บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์

1.1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)

1.2 หลอดทดลอง (test tube)

1.3 ที่วางหลอดทดลอง (rack)

1.4 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 150 ml

1.5 กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 10 50 และ 100 ml

1.6 บีกเกอร์ (beaker)

1.7 แท่งแก้วคน (stirrer)

1.8 Pasture pipette

1.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.10 ช้อนตักสาร (spatula)

1.11 ปากคีบ (forcep)

1.12 แผ่นไม้กระดานสำหรับรองตัดส่วนต่างๆของพืช

1.13 เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)

1.14 ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)

1.15 สำลี

1.16 กระดาษชั่งสาร

1.17 Paraffin film

1.18 กระดาษซับ (อาจใช้กระดาษทิชชูหรือกระดาษกรอง)

1.19 สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ (slides and cover slips)

1.20 แท่งแก้วรูปตัว V

1.21 ถุงพลาสติก

1.22 หนังยาง

1.23 ไม้บรรทัด

1.24 มีด

1.25 ผ้าขาวบาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

1.26 ปากกาเขียนแก้ว

1.27 Stage micrometer

1.28 Ocular micrometer

1.29 กรรไกร

1.30 กระบะขนาด 10x12x4.5 นิ้ว

2. เครื่องมือ

2.1	กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microcsope)	ยี่ห้อ Olympus
2.2	กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microcsope)	ยี่ห้อ Olympus
2.3	เตาแก๊ส	
2.4	ตู้ถ่ายเชื้อ	ยี่ห้อ S.K. Trading
2.5	หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)	ยี่ห้อ All American รุ่น 25X
2.6	เครื่องชั่งละเอียด (4 ตำแหน่ง)	ยี่ห้อ A&D
2.7	ตู้อบ (hot air oven)	ยี่ห้อ WTB binder
2.8	ตู้ไมโครเวฟ	ยี่ห้อ Sharp

3. วัสดุ

3.1 มันฝรั่ง

3.2 ข้าวโพดบด

3.3 เมล็ดข้าวเหนียว

3.4 เปลือกข้าว

3.5 ดินเหนียว

4. ตัวอย่างพืช

4.1 ข้าวเหนียวสันป่าตอง จาก ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่, MJNSP

4.2 ข้าวเหนียวสันป่าตอง จากตำบลสันผีเสื้อ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่, SPNSP

4.3 ข้าวเหนียวสันป่าตอง จากแปลงทดลองพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ANSP

4.4 ข้าวเหนียว กข6 จากตำบลหนองจ๊อม อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่, NK กข6

4.5 ข้าวเหนียว กข6 จากตำบลป่าไผ่ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่, PP กข6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

4.6 ข้าวเหนียว กข6 จากแปลงทดลองพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, A กข6

4.7 ข้าวขาวดอกมะลิ จากตำบลหนองจ๊อม อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่, NKH

4.8 ข้าวขาวดอกมะลิ จากตำบลป่าไผ่ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่, PPH

4.9 ข้าวขาวดอกมะลิ จากแปลงทดลองพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, AH

4.10 ข้าวเหนียวสุพรรณ จากตำบลป่าไผ่ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่, PS

4.11 ข้าวเหนียวสุพรรณ จากตำบลหนองจ๊อม อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่, TS

4.12 ข้าวเหนียว กข7 จากตำบลหนองจ๊อม อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่, T กข7

4.13 ข้าวเหนียว กข22 จากตำบลหนองจ๊อม อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่, T กข22

4.14 ข้าวไร่ซิวแม่จันทร์ จากตำบลเมืองงาย อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่, OrMC

4.15 ข้าวไร่ฮ้าวเม็ดแดง จากตำบลอินทขิล อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่, OrMR

4.16 ข้าวไร่ขาวเม็ดมอญ จากตำบลอินทขิล อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่, OrMW

5. สารเคมี

5.1 สารเคมีที่ใช้ในการแยกเชื้อรา

5.1.1 โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10% (sodium hypochlorite, $NaClO_3$) ชื่อทางการค้า คลอร๊อกซ์ (Clorox 10%)

5.1.2 Ethanol 95%

5.1.3 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (distilled water)

5.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.2.1 Malt extract (Difco)

5.2.2 Rose bengal (Fluka)

5.2.3 Yeast extract (Difco)

5.2.4 Chloramphinical

5.2.5 Dextrose

5.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสไลด์กึ่งถาวร

5.3.1 Lactophenol

5.3.2 Lactophenol-cotton blue

5.3.3 Ethanol 70%, 90%

5.3.4 น้ำกลั่น

5.3.5 น้ำยาทาเล็บ

6. อาหารที่ใช้สำหรับแยกและเลี้ยงเชื้อ (แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก)

6.1 Potato dextrose agar (PDA)

6.2 Rose bengal agar (RBA)

6.3 Corn meal agar (CMA)

วิธีการทดลอง

1. การแยกและจำแนกชนิดเชื้อราเอนโดไฟต์

1.1 การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอนโดไฟต์

ทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวส่วนต่างๆ ของต้นข้าวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอนโดไฟต์เพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแช่ชิ้นส่วนใบ ลำต้น และราก ของต้นข้าวในโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นต่างๆกัน มีขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างใบ ลำต้น และรากของต้นข้าวที่ไม่เป็นโรคมาล้างน้ำให้สะอาด
2. ใช้กรรไกรตัดส่วนของใบ ลำต้น และราก ให้ได้ความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร
3. นำผ้าขาวบางมาห่อชิ้นส่วนของพืชที่ตัดได้ จากนั้นนำมาแช่ใน แอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 15 วินาที
4. นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมด แช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 1, 3 และ 5 % ในเวลานานต่างๆกันคือ 1, 3 และ 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว
5. นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ใน แอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 15 วินาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว
6. นำชิ้นส่วนของพืชวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ RBA โดยแต่ละจานอาหารวาง 5 ตำแหน่ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส)
7. ตรวจดูเชื้อที่เจริญออกมาจากแต่ละชิ้นส่วนของต้นข้าว วิเคราะห์ผลของการเจริญของเชื้อราที่เวลาและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ต่างๆ กัน

1.2 การเก็บตัวอย่างพืช (sample collection) และการแยกเชื้อ (isolation)

สุ่มเก็บตัวอย่างต้นข้าวพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ สันป่าตอง สุพรรณ กข6 กข7 กข22 ขาวดอกมะลิ ซิวแม่จันทร์ ฮ้าวเม็ดแดง และขาวเม็ดมอญ จากบริเวณอำเภอเมือง อำเภอสันทราย อำเภอแม่แตง และอำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 16 ตัวอย่างๆ ละ 8 ซ้ำ โดยเลือกเก็บเฉพาะต้นที่ปกติ (ไม่มีการเข้าทำลายของแมลงและแสดงอาการของโรค) นำตัวอย่างมาผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิว

เหมือนกับข้อ 1 และจากผลการทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว ความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ใช้คือ 1% และระยะเวลาที่ใช้ในการแช่คือ 1 นาที ตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากแต่ละชิ้นพืชของต้นข้าว แยกเชื้อราที่ได้ไปทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA และเก็บไว้ใน PDA slant เพื่อจัดจำแนกและบ่งบอกชนิดเชื้อราต่อไป นับจำนวนชิ้นตัวอย่างที่มีเชื้อเจริญออกมาเพื่อคำนวณหาค่า isolate prevalence หรือ colonization rate (Taylor *et al.*, 1999) ดังสูตร

$$\text{Colonization rate} = \frac{\text{Total number of samples yielding} \geq 1 \text{ isolate}}{\text{Total number of samples in that trial}} \times 100$$

1.3 การตรวจสอบและบ่งชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์

1. ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่เพาะเลี้ยงคือ PDA และ CMA

2. ตรวจลักษณะรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้น ทำสไลด์กึ่งถาวร (ภาคผนวก ข) สำหรับชนิดที่สร้างสปอร์จำนวนมากหรือ สปอร์อาจหลุดจากก้านชูสปอร์ง่าย

3. เปรียบเทียบลักษณะต่างๆ เพื่อบ่งบอกชนิดของเชื้อราในระดับ genus โดยเปรียบเทียบกับหนังสืออ้างอิง Barnett and Hunter (1987), Ellis (1971, 1976), Dennis (1978), Carmichael *et al.* (1980), Sutton (1980), Hawksworth *et al.* (1995) และ Hanlin (1998)

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว

นำต้นข้าวที่แสดงอาการถอดฝักดาบ ซึ่งได้ล้างทำความสะอาดบริเวณราก และโคนต้น แล้วตัดส่วนโคนต้น และรากจุ่มลงในแอลกอฮอล์ 95% ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นตัดชิ้นพืชให้ขนาดเล็กลง แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1% นาน 1 นาที แล้วนำชิ้นพืชที่เป็นโรคไปวางบนอาหาร PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) เมื่อเชื้อราเจริญออกมา ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป โดยเชื้อราสาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าวคือเชื้อรา *Fusarium moniliforme*

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว

นำเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นข้าวมาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Fusarium moniliforme* เชื้อราสาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว ทำการทดสอบโดยวิธี dual culture โดยวางเชื้อราสาเหตุกับเชื้อราเอนโดไฟต์บนอาหาร PDA ให้ห่างกัน 5 เซนติเมตร ในการวางเชื้อจะทำการวางเชื้อที่เจริญช้าก่อน แล้วจึงวางเชื้อที่เจริญเร็วในเวลาถัดมา เพื่อให้เชื้อรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์แต่ละชนิด บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตบันทึกผลการเจริญของเชื้อราสาเหตุ โดยวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุด้านที่ติดกับเชื้อราเอนโดไฟต์ในชุดทดสอบ และวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุจากชุดควบคุม (ภาพที่ 1) และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราเอนโดไฟต์หรือเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Fusarium moniliforme* โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณคือ

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (Percent Inhibition of Radial Growth: PIRG)

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

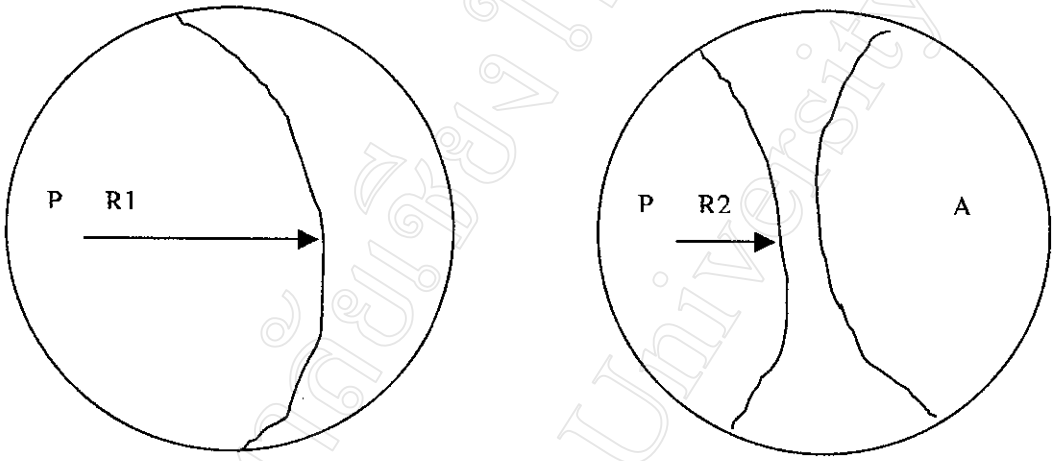
R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ในจานชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* 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)

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS



ชุดควบคุม ชุดทดสอบ

P = เชื้อราสาเหตุโรคพืช (pathogen)
A = เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist)
R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานชุดควบคุม
R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานชุดทดสอบ

ภาพที่ 1 รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าวเมื่อทดสอบกับเชื้อราปฏิปักษ์เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยวิธี dual culture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

4. การทดสอบผลของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการงอกและการเจริญของกล้าข้าว

4.1 การเตรียมดินปลูก

การเตรียมดินปลูกโดยนำดินเหนียวที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นบรรจุลงในกระบะขนาด 10x12x4.5 นิ้ว โดยบรรจุดินประมาณครึ่งกระบะ จากนั้นราดน้ำให้ชุ่ม เพื่อนำเมล็ดมาปลูกต่อไป

4.2 การเตรียม suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์

เตรียม suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์ โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ใช้ในการทดสอบคือเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ให้ผลในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว ซึ่งเป็นเชื้อราที่ให้ผลในการยับยั้งแบบเชื้อราเจริญทับเชื้อราสาเหตุและการเกิด clear zone และเป็นเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคถอดฝักดาบของข้าวในโรงเรือน โดยเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบคือ *Nodulosporium* sp. 0020, *Neosartorya* sp. 0026, *Aspergillus* sp. 0036, Coelomycetes 1 0117 และ *Acremonium* sp. 0119 เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้ง 5 ไอโซเลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 5-7 วัน จากนั้นนำมาเตรียมเป็น suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลท โดยความเข้มข้นของ suspension ของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบต้องมากกว่า 10^6 CFU/seed (Mao *et al.*, 1997)

4.3 การเตรียมเมล็ดปลูก

เมล็ดข้าวที่ใช้ในการทดสอบเป็นเมล็ดข้าวเหนียวพันธุ์ กข10 จากศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 7 กรมส่งเสริมการเกษตร เชียงใหม่ ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวโดยแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1% นาน 1 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3- 4 ครั้ง (Desjardins *et al.*, 2000) จากนั้นนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว มาแช่ลงใน suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์ โดยทำการแช่ทิ้งไว้ก่อนปลูก 24 ชั่วโมง (Rosales and Mew, 1997)

4.4 การทดสอบผลของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการงอกของเมล็ดข้าว

นำเมล็ดข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อราเอนโดไฟต์ มาวางเพาะบนกระดาษชื้นในจานอาหาร โดยทำการทดสอบ 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด หลังจากนั้น 7 วัน ทำการวัดผลโดยตรวจจากเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดข้าว เพื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเมล็ดไม่ได้ปลูกด้วยเชื้อราเอนโดไฟต์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

4.5 การทดสอบผลของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการเจริญของกล้าข้าวในโรงเรือน

นำเมล็ดข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อราเอนโดไฟต์ (ข้อ 4.2) ปลูกลงในกระบะบรรจุดินเหนียว (ข้อ 4.1) ดังรายละเอียดของแผนงานทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	ชุดควบคุมหรือ control (เมล็ดไม่ได้ปลูกด้วยเชื้อราเอนโดไฟต์)
กรรมวิธีที่ 2	เมล็ดปลูกด้วย *Nodulosporium* sp. 0020
กรรมวิธีที่ 3	เมล็ดปลูกด้วย *Neosartorya* sp. 0026
กรรมวิธีที่ 4	เมล็ดปลูกด้วย *Aspergillus* sp. 0036
กรรมวิธีที่ 5	เมล็ดปลูกด้วย Coelomycetes 1 0117
กรรมวิธีที่ 6	เมล็ดปลูกด้วย *Acremonium* sp. 0119

วางแผนงานทดลองแบบ CRD โดยทำการทดลองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 500 เมล็ด ดูแลรดน้ำเป็นประจำทุกวัน เมื่อข้าวเริ่มงอกรดน้ำให้ท่วมดิน ประเมินผลโดยเก็บกล้าข้าวมาชั่งน้ำหนัก โดยทำการชั่งทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง การเก็บตัวอย่างมาชั่งน้ำหนัก เก็บกล้าข้าวกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 100 ต้น มาทำการชั่งน้ำหนักสด โดยเก็บกล้าข้าวแล้วนำมาล้างทำความสะอาดเพื่อชะล้างเอาเศษดินออก จากนั้นผึ่งไว้ให้แห้งประมาณ 30 นาที จึงทำการชั่งน้ำหนัก และการชั่งน้ำหนักแห้ง นำกล้าข้าวที่ผ่านการชั่งน้ำหนักสดมาอบให้แห้งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นานประมาณ 12 วัน หรือจนน้ำหนักแห้งของกล้าข้าวคงที่ จึงทำการบันทึกผลของน้ำหนักแห้งที่ชั่งได้ ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการชั่งน้ำหนักครั้งแรกเมื่อข้าวอายุได้ 14 วัน จากนั้นเก็บผลเมื่อกล้าข้าวอายุ 21, 28 และ 35 วัน โดยทำการเก็บผลรวมทั้งสิ้น 4 ครั้ง และนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางผลสถิติ

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคถอดฝักดาบของข้าวในระยะต้นกล้าในโรงเรือน

5.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุ

การเพิ่มปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว (*Fusarium moniliforme*) โดยเลี้ยงบนเปลือกข้าวผสมกับเมล็ดข้าวที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว สามารถเตรียมได้โดย ผสมเปลือกข้าวและเมล็ดข้าวในอัตราส่วน 3:1 เติมน้ำกลั่นอีก 100 ml ปิดฝาขวดให้สนิท จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นย้ายเชื้อราสาเหตุลงในขวด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นาน 7 วัน ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป (Rosales and Mew, 1997)

5.2 การเตรียมดินปลูก

การเตรียมดินปลูกโดยนำดินเหนียวที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นบรรจุลงในกระบะขนาด 10x12x4.5 นิ้ว โดยบรรจุดินประมาณครึ่งกระบะ จากนั้นนำ inoculum ของเชื้อราสาเหตุมาคลุกกับดิน บ่มเชื้อทิ้งไว้ 2 วัน ก่อนนำมาทดสอบ

5.3 การเตรียม suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์

เตรียม suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์ โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ใช้ในการทดสอบคือเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ให้ผลในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว ซึ่งเป็นเชื้อราที่ให้ผลในการยับยั้งแบบเชื้อราเจริญทับเชื้อราสาเหตุและการเกิด clear zone โดยเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบคือ *Nodulosporium* sp. 0020, *Neosartorya* sp. 0026, *Aspergillus* sp. 0036, Coelomyetes 1 0117 และ *Acremonium* sp. 0119 เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้ง 5 ไอโซเลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 5-7 วัน จากนั้นนำมาเตรียมเป็น suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลท โดยความเข้มข้นของ suspension ของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบต้องมากกว่า 10^6 CFU/seed (Mao *et al.*, 1997)

5.4 การเตรียมเมล็ดปลูก

เมล็ดข้าวที่ใช้ในการทดสอบเป็นเมล็ดข้าวเหนียวพันธุ์ กข10 จากศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 7 กรมส่งเสริมการเกษตร เชียงใหม่ ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวโดยแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1% นาน 1 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3- 4 ครั้ง (Desjardins *et al.*, 2000) จากนั้นนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว มาแช่ลงใน suspension ของเชื้อราเอนโดไฟต์ โดยทำการแช่ทิ้งไว้ก่อนปลูก 24 ชั่วโมง (Rosales and Mew, 1997)

5.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการงอกของเมล็ดข้าวที่ถูกปลูกด้วยเชื้อราสาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว (*Fusarium moniliforme*)

นำเมล็ดข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อราเอนโดไฟต์ มาเพาะลงในจานอาหารที่มีดินที่มีเชื้อราสาเหตุอยู่ โดยเพาะในจานอาหารจานละ 100 เมล็ด ทำการทดสอบ 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด หลังจากนั้น 10-15 วัน ทำการวัดผลโดยตรวจจากเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดข้าวที่งอกขึ้นมา ดังรายละเอียดของแผนงานทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุมหรือ control (ไม่ปลูกเชื้อราเอนโดไฟต์ ไม่ปลูกเชื้อราสาเหตุ)
กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อราสาเหตุเพียงอย่างเดียว
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อราสาเหตุ + *Nodulosporium* sp. 0020
กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อราสาเหตุ + *Neosartorya* sp. 0026
กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อราสาเหตุ + *Aspergillus* sp. 0036
กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อราสาเหตุ + Coelomycetes 1 0117
กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อราสาเหตุ + *Acremonium* sp. 0119

นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

5.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคถอดฝักดาบของข้าวในระยะต้นกล้าในโรงเรือน

นำเมล็ดข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อราเอนโดไฟต์ (ข้อ 5.4) ปลูกลงในกระบะบรรจุดินเหนียวที่คลุกเชื้อราสาเหตุ (ข้อ 5.2) ดังรายละเอียดของแผนงานทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุมหรือ control (ไม่ปลูกเชื้อราเอนโดไฟต์ ไม่ปลูกเชื้อราสาเหตุ)
กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อราสาเหตุเพียงอย่างเดียว
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อราสาเหตุ + *Nodulosporium* sp. 0020
กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อราสาเหตุ + *Neosartorya* sp. 0026
กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อราสาเหตุ + *Aspergillus* sp. 0036
กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อราสาเหตุ + Coelomycetes 1 0117
กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อราสาเหตุ + *Acremonium* sp. 0119

วางแผนงานทดลองแบบ CRD โดยทำการทดลองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 500 เมล็ด ดูแลรดน้ำเป็นประจำทุกวัน เมื่อข้าวเริ่มงอกรดน้ำให้ท่วมดิน ประเมินผลโดยเก็บกล้าข้าวมาชั่งน้ำหนัก โดยทำการชั่งทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง การเก็บตัวอย่างมาชั่งน้ำหนัก เก็บกล้าข้าวกรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 100 ต้น มาทำการชั่งน้ำหนักสด โดยเก็บกล้าข้าวแล้วนำมาล้างทำความสะอาดเพื่อชะล้างเอาเศษดินออก จากนั้นผึ่งไว้ให้แห้งประมาณ 30 นาที จึงทำการชั่งน้ำหนัก และการชั่งน้ำหนักแห้ง นำกล้าข้าวที่ผ่านการชั่งน้ำหนักสดมาอบให้แห้งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นานประมาณ 12 วัน หรือจนน้ำหนักแห้งของกล้าข้าวคงที่ จึงทำการบันทึกผลของน้ำหนักแห้งที่ชั่งได้ ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการชั่งน้ำหนักครั้งแรกเมื่อข้าวอายุได้ 14 วัน จากนั้นเก็บผลเมื่อกล้าข้าวอายุ 21, 28 และ 35 วัน โดยทำการเก็บผลรวมทั้งสิ้น 4 ครั้ง และนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางผลสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University