6627	1.67^{ns}
Treatments	6	1365.8966	227.6494	1.65^{ns}
Error	12	1659.8083	138.3174	
Total	20	3489.0303		

C.V. 36.96 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 2-10 วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยน้ำหนักซากสด (แปลงทดลอง)

Source	df	SS	MS	F
Blocks	2	249406.5386	124703.2693	1.96^{ns}
Treatments	6	772998.8504	128833.1417	2.02^{ns}
Error	12	764149.057	63679.088	
Total	20	1786554.446		

C.V. 18.64 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 2-11 วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยปริมาณ ไนโตรเจนทั้งหมดในต้น (แปลงทดลอง)

Source	df	SS	MS	F
Block	2	25.1688	12.5844	2.92^{ns}
Treatments	6	11.4315	1.9052	0.44^{ns}
Error	12	51.79932	4.3166	
Total	20	88.3997		

C.V. 7.70 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 2-12 วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยปริมาณ ไนโตรเจนทั้งหมดในเมล็ด (แปลงทดลอง)

Source	df	SS	MS	F
Block	2	7.0778	3.5389	2.30^{ns}
Treatments	6	4.1352	0.6891	0.45^{ns}
Error	12	18.4745	1.5393	
Total	20	29.6874		

C.V. 4.53 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ