

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตรวจสอบชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มี 4 พันธุ์ คือ ชม. 60 สจ. 5 MJ 9518-20 และ MJ 9520-21 ที่ได้จากศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ นำมาตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดโดยวิธีการเพาะบนกระดาษขึ้น (blotter method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1999) วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ส่วนปริมาณเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ติดมากับเมล็ด และเปอร์เซ็นต์ความงอก นำผลการทดลองมาวิเคราะห์แบบ CRD สุ่มตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ละ 400 เมล็ด โดยนำเมล็ดวางบนกระดาษขึ้นในงานเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ซึ่งมีกระดาษกรอง Whatman No.1 จำนวน 1 แผ่นอยู่ด้านบนและกระดาษฟางจำนวน 3 แผ่นอยู่ด้านล่างที่ชุ่มน้ำแล้ว วางเมล็ดจานละ 10 เมล็ด โดยทำการทดลองกับเมล็ดถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ พันธุ์ละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด จากนั้นนำไปบ่ม (incubate) ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดจึงนำเมล็ดถั่วเหลืองมาตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด และเปอร์เซ็นต์ความงอกภายใต้กล้อง stereo microscope และ compound microscope และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติพร้อมทั้งทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส และ เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ให้บริสุทธิ์โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA และเก็บไว้เป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในต้นอ่อนถั่วเหลือง

2.1 การเตรียมดินปลูก

นำดินร่วนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาใส่ลงในถาดหลุม (จำนวน 104 หลุม/ถาด) โดยใส่ดินให้เต็มแต่ละหลุมทั้งหมด 100 หลุม

2.2 การเตรียม suspension ของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum*

นำเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ที่แยกได้จากการทดลองที่ 1 ซึ่งเลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 14 วันมาเตรียมเป็น spore suspension โดยวัดความเข้มข้นของ spore suspension ของเชื้อราให้ได้ประมาณ 10^6 spores/ml

2.3 การเตรียมเมล็ดปลูกทดสอบ

นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ชม. 60 และสจ. 5 ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยแช่เมล็ดในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 ครั้ง แล้วจึงแบ่งเมล็ดถั่วเหลืองไว้ส่วนหนึ่งและนำเมล็ดถั่วเหลืองส่วนที่เหลือมาแช่ใน spore suspension ของเชื้อรา *C. truncatum* เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงนำมาฝังบนกระดาษกรองที่อบฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อเตรียมนำไปปลูกต่อไป

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ต่อการเกิดโรคของถั่วเหลือง

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่เตรียมไว้มาเพาะลงในถาดหลุมที่ใส่ดินอบฆ่าเชื้อแล้ว (ข้อ 2.1) โดยเพาะในถาดหลุม 100 เมล็ด หลังจากนั้น 7 วัน จึงทำการบันทึกผลของเชื้อ *C. truncatum* ต่อการเกิดโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองโดยดูจากเปอร์เซ็นต์ความงอกและการเกิดโรค

3. การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส

3.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum*

นำเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท ที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองมาทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *C. truncatum* โดยทดสอบด้วยวิธี dual culture โดยวางเชื้อรา *C. truncatum* ให้ห่างขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร หลังจากนั้น 3 วัน จึงทำการวางเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในด้านตรงกันข้ามกับเชื้อรา *C. truncatum* โดยห่างขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ทำการทดลอง 5 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 35-38 องศาเซลเซียส) ทำการบันทึกผลการเจริญของเชื้อรา *C. truncatum* โดยวัดความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *C. truncatum* ในชุดทดสอบและชุดควบคุม (ภาพ 1) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อรา *C. truncatum* โดยใช้สูตรในการคำนวณดังนี้

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (Percent Inhibition of Radial Growth: PIRG)

$$\text{PIRG} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

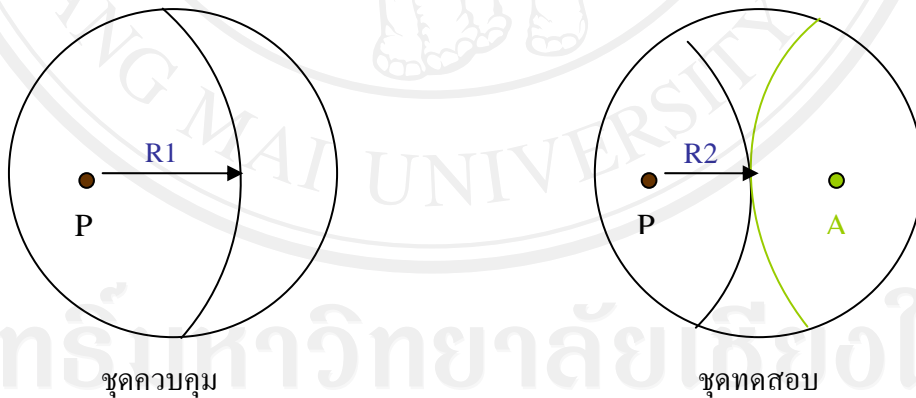
R1

โดย R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *C. truncatum* ในงานชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *C. truncatum* ในงานชุดทดสอบ

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)



P = เชื้อราสาเหตุโรคพืช (pathogen)

A = เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist)

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในงานชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในงานชุดทดสอบ

ภาพ 1 การวางเชื้อราทดสอบและรัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยวิธี dual culture

3.2 ศึกษาปฏิกริยาการยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อรา

Colletotrichum truncatum ด้วยวิธี slide dual culture

slide dual culture ทดสอบโดยนำกระดาษกรอง Whatman No.1 วางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นจึงวางยางรัดบนกระดาษกรอง แล้ววางแผ่นสไลด์บนยางรัด นำชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 5×5 มิลลิเมตร โดยวางกลางแผ่นสไลด์ ใช้เข็มเย็บย้ายเชื้อรา *C. truncatum* มาแตะที่ขอบด้านข้างชิ้นวุ้นอาหาร PDA และใช้เข็มเย็บย้ายเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาแตะที่ขอบชิ้นวุ้นอาหาร PDA ด้านตรงกันข้ามกับเชื้อรา *C. truncatum* ปิดด้วย cover glass และให้ความชื้นแก่จานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการหยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้กระดาษกรองชื้น และปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อรักษาความชื้น เมื่อเชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญปกคลุมเชื้อรา *C. truncatum* จึงนำมาศึกษาปฏิกริยาการยับยั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. ศึกษาผลของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการงอกและการเจริญของต้นถั่วเหลืองพันธุ์ ชม. 60

และสจ. 5

4.1 การเตรียมดินปลูก

นำดินร่วนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงไปนในถาดหลุม โดยใช้ถาดหลุมจำนวน 104 หลุม ใส่ดินลงในถาดหลุม 100 หลุม จำนวน 40 ถาดหลุม

4.2 การเตรียม spore suspension ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* sp. จำนวน 4 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท 1, ไอโซเลท 2, ไอโซเลท 3 และไอโซเลท 4 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมาเตรียมเป็น spore suspension ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท ให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^6 spores/ml

4.3 การเตรียมเมล็ดปลูก

เมล็ดถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดสอบคือพันธุ์ ชม. 60 และสจ. 5 นำเมล็ดถั่วเหลืองมาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 ครั้ง แล้วนำเมล็ดมาผึ่งให้แห้งบนกระดาษที่ฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อเมล็ดแห้งจึงนำเมล็ดส่วนหนึ่งมาแช่ใน spore suspension ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเมล็ดมาผึ่งให้แห้งบนกระดาษฟางที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบ

4.4 การทดสอบผลของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการงอกของเมล็ดถั่วเหลือง (germination test)

ทดสอบด้วยวิธี between paper ตามวิธีการของ ISTA (1999) โดยใช้กระดาษเพาะขนาด 25 × 30 เซนติเมตรจำนวน 2 แผ่นจุ่มน้ำให้ชุ่ม วางเมล็ดถั่วเหลืองลงบนกระดาษเพาะโดยให้มีระยะห่างเท่า ๆ กันให้ได้ 100 เมล็ด แล้ววางกระดาษเพาะที่ชุ่มน้ำอีกแผ่นปิดทับเมล็ด จากนั้นพับขอบกระดาษส่วนล่างขึ้นมาประมาณ 1 นิ้ว ม้วนกระดาษจากปลายด้านหนึ่งไปจนสุดปลายอีกด้านหนึ่งแต่อย่าให้แน่นเกินไป การทดลองแบ่งออกเป็น 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด ดังนี้

- | | |
|---------------|--|
| กรรมวิธีที่ 1 | ชุดควบคุม (ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดอย่างเดียว) |
| กรรมวิธีที่ 2 | เมล็ดที่ปลูกเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลท ที่ 1 |
| กรรมวิธีที่ 3 | เมล็ดที่ปลูกเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลท ที่ 2 |
| กรรมวิธีที่ 4 | เมล็ดที่ปลูกเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลท ที่ 3 |
| กรรมวิธีที่ 5 | เมล็ดที่ปลูกเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลท ที่ 4 |

แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนด 7 วัน จึงทำการตรวจเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

4.5 การทดสอบผลของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อความแข็งแรงของต้นถั่วเหลือง

4.5.1 อัตราการเจริญของต้นกล้า (seedling growth rate, SGR)

ทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบความงอกในข้อ 4.4 เมื่อครบกำหนด 7 วัน นำต้นอ่อนถั่วเหลืองที่งอกปกติมาตัดเอาเฉพาะส่วนของยอดอ่อนและราก บรรจุใส่ถุงกระดาษแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและราก แล้วคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและราก}}{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}}$$

4.6 การทดสอบผลของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเจริญของต้นถั่วเหลืองในโรงเรือน

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท ปลูกในถาดหลุมที่ใส่ดินร่วนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ดังกรรมวิธีต่อไปนี้

- กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดอย่างเดียว)
 กรรมวิธีที่ 2 เมล็ดที่ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท ที่ 1
 กรรมวิธีที่ 3 เมล็ดที่ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท ที่ 2
 กรรมวิธีที่ 4 เมล็ดที่ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท ที่ 3
 กรรมวิธีที่ 5 เมล็ดที่ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท ที่ 4

ทำการทดลองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด เมื่อดันอ่อนอายุได้ 14 วันจึงตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความงอกและนำดันอ่อนมาชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง โดยทำการเก็บดันอ่อนถั่วเหลืองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 25 ดัน นำมาชั่งน้ำหนักสด โดยนำดันอ่อนถั่วเหลืองมาล้างทำความสะอาดแล้วผึ่งไว้ 30 นาที แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนักสด ส่วนน้ำหนักแห้งนั้นทำโดยนำดันอ่อนถั่วเหลืองที่ผ่านการชั่งน้ำหนักสดมาอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งต่อไป

4.6.1 อัตราการเจริญเติบโตของราก (root growth rate)

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบอัตราการเจริญของต้นถั่วเหลืองแต่ประเมินผลด้วยการวัดความยาวของราก โดยวัดความยาวของรากจากโคนต้นไปถึงปลายราก

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองพันธุ์ ชม. 60 และ สจ. 5 ในระยะต้นอ่อนในโรงเรือนเปรียบเทียบกับสารเคมีคลุกเมล็ด

5.1 การเตรียมดินปลูก

นำดินร่วนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงไปในถาดหลุม โดยใช้ถาดหลุมจำนวน 104 หลุม ใส่ดินลงในถาดหลุม 100 หลุม จำนวน 40 ถาดหลุม

5.2 การเตรียม spore suspension ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท และเชื้อรา *Colletotrichum truncatum*

เลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมาเตรียมเป็น spore suspension ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^6 spores/ml ส่วนเชื้อรา *C. truncatum* นั้นเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำมาเตรียมเป็น spore suspension ให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^6 spores/ml

5.3 การเตรียมเมล็ดปลูก

นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ ชม. 60 และสจ. 5 มาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 ครั้ง แล้วนำเมล็ดมาผึ่งให้แห้งบนกระดาษฟางที่ฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อเมล็ดแห้งแบ่งเมล็ดเก็บไว้ส่วนหนึ่งอีกส่วนหนึ่งนำเมล็ดมาแช่ใน spore suspension ของเชื้อรา *C. truncatum*. เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเมล็ดมาผึ่งให้แห้งบนกระดาษฟางที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแบ่งเมล็ดออกเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกนำไปแช่ใน spore suspension ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท ส่วนที่สองนำไปคลุกกับสารฆ่าเชื้อรา captan ในอัตรา 3 กรัมต่อเมล็ด 1 กิโลกรัม ส่วนสุดท้ายเป็นเมล็ดที่ผ่านการปลูกเชื้อรา *C. truncatum* เพียงอย่างเดียว

5.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรก

โนสของถั่วเหลืองในระยะต้นอ่อนในโรงเรือนเปรียบเทียบกับสารเคมีคลุกเมล็ด

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่เตรียมไว้ในข้อ 5.3 ปลูกลงในถาดหลุมที่มีดินอบฆ่าเชื้อแล้ว โดยแบ่ง เป็น 8 กรรมวิธีดังนี้

- | | |
|---------------|--|
| กรรมวิธีที่ 1 | ชุดควบคุม (ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดอย่างเดียว) |
| กรรมวิธีที่ 2 | ชุดควบคุมปลูกเชื้อรา <i>C. truncatum</i> เพียงอย่างเดียว |
| กรรมวิธีที่ 3 | ปลูกเชื้อรา <i>C. truncatum</i> + ปลูกเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลท 1 |
| กรรมวิธีที่ 4 | ปลูกเชื้อรา <i>C. truncatum</i> + ปลูกเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลท 2 |
| กรรมวิธีที่ 5 | ปลูกเชื้อรา <i>C. truncatum</i> + ปลูกเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลท 3 |
| กรรมวิธีที่ 6 | ปลูกเชื้อรา <i>C. truncatum</i> + ปลูกเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลท 4 |
| กรรมวิธีที่ 7 | ปลูกเชื้อรา <i>C. truncatum</i> + คลุกสาร captan |
| กรรมวิธีที่ 8 | ชุดควบคุมเมล็ดคลุกสาร captan อย่างเดียว |

ทำการทดลองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 100 ต้น เมื่อต้นอ่อนอายุได้ 14 วันจึงหาเปอร์เซ็นต์ความงอกและการเกิดโรคหลังจากนั้นจึงนำต้นอ่อนมาชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง โดยทำการเก็บต้นอ่อนถั่วเหลืองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 25 ต้น นำมาชั่งน้ำหนักสด โดยนำต้นอ่อนถั่วเหลืองมาล้างทำความสะอาดแล้วผึ่งไว้ 30 นาที แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนักสด ส่วนน้ำหนักแห้งนั้นทำโดยนำต้นอ่อนถั่วเหลืองที่ผ่านการชั่งน้ำหนักสดมาอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง และนำข้อมูลที่ได้อ้อมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยโปรแกรม Statistix for Window version 8.0 และนำค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีมาเปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference) ต่อไป