บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดิน และการแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. จากดินตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างดินเกษตรกรรมที่ปลูกถั่วลิสงและถั่วหรั่ง สามารถแยกเชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยวิธี soil plate technique บนอาหาร TSM (ภาพที่ 5) ได้ทั้งหมดจำนวน 462 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2)

ภาพที่ 5 โคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. (ศรชี้) ภายหลังจากบ่มเชื้อนาน 7 วัน ในอาหาร TSM โดยวิธี soil plate technique

ตารางที่ 2 จำนวนสายพันธุ์เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินเกษตรกรรมแหล่งต่าง ๆ

แหล่งดินเกษตรกรรม	รหัสแปลง	ชนิดพืชปลูก	จำนวนสายพันธุ์
อ. รัตภูมิ จ. สงขลา	ThA-I	ถั่วหรั่ง	19
	ThA-II	ถั่วหรั่ง	28
	ThA-III	ถั่วหรั่ง	13
	ThA-IV	ถั่วหรั่ง	19
	ThA-V	ถั่วหรั่ง	23
	ThA-VI	ถั่วหรั่ง	28
	ThA-VII	ถั่วหรั่ง	3
	ThA-VIII	ถั่วหรั่ง	16
อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	ThB-I	ถั่วลิสง	66
	ThB-II	ถั่วหรั่ง	7
	ThB-III	ถั่วลิสง	5
	ThB-IV	ถั่วหรั่ง	15
อ. จะนะ จ. สงขลา	ThC-I	ถั่วลิสง	20
อ. กงหรา จ. พัทลุง	ThD-I	ถั่วลิสง	26
อ. ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช	ThE-I	ถั่วลิสง	16
อ. รือเสาะ จ. นราธิวาส	ThF-I	ถั่วหรั่ง	13
	ThF-II	ถั่วลิสง	9
อ. ยะหา จ. ยะลา	ThG-I	ถั่วลิสง	29
	ThG-II	ถั่วหรั่ง	7
	ThG-III	ถั่วลิสง	3
	ThG-IV	ถั่วหรั่ง	72
	ThG-V	ถั่วหรั่ง	1
	ThG-VI	ถั่วหรั่ง	24
รวมทั้งสิ้น			462

2. การแยกเชื้อราสาเหตุ และการพิสูจน์การเกิดโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง

การแยกเส้นใยเชื้อราสาเหตุบริสุทธิ์จากชิ้นเนื้อเยื่อพืช พบว่าได้เชื้อราที่เส้นใยมีสีน้ำตาล เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยกว้างประมาณ 6.25 - 7.5 ไมโครเมตร มีผนังกั้น แตกกิ่งก้านแบบตั้งฉาก มีการสร้าง monilioid cell หรือ คลาไมโดสปอร์ ลักษณะเป็นลูกโซ่หรือบางครั้งรวมกันเป็นกลุ่ม เรียก sporodochia มีโครงสร้างสเคลอโรเทียมสีน้ำตาลหรือน้ำตาลดำ เพื่อใช้ในการอยู่ข้ามฤดูของเชื้อ (ภาพที่ 6)

การพิสูจน์การเกิดโรค นำเส้นใยของเชื้อราดังกล่าวไปทดสอบโดยการนำไปเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ น้ำหนัก 10 กรัม ใส่ลงบริเวณโคนกอของถั่วหรั่ง ภายหลังจากการใส่เชื้อประมาณ 7 วัน พบว่าบริเวณใบและก้านของถั่วหรั่งเริ่มแสดงอาการของโรคใบไหม้ โดยมีการแสดงอาการที่โคนก้านซึ่งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และมีเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ (ภาพที่ 7) เมื่อเอาชิ้นส่วนบริเวณที่แสดงอาการของโรคไปเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าลักษณะโคโลนีมีลักษณะเหมือนกับที่เลี้ยงในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ครั้งแรก และเมื่อตรวจดูลักษณะของเส้นใยโดยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound พบว่าลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ มีลักษณะเป็นเชื้อราสาเหตุ *R. solani* ตามรายงานของ Sneh และคณะ (1991)

ภาพที่ 6 ลักษณะของเชื้อราสาเหตุ *R. solani*

ก เส้นใยที่เลี้ยงในจานอาหาร PDA นาน 4 วัน

ข เส้นใย (400 เท่า)

ภาพที่ 7 อาการของโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง

ก อาการบริเวณโคนก้านใบ (ทดสอบในเรือนทดลอง)

ข อาการบริเวณใบ (ทดสอบในแปลงทดลองขนาดเล็ก)

3. การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp.

3.1 การคัดเลือกโดยวิธี dual culture technique

จากจำนวนเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่สามารถแยกได้จากพื้นที่ปลูกถั่ว ทั้งหมด 462 สายพันธุ์ นำเชื้อราปฏิปักษ์ จำนวน 249 สายพันธุ์ ซึ่งได้จากแปลงที่ตรวจพบเชื้อราปฏิปักษ์มากกว่า 25 สายพันธุ์ ได้แก่ พื้นที่แปลง ThA-II, ThA-VI, ThB-I, ThD-I, ThG-I และ ThG-IV คัดเลือกโดยวิธี dual culture technique ผลการทดลอง พบว่ามีเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการเข้าครอบคลุมและทำลายเชื้อราสาเหตุได้ดี โดยเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีปฏิกิริยาการเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุแบบที่ 1 คือเส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์เจริญครอบคลุมเส้นใยของเชื้อราสาเหตุทั้งหมด จำนวน 226 สายพันธุ์ (90.8 เปอร์เซ็นต์) และมีปฏิกิริยาการเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุแบบที่ 3 คือ เส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุสามารถเจริญมาสัมผัสกันครึ่งทาง จำนวน 23 สายพันธุ์ (9.2 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 3) (ภาพที่ 8)

3.2 ความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการพันรัดเชื้อรา *R. solani*

จากการนำเชื้อราปฏิปักษ์จำนวน 226 สายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกข้างต้นมาตรวจดูความสามารถในการพันรัด (coiling) ที่เกิดขึ้นระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *R. solani* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์จำนวน 13 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ ThA-II-05, ThA-II-13, ThA-VI-04, ThA-VI-23, ThB-I-15, ThB-I-23, ThB-I-26, ThB-I-32, ThB-I-54, ThB-I-59, ThB-I-60, ThB-I-65 และ ThD-I-02 มีความสามารถในการพันรัดเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ โดยเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จะเจริญขนานไปกับเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ และมีการแตกแขนงเป็นช่วง ๆ เป็นแขนงสั้น ๆ ออกมาพันรัดเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ โดยสามารถสังเกตได้ว่าเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญเป็นคลื่นหยักขึ้น ๆ ลง ๆ (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 3 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากทั้งสิ้น 249 สายพันธุ์ โดยวิธี dual culture technique (Bell *et al*., 1982)

สายพันธุ์	พืชปลูก	ปฏิกิริยาการเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุ (Bell *et al*., 1982)				
		1	2	3	4	5
ThA-II	ถั่วหรั่ง	28	-	-	-	-
ThA-VI	ถั่วหรั่ง	28	-	-	-	-
ThB-I	ถั่วลิสง	66	-	-	-	-
ThD-I	ถั่วลิสง	14	-	12	-	-
ThG-I	ถั่วลิสง	29	-	-	-	-
ThG-IV	ถั่วหรั่ง	61	-	11	-	-
รวมทั้งสิ้น		226	-	23	-	-

หมายเหตุ :

มาตรฐานของ Bell และคณะ (1982) แบ่งปฏิกิริยาได้ 5 ลักษณะ ดังนี้

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

ภาพที่ 8 รูปแบบปฏิกิริยาระหว่างเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. (T) และเชื้อราสาเหตุ *R. solani* (R) ทดสอบโดยวิธี dual culture technique

ก ปฏิกิริยาแบบที่ 1 เส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์เจริญครอบคลุมเส้นใยของเชื้อราสาเหตุทั้งหมด

ข ปฏิกิริยาแบบที่ 3 เส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุเจริญมาชนกันครึ่งทาง

ภาพที่ 9 ลักษณะการพันรัด (coiling) เส้นใยของเชื้อราสาเหตุ *R. solani* โดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ ThB-I-54

ก เส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ ThB-I-54 พันรัดเส้นใยเชื้อรา *R. solani* (200 เท่า)

ข เส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ ThB-I-54 เป็นปรสิตต่อเส้นใยเชื้อรา *R. solani* (200 เท่า)

3.3 **ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยวิธี** congo red agar

เชื้อราปฏิปักษ์จำนวนทั้งสิ้น 13 สายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการพันรัดเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ พบว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเกือบทุกสายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ ThB-I–54 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุด เท่ากับ 1.8 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ ThA-II-05, ThA-II-13, ThA-VI-04, ThA-VI-23, ThB-I-15, ThB-I-23, ThB-I-26, ThB-I-32, ThB-I-59, ThB-I-60, ThB-I-65, ThD-I-02, *A. flavus* และ *A. niger* (ภาพที่ 10) (ตารางที่ 4) (ภาคผนวก จ ตารางที่ 2-1)

ภาพที่ 10 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ ThB-I-54 โดยวิธี congo red agar

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ด้วยวิธี congo red agar

สายพันธุ์เชื้อรา	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)
ThA-II-05	0.00d
ThA-II-13	1.75ab
ThA-VI-04	1.70b
ThA-VI-23	1.70b
ThB-I-15	1.65b
ThB-I-23	1.75ab
ThB-I-26	1.65b
ThB-I-32	1.75ab
ThB-I-54	1.80a
ThB-I-59	1.75ab
ThB-I-60	1.75ab
ThB-I-65	1.70b
ThD-I-02	1.50c
A. flavas	0.00d
A. niger	1.40c
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	0.00d
F-test	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	3.409

** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

อักษรเหมือนกันในคอลัมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

3.4 การจำแนกและตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่ผ่านการคัดเลือก

การจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์สายพันธุ์ ThB-I–54 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นเชื้อรา *T. harzianum* Rifai ซึ่งมีลักษณะสำคัญ คือ มีลักษณะของ conidial area สีเขียวเข้ม conidiophore type เป็นแบบ koningii phialide มีรูปร่าง flask shape, phialospore ค่อนข้างกลม ผิวเรียบ มีสีเขียว โครงสร้าง chlamydospore ใสไม่มีสี (ตารางที่ 5) (ภาพที่ 11)

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ ThB-I-54 และ *T. harzianum* (Rifai, 1969)

โครงสร้าง	สี /รูปร่าง /ตำแหน่ง	ขนาด (ไมโครเมตร)	
		Trichoderma sp. สายพันธุ์ ThB-I-54	*T. harzianum* (Rifai, 1969)
Conidial area	สีเขียวเข้ม	-	-
Conidiophore	แบบ koningii type	-	-
Phialide	แบบ flask shape จำนวน 3-5 ข่อ	7.5-10 X 2-2.5	5-7 X 3-3.5
Phialospore	สีเขียว/ค่อนข้างกลม ผิวเรียบ	2-2.5 X 2.5-3.5	2.8-3.2 X 2.5-2.8
Chlamydospore	ไม่มีสี /ค่อนข้างกลม หรือวงรี / ตำแหน่ง intercalary หรือ terminal	5-7.5 X 7.5-10	6-12
Vegetative hyphae	เส้นยาว ผิวเรียบ มีผนังกั้น	2-2.5	2.5

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยจาก 50 ซ้ำ

ภาพที่ 11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54

ก phialospore (400 เท่า)

ข phialide และ conidiophore แบบ koningii type (400 เท่า)

ค chlamydospore (400 เท่า)

ง กลุ่ม conidia บน phialide (200 เท่า)

4. ประสิทธิภาพของมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54

4.1 มวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54

มวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในรูปแบบวัสดุต่าง ๆ ที่ผลิตได้ เมื่อตรวจนับปริมาณเชื้อโดยวิธี dilution plate technique พบว่า มวลชีวภาพในวัสดุข้าวฟ่างให้ปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์มากที่สุด โดยมีปริมาณ $1x10^{25}$ cfu/กรัม (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54 ตรวจนับโดยวิธี dilution plate technique หลังจากเลี้ยงบนวัสดุต่าง ๆ ซึ่งใช้ในการทดสอบในสภาพเรือนทดลองและแปลงทดลองขนาดเล็ก

วัสดุ	ปริมาณเชื้อ (cfu/กรัม)
กากใยปาล์มบด[1]	$1x10^{25}$
ข้าวฟ่าง[2]	$1x10^{26}$

หมายเหตุ : [1] อายุ 10 วัน

[2] อายุ 7 วัน

4.2 การเตรียมเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ NC-92

จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ NC-92 ในอาหาร YMB แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 26-32 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน หลังจากนั้นตรวจนับปริมาณเชื้อ โดยวิธี dilution plate technique แล้วจึงนำไปคลุกเมล็ดก่อนปลูกทดสอบในสภาพเรือนทดลอง และแปลงทดลองขนาดเล็กต่อไป ซึ่งปริมาณเชื้อที่นับได้เท่ากับ $8.4x10^{10}$ และ $3.2x10^{11}$ cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54 ในการควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งในสภาพเรือนทดลอง

4.3.1 การทดสอบเพื่อคัดเลือกกรรมวิธีที่เหมาะสมเบื้องต้น

จากการทดสอบมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54 ในวัสดุต่าง ๆ เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุ *R. solani* เมื่อต้นถั่วหรั่งอายุครบ 45 วัน ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุในแบบต่าง ๆ แล้วตรวจสอบผลการควบคุมโรคใบไหม้ เมื่อต้นถั่วหรั่งอายุ 49 วัน พบว่ากรรมวิธีควบคุมที่ให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนก้านรอดตายสูงสุด คือ การใช้มวลชีวภาพข้าวฟ่างผสมโดโลไมท์ (74.69 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาได้แก่ มวลชีวภาพเมล็ดข้าวฟ่าง (69.55 เปอร์เซ็นต์), มวลชีวภาพกากใยปาล์มบด(65.47 เปอร์เซ็นต์) และชีวภัณฑ์เชื้อรา *T. harzianum* (65.45 เปอร์เซ็นต์)

ส่วนการใช้สารฆ่าเชื้อรา iprodione ให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนก้านรอดตาย เท่ากับ 50.0 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม (ปลูกเชื้อราสาเหตุเพียงอย่างเดียว) ให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนก้านรอดตายเท่ากับ 39.48 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าแต่ละกรรมวิธีการควบคุมให้ค่าที่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 7) โดยเมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างทุกกรรมวิธีที่ทำการควบคุมเชื้อราสาเหตุกับชุดควบคุม (ปลูกเชื้อราสาเหตุอย่างเดียว) และการใช้มวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมกับการใช้สารฆ่าเชื้อรา iprodione พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ภาคผนวก จ ตารางที่ 2-2)

สำหรับการทดสอบเวลาในการปลูกเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54 และเชื้อราสาเหตุ *R. solani* ทั้ง 3 วิธี พบว่าแต่ละกรรมวิธีมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ภาคผนวก จ ตารางที่ 2-2) โดยการปลูกเชื้อราปฏิปักษ์ก่อน 2 วัน แล้วปลูกเชื้อราสาเหตุ ให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ก้านใบปกติสูงสุด (74.40 เปอร์เซ็นต์)

การปลูกเชื้อราแบบที่ 1 คือ การปลูกเชื้อราสาเหตุก่อน 2 วัน แล้วตามด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ ซึ่งชุดทดลองที่ให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนก้านรอดตายสูงสุด คือ มวลชีวภาพกากใยปาล์มบด+เชื้อรา *R. solani* (77.78 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา ได้แก่ มวลชีวภาพเมล็ดข้าวฟ่าง+เชื้อรา *R. solani* (68.00 เปอร์เซ็นต์), ชีวภัณฑ์เชื้อรา *T. harzianum* (67.82 เปอร์เซ็นต์) และมวลชีวภาพข้าวฟ่างผสมโดโลไมท์ (61.11 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

การปลูกเชื้อราแบบที่ 2 คือ การปลูกเชื้อราสาเหตุพร้อมกับเชื้อราปฏิปักษ์ ซึ่งชุดทดลองที่ให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนก้านรอดตายสูงสุด คือ มวลชีวภาพข้าวฟ่างผสมโดโลไมท์ (79.63 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา ได้แก่ มวลชีวภาพเมล็ดข้าวฟ่าง+เชื้อรา *R. solani* (65.18 เปอร์เซ็นต์), ชีวภัณฑ์เชื้อรา *T. harzianum* (62.46 เปอร์เซ็นต์) และมวลชีวภาพกากใยปาล์มบด+เชื้อรา *R. solani* (45.93 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

การปลูกเชื้อราแบบที่ 3 คือ การปลูกเชื้อราปฏิปักษ์ก่อน 2 วัน แล้วปลูกเชื้อราสาเหตุ ซึ่งชุดทดลองที่ให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนก้านรอดตายสูงสุด คือ มวลชีวภาพข้าวฟ่างผสมโดโลไมท์+เชื้อรา *R. solani* (83.33 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาได้แก่ มวลชีวภาพเมล็ดข้าวฟ่าง+เชื้อรา *R. solani* (75.48 เปอร์เซ็นต์), มวลชีวภาพกากใยปาล์มบด+เชื้อรา *R. solani* (72.70 เปอร์เซ็นต์) และชีวภัณฑ์เชื้อรา *T. harzianum* (66.07 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

จากค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ก้านใบปกติมากที่สุด พบว่ากรรมวิธีการใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54 ก่อน 2 วัน แล้วปลูกเชื้อราสาเหตุ *R. solani* สามารถควบคุมการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด

มวลชีวภาพจากวัสดุกากใยปาล์มให้ผลในการควบคุมโรคใบไหม้ได้เป็นลำดับรองจากการใช้เมล็ดข้าวฟ่าง ดังนั้น เพื่อเป็นการส่งเสริมการนำวัสดุที่มีอยู่ในท้องถิ่นมาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อชุมชนมากที่สุดและเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต จึงคัดเลือกวัสดุกากใยปาล์มและเมล็ดข้าวฟ่างเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของมวลชีวภาพร่วมกับการใช้เชื้อไรโซเบียมในการควบคุมเชื้อราสาเหตุ *R. solani* ต่อไป

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนก้านใบปกติ ที่ผ่านการทดสอบการควบคุมเชื้อราสาเหตุ *R. solani* โดยกรรมวิธีต่าง ๆ เมื่อถั่วหรั่งอายุ 49 วัน (เรือนทดลอง 1)

กรรมวิธีการทดลอง	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์จำนวนก้านใบปกติ			
(A)	(B) I[1/]	II[2/]	III[3/]	ค่าเฉลี่ย (A)
มวลชีวภาพเมล็ดข้าวฟ่าง	68.00	65.18	75.48	69.55 b
มวลชีวภาพกากใยปาล์ม	77.78	45.93	72.70	65.47 c
ชีวภัณฑ์เชื้อรา *T. harzianum*	67.82	62.46	66.07	65.45 c
มวลชีวภาพข้าวฟ่างผสมโดโลไมท์	61.11	79.63	83.33	74.69 a
ค่าเฉลี่ย (B)	68.68 b	63.30 c	74.40 a	
สารฆ่าเชื้อรา iprodione	50.00			
ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อรา *R. solani*)	39.48			
F-test **				
C.V. (เปอร์เซ็นต์) 3.05				

** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

อักษรเหมือนกันในแถวและคอลัมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จากการตรวจสอบโดย DMRT

หมายเหตุ : A คือ กรรมวิธีการควบคุม

B คือ ลักษณะการปลูกเชื้อ มีดังนี้

[1/] ปลูกเชื้อรา *R. solani* ก่อน 2 วัน แล้วตามด้วยเชื้อรา *T. harzianum* (ThB-I-54)

[2/] ปลูกเชื้อรา *R. solani* พร้อม *T. harzianum* (ThB-I-54)

[3/] ปลูกเชื้อรา *T. harzianum* (ThB-I-54) ก่อน 2 วัน แล้วตามด้วยเชื้อรา *R. solani*

4.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของมวลชีวภาพร่วมกับเชื้อ *Rhizobium* sp.

การทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งโดยกรรมวิธีต่าง ๆ ต่อต้นถั่วหรั่งซึ่งก่อนปลูกได้ผ่านการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ $8.4x10^{10}$ cfu/มิลลิลิตร เมื่อถั่วหรั่งอายุ 60 วัน ทำการทดสอบโดยปลูกเชื้อราสาเหตุแล้วทำการควบคุมโรคโดยชุดควบคุมต่าง ๆ จากผลการศึกษา พบว่า

ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ก้านปกติของแต่ละกรรมวิธีการทดลอง มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยชุดทดลองที่ให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนก้านรอดตายมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ การใช้มวลชีวภาพข้าวฟ่างผสมโดโลไมท์+เชื้อรา *R. solani* (98.72 เปอร์เซ็นต์), สารฆ่าเชื้อรา iprodione+เชื้อรา *R. solani* (97.47 เปอร์เซ็นต์) และมวลชีวภาพกากใยปาล์มบด+เชื้อรา *R. solani* (95.18 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ส่วนปัจจัยการคลุกเชื้อไรโซเบียมก่อนปลูก พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 8) (ภาคผนวก จ ตารางที่ 2-3)

การเปรียบเทียบผลการเกิดปมของต้นถั่วหรั่งในแต่ละชุดทดลอง พบว่าแต่ละกรรมวิธีการทดลอง ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนปมต่อต้นซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยกรรมวิธีการทดลองที่ให้ค่าเฉลี่ยสูงสุด 3 อันดับแรก คือ การใช้มวลชีวภาพกากใยปาล์มบดผสมโดโลไมท์+เชื้อรา *R. solani* (55.90 ปม), ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อรา *R. solani*) (52.20 ปม) และมวลชีวภาพกากใยปาล์มบด+เชื้อรา *R. solani* (45.10 ปม) ตามลำดับ ส่วนปัจจัยการคลุกเชื้อไรโซเบียมก่อนปลูก พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 8) (ภาคผนวก จ ตารางที่ 2-4)

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักปมต่อต้น พบว่าแต่ละกรรมวิธีการทดลองให้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักปมต่อต้นซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ กรรมวิธีการทดลองที่ให้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักปมต่อต้นมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ การใช้มวลชีวภาพกากใยปาล์มบดผสมโดโลไมท์+เชื้อรา *R. solani* (0.71 กรัม/ต้น), ชุดควบคุม(ปลูกเชื้อรา *R. solani*) (0.56 กรัม/ต้น) และมวลชีวภาพกากใยปาล์มบด+เชื้อรา *R. solani* (0.52 กรัม/ต้น) ตามลำดับ ส่วนปัจจัยการคลุกเชื้อไรโซเบียมก่อนปลูก พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 8) (ภาคผนวก จ ตารางที่ 2-5)

การเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของต้นถั่วหรั่งที่ผ่านการทดลองโดยชุดทดลองดังกล่าว แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด พบว่าแต่ละกรรมวิธีการทดลองให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณไนโตรเจนซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยชุดทดลองที่ให้ค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นถั่วหรั่งมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ การใช้มวลชีวภาพข้าวฟ่างผสมโดโลไมท์+เชื้อรา *R. solani* (22.75 กรัม/กิโลกรัม), มวลชีวภาพกากใยปาล์มบด+เชื้อรา *R. solani* (22.23 กรัม/กิโลกรัม) และการใช้สารฆ่าเชื้อรา iprodione+เชื้อรา *R. solani* (21.24กรัม/กิโลกรัม)

ตามลำดับ ส่วนปัจจัยการคลุกเชื้อไรโซเบียมก่อนปลูก พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 8) (ภาคผนวก จ ตารางที่ 2-6)

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของมวลชีวภาพเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54 ในการควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งในสภาพพื้นที่แปลงทดลองขนาดเล็ก

การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งโดยมวลชีวภาพกากใยปาล์มของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54 ในสภาพแปลงทดลองเมื่อต้นถั่วอายุครบ 60 วัน หลังการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อราสาเหตุ 12 วัน โดยชุดทดลองต่าง ๆ พบว่าระดับความรุนแรงของการเกิดโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งซึ่งทำการประเมินเปอร์เซ็นต์จำนวนก้านตายทางสายตา ให้ค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยชุดทดลองที่ให้ค่าเฉลี่ยของระดับความรุนแรงของโรคสูงสุด คือ การใช้สารฆ่าเชื้อรา iprodione + เชื้อรา *R. solani* (1.26) รองลงมา ได้แก่ การใช้มวลชีวภาพกากใยปาล์ม + เชื้อไรโซเบียม + เชื้อรา *R. solani* (1.14) และชุดควบคุม (คลุกเชื้อไรโซเบียม + เชื้อรา *R. solani*) (1.07) ตามลำดับ (ตารางที่ 9) (ภาคผนวก จ ตารางที่ 2-7)

การเปรียบเทียบผลผลิตและการให้เศษซากพืชที่ได้โดยการชั่งน้ำหนัก เมื่อต้นถั่วครบอายุการเก็บเกี่ยว 116 วัน จากผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตฝักสด ผลผลิตฝักแห้ง ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในลำต้นและในเมล็ดของถั่วหรั่ง ที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคโดยชุดทดลองต่าง ๆ พบว่า แต่ละชุดทดลองให้ค่าเฉลี่ยซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 9) (ภาคผนวก จ ตารางที่ 2-8, 2-9, 2-10, 2-11, 2-12)

นอกจากนี้ในสภาพดินทั่วไปที่ไม่มีการปลูกเชื้อราสาเหตุ *R. solani* และทำการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรค (ชุดตรวจสอบ) พบว่าสามารถพบเชื้อราสาเหตุ *R. solani* และสามารถทำให้เกิดโรคใบไหม้กับถั่วหรั่งได้ในระดับหนึ่ง (ตารางที่ 9)

5. การวัดปริมาณประชากรของมวลชีวภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54 ที่ผลิตในรูปมวลชีวภาพผสมโดโลไมท์แบบต่าง ๆ

มวลชีวภาพราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54 ผสมโดโลไมท์ซึ่งผลิตโดยวัสดุที่แตกต่างกัน แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) ตรวจนับปริมาณของเชื้อทุกเดือน นาน 8 เดือน ผลการทดลองพบว่ามวลชีวภาพในรูปแบบข้าวฟ่างซึ่งผสมโดโลไมท์ ทั้งที่ผ่านการอบและไม่อบฆ่าเชื้อปนเปื้อน สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) ได้นานเพียง 1 เดือน หลังจากนั้นไม่สามารถตรวจนับจำนวนประชากรได้เนื่องจากข้าวฟ่างเกิดการเน่า ส่วนมวลชีวภาพในรูปกากใยปาล์มบดซึ่งผสมโดโลไมท์ทั้งที่ผ่านการอบและไม่อบฆ่าเชื้อปนเปื้อน มีอัตราการลดลงของปริมาณประชากรเป็น 10^{9} และ 10^{12} cfu/กรัม ของประชากรตั้งต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ปริมาณประชากรของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ ThB-I-54 ที่เลี้ยงในรูปแบบมวลชีวภาพผสมโดโลไมท์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) นาน 8 เดือน

รูปแบบมวลชีวภาพ	**ปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ThB-I-54 (cfu/กรัม)**							
	1*	2	3	4	5	6	7	8
ข้าวฟ่าง + sterile dolomite	10^{24}	-	-	-	-	-	-	-
ข้าวฟ่าง + non-sterile dolomite	10^{23}	-	-	-	-	-	-	-
กากใยปาล์มบด + sterile dolomite	10^{26}	10^{25}	10^{24}	10^{22}	10^{20}	10^{20}	10^{19}	10^{17}
กากใยปาล์มบด + non-sterile dolomite	10^{26}	10^{24}	10^{23}	10^{20}	10^{17}	10^{16}	10^{15}	10^{14}

หมายเหตุ : * จำนวนเดือนที่ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อ

- วัสดุเริ่มเน่าและปนเปื้อนโดยเชื้อราและแบคทีเรียชนิดอื่นทำให้ไม่สามารถตรวจนับปริมาณได้