บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์

1.1 จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม.
1.2 หลอดทดลอง (test tube)
1.3 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
1.4 กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 10 100 และ 500 ml
1.5 บีกเกอร์ (beaker)
1.6 Pasture pipette
1.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์
1.8 ช้อนตักสาร (spatula)
1.9 ปากคีบ (forceps)
1.10 เข็มเขี่ย (needle)
1.11 ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
1.12 สำลี
1.13 กระดาษชั่งสาร
1.14 กระดาษทิชชู
1.15 กระดาษกรอง (Whatman No. 1)
1.16 สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ (slides and cover slips)
1.17 ถุงพลาสติก
1.18 ยางรัด
1.19 ไม้บรรทัด
1.20 มีด
1.21 กรรไกร
1.22 ปากกาเขียนแก้ว
1.23 ไฟแช็ค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.24 ตระกร้า

1.25 กระถาง

2. เครื่องมือ

2.1 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

2.2 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

2.3 เตาแก๊ส

2.4 เตาไมโครเวฟ

2.5 ตู้ถ่ายเชื้อ

2.6 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

2.7 ตู้อบ (hot air oven)

3. วัสดุ

3.1 มันฝรั่ง

3.2 เมล็ดข้าวบาร์เลย์

3.3 ดิน

4. สารเคมี

4.1 สารเคมีที่ใช้ในการแยกเชื้อรา

4.1.1 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 % (sodium hypochlorite : NaClO)
ชื่อทางการค้า : คลอร็อกซ์ 10 % (Clorox 10 %)

4.1.2 เอทานอล 95 % (ethanol 95 %)

4.1.3 น้ำกลั่น

4.1.4 ยาปฏิชีวนะ Ampicillin

4.1.5 ยาปฏิชีวนะ streptomycin sulphate

4.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.1 น้ำตาล dextrose

4.2.2 วุ้น (agar)

4.2.3 Rose Bengal

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2.4 Malt extract

4.2.5 Yeast extract

4.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสไลด์กึ่งถาวร

4.3.1 Lactophenol

4.3.2 Lactophenol –cotton blue

4.3.3 Ethanol 70 % และ 95 %

4.3.4 น้ำกลั่น

4.3.5 น้ำยาทาเล็บ

5. อาหารที่ใช้สำหรับแยกและเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

5.1 Potato dextrose agar (PDA)

5.2 Rose Bengal agar (RBA) ที่ผสม สารปฏิชีวนะ (streptomycin sulphate 100 µg/ml และ Ampicillin 150 µg/ml)

5.3 Malt agar (MA)

6 ต้นหญ้าแต่ละชนิดจากแหล่งต่างๆ

6.1 หญ้าคา จากแปลงทดลองคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ (TI1)

6.2 หญ้าแห้วหมู จากแปลงทดลองคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ (TC1)

6.3 หญ้าแขม จากดอยสุเทพ-ปุย ต.สุเทพ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ (TU1)

6.4 หญ้าคา จาก ต.แม่แรม อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ (TI2)

6.5 หญ้าแห้วหมู จาก ต.แม่แรม อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ (TC2)

6.6 หญ้าแขม จาก ต.แม่แรม อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ (TU2)

6.7 หญ้าคา จาก ต.แม่ลอย อ.เทิง จ.เชียงราย (TI3)

6.8 หญ้าแห้วหมู จาก ต.แม่ลอย อ.เทิง จ.เชียงราย (TC3)

6.9 หญ้าแขม จาก ต.แม่ลอย อ.เทิง จ.เชียงราย (TU3)

6.10 หญ้าคา จาก ต.แม่เจดีย์ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย (TI4)

6.11 หญ้าแห้วหมู จาก ต.แม่เจดีย์ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย (TC4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.12 หญ้าแขม จาก ต.แม่เจดีย์ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย (TU4)

6.13 หญ้าคา จาก อ.สารภี จ.เชียงใหม่ (TI5)

6.14 หญ้าแห้วหมู จาก อ.สารภี จ.เชียงใหม่ (TC5)

6.15 หญ้าแขมจาก อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (TU5)

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากต้นหญ้า

1.1 ทดสอบวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ของตัวอย่างต้นหญ้าทั้ง 3 ชนิด

ทำการฆ่าเชื้อที่ผิว โดยวิธี Triple Surface Sterilization (ปรับปรุงจาก Taylor *et al.*, 1999) โดยแช่ในแอลกอฮอล์ 95 % นาน 60 วินาที โซเดียมไฮโปคลอไรท์ และ แช่ในแอลกอฮอล์ 95 % นาน 30 วินาที ตามลำดับ สำหรับการทดสอบวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิวนั้น เพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อที่ผิวของส่วนต่างๆ ของต้นหญ้าทั้ง 3 ชนิดที่นำมาแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ ทำโดยนำตัวอย่างหญ้าแห้วหมู หญ้าคา และหญ้าแขม มาล้างผ่านน้ำไหลให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง ใช้กรรไกรตัดต้นหญ้าออกเป็นส่วนๆ คือ ใบ กาบใบ และ ราก ให้ยาวประมาณ 1 ซม. นำตัวอย่างส่วนต่างๆ มาฆ่าเชื้อที่ผิว ใช้ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 % และใช้เวลาในการแช่ 1 3 และ 5 นาที ซับชิ้นพืชบนกระดาษทิชชูที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำชิ้นพืชวางบนอาหาร Malt extract agar ที่ผสม Rose Bengal (0.003 %) และสารปฏิชีวนะ Ampicillin (150 µg/ml) และ streptomycin sulphate (100 µg/ml) (Liu *et al.*, 2001) โดยวาง 4 ชิ้น ต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นพืช แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Hyphal Tip Isolation ในจานอาหาร PDA แล้วเก็บใน PDA slant ตรวจดูจำนวนเชื้อราที่เจริญออกมาจากส่วนต่างๆ ของต้นหญ้าแต่ละชนิด วิเคราะห์ผลการเจริญของเชื้อราที่ระยะเวลาและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่างๆ และเลือกที่เหมาะสมในการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

1.2 การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากต้นหญ้า 3 ชนิด

สุ่มเก็บตัวอย่างต้นหญ้า 3 ชนิด คือ หญ้าคา หญ้าแห้วหมู และ หญ้าแขม (ภาคผนวก ข) ที่มีลักษณะการเจริญปกติ ไม่มีร่องรอยการทำลายของโรคและแมลง โดยสุ่มเก็บในบริเวณ อำเภอเมือง อำเภอแม่ริม อำเภอแม่ริม อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเวียงป่าเป้า และ อำเภอเทิง จังหวัดเชียงราย ทั้งหมดมีจำนวน 15 ตัวอย่าง ๆ ละ 7 ซ้ำ ตัวอย่างที่เก็บได้นำมาผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple surface sterilization โดยใช้ระยะเวลาและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหมาะสมตามผลจากการทดสอบใน ข้อ 1.1 จากนั้นเมื่อเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นพืช แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในจานอาหาร PDA แล้วเก็บใน PDA slant นับจำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อราเจริญออกมาเพื่อนำมาคำนวณหาค่า isolate prevalence (Bussaban *et al.*, 2001) จากสูตร

$$\text{Isolate prevalence} = \frac{\text{จำนวนของชิ้นพืชที่มีเชื้อราเอนโดไฟท์เจริญ}}{\text{จำนวนของชิ้นพืชที่วางทดสอบ}} \times 100$$

1.3 การจำแนกชนิด (Identification) ของเชื้อราเอนโดไฟท์

ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ ลักษณะทางสรีรวิทยา ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากแต่ละส่วนของต้นหญ้าทั้ง 3 ชนิด โดยตรวจสอบรูปร่างและลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ ตรวจสอบลักษณะทางทางสรีรวิทยา โดยตรวจสอบลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA และ MA จัดจำแนกชนิดของเชื้อราในระดับ genus โดยเปรียบเทียบกับหนังสืออ้างอิง เช่น Coelomycetous anamorphs with appendage–bearing conidia (Nag Raj, 1993) Dematiaceous Hyphomycetes (Ellis, 1971) Illustrated Genera of Ascomycetes (Hanlin, 1998) และ Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett and Hunter, 1998)

2. การตรวจสอบและแยกเชื้อราสาเหตุของโรคใบจุดสีน้ำตาล (spot blotch) ของข้าวบาร์เลย์

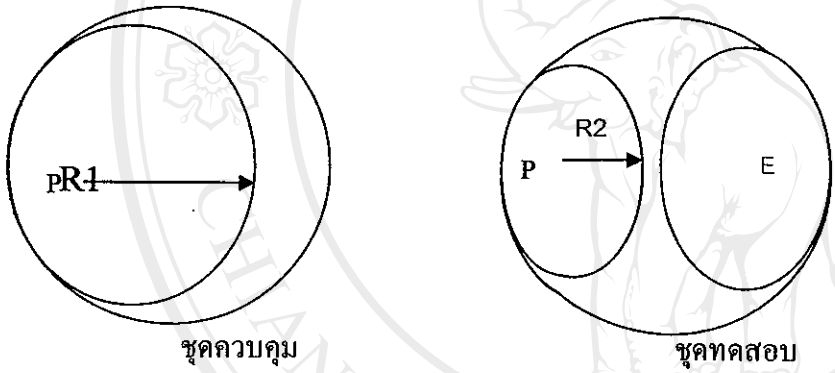
ทำการตรวจหาเชื้อราสาเหตุบนแผลใบจุดสีน้ำตาลโดยวิธี Free Hand Section จากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ และตรวจสอบภายใต้เนื้อเยื่อที่เป็นโรคโดยนำตัวอย่างใบของข้าวบาร์เลย์ที่แสดงอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาล มาตัดบริเวณแผลนำชิ้นพืชไปต้มใน lactophenol – cotton blue เพื่อกำจัดเม็ดสี (chlorophyll pigment) จากนั้นนำชิ้นพืชมาวางบน slide หยดด้วย lactophenol นำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope)

แยกเชื้อราสาเหตุโดย Tissue Transplanting Method เริ่มจากเก็บตัวอย่างใบของข้าวบาร์เลย์ที่แสดงอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาล มาตัดบริเวณแผลให้มีขนาด 2×2 มม. โดยให้มีทั้งส่วนที่ปกติและส่วนที่เป็นโรค จากนั้นนำมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยวิธี Triple Surface Sterilization โดยนำชิ้นพืชมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95 % นาน 30 วินาที โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 % นาน 1 นาที และ แอลกอฮอล์ 95 % 30 วินาที ตามลำดับ วางชิ้นพืชบนอาหาร PDA จำนวน 4 ชิ้น ต่อ 1 จาน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นพืชทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี Single Spore Isolation เก็บเชื้อใน PDA slant เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Bipolaris sorokiniana* บนอาหาร PDA

คัดเลือกตัวแทนเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 163 ไอโซเลท จากทั้งหมด 557 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. sorokiniana* โดย Dual Culture Method ทำการทดสอบโดย ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟท์ และ *B. sorokiniana* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. (culture disc) วางบนจานอาหาร PDA ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. โดยวางเชื้อทั้งสองห่างกัน 5 ซม. (ภาพที่ 1) วางเชื้อราที่เจริญช้าก่อนจากนั้นจึงวางเชื้อราที่เจริญเร็ว สำหรับชุดควบคุม (control) วาง culture disc ของ *B. sorokiniana* และชิ้นวุ้น (agar disc) ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ สังเกตและบันทึกผล การปฏิสัมพันธ์ของเชื้อราเอนโดไฟท์กับเชื้อราสาเหตุ



ภาพที่ 1 รูปแบบของ Dual Culture Method และวิธีวัดผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Bipolaris sorokiniana*

P = เชื้อราสาเหตุ (pathogen)

E = เชื้อราเอนโดไฟท์ (endophytic fungi)

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุ ในชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในชุดทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การทดสอบอิทธิพลในการวางเชื้อราเอนโดไฟท์และเชื้อรา *Bipolaris sorokiniana* ต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ

คัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *B. sorokiniana* จำนวน 21 ไอโซเลท จากข้อ 3 ทดสอบอิทธิพลในการวางเชื้อราเอนโดไฟท์ โดยวิธี Dual Culture Method ดังอธิบายในข้อ 3 เชื้อราเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลทถือเป็น 1 กรรมวิธี และแบ่งเป็น 3 การทดลอง คือ 1. วางเชื้อราเอนโดไฟท์ก่อนเชื้อสาเหตุ 2 วัน 2. วางเชื้อราเอนโดไฟท์พร้อมกับเชื้อสาเหตุ และ 3. วางเชื้อราเอนโดไฟท์หลังเชื้อราสาเหตุ 2 วัน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยทำ 4 ซ้ำ ต่อ 1 กรรมวิธี ในแต่ละการทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และบันทึกผลการเจริญของเชื้อราสาเหตุโดยวัดขนาดความยาวของรัศมีของโคโลนีของเชื้อสาเหตุด้านที่ติดกับเชื้อราเอนโดไฟท์ในชุดทดสอบและความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุในชุดควบคุม จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อเชื้อรา *B. sorokiniana* จากสูตร เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{\text{รัศมีของโคโลนีชุดควบคุม} - \text{รัศมีของโคโลนีชุดทดสอบ}}{\text{รัศมีของโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อเชื้อรา *B. sorokiniana* และประมาณค่าระดับการยับยั้ง ตามวิธีการของ เกษม (2532)

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการควบคุมเชื้อรา *Bipolaris sorokiniana* ที่ติดมากับเมล็ดข้าวบาร์เลย์

1. คัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง จากการทดลอง ข้อ 4 มาจำนวน 4 ไอโซเลท คือ Mycelia sterilia (4) T_5UL033, *Penicillium* sp. T_5IR007, *Emericella* sp. T_1CR001 และ Hyphomycetes (7) T_3UL007 เลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้ง 4 ไอโซเลท ในจานอาหาร PDA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. จากนั้นนำมาเตรียม suspension เพื่อทำการทดลองต่อไป

2. สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวบาร์เลย์ พันธุ์ พรบ. 9 มาฆ่าเชื้อที่ผิวโดย จุ่มใน เอทานอล 70 % นาน 1 นาที ตามด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 % นาน 1 นาที และ เอทานอล 70 % นาน 1 นาที นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาแช่ใน suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามแผนงานทดลอง

แผนงานทดลองแบ่งออกเป็น 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่ในน้ำฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 แช่ใน suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์ Mycelia sterilia (4) T_5UL033 ความเข้มข้น 1.0×10^6 cells/ml

กรรมวิธีที่ 3 แช่ใน suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Penicillium* sp. T_5IR007 ความเข้มข้น 1.21×10^6 conidia/ml

กรรมวิธีที่ 4 แช่ใน suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Emericella* sp. T_1CR001 ความเข้มข้น 1.0×10^6 ascospores/ml

กรรมวิธีที่ 5 แช่ใน suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์ Hyphomycetes (7) T_3UL007 ความเข้มข้น 1.24×10^6 conidia/ml

เพาะเมล็ดข้าวบาร์เลย์ที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆ บนกระดาษชื้น กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ โดยทำซ้ำ ละ 100 เมล็ด (วาง 20 เมล็ด/จาน) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

3. บันทึกผลโดยตรวจนับจำนวนเมล็ดข้าวบาร์เลย์ที่มีเชื้อรา *B. sorokiniana* เจริญอยู่บนเมล็ดและตรวจสอบความงอกของเมล็ด เปรียบเทียบจำนวนที่ได้จากแต่ละกรรมวิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Bipolaris sorokiniana* ในสภาพโรงเรือน

6.1 การศึกษาผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อความงอกของต้นกล้าข้าวบาร์เลย์

1. นำเชื้อราเอนโดไฟท์จากการทดลอง ข้อ 5 คือ Mycelia sterilia (4) T_5UL033, *Penicillium* sp. T_5IR007, *Emericella* sp. T_1CR001 และ Hyphomycetes (7) T_3UL007 เลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้ง 4 ไอโซเลท ในจานอาหาร PDA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. จากนั้นนำมาเตรียม suspension เพื่อทำการทดลองต่อไป

2. สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวบาร์เลย์ พันธุ์ พรบ. 9 มาฆ่าเชื้อที่ผิวโดย จุ่มใน เอทานอล 70 % นาน 1 นาที ตามด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 % นาน 1 นาที และ เอทานอล 70 % นาน 1 นาที นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาแช่ใน suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามแผนงานทดลอง

แผนงานทดลองแบ่งออกเป็น 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่ในน้ำฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 แช่ใน suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์ Mycelia sterilia (4) T_5UL033 ความเข้มข้น 1.0×10^6 cells/ml

กรรมวิธีที่ 3 แช่ใน suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Penicillium* sp. T_5IR007 ความเข้มข้น 1.21×10^6 conidia/ml

กรรมวิธีที่ 4 แช่ใน suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Emericella* sp. T_1CR001 ความเข้มข้น 1.0×10^6 ascospores/ml

กรรมวิธีที่ 5 แช่ใน suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์ Hyphomycetes (7) T_3UL007 ความเข้มข้น 1.24×10^6 conidia/ml

เพาะเมล็ดข้าวบาร์เลย์ที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆ ในกระถางที่มีดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 20 เมล็ด เพาะ 20 เมล็ด ต่อ กระถาง

3. ตรวจบันทึกผลความงอกของต้นกล้าในแต่ละกรรมวิธี หลังจากเพาะเมล็ดในกระถาง 7 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.2 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อรา *Bipolaris sorokiniana* ในต้นข้าวบาร์เลย์

สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวบาร์เลย์ พันธุ์ พรบ. 9 มาฆ่าเชื้อที่ผิวโดย จุ่มใน เอทานอล 70 % นาน 1 นาที ตามด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 % นาน 1 นาที และ เอทานอล 70 % นาน 1 นาที นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาทำตามการทดลองโดยแช่น้ำฆ่าเชื้อ หรือ suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์แต่ละชนิด (Mycelia sterilia (4) T_5UL033, *Penicillium* sp. T_5IR007, *Emericella* sp. T_1CR001 และ Hyphomycetes (7) T_3UL007) นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำเมล็ดดังกล่าวมาเพาะในกระถางบรรจุดินนึ่งฆ่าเชื้อจนกระทั่งข้าวบาร์เลย์อายุ 3 สัปดาห์ จึงพ่นด้วย น้ำฆ่าเชื้อ หรือ เชื้อรา *B. sorokiniana* หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุแล้วพ่น suspension ของเชื้อราเอนโดไฟท์แต่ละชนิด ดังกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

แผนงานทดลองแบ่งออกเป็น 14 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ต้นแช่เมล็ดด้วยน้ำ (พ่นน้ำ) (ชุดควบคุม1)
กรรมวิธีที่ 2 ต้นแช่เมล็ดด้วยน้ำ + เชื้อสาเหตุ (ชุดควบคุม2)
กรรมวิธีที่ 3 ต้นแช่เมล็ดด้วย Mycelia sterilia (4) T_5UL033 + เชื้อสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 4 ต้นแช่เมล็ดด้วย *Penicillium* sp. T_5IR007 + เชื้อสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 5 ต้นแช่เมล็ดด้วย *Emericella* sp. T_1CR001 + เชื้อสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 6 ต้นแช่เมล็ดด้วย Hyphomycetes (7) T_3UL007 + เชื้อสาเหตุ
กรรมวิธีที่ 7 ต้นแช่เมล็ดด้วย Mycelia sterilia (4) T_5UL033 + พ่นน้ำ + Mycelia sterilia (4) T_5UL033
กรรมวิธีที่ 8 ต้นแช่เมล็ดด้วย *Penicillium* sp. T_5IR007 + พ่นน้ำ + *Penicillium* sp. T_5IR007
กรรมวิธีที่ 9 ต้นแช่เมล็ดด้วย *Emericella* sp. T_1CR001 + พ่นน้ำ + *Emericella* sp. T_1CR001
กรรมวิธีที่ 10 ต้นแช่เมล็ดด้วย Hyphomycetes (7) T_3UL007 + พ่นน้ำ + Hyphomycetes (7) T_3UL007
กรรมวิธีที่ 11 ต้นแช่เมล็ดด้วย Mycelia sterilia (4) T_5UL033 + เชื้อสาเหตุ + Mycelia sterilia (4) T_5UL033

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 12 ต้นแช่เมล็ดด้วย *Penicillium* sp. T_5IR007 + เชื้อสาเหตุ
+ *Penicillium* sp. T_5IR007

กรรมวิธีที่ 13 ต้นแช่เมล็ดด้วย *Emericella* sp. T_1CR001 + เชื้อสาเหตุ
+ *Emericella* sp. T_1CR001

กรรมวิธีที่ 14 ต้นแช่เมล็ดด้วย Hyphomycetes (7) T_3UL007 + เชื้อสาเหตุ
+ Hyphomycetes (7) T_3UL007

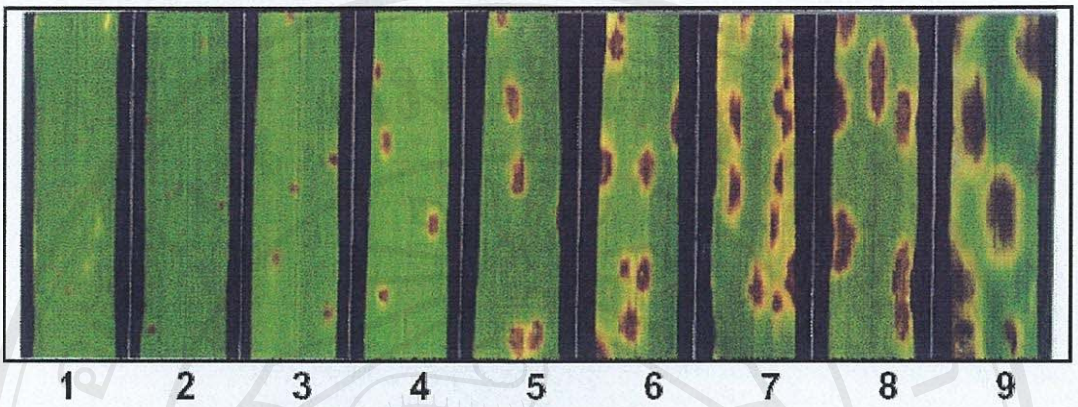
โดยทำการวัดผลการทดลองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 ต้น ตรวจบันทึกผลการเกิดโรคใบจุดสีน้ำตาลจากใบที่ 2 ของต้นข้าวบาร์เลย์ หลังจากทำการทดลอง 1 สัปดาห์ โดยประเมินผลการเกิดโรคตามวิธีการของ Fetch and Steffenson (1999) โดยจัดแบ่งระดับการเกิดโรคออกเป็น 9 ระดับ (ภาพที่ 2) จากนั้นนำมาหาค่าระดับของการเกิดโรคในแต่ละกรรมวิธี จาก

$$\text{ระดับการเกิดโรค} = \frac{\text{ค่าความถี่ในแต่ละระดับของการเกิดโรค} \times \text{ระดับ}}{\text{จำนวนต้นที่ทำการทดลองในกรรมวิธีนั้น}}$$

และทำการประเมินผลการเกิดโรค 3 รูปแบบ คือ

การเกิดโรคต่ำ (Low compatibility) = ระดับ 1–3
การเกิดโรคปานกลาง (Intermediate compatibility) = ระดับ 4–5
การเกิดโรคสูง (High compatibility) = ระดับ 6–9

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2 ระดับของการเกิดโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าวบาร์เลย์ในระยะต้นกล้า (Fetch and Steffenson,1999)

ระดับ 1 เกิดแผลจุดขนาดเล็กสีน้ำตาลรูปร่างกลม

ระดับ 2 แผลสีน้ำตาล รูปสี่เหลี่ยม มีความยาวประมาณ 0.3–0.7 มิลลิเมตร (มม.) กว้าง 0.3–0.5 มม.

ระดับ 3 แผลสีน้ำตาล รูปร่างกลมหรือสี่เหลี่ยม มีขนาดใหญ่กว่า ระดับ 2 มีความยาวประมาณ 0.8–1.3 มม. กว้าง 0.5–0.7 มม. เกิด chlorosis บริเวณขอบแผล

ระดับ 4 –5 แผลสีน้ำตาล รูปร่างกลมรี มีความยาวประมาณ 0.7–1.3 มม. กว้าง 0.3–0.7 มม. ระดับ 5 มีขนาดใหญ่กว่าระดับ 4 เล็กน้อย เกิด chlorosis อย่างชัดเจนบริเวณขอบแผล

ระดับ 6–9 แผลสีน้ำตาล รูปร่างรียาว เกิด chlorosis อย่างชัดเจนบริเวณขอบแผลและแผ่ขยายออกไป เห็นได้ชัดว่าเนื้อเยื่อของใบจะมีสีสว่างปรากฏอยู่ล้อมรอบแผล ขนาดของแผลจะแตกต่างกัน อยู่ในช่วงความยาวประมาณ 0.4–0.8 มม. กว้าง 1.4–3.2 มม. chlorosis มีความกว้างประมาณ 0.5–1 มม. บ่อยครั้งพบว่าแผลที่อยู่ใกล้กันจะเชื่อมต่อกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved