บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะสายพันธุ์เชื้อราปฏิปักษ์ *Arthrobotrys* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) สภาพห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อราปฏิปักษ์สกุล *Arthrobotrys oligospora* และ *Arthrobotrys conoides* รวมทั้งหมดจำนวน 12 ไอโซเลท (isolate) คือ 1) *Arthrobotrys oligospora* ห้วยน้ำริน (HNR oil) 2) *A. oligospora* ดงฤาษี (Dong oil) 3) *A. oligospora* ห้วยโป่ง (HP oil) 4) *A. oligospora* แม่แฮ (MH) 5) *A. conoides* ห้วยน้ำริน (HNR con) 6) *A. conoides* ดงฤาษี (Dong con) 7) *A. conoides* ม.ขอนแก่น (KKU) 8) *A. conoides* ปางดะ (PD) 9) *A. conoides* ขุนวาง (KW) 10) *A. conoides* หนองหอย (NH) 11) *A. conoides* แม่ปูนหลวง (MPL) และ 12) *A. conoides* อ่างขาง (AK) ที่เก็บใน mineral oil ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 17 เดือนจากการเก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อราปฏิปักษ์สกุล *Arthrobotrys* spp. ของ ผศ. ภมรทิพย์ อักษรทอง ปี 2546 มาทดสอบความมีชีวิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA (potato dextrose agar) สภาพอุณหภูมิห้อง 25±2 องศาเซลเซียส โดยนำ culture disc แต่ละชิ้นที่แช่อยู่ใน mineral oil มาวางบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อ เพื่อซับน้ำมันที่เคลือบ disc ออกบางส่วนจากนั้นนำ disc ไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อทดสอบความมีชีวิตของเชื้อ การตรวจสอบทำ 2 ครั้ง ในแต่ละไอโซเลทของเชื้อรา สังเกตและตรวจสอบการเจริญของเชื้อราภายในเวลา 7 วัน บันทึกลักษณะและขนาดของสปอร์เชื้อราพร้อมบันทึกภาพ จากนั้นเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้บนอาหาร PDA ให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นตอนไป

2. การคัดเลือกวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อราปฏิปักษ์ *Arthrobotrys* spp. สภาพห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ดังนี้คือ ปัจจัยที่ 1 เชื้อราปฏิปักษ์จำนวน 8 ไอโซเลท (ผลการคัดเลือกจากข้อ 1) และปัจจัยที่ 2 วัตถุดิบที่ใช้ประกอบเป็นอาหารเลี้ยงราปฏิปักษ์ จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ ข้าวจ้าว ข้าวกล้อง ข้าวท่อน ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มะพร้าว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง และมันสำปะหลัง รวมเป็น 64 กรรมวิธี ทำ 6 ซ้ำ

ขั้นตอนการเตรียมอาหารที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อยคือ

การทดลองย่อยที่ 1 เติมน้ำตาลทราย 20 กรัม วิธีการเตรียมอาหารเริ่มจากนำวัตถุดิบที่ใช้ในการทดสอบน้ำหนัก 50 กรัม แช่ในน้ำเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ยกเว้นมะพร้าวขูดและมันสำปะหลัง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นนำมาปั่นกับน้ำกรองปริมาตร 50 มิลลิลิตร จนละเอียด นำส่วนผสมที่ได้ไปผสมกับน้ำกรองและน้ำตาลทรายจำนวน 20 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรอง แล้วนำไปต้มให้สุก ผสมวัตถุดิบดังกล่าวกับวุ้น 17 กรัม ที่ละลายในน้ำกรอง 500 มิลลิลิตร และนำไปต้มจนสุกแล้ว ปรับปริมาตรของส่วนผสมทั้งสองให้มีปริมาตรรวมเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกรอง บรรจุส่วนผสมที่ได้ใส่ภาชนะบรรจุปริมาตร 200 มิลลิลิตรต่อขวด นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลานาน 20 นาที เทอาหารซึ่งฆ่าเชื้อแล้วชนิดต่างๆในจานแก้วที่ใช้เลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ปริมาตรบรรจุ 15 มิลลิลิตร ต่อจานอาหาร

การทดลองย่อยที่ 2 ไม่เติมน้ำตาลทราย วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการทดลองย่อยที่ 1 แต่ไม่เติมน้ำตาลทรายในอาหารทดสอบ

ขั้นตอนการเตรียมเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบและการวางเชื้อราบนอาหาร

การเตรียมเชื้อราเพื่อใช้ในการทดสอบ เริ่มจากเจาะชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของเชื้อราแต่ละไอโซเลท ที่เลี้ยงจนบริสุทธิ์แล้วจากการทดลองข้อ1 ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำชิ้นวุ้นไปวางตรงตำแหน่งกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อในตู้เลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลานาน 3 วัน

การวางเชื้อราบนอาหาร ทำโดยเจาะชิ้นวุ้นบริเวณปลายโคโลนีในจานอาหารดังกล่าวมาวางตรงตำแหน่งกึ่งกลางของจานอาหารทดสอบชนิดต่าง ๆ 8 ชนิด แต่ละชนิดทำ 6 ซ้ำ บันทึกการเจริญเติบโตของเส้นใยแต่ละไอโซเลทในวันที่ 3 5 และ 7 พร้อมทั้งนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลทบนอาหารทดสอบแต่ละชนิดในวันที่ 7

การนับจำนวนสปอร์

เริ่มจากเลือกจานอาหารทดสอบสำหรับเป็นตัวแทนของแต่ละกรรมวิธีมาตรวจหาความเข้มข้นของสปอร์ในน้ำ 1 มิลลิลิตร (จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร) วิธีการตรวจสอบทำโดยดูดน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เลือกเป็นตัวแทน ขูดเส้นใยที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร แล้วเทสารแขวนลอยที่ได้ลงในหลอดทดสอบซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว หยด Tween 80 จำนวน 5 หยด เพื่อทำให้สปอร์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ เขย่าจนเข้ากัน ตรวจนับความเข้มข้นของสปอร์ด้วย haemacytometer ปริมาตรสารแขวนลอยสปอร์ที่ใช้ตรวจสอบคือ 3 ไมโครลิตร (µl) นับ 6 ซ้ำ ในแต่ละกรรมวิธีและวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย Factorial in CRD โดยใช้โปรแกรม Statistix 8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทดสอบปัจจัยทางกายภาพที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์ *Arthrobotrys* spp.

3.1 ทดสอบระดับของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์

เตรียมเชื้อตามขั้นตอนการเตรียมเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบและการวางเชื้อราบนอาหารเหมือนวิธีการทดลองข้อที่ 2 เลี้ยงเชื้อราทุกไอโซเลทบนอาหารที่ทำจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ซึ่งคัดเลือกแล้วจากผลการทดลองข้อ 2 ในตู้เลี้ยงเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (gradient temperature incubator) เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราบนอาหารในสภาพอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 6 ระดับ คือ 10 20 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส แต่ละกรรมวิธีทำ 6 ซ้ำ บันทึกการเจริญเติบโตด้านเส้นใยของเชื้อราทุก 3 5 และ 7 วัน พร้อมทั้งตรวจสอบจำนวนสปอร์ตามขั้นตอนการนับสปอร์ข้อ 2 และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย Factorial in CRD โดยใช้โปรแกรม Statistix 8

3.2 ทดสอบระดับความเป็นกรด ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์

เตรียมเชื้อตามขั้นตอนการเตรียมเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบและการวางเชื้อราบนอาหารเหมือนวิธีการทดลองข้อที่ 2 เลี้ยงเชื้อราทุกไอโซเลทบนอาหารที่ทำจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ซึ่งคัดเลือกแล้วจากผลการทดลองข้อ 2 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่มี pH แตกต่างกัน 11 ระดับ คือ 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 และ 12 แต่ละกรรมวิธีทำ 6 ซ้ำ บันทึกการเจริญเติบโตด้านเส้นใยของเชื้อราทุก 3 5 และ 7 วัน พร้อมทั้งตรวจสอบจำนวนสปอร์ตามขั้นตอนการนับสปอร์ข้อ 2 และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย Factorial in CRD โดยใช้โปรแกรม Statistix 8

วิธีปรับระดับ pH ของอาหารทดสอบ

ทำโดยตรวจสอบระดับ pH เริ่มต้นของอาหารหลังจากผสมวัตถุดิบทั้งหมดกับวุ้นที่ยังไม่ได้ต้มด้วย pH meter หยด HCl เพื่อปรับ pH ให้อาหารเป็นกรดหรือหยด KOH เพื่อปรับ pH เป็นด่างตามระดับ pH ที่ต้องการเฉพาะ pH 5-12 จากนั้นนำอาหารที่ปรับระดับ pH แล้วบรรจุลงในขวดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อตามขั้นตอนการเตรียมอาหารข้อ 2 สำหรับการปรับระดับ pH ที่มีความเป็นกรดสูงคือ ระดับ 2 3 และ 4 ให้นับจำนวนหยดของกรด HCl ที่ใช้ในการปรับระดับ pH แต่ละระดับต่อปริมาตรอาหาร ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้บรรจุอาหาร 200 มิลลิลิตร ต่อขวด ดังนั้นจึงทำการนับหยดของ HCl ที่ใช้ปรับ pH แต่ละระดับต่อปริมาตรอาหาร 200 มิลลิลิตร บันทึกจำนวนหยดของ HCl ที่ใช้ในการปรับระดับ pH แต่ละระดับ หลังจากนั้นเตรียมอาหารทดสอบตามวิธีการทดลองข้อที่ 2 แต่ขั้นตอนก่อนการเทอาหารลงในจานทดสอบให้หยดกรด HCl เท่ากับจำนวนหยดที่ใช้ในการปรับ pH แต่ละระดับซึ่งทดสอบมาแล้วลงในขวดอาหาร เขย่าส่วนผสมทั้งสองให้เข้ากันจึงค่อยเทอาหารลงในจานทดสอบจานละ 15 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 ทดสอบความต้องการแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์

เตรียมเชื้อตามขั้นตอนการเตรียมเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบและการวางเชื้อราบนอาหารเหมือนวิธีการทดลองข้อที่ 2 เลี้ยงเชื้อราทุกไอโซเลทบนอาหารที่ทำจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ซึ่งคัดเลือกแล้วจากผลการทดลองข้อ 2 ในตู้เลี้ยงเชื้อที่สามารถตั้งเวลาปิด-เปิดหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราบนอาหารในสภาพที่ได้รับแสงและไม่ได้รับแสง 3 รูปแบบ คือ สภาพได้รับแสงตลอด 24 ชั่วโมง สภาพได้รับแสง 12 ชั่วโมงสลับมืด 12 ชั่วโมง และสภาพมืดตลอด 24 ชั่วโมง แต่ละกรรมวิธีทำ 6 ซ้ำ บันทึกการเจริญทางด้านเส้นใยของเชื้อราทุก 3 5 และ 7 วัน พร้อมทั้งตรวจสอบจำนวนสปอร์ตามขั้นตอนการนับสปอร์ข้อ 2 และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย Factorial in CRD โดยใช้โปรแกรม Statistix 8

4. การทดสอบปฏิกิริยาร่วมระหว่างเชื้อรา *Arthrobotrys* spp. กับ *Paecilomyces lilacinus* และ *Trichoderma harzianum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา ในห้องปฏิบัติการ

แบ่งกรรมวิธีการทดสอบเป็น 3 กรรมวิธี คือ

1. เลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ *Arthrobotrys* sp. ร่วมกับเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus*
2. เลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ *Arthrobotrys* sp. ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma harzianum*
3. เลี้ยงเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ร่วมกับ *Trichoderma harzianum*

ทดสอบเชื้อรา *Arthrobotrys* spp. ทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ได้จากผลการทดลองข้อ 1 ร่วมกับรา *Paecilomyces lilacinus* 1 ไอโซเลท และ *Trichoderma harzianum* 1 ไอโซเลท ที่ได้จากมูลนิธิโครงการหลวง ด้วยวิธี dual culture (ภาพที่ 1) ตามกรรมวิธีข้างต้นบนอาหารที่ประกอบด้วยข้าวฟ่าง (วิธีการเตรียมทำเหมือนขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในวิธีการทดลองข้อ 2)โดยเลี้ยงเชื้อราที่มีการเจริญช้า ก่อนเชื้อราที่เจริญเร็ว วัดความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อราที่ต้องการทดสอบหลังจากเชื้อราเจริญชนกันทุก 3 5 และ 7 วัน จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรที่อ้างโดยวันพร, 2547 และสืบศักดิ์ (2541) วิเคราะห์ผลการทดลองด้วย Completely randomized design (CRD) โดยใช้โปรแกรม Statistix 8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (percent inhibition of radial growth: PIRG)

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

R_1 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *Arthrobotrys* sp. ในชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *Arthrobotrys* sp. ในชุดทดสอบ

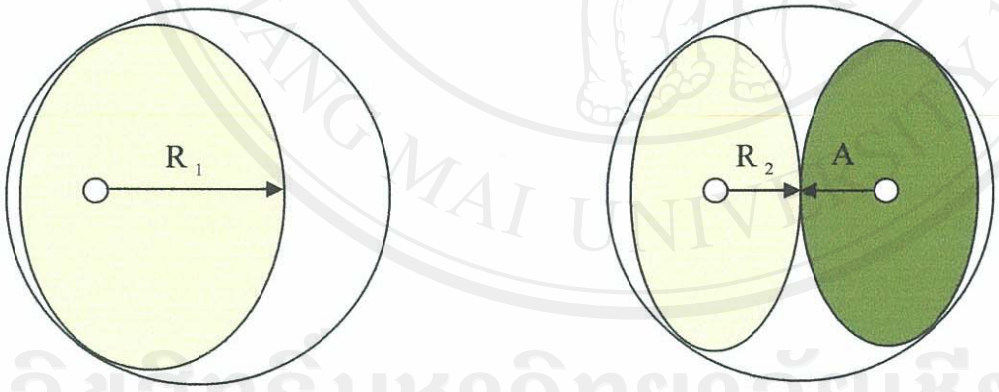
นำค่าที่ได้มาประเมินความสามารถในการยับยั้ง ดังนี้ (เกษม, 2532)

> 75 % = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก

61-75 % = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง

51-60 % = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง

< 51 % = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ



ภาพที่ 1 ลักษณะตำแหน่งการวางเชื้อตามแบบ dual culture technique

กำหนด R_1 = ความยาวรัศมีโคโลนีเชื้อรา *Arthrobotrys* sp. ในจานชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีโคโลนีเชื้อรา *Arthrobotrys* sp. ในจานชุดทดสอบ

A = เชื้อราปฏิปักษ์ชนิดอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการเข้าทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม สภาพห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อรา *Arthrobotrys* spp. ทั้ง 8 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากผลการทดลองข้อ 1 มาเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วยข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญทางด้านเส้นใยและสร้างสปอร์จากผลการคัดเลือกในข้อ 2 โดยทำการเจือจางความเข้มข้นของอาหารทดสอบลง 10 เท่า (Kumur and Singh, 2006) เลี้ยงเชื้อราเป็นระยะเวลานาน 10 วัน จากนั้นนำตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมใส่ลงในจานอาหารจำนวน 100 ตัว ต่อจานอาหารทดสอบ ทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละไอโซเลทเชื้อรา สำหรับชุดควบคุมไม่ต้องเลี้ยงเชื้อราให้ใส่เฉพาะตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2 อย่างเดียว ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยทุกๆ 3 5 และ 7 วัน พร้อมถ่ายภาพพฤติกรรมการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยของเชื้อราและวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย Completely randomized design (CRD)

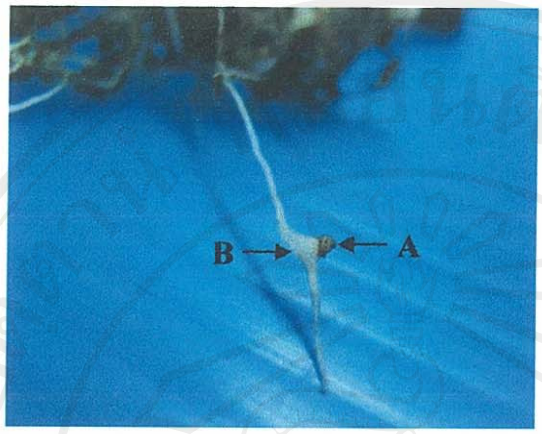
วิธีเตรียมตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2

ทำโดยนำรากปมต้นผักกาดหอมห่อที่มีอายุการปลูกนานประมาณ 40-45 วัน (งดให้น้ำก่อนนำมาใช้ทดสอบ 3 วัน) มาแช่น้ำเพื่อล้างดินออก คัดเลือกรากปมที่มีถุงไข่สีน้ำตาลเข้ม ซึ่งยื่นออกมาภายนอกราก ดังแสดงในภาพที่ 2 จากนั้นนำรากปมลักษณะดังกล่าวมาแช่ใน Clorox ® 1 % นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ใช้เข็มปลายแหลมที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วสะกิดถุงไข่ออกมาใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุในจานแก้วนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาจานแก้ว ทิ้งไว้ประมาณ 24-36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 27±3 องศาเซลเซียส (ภมรทิพย์, 2546) เพื่อให้ไข่ฟักออกมาเป็นตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2 โดยเฉลี่ยหนึ่งถุงไข่จะมีไข่ไส้เดือนฝอยอยู่ในช่วง 100-1,000 ฟอง (นุชนารถ, 2546)

วิธีนับจำนวนตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 เพื่อใช้ทดสอบ

เริ่มจากเขย่าสารแขวนลอยไส้เดือนฝอยในจานแก้วหลังจากการฟักไข่ ตามวิธีเตรียมตัวอ่อนไส้เดือนฝอยข้างต้นแบบเบาๆ ดูดสารแขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาตรวจนับจำนวนด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo หาค่าเฉลี่ยจำนวนตัวอ่อนไส้เดือนฝอยแล้วคำนวณหาปริมาตรของสารแขวนลอยที่มีไส้เดือนฝอยจำนวน 100 ตัว โดยการเทียบบัญญัติไตรยางศ์ จากนั้นดูดสารแขวนลอยเท่ากับปริมาตรที่คำนวนได้ใส่ในจานอาหารทดสอบแต่ละจาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2 ลักษณะรากปมที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย

A. ถุงไข่สีน้ำตาลเข้ม ภายในมีตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 1

B. รากปม ภายในมีไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* sp. เพศเมีย ระยะเต็มวัย

6. การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของเชื้อรา *Arthrobotrys* spp. ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* sp. สภาพโรงเรือนทดลอง

คัดเลือกไอโซเลทเชื้อรา *Arthrobotrys* spp. 4 อันดับแรกที่มีประสิทธิภาพในการทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมคือ *A. oligospora* ไอโซเลท ห้วยน้ำริน (HNR oli) และดงฤาษี (Dong oli) กับ *A. conoides* ไอโซเลท ดงฤาษี (Dong con) และป่างดะ (PD) จากผลการทดลองข้อ 5 มาเลี้ยงบนเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์นึ่งฆ่าเชื้อ (ผลการคัดเลือกข้อ 2) ในรูปแบบของการเลี้ยงเชื้อสดบนเมล็ดธัญพืช (granular formulation) (Kumur and Singh, 2006)

ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อสด

เริ่มจากชั่งเมล็ดธัญพืชที่ล้างและต้มในน้ำจนเมล็ดธัญพืชมีลักษณะอ่อนนิ่ม จำนวน 300 กรัม ใส่เมล็ดธัญพืชที่ได้ในถุงพลาสติกใส ซ้อนกัน 2 ชั้น คลอบปากถุงด้วยคอขวดพลาสติกที่อุดจุกด้วยสำลี นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นใส่เชื้อรา *Arthrobotrys* sp. ซึ่งเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามขั้นตอนการเตรียมเชื้อราเพื่อใช้ในการทดสอบวิธีการทดลองข้อ 2 แต่เจาะชิ้นวุ้นขนาด 1 เซนติเมตร ลงในถุงอาหารเมล็ดธัญพืชที่เตรียมไว้แล้ว จำนวน 5 ชิ้นต่อถุง บ่มเชื้อในตู้เพาะเลี้ยงในสภาพที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตคือ อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และได้รับแสง 12 ชั่วโมงสลับมืด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12 ชั่วโมง (ผลการทดลองข้อ 3) เป็นระยะเวลานาน 12 วัน เตรียมหัวเชื้อรา *Arthrobotrys* spp. 4 ไอโซเลท รวมทั้งหัวเชื้อรา *T. harzianum* และ *P. lilacinus* ตามขั้นตอนที่กล่าวข้างต้น

การทดสอบแบ่งออกเป็น 19 กรรมวิธี ดังต่อไปนี้

1. เชื้อรา *A. oligospora* ไอโซเลท HNR oli น้ำหนัก 50 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
2. เชื้อรา *A. oligospora* ไอโซเลท HNR oli น้ำหนัก 100 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
3. เชื้อรา *A. oligospora* ไอโซเลท HNR oli น้ำหนัก 200 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
4. เชื้อรา *A. oligospora* ไอโซเลท Dong oli น้ำหนัก 50 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
5. เชื้อรา *A. oligospora* ไอโซเลท Dong oli น้ำหนัก 100 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
6. เชื้อรา *A. oligospora* ไอโซเลท Dong oli น้ำหนัก 200 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
7. เชื้อรา *A. conoides* ไอโซเลท Dong con น้ำหนัก 50 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
8. เชื้อรา *A. conoides* ไอโซเลท Dong con น้ำหนัก 100 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
9. เชื้อรา *A. conoides* ไอโซเลท Dong con น้ำหนัก 200 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
10. เชื้อรา *A. conoides* ไอโซเลท PD น้ำหนัก 50 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
11. เชื้อรา *A. conoides* ไอโซเลท PD น้ำหนัก 100 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
12. เชื้อรา *A. conoides* ไอโซเลท PD น้ำหนัก 200 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
13. สารเคมีคาโซเม็ท ใช้อบดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอยในกระถางทดสอบก่อนการปลูกพืช 7 วัน อัตราใช้ 300 กรัม ต่อดิน 1 ลูกบาศก์เมตร (ปรีชา, 2542)
14. สารเคมีคาร์โบฟูราน ใช้รองก้นหลุมก่อนการปลูกพืชในดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย อัตราใช้ 3 กรัม ต่อหลุม (ปรีชา, 2542)
15. เชื้อรา *Trichoderma harzianum* อัตราใช้ 30 กรัม ต่อหลุม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย (ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง, ไม่ระบุปีที่พิมพ์)
16. เชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* อัตราใช้ 4 กรัม ต่อ หลุม (สุภกิจ และคณะ, 2532) ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
17. ชุดควบคุมไม่ใส่สารใด ๆ ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
18. ชุดควบคุมไม่ใส่สารใด ๆ และใช้ดินอบฆ่าเชื้อ
19. ชุดควบคุมไม่ใส่สารใด ๆ และใช้วัสดุเพาะกล้าที่นึ่งฆ่าเชื้ออย่างเดียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) การทดสอบทำโดยบรรจุดินลงในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว ครึ่งกระถางล่างเป็นดินอบฆ่าเชื้อและครึ่งบนเป็นดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 จำนวน 80±20 ตัว ที่ผสมกับหัวเชื้อรา *Arthrobotrys* sp. ตามกรรมวิธีข้างต้น รวมทั้งกรรมวิธีอื่นด้วยเช่นกัน ในแต่ละกรรมวิธีทำ 10 ซ้ำ หมักเชื้อรากับดินเป็นระยะเวลานาน 7 วัน ก่อนย้ายกล้าต้นผักกาดหอมห่อลงปลูก ดูแลรดน้ำ ให้ปุ๋ยตามวิธีการปลูกพืชจนถึงอายุการเก็บเกี่ยว

การบันทึกผล

1.ประเมินการเกิดปมที่รากเมื่อถึงอายุเก็บเกี่ยวของผักกาดหอมห่อ (ประมาณ 40-45 วัน) ตามวิธีของ Kinloch (1990) แบ่งดัชนีการเกิดปมเป็น 5 ระดับ ดังนี้

0 = ไม่มีปม

1 = มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย

2 = เกิดปมน้อยกว่า 25%

3 = เกิดปม 25-50%

4 = เกิดปม 50-75%

5 = เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก

2. ชั่งน้ำหนักสดของพืชทดสอบ (กรัมต่อต้น)

3. ตรวจนับจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* sp. ที่อยู่ในดินหลังการทดสอบ (final population) (วิธีการตรวจนับอธิบายไว้ในส่วนของภาคผนวก ค)

4. ตรวจหาเชื้อรา *Arthrobotrys* sp. จากดินในกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อราหลังการทดสอบด้วย soil dilution plating technique ความเข้มข้นเจือจาง 1 เท่า บนอาหาร PDA ที่ผสม rose bengal 0.075 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร เริ่มจากสุ่มเก็บดินในกระถางปลูกทุกกระถางแยกเป็นแต่ละกรรมวิธีให้ได้น้ำหนักรวม 100 กรัม จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำดินไปอบในตู้ hot air oven ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง สุ่มดินจำนวน 10 กรัม มาตรวจหาเชื้อรา *Arthrobotrys* sp. ทำ 4 ซ้ำต่อกรรมวิธี การตรวจสอบผลทำโดยเขี่ยเส้นใยเชื้อราแต่ละโคโลนีที่เจริญบนอาหารหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลานาน 7 วัน มาวางในน้ำกลั่น lactophenal หรือ lactophenal cotton blue ที่หยดอยู่บนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วตรวจดูลักษณะเส้นใยและสปอร์ด้วย compound light microscope

นำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์ผลทางสถิติตามแผนการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. การทดสอบวิธีการผลิตและเพิ่มปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์ *Arthrobotrys* spp. เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* sp.) สภาพโรงเรือนทดลอง

7.1 ทดสอบอัตราส่วนผสมของปุ๋ยหมักเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อรา *Arthrobotrys oligospora* ไอโซเลท ดงฤาษี (Dong oli)

วิธีการทดสอบเริ่มจากเลี้ยงเชื้อรา *A. oligospora* ไอโซเลท Dong oli ซึ่งเป็นไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการทำลายตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมจากผลการทดลองข้อ 6 ตามขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อสดที่อธิบายในวิธีการทดลองข้อ 6 จากนั้นคลุกหัวเชื้อจำนวน 600 กรัม กับปุ๋ยหมัก 3 กิโลกรัม อัตราส่วนหัวเชื้อสดต่อปุ๋ยหมักเป็น 1:5 ซึ่งได้จากการคำนวณจำนวนสปอร์ต่อเมล็ดข้าวโพดเบื้องต้น เพื่อให้ความเข้มข้นของสปอร์ในกองปุ๋ยหมักหลังการตรวจสอบมีประมาณ 10^4 สปอร์ ส่วนผสมของปุ๋ยหมักที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ มูลวัว เปลือกถั่ว ขี้เถ้า รำข้าว เปลือกข้าว และขุยมะพร้าวละเอียด แบ่งกรรมวิธีการทดสอบเป็น 5 กรรมวิธี ดังแสดงในตารางที่ 2 ผสมปุ๋ยหมักตามอัตราส่วนดังแสดงในตารางกับหัวเชื้อรา แผ่กองปุ๋ยหมักแต่ละกองบนผ้าพลาสติก ความสูงประมาณ 10 เซนติเมตร รดน้ำพอชื้น คลุมด้วยผ้าพลาสติกเพื่อเก็บความชื้น ดังแสดงในภาพที่ 3

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำ 4 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี สุ่มตัวอย่างปุ๋ยหมักที่คลุกเคล้าส่วนผสมทั้งหมดภายในกองแล้ว โดยเก็บตัวอย่างปุ๋ยหมักทุกซ้ำของแต่ละกรรมวิธีกองละเท่าๆ กันให้ได้น้ำหนักรวม 30 กรัม ทำการตรวจนับจำนวนสปอร์เชื้อราที่เจริญบนกองปุ๋ย ตรวจสอบผลทุกๆ 5 7 9 11 และ 13 วัน หลังจากเริ่มหมักปุ๋ยและวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย Factorial in CRD

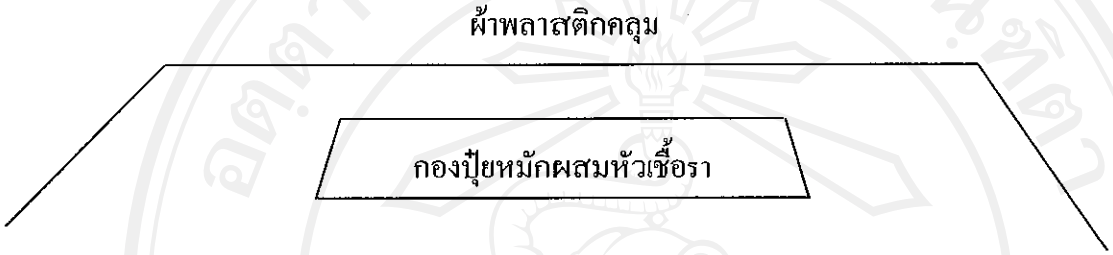
ตารางที่ 2 อัตราส่วนปุ๋ยหมักที่ใช้ในการทดสอบ

กรรมวิธีที่	อัตราส่วนของวัตถุดิบในการทำปุ๋ยหมัก 3 กิโลกรัม (%)						
	มูลวัว	เปลือกถั่ว	ขี้เถ้า	รำข้าว	เปลือกข้าว	ขุยมะพร้าว	ต้นทุน
1	10 (1.0)	10 (3.0)	30 (3.0)	10 (4.0)	20 (2.0)	20 (6.0)	19.0
2	20 (2.0)	30 (9.0)	20 (2.0)	-	10 (1.0)	20 (6.0)	20.0
3	30 (3.0)	20 (6.0)	10 (1.0)	10 (4.0)	20 (2.0)	10 (3.0)	19.0
4	20 (2.0)	20 (6.0)	30 (3.0)	20 (8.0)	10 (1.0)	-	20.0
5	50 (5.0)	-	20 (2.0)	10 (4.0)	10 (1.0)	10 (3.0)	15.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประมาณราคาสูงสุดที่ซื้อ มูลวัว ราคากิโลกรัมละ 3 บาท เปลือกถั่ว ราคากิโลกรัมละ 9 บาท ขี้เถ้า ราคากิโลกรัมละ 3 บาท รำข้าว ราคากิโลกรัมละ 12 บาท เปลือกข้าว ราคากิโลกรัมละ 3 บาท ขุยมะพร้าวละเอียด ราคากิโลกรัมละ 9 บาท

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บเป็นราคาต้นทุนส่วนผสมที่ใช้ ซึ่งคำนวณจากปริมาณที่ใช้และราคาที่ซื้อ



ภาพที่ 3 รูปแบบการทดสอบอัตราส่วนผสมปุ๋ยหมัก

วิธีการตรวจนับจำนวนสปอร์

ทำการตรวจนับสปอร์เชื้อรา *A. oligospora* ไอโซเลท Dong oli ในแต่ละกรรมวิธี โดยใส่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 300 มิลลิลิตร ในตัวอย่างปุ๋ยหมัก 30 กรัม ที่เก็บมา เขย่าจนเข้ากันแล้วตรวจนับจำนวนสปอร์เชื้อราด้วย haemacytometer ทันที ภายใต้ compound light microscope ปริมาตรของสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่ใช้ตรวจสอบคือ 3 µl

7.2 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Arthrobotrys oligospora* ไอโซเลท ดงฤาษี (Dong oli) และ *A. conoides* ไอโซเลท ดงฤาษี (Dong con) ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม สภาพโรงเรือนทดลอง

ทดสอบหาอัตราการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอย *A. oligospora* ไอโซเลท Dong oli และ *A. conoides* ไอโซเลท Dong con ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายไส้เดือนฝอยรากปมมากที่สุด 2 อันดับแรกจากผลการทดลองข้อ 6 หลังจากเพิ่มปริมาณเชื้อราบนกองปุ๋ยหมักที่ประกอบด้วยมูลวัว 50% ขี้เถ้า 20% รำข้าว 10% เปลือกข้าว 10% และขุยมะพร้าวละเอียด 10% หมักนาน 15 วัน ซึ่งเป็นผลการทดลองในข้อ 7.1

การทดสอบแบ่งเป็น 8 กรรมวิธี ดังนี้

1. ปุ๋ยหมักผสมรา *A. oligospora*; Dong oli น้ำหนัก 100 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
2. ปุ๋ยหมักผสมรา *A. oligospora*; Dong oli น้ำหนัก 200 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
3. ปุ๋ยหมักผสมรา *A. oligospora*; Dong oli น้ำหนัก 300 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ปุ๋ยหมักผสมรา *A. conoides*; Dong con น้ำหนัก 100 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
5. ปุ๋ยหมักผสมรา *A. conoides*; Dong con น้ำหนัก 200 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
6. ปุ๋ยหมักผสมรา *A. conoides*; Dong con น้ำหนัก 300 กรัม ผสมดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย
7. ดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2 จำนวน 80 ± 20 ตัว ต่อ กระถางปลูก (inoculated)
8. ดินฆ่าเชื้อ (non-inoculated)

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิธีการทดสอบเริ่มจากบรรจุดินที่มีตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 จำนวนประมาณ 80±20 ตัว ที่ผสมกับหัวเชื้อรา *Arthrobotrys* sp.ในปุ๋ยหมักตามกรรมวิธีข้างต้น ลงในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว แต่ละกรรมวิธีทำ 12 ซ้ำ ย้ายกล้าต้นผักกาดหอมห่อลงปลูกในกระถางทันที ดูแลรดน้ำ ให้ปุ๋ยตามวิธีการปลูกพืชจนถึงอายุการเก็บเกี่ยว บันทึกผลเหมือนการทดลองข้อ 6 แต่การตรวจหาเชื้อรา *Arthrobotrys* sp. จากดินในกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อราหลังการทดสอบให้ทำการตรวจสอบด้วย soil scattering method (ภมรทิพย์, 2546) และเพิ่มการบันทึกข้อมูลด้านความสูงของต้นพืช (เซนติเมตร) ความยาวของราก (เซนติเมตร) น้ำหนักรากสด (กรัม) และน้ำหนักรากแห้ง (กรัม) การบันทึกน้ำหนักรากแห้งให้นำรากสดไปอบในตู้อบ (oven) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

ขั้นตอนการทำ soil scattering method

สุ่มเก็บดินจากทุกกระถาง (ซ้ำ)ให้ได้น้ำหนักรวม 100 กรัมในแต่ละกรรมวิธี จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำดินไปอบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 12 ชั่วโมง สุ่มดินจำนวน 3 กรัม มาทดสอบโดยโรยบนอาหาร WA ที่ผสมคลอแรมเฟนิคอล 2 % (Ghahfarokhi *et al.*, 2004) ตรงแนวเส้นผ่าศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ทำการดูดสารแขวนลอยตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมลงไปในจานอาหารดังกล่าว 30 ตัวต่อจานอาหาร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 27 ± 3 องศาเซลเซียส สภาพไม่มีแสง (การตรียมตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 ให้ทำตามขั้นตอนที่อธิบายไว้ในวิธีการทดลองข้อ 5) หลังจากนั้น 3 วัน ตรวจสอบจำนวนเชื้อราที่เจริญบนเม็ดดินและเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายไส้เดือนฝอยของเชื้อรา เปรียบเทียบผลกับดินชุดควบคุมที่มีเฉพาะตัวอ่อนไส้เดือนฝอย (กรรมวิธีที่ 7) กำหนดแต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำและวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย Completely randomized design (CRD)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved