

### บทที่ 3

#### วิธีการวิจัย

##### การแยกและเก็บรักษาเชื้อรา *Trichoderma* spp.

##### การเก็บตัวอย่างดินขุยไผ่

เก็บตัวอย่างดินขุยไผ่ในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย ที่ระดับความลึก 10 เซนติเมตรจากผิวน้ำดิน โดยสุ่มเก็บบริเวณใต้กอไผ่ห่างจากกอ 1 เมตร จำนวน 3 จุด ต่อ 1 กอ นำตัวอย่างดินขุยไผ่ที่เก็บมาผึ่งเพื่อลดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 2$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ทดลองต่อไป

##### การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ชั่งตัวอย่างดินขุยไผ่ 10 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำกลั่นหนึ่งฝา เชื้อแล้ว จำนวน 90 มิลลิลิตร ก่อนนำไปเขย่าบน shaker ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ทำการเจือจางดินแขวนลอย ให้มีความเข้มข้น  $10^{-2}$  และ  $10^{-3}$  เท่า ตามลำดับ ก่อนดูดเอาดินแขวนลอยที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร ไป spread บนอาหาร Martin's medium เพื่อแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. บ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 วัน

##### การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ให้บริสุทธิ์และการเก็บรักษา

แยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ให้บริสุทธิ์ โดยวิธี single spore (Intana, 2003) ด้วยการนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลท (isolate) ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกว่าจะสร้างสปอร์ ก่อนนำไปทำสปอร์แขวนลอยให้มีความเข้มข้น  $10^3$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร และดูดสปอร์แขวนลอยจำนวน 0.1 มิลลิลิตร ไป spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ก่อนบ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเย็บเชื้อตักชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพียง 1 สปอร์ซึ่งกำลังงอกและนำไปวางบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ก่อนทำสปอร์

แขวนลอยให้มีความเข้มข้น $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วดูดสปอร์แขวนลอย 1.0 มิลลิลิตรใส่ในขวดที่บรรจุดิน (ดิน:ทราย อัตรา 8:2 โดยปริมาตร) จำนวน 80 กรัม เก็บขวดตัวอย่างดินที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน ก่อนนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

แหล่งที่มา (ตำบล อำเภอ และจังหวัด) ของตัวอย่างดินขุยไม้ และพันธุ์ไม้ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity: EC) ของตัวอย่างดินขุยไม้ และวิเคราะห์สมบัติทางเคมี ได้แก่ ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (Organic matter: OM.) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) ของดินขุยไม้ตัวอย่างที่สามารถแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคเน่าระดับดินและส่งเสริมการเจริญเติบโตของคะน้า

### การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

#### เชื้อรา *P. aphanidermatum*

เชื้อรา *P. aphanidermatum* สาเหตุโรคเน่าระดับดินของคะน้า ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. วาริน อินทนา สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช

#### การเตรียมเชื้อรา *P. aphanidermatum*

เตรียมให้อยู่ในรูปเส้นใยแขวนลอย (mycelial suspension) ตามวิธีการของจิระเดช แจ่มสว่าง และคณะ (2544ข) โดยเลี้ยงเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน ใช้มีดผ่าตัดคั่นไฟทิ้งให้เย็น ตัดเส้นใยที่เจริญบนผิวอาหารจนขาดเป็นชิ้นๆ โดยใช้เชื้อ 1 จานอาหาร ต่อน้ำสะอาดหนึ่งฆ่าเชื้อ 300 มิลลิลิตร ปั่นละเอียดโดยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ประมาณ 3-5 นาที ก่อนนำไปใช้

### การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *P. aphanidermatum*

แช่เมล็ดคั่วที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย sodium hypochlorite 0.5 เปอร์เซ็นต์ (Haite<sup>®</sup>) ในเส้นใยแขวนลอย (mycelial suspension) ของเชื้อรา *P. aphanidermatum* เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเมล็ดดังกล่าวไปวางในกล่องเพาะเมล็ดที่มีกระดาษเพาะเมล็ดที่ขึ้นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร โดยวาง 50 เมล็ดต่อกล่อง วางกล่องเพาะเมล็ดไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่แช่เมล็ดคั่วในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ทำการทดสอบแบบ Two-Sample T Test กรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 1 กล่อง

### การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

ตรวจนับเมล็ดและต้นกล้าคั่วที่แสดงอาการของโรคทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน คำนวณความรุนแรงของโรคโดยใช้สูตร  $[(S_T - S_0)/S_T] \times 100$  เมื่อ  $S_T$  คือ จำนวนเมล็ดคั่วทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง และ  $S_0$  คือ จำนวนต้นกล้าคั่วที่ไม่เป็นโรคและเมล็ดที่ไม่แสดงอาการของโรคเมล็ดเน่า ซึ่งน้ำหนักสดของต้นกล้า วัดความยาวต้นและรากของต้นกล้า

### การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญ และคลุมทับเส้นใยของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทที่แยกได้ และเชื้อรา *P. aphanidermatum* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำมาทดสอบตามวิธีของวาริน อินทนา และคณะ (2548) โดยเจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อรา *P. aphanidermatum* ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร นำเชื้อราทั้ง 2 มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในแนวตรงข้ามกันโดยให้ห่างกัน 6.0 เซนติเมตร บ่มจนเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่วางเฉพาะชิ้นวุ้นเชื้อรา *P. aphanidermatum* วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 1 จานทดลอง

## การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

1. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* คำนวณโดยใช้สูตร  $[(R_c - R_T) / R_c] \times 100$  เมื่อ  $R_c$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในจานเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ  $R_T$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีเชื้อรา *P. aphanidermatum* ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *Trichoderma* spp.

2. อัตราการคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *P. aphanidermatum* คำนวณโดยใช้สูตร  $(C_1 - C_2) / T$  เมื่อ  $C_1$  ค่าเฉลี่ยของรัศมีเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในวันที่ทำการศึกษา (หลังการบ่มเชื้อ 5 วัน)  $C_2$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในวันที่ชนกับเชื้อรา *P. aphanidermatum* และ  $T$  คือ ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษามีหน่วยเป็นวัน (วันที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ชนกับเชื้อรา *P. aphanidermatum* จนถึงวันที่ทำการศึกษา)

## การพัฒนาสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* spp.

### การฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV)

คัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 30 ไอโซเลท (คัดเลือกจากลักษณะสีของเส้นใย สีของสปอร์ การเจริญเติบโตของเส้นใย และการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ) มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสม streptomycin เป็นเวลา 7 วัน ก่อนทำสปอร์แขวนลอยให้มีความเข้มข้น  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วดูดสปอร์แขวนลอย 3 มิลลิลิตรใส่จานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ก่อนนำไปฉายรังสี UV (UV-C ช่วงความยาวคลื่น 100 – 280 นาโนเมตร) เป็นเวลา 5 นาที โดยให้มีระยะห่างระหว่างหลอดกำเนิดแสง UV กับจานเลี้ยงเชื้อ 20 เซนติเมตร หลังจากนั้น ดูดสปอร์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแล้ว 0.3 มิลลิลิตรไป spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสม carbendazim ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-10 วัน (ดัดแปลงจาก Intana, 2003)

### การแยกและเก็บรักษาเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี UV

แยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี UV ให้บริสุทธิ์โดยการใส่เข็มเขี่ยเชื้อตักชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพียง 1 สปอร์ซึ่งกำลังงอกและนำไปวางบนอาหาร PDA ที่ผสม carbendazim ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปุ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ก่อนทำสปอร์แขวนลอยให้มีความเข้มข้น  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วดูดสปอร์แขวนลอย 1.0 มิลลิลิตรใส่ในขวดที่บรรจุดิน (ดิน:ทราย อัตรา 8:2 โดยปริมาตร และเติม carbendazim ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) จำนวน 80 กรัม เก็บขวดตัวอย่างดินที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน ก่อนนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี UV ในการยับยั้งการเจริญและคลุมทับเส้นใยของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี UV ทุกสายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน และปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญและคลุมทับเส้นใยของเชื้อรา *P. aphanidermatum*

### การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี UV ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของคะน้า

#### การเตรียมเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

เตรียมเชื้อรา *P. aphanidermatum* เช่นเดียวกับการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *P. aphanidermatum*

#### การเตรียมเชื้อรา *Trichoderma* spp.

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี UV มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเตรียมเชื้อรา *Trichoderma* spp. ให้อยู่ในรูปสปอร์

แขวนลอย โดยการเติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้ท่วมผิวหน้าอาหาร ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมกวาดสปอร์ ในจานเลี้ยงเชื้อ นับปริมาณสปอร์โดยใช้ haemocytometer แล้วปรับระดับความเข้มข้นด้วยน้ำ กลั่นให้มี ความเข้มข้น  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำไปใช้

### การควบคุมโรคเน่าระดับดินของคะน้า

ทดสอบกับเมล็ดคะน้าโดยใช้วัสดุปลูก [ดินลำดวน<sup>®</sup> (ดินเผา:ทราย: ปุ๋ยอินทรีย์ อัตราส่วน 1:0.25: 2 , pH 6.0-6.5)] ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 30 นาที นึ่งฆ่าเชื้อ 1 ครั้งแล้วบรรจุลงในกระบะเพาะกล้าขนาด 60 หลุม ก่อนปลูกเมล็ดคะน้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อบนผิวเมล็ดด้วย sodium hypochlorite (Haite<sup>®</sup>) 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแช่ในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อ 360 เมล็ด แช่นาน 30 นาที ปลูกหลุมละ 2 เมล็ด หยอดน้ำผสมเชื้อรา *P. aphanidermatum* 0.1 มิลลิลิตรต่อหลุม รดน้ำและปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ให้ความชื้นเป็นระยะ เปรียบเทียบกับ กรรมวิธีควบคุม 1 ที่ใส่เชื้อรา *P. aphanidermatum* อย่างเดียวและกรรมวิธีควบคุม 2 ที่ไม่ใช้เชื้อ ราชนิดใดเลย วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 30 หลุม

### การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

ตรวจนับ ต้นกล้าที่ตายและรอดตายทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน คำนวณความรุนแรงของ โรคโดยใช้สูตร  $[(S_T - S_D)/S_T] \times 100$  เมื่อ  $S_T$  คือ จำนวนเมล็ดคะน้าทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง และ  $S_D$  คือ จำนวนต้นกล้าคะน้าที่ออกและไม่เป็นโรคเน่าระดับดิน

### การตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

หลังทดสอบการควบคุมโรคเน่าต้นกล้าคะน้ากรรมวิธีละ 9 ต้น มาตรวจหาเปอร์เซ็นต์ การครอบครองราก ใช้ต้นละ 3 ราก ใช้ส่วนโคนราก กลางราก และปลายราก โดยวิธีล้างรากให้ สะอาดด้วยน้ำเปล่าโดยการผ่านน้ำไหล แล้วแช่ใน sodium hypochlorite (Haite<sup>®</sup>) 0.5 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที ตัดแยกส่วนต่างๆ ของรากล้างด้วยน้ำหนึ่งฆ่าเชื้ออีก 1 ครั้ง จากนั้นซบขึ้นราก ด้วยกระดาษเพาะเมล็ดหนึ่งฆ่าเชื้อ ซบให้แห้ง จึงย้ายวางบนอาหาร Martin's medium โดยวาง 9

ขึ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ 3 วัน ตรวจเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อรา *Trichoderma* spp. วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 1 จานเลี้ยงเชื้อ

### การตรวจสอบปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp.

หลังทดสอบการควบคุมโรค ตรวจปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในดินโดยวิธีการเจือจาง (Soil dilution spread plate) โดยนำวัสดุปลูกในแต่ละกรรมวิธี จำนวน 10 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 90 มิลลิลิตร ก่อนนำไปเขย่าบน shaker ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ทำการเจือจางดินแขวนลอยตัวอย่างให้มีความเข้มข้น  $10^{-4}$  ก่อนดูดเอาสารแขวนลอยที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร ไป spread บนอาหาร Martin's medium บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ตรวจนับปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละกรรมวิธี เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 1 จานเลี้ยงเชื้อ

### การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี UV ต่อการงอกของเมล็ดคะน้า

#### การเตรียมเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เตรียมเชื้อรา *Trichoderma* spp. เช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี UV ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของคะน้า

#### การงอกของเมล็ดคะน้า

แช่เมล็ดคะน้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย sodium hypochlorite (Haite<sup>®</sup>) 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในสเปร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ( $10^6$  สปอร์/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำเมล็ดดังกล่าวไปวางในกล่องเพาะเมล็ดที่มีกระดาษเพาะเมล็ดที่ขึ้นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร โดยวาง 50 เมล็ดต่อกล่อง วางกล่องเพาะเมล็ดไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่แช่เมล็ดคະນ້າในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 1 กลุ่ม

### การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

เปอร์เซ็นต์การงอก น้ำหนักสดของต้นกล้า ความยาวต้นและรากของต้นกล้า

**การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี UV ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของคະນ້า**

### การเตรียมเชื้อรา *Trichoderma* spp.

คัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี UV ที่มีประสิทธิภาพสูงในยับยั้งการเจริญและคลุมทับเส้นใยของเชื้อรา *P. aphanidermatum* มีเปอร์เซ็นต์การควบคุมโรคเน่าระดับดิน การครอบครองราก และส่งเสริมการงอกของเมล็ดคະນ້าได้สูงมาเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้วขยายเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณ โดยการใส่ปลายข้าวหรือข้าวสาร หุงด้วยหม้อหุงข้าวไฟฟ้า (ข้าว 3 ส่วนต่อน้ำ 2 ส่วน) ใส่ในถุงพลาสติกทึบร้อนขนาด 8x12 นิ้ว (250 กรัม/ถุง) ใส่เชื้อรา *Trichoderma* spp. อัตรา ¼ จานเลี้ยงเชื้อต่อถุง เจาะถุงพลาสติกด้วยเข็ม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน (ดัดแปลงจากจิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู, 2545)

### การส่งเสริมการเจริญเติบโตของคະນ້า

ซังเชื้อรา *Trichoderma* spp. ชนิดสด 40 กรัม ผสมกับวัสดุปลูก [ดิน: ขุยมะพร้าว: แกลบดำ อัตรา 1:1:1 โดยปริมาตร พร้อมผสมปุ๋ยคอก (มูลไก่) อัตรา 3,000 กิโลกรัมต่อไร่ (34.22 กรัมต่อกระถาง) (อิสริยาภรณ์ ดำรงรักษ์, 2546)] บรรจุลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว บ่มเชื้อรา *Trichoderma* spp. ชนิดสดในวัสดุปลูกนาน 7 วัน โดยใช้ถุงพลาสติกสีดำปิดกระถาง จากนั้นหยอดเมล็ดคະນ້าจำนวน 10 เมล็ดต่อกระถาง เมื่อต้นกล้ามีอายุ 7 วัน ถอนแยกให้เหลือกระถางละ 3 ต้น วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 3 กระถาง

## การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

1. ความเป็นกรด - ด่าง (pH) และค่าการนำไฟฟ้า (EC) ของวัสดุปลูกก่อนปลูกและหลังปลูกที่ระยะเก็บเกี่ยว 42 วัน
2. ความสูงต้น (เซนติเมตร) โดยวัดจากโคนต้นถึงปลายใบที่ยาวที่สุด ทุกๆ 7 วัน เริ่มวัดหลังจากปลูก 21 วัน จนถึงระยะเก็บเกี่ยว 42 วัน
3. เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น (เซนติเมตร) ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ (ตำแหน่งที่เกิดใบเลี้ยงโคนต้น) ทุกๆ 7 วัน เริ่มวัดหลังจากปลูก 21 วัน จนถึงระยะเก็บเกี่ยว 42 วัน
4. ความเข้มของสีใบ (SPAD) โดยใช้เครื่องวัดสีใบ Minolta รุ่น SPAD-502 ทุกๆ 7 วัน เริ่มวัดหลังจากปลูก 21 วัน จนถึงระยะเก็บเกี่ยว 42 วัน โดยวัดความเข้มสีใบของใบจริงใบที่ 5 ซึ่งจะวัด 3 ตำแหน่ง (ปลายใบ กลางใบและโคนใบ) แล้วหาค่าเฉลี่ย
5. จำนวนใบ (ใบ/ต้น) นับเฉพาะใบจริงที่กางเต็มที่ เริ่มวัดหลังจากปลูก 21 วัน จนถึงระยะเก็บเกี่ยว 42 วัน
6. ขนาดใบ (ความกว้างและความยาว) (เซนติเมตร) โดยวัดจากใบที่ใหญ่ที่สุด จำนวน 4 ใบ/ต้น ที่ระยะเก็บเกี่ยว 42 วัน
7. น้ำหนักสดผลผลิต (ใบ+ลำต้น) และราก (กรัม/ต้น) ที่ระยะเก็บเกี่ยว 42 วัน
8. น้ำหนักแห้งผลผลิต (ใบ+ลำต้น) และราก (กรัม/ต้น) โดยการอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน
9. ความยาวราก (เซนติเมตร) ล้างรากโดยระวังไม่ให้รากขาด
10. เปอร์เซ็นต์การส่งเสริมการเจริญเติบโตในแต่ละตัวชี้วัด (parameter) จำนวน 11 ตัวชี้วัด ได้แก่ ความสูงต้น เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น จำนวนใบ ความเข้มสีใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ น้ำหนักสดและแห้งผลผลิต น้ำหนักสดและแห้งราก และความยาวรากโดยใช้สูตร  $[(T-C)/C] \times 100$  เมื่อ T คือ ค่าเฉลี่ยของตัวชี้วัดในแต่ละกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. และ C คือ ค่าเฉลี่ยของตัวชี้วัดในกรรมวิธีที่ไม่ใช้เชื้อรา
11. เปอร์เซ็นต์การส่งเสริมการเจริญเติบโตรวมทุกตัวชี้วัด โดยใช้สูตรเปอร์เซ็นต์การส่งเสริมการเจริญเติบโตรวมทุกตัวชี้วัด เท่ากับ ผลรวมของเปอร์เซ็นต์การส่งเสริมการเจริญเติบโตในแต่ละตัวชี้วัด/จำนวนตัวชี้วัด

### การตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี UV ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของคะน้า

### การตรวจสอบปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ตรวจปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในดิน เช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสี UV ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของคะน้า

### การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคเน่าระดับดินและส่งเสริมการเจริญเติบโตของคะน้า มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มจนเลี้ยงเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำไปทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ดูลักษณะของเส้นใย สีของเส้นใย สปอร์ phialides และ phialospores เพื่อบ่งชี้ชนิดของเชื้อรา โดยเปรียบเทียบกับเอกสารการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. (Rifai, 1969; จินตนา อิงคินันท์, 2543; วารุณี มณีนาค, 2546; มาลัยพร เชื้อบัณฑิต, 2548)

### การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple ranges test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 10.0

### สถานที่ทำการวิจัย

ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการผลิตพืช ห้องปฏิบัติการปฐพีวิทยา และโรคพืช โรงเรียนหลังคาพลาสติกป้องกันน้ำฝน ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี

### ระยะเวลาการดำเนินการ

มกราคม 2550 ถึง ธันวาคม 2551