บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1 ตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลองมี 6 พันธุ์ คือ พันธุ์ ชม.1, ชม.2, ชม.60, สจ.4, สจ.5 จากศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ และพันธุ์คอยคำ จากมูลนิธิโครงการหลวง สุ่มตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ ๆ ละ 400 เมล็ด นำมาตรวจหาเชื้อราบนเมล็ดโดยวิธี Blotter method (การเพาะบนกระดาษชื้น) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association , ISTA(1999) โดยนำเมล็ดถั่วเหลืองวางบนกระดาษเพาะในจานแก้ว (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ซึ่งภายในบรรจุกระดาษกรอง Whatman No. 1 จำนวน 1 แผ่น ไว้ด้านบนและกระดาษฟาง 3 แผ่นที่ชุบน้ำจนชุ่มไว้ด้านล่าง วางเมล็ดถั่วเหลืองจานละ 10 เมล็ด ในการทดลองนี้ทำการทดลองถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ 4 ซ้ำ (replication) ซ้ำละ 100 เมล็ด จากนั้นนำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดมาตรวจหาเปอร์เซ็นต์ความงอก พร้อมทั้งตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดภายใต้กล้อง stereo microscope และทำการแยกเชื้อราแต่ละชนิดให้บริสุทธิ์โดยเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) และเก็บเป็น Stock culture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราบางชนิดที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลือง

นำเชื้อราแต่ละชนิดจาก Stock culture ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA เมื่ออายุได้ 7 วัน ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดเจาะปลายเส้นใยและนำชิ้นวุ้น inoculum ที่ได้ไปวางที่กึ่งกลางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทดลองเชื้อละ 5 ซ้ำ (จานอาหารเลี้ยงเชื้อ) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราทุกวันจนกระทั่งเชื้อราแต่ละชนิดเจริญเต็มจานอาหาร

3 การคัดเลือกเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส

3.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum*

นำเชื้อราแต่ละชนิดที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองมาทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *C. truncatum* เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง มาทดสอบด้วยวิธี Dual culture โดยวางเชื้อราสาเหตุกับเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลือง อายุ 7 วันบนอาหาร PDA ให้ห่างกัน 5 เซนติเมตร ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดจะห่างจากขอบจาน 2 เซนติเมตร ทำการทดลอง 5 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกผลการเจริญของเชื้อราสาเหตุ โดยวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุด้านที่ติดกับเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองในชุดทดสอบ และวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุจากชุดควบคุม (ภาพที่ 1) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราแต่ละชนิดที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองหรือเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *C. truncatum* โดยใช้สูตรในการคำนวณ ดังนี้

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (Percent Inhibition of Radial Growth: PIRG)

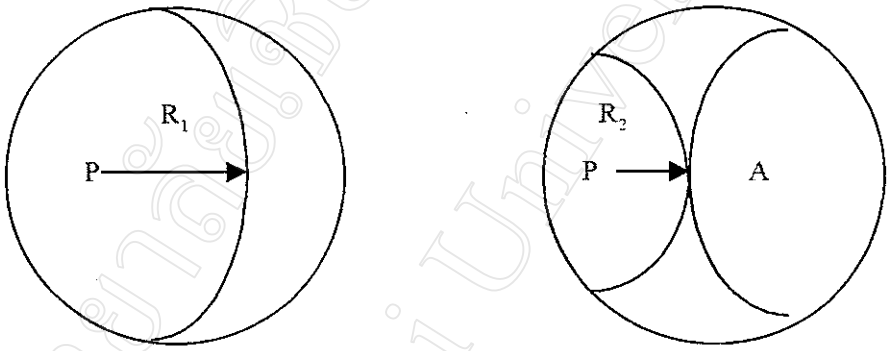
$$PIRG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

โดย R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *C. truncatum* ในจานชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *C. truncatum* ในจานชุดทดสอบ

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

> 75 %	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (very high antagonistic activity)
61-75 %	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง (high antagonistic activity)
51-60 %	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (moderate antagonistic activity)
< 50 %	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ (low antagonistic activity)



ชุดควบคุม ชุดทดสอบ

P = เชื้อราสาเหตุโรคพืช (pathogen)

A = เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist)

R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานชุดทดสอบ

ภาพที่ 1 การวางเชื้อราทดสอบ และรัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยวิธี Dual culture.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

3.2 ศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ด้วยวิธี Slide culture

ทำ Slide culture โดยวิธี Dual slide culture นำจานอาหารที่อบฆ่าเชื้อรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 และวางแผ่นสไลด์บนยางรัดที่วางอยู่บนกระดาษกรอง นำชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 5 x 5 มิลลิเมตร วางกลางแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ ใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อรา *C. truncatum* แตะที่ขอบด้านข้างชิ้นวุ้นอาหาร PDA และใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากข้อ 3.1 มาแตะที่ขอบด้านข้างของชิ้นวุ้นในด้านตรงข้ามที่ได้แตะเชื้อรา *C. truncatum* ไว้ ปิดด้วย cover glass และให้ความชื้นแก่จานอาหารด้วยการหยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้กระดาษกรองชื้น และปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อรักษาความชื้น เมื่อเชื้อราปฏิปักษ์เจริญปกคลุม เชื้อรา *C. truncatum* จึงนำมาศึกษาลักษณะการเข้าทำลาย และตรวจดูปฏิกิริยาการยับยั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4 ศึกษาผลของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ต่อการงอกและการเจริญของต้นกล้าถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.2

4.1 การเตรียมดินปลูก

การเตรียมดินปลูกโดยนำดินร่วนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วบรรจุลงในตะกร้าปลูกขนาด 35x45x12 เซนติเมตร โดยบรรจุดิน 2/3 ของความสูงตะกร้า จำนวน 8 ตะกร้า

4.2 การเตรียม suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์

เตรียม suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ โดยเชื้อราปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดสอบ คือ *Trichoderma* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง เลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 12 วัน จากนั้นนำมาเตรียม suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ให้มีความเข้มข้นของ suspension ของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบประมาณ 10^6 spore/ml.

4.3 การเตรียมเมล็ดปลูก

เมล็ดถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดสอบคือ พันธุ์ ชม.2 นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด ถั่วเหลืองโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 - 4 ครั้ง หลังจากนั้นจึงนำเมล็ดมาแช่ลงใน suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. นาน 30 นาที แล้วนำเมล็ดมาผึ่งให้แห้งบน

กระดาษฟางฆ่าเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบ ในส่วนของชุดควบคุมนั้นใช้เมล็ดถั่วเหลืองที่ฆ่าเชื้อที่ผิวอย่างเดียว

4.4 การทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ต่อการงอกของเมล็ดถั่วเหลือง (Germination test)

ทดสอบด้วยวิธี Between paper ตามวิธีการของ ISTA (1999)โดยใช้กระดาษเพาะ 2 แผ่น จุ่มน้ำให้เปียก วางเมล็ดถั่วเหลืองลงบนกระดาษเพาะแผ่นแรกโดยให้มีระยะห่างเท่า ๆ กัน แล้ววางกระดาษเพาะอีกแผ่นหนึ่งปิดบนเมล็ด พับขอบกระดาษส่วนล่างขึ้นประมาณ 1 นิ้ว ม้วนกระดาษอย่าให้แน่นเกินไปแล้วรัดด้วยยางรัด ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กรรมวิธี ๆ ละ 8 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด ดังนี้คือ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุมหรือ control (เมล็ดที่ฆ่าเชื้อที่ผิวอย่างเดียว)
กรรมวิธีที่ 2 เมล็ดที่ปลูกเชื้อ *Trichoderma* sp.

แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนด 7 วัน จึงประเมินผลการทดสอบ โดยตรวจจากเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

4.5 การทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ต่อความแข็งแรงของต้นกล้าถั่วเหลือง (Seedling Vigor Test)

4.5.1 อัตราการเจริญของต้นกล้า (Seedling Growth Rate)

ทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบความงอกในข้อ 4.4 ด้วยวิธี Between paper และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน นำเมล็ดออกมาตรวจนับความงอก นำต้นกล้าที่งอกปกติมาตัดเอาเฉพาะส่วนของยอดอ่อนและราก บรรจุใส่ถุงกระดาษแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและราก แล้วคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (SGR)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและราก}}{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}}$$

4.5.2 อัตราการเจริญเติบโตของราก (Root Growth Rate)

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบอัตราการเจริญของต้นกล้าในข้อ 4.5.1 โดยประเมินผลด้วยการวัดความยาวของส่วนที่งอกเป็นราก วัดความยาวของรากถั่วเหลืองจากข้อของใบเลี้ยงไปถึงปลายราก (กรรมวิธีละ 8 ซ้ำ ๆ ละ 50 ต้น)

4.6 การทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ต่อการเจริญของต้นกล้าถั่วเหลืองในโรงเรือน

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ปลูกด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. (ข้อ 4.3) ปลูกลงในตะกร้าที่บรรจุดินร่วนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ข้อ 4.1) ดังรายละเอียดดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุมหรือ control (เมล็ดที่ฆ่าเชื้อที่ผิวอย่างเดียว)

กรรมวิธีที่ 2 เมล็ดที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp.

ทำการทดลองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด ดูแลรดน้ำเป็นประจำทุกวัน เมื่อต้นกล้าถั่วเหลืองอายุได้ 14 วัน จึงประเมินผลเปอร์เซ็นต์ความงอกและผลต่อต้นกล้า และนำต้นกล้าถั่วเหลืองมาชั่งน้ำหนัก ทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง การเก็บตัวอย่างมาชั่งน้ำหนัก ทำการเก็บต้นกล้าถั่วเหลืองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 ต้น นำมาชั่งน้ำหนักสด โดยนำต้นกล้าถั่วเหลืองมาล้างทำความสะอาดแล้วนำไปผึ่งไว้ประมาณ 30 นาที จึงนำมาชั่งน้ำหนัก ส่วนการชั่งน้ำหนักแห้ง โดยนำต้นกล้าถั่วเหลืองที่ผ่านการชั่งน้ำหนักสดมาอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จึงบันทึกผลของน้ำหนักแห้งที่ได้และนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.2 ในระยะต้นกล้าในโรงเรือนเปรียบเทียบกับสารเคมีคลุกเมล็ด

5.1 การเตรียมดินปลูก

นำดินร่วนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วบรรจุลงในตะกร้าปลูกขนาด 35 x 45 x 12 เซนติเมตร โดยบรรจุดินในปริมาณ 2/3 ของความสูงตะกร้า จำนวน 20 ตะกร้าและบรรจุดินลงในแก้วน้ำพลาสติกขนาดบรรจุ 10 ออนซ์ ในปริมาณ 3/4 ของความสูงแก้วพลาสติก จำนวนทั้งหมด 200 ใบ

5.2 การเตรียม suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. และเชื้อราสาเหตุ *Colletotrichum truncatum*

นำเชื้อราปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดสอบคือ *Trichoderma* sp. มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 12 วัน จากนั้นนำมาเตรียมเป็น suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. โดยวัดความเข้มข้นของ suspension ของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบประมาณ 10^6 spore/ml ส่วนการเตรียม suspension ของเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* ทำการเลี้ยงเชื้อราสาเหตุนี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 14 วัน จากนั้นจึงนำมาเตรียมเป็น suspension ของเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^6 spore/ml

5.3 การเตรียมเมล็ดปลูก

นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ ชม. 2 ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดถั่วเหลือง โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 ครั้ง แบ่งเมล็ดเก็บไว้ส่วนหนึ่งและนำเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วส่วนที่เหลือมาแช่ลงใน suspension ของเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำเมล็ดมาผึ่งบนกระดาษฟางที่ฆ่าเชื้อแล้วนาน 24 ชั่วโมง แล้วนำเมล็ดดังกล่าวแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกนำไปแช่ใน suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ส่วนที่สองนำเมล็ดไปคลุกกับสารฆ่าเชื้อรา Thiram ในอัตรา 3 กรัม/เมล็ด 1 กิโลกรัม และส่วนสุดท้ายใช้เป็นชุดควบคุมเมล็ดที่ผ่านการปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* เพียงอย่างเดียว โดยเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วที่แบ่งไว้ตั้งแต่ต้นใช้เป็นชุดควบคุมเมล็ดที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ

5.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ต่อการงอกของเมล็ดถั่วเหลืองที่ปลูกด้วยเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง (*Colletotrichum truncatum*) เปรียบเทียบกับสารเคมีคลุกเมล็ด

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่เตรียมไว้ (ข้อ 5.3) มาเพาะลงในแก้วน้ำพลาสติกที่ใส่ดินอบฆ่าเชื้อแล้ว (ข้อ 5.1) โดยเพาะในแก้วน้ำพลาสติกใบละ 10 เมล็ด ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด หลังจากนั้น 14 วัน จึงทำการประเมินผลถึงประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง โดยตรวจจากเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดถั่วเหลืองและวัดความยาวรากและลำต้นของต้นกล้าถั่วเหลือง ดังรายละเอียดของแผนงานทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อ)

กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุมปลูกเชื้อรา *C. truncatum* อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อรา *C. truncatum*+ ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp.

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อรา *C. truncatum* + สารเคมีคลุกเมล็ด thiram.

กรรมวิธีที่ 5 ชุดควบคุมเมล็ดคลุกสารเคมี thiram อย่างเดียว

5.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองในระยะต้นกล้าในโรงเรือนเปรียบเทียบกับสารเคมีคลุกเมล็ด

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่เตรียมไว้ (ข้อ 5.3) ปลูกลงในตะกร้าที่บรรจุดินที่อบฆ่าเชื้อแล้ว (ข้อ 5.1) โดยแบ่งเป็นแผนงานดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อ)

กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุมปลูกเชื้อรา *C. truncatum* อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อรา *C. truncatum* + ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp.

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อรา *C. truncatum* + สารเคมีคลุกเมล็ด thiram

กรรมวิธีที่ 5 ชุดควบคุมเมล็ดคลุกสารเคมี thiram อย่างเดียว

ทำการทดลองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด (4 ตะกร้า ๆ ละ 100 เมล็ด) ดูแลรดน้ำเป็นประจำทุกวัน เมื่อต้นกล้าถั่วเหลืองอายุได้ 14 วัน จึงประเมินผลโดยเก็บตัวอย่างต้นกล้าถั่วเหลืองมาชั่งน้ำหนัก ทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง โดยเก็บต้นกล้าถั่วเหลืองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 ต้น นำมาล้างทำความสะอาดแล้วนำไปผึ่งไว้ประมาณ 30 นาที จึงทำการชั่งน้ำหนักสด ส่วนการชั่งน้ำหนักแห้ง นำต้นกล้าถั่วเหลืองที่ผ่านการชั่งน้ำหนักสดมาอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนักแห้ง และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ