

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองมี 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1

การเปรียบเทียบหัวเชื้อราอับสคูลารีไมคอร์ไรซาที่ผลิตเป็นการค้ากับหัวเชื้อราอับสคูลารีไมคอร์ไรซาจากประเทศไทยสำหรับการปลูกสตรอเบอร์รี่แต่ละพันธุ์

ในขั้นตอนที่ 1 ประกอบด้วยการทดลองย่อย 4 การทดลอง โดยใช้สตรอเบอร์รี่ 1 พันธุ์ต่อ 1 การทดลองย่อย สตรอเบอร์รี่ที่ใช้ในการทดลองมี 4 พันธุ์ คือ พันธุ์พระราชทานเบอร์ 20, 50, 70 และพันธุ์เนียวโฮ ในแต่ละการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราอับสคูลารีไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ละและสายพันธุ์เดียวจากประเทศไทย กับหัวเชื้อราอับสคูลารีไมคอร์ไรซาที่ผลิตเป็นการค้าจากประเทศญี่ปุ่นและเยอรมัน (รูปที่ 1) วางแผนทุกการทดลองแบบ RCB (Randomized Complete Block Design) มี 8 ซ้ำ ใช้ดินอ่อนสตรอเบอร์รี่ที่แตกต่างกันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยจัดให้มีความสม่ำเสมอในแต่ละซ้ำ ดังนั้นในแต่ละซ้ำจึงใช้ดินอ่อนของสตรอเบอร์รี่ที่มีขนาดแตกต่างกัน ปลูกสตรอเบอร์รี่ในเรือนทดลอง โดยใช้ดินอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปลูกในภาชนะพลาสติกทรงกระบอก เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 ซม. ความลึก 15 ซม. วัสดุปลูกประกอบด้วย ทรายผสมปุ๋ยหมักในอัตรา 2:1 โดยวัสดุปลูกได้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ในวัสดุปลูกมีการใส่หินฟอสเฟตในอัตราที่ให้ P 9 กก. P_2O_5 ต่อไร่ (0.515 กรัม P_2O_5 ต่อกระถาง) ใช้วัสดุปลูก 500 กรัมต่อกระถาง การให้น้ำนอกจากให้โดยฝักบัวแล้วยังให้น้ำทางราก ซึ่งใช้เชือกเป็นตัวควบน้ำจากภาชนะรองรับที่ใส่น้ำไว้ (รูปที่ 2) ดำรับการทดลองสำหรับการปลูกสตรอเบอร์รี่แต่ละพันธุ์มีดังนี้

ดำรับที่ 1 control ไม่มีการใส่เชื้อ

ดำรับที่ 2 – 5 เป็นเชื้อราอับสคูลารีไมคอร์ไรซาที่ได้จากประเทศไทยได้แก่เชื้อ *Acaulospora*

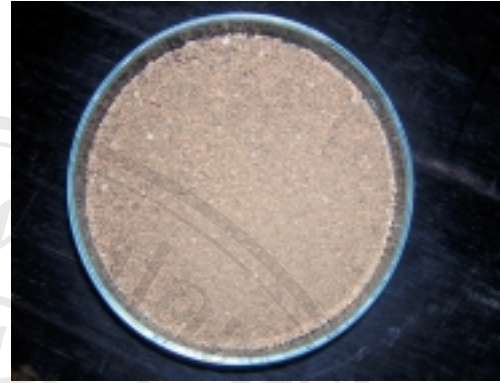
, *D₃*, KN และ *Scutellospora* ตามลำดับ



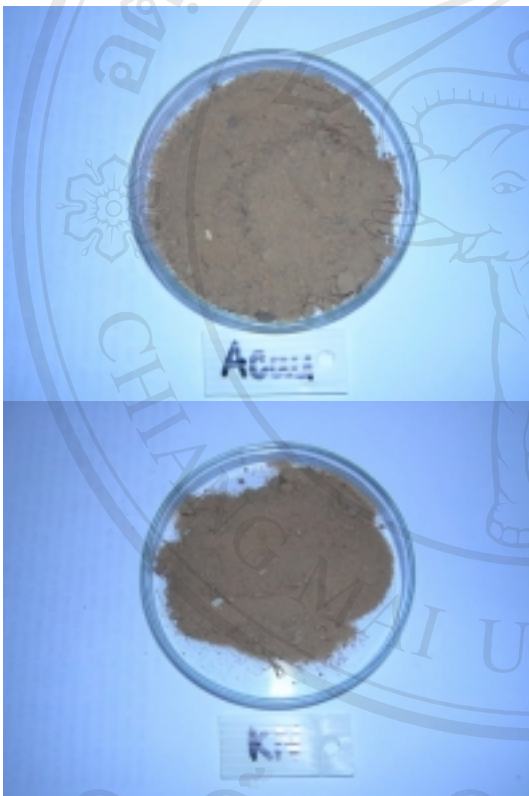
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



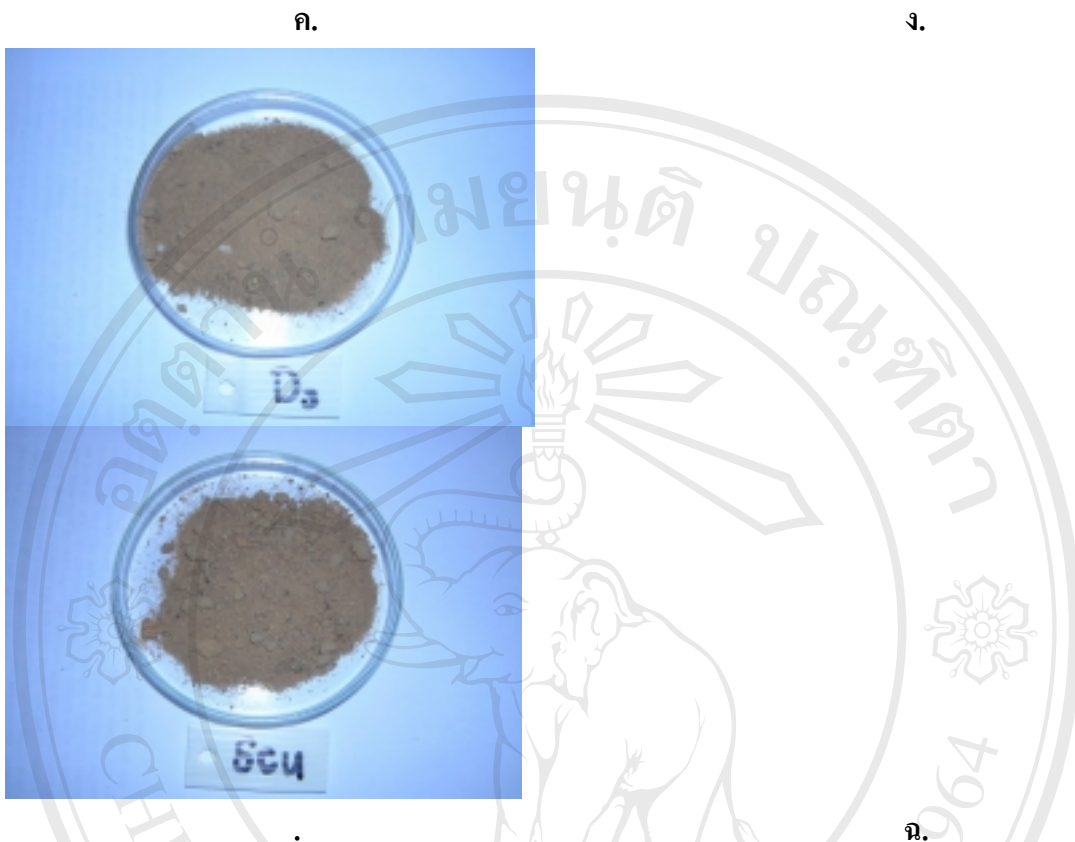
ก.



ข.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 1 ลักษณะหัวเชื้อแต่ละชนิดที่ใช้ในงานทดลอง (ก.) หัวเชื้อทางการค้าจากประเทศเยอรมัน (ข.) หัวเชื้อทางการค้าจากประเทศญี่ปุ่น (ค.) เชื้อ *Acaulospora* (ง.) เชื้อ KN (จ.) เชื้อ D_3 และ (ฉ.) เชื้อ *Scutellospora*

เชื้อ *Acaulospora* และ *Scutellospora* เป็นหัวเชื้อเดี่ยวที่มีแหล่งกำเนิดจากดินในประเทศไทย สำหรับเชื้อ D_3 และ KN เป็นหัวเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่เคยใช้ในการทดลองแล้วได้ผลดี (บังอร, 2545 และ บุษกร, 2541) และเป็นเชื้อผสมประกอบด้วยเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดต่างๆ ซึ่งยังไม่มีกรจำแนกและมีอยู่ในดินธรรมชาติ ส่วนเชื้อ KN เป็นเชื้อผสมเช่นกัน ประกอบด้วยสปอร์ของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในดินจากหมู่บ้านแกน้อย อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่

ตำรับที่ 6 และ 7 เป็นหัวเชื้อราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ผลิตเป็นการค้าจากประเทศญี่ปุ่นและเยอรมัน ตามลำดับ



รูปที่ 1 ลักษณะของภาชนะที่ใช้ปลูกต้นอ่อนของสตรอเบอร์รี่ในงานทดลอง

ในแต่ละตำรับใส่เชื้อราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดตามอัตราแนะนำ คือ 300 สปอร์ต่อต้น สำหรับหัวเชื้อจากประเทศไทยทุกชนิด สำหรับหัวเชื้อจากประเทศญี่ปุ่นใช้ 2 มล./ต้น ส่วนหัวเชื้อจากประเทศเยอรมัน ใช้อัตรา 6 มล./ต้น สำหรับหัวเชื้อจากประเทศไทยทุกชนิด อยู่ในรูปของ soil inoculum และสามารถหาปริมาณสปอร์ในหัวเชื้อได้ด้วยวิธีนับสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ส่วนหัวเชื้อจากประเทศญี่ปุ่นผลิตโดยใช้ vermiculite เป็นวัสดุรองรับเชื้อ แต่หัวเชื้อจากประเทศเยอรมันผลิตโดยใช้ expanded clay เป็นวัสดุรองรับเชื้อ ซึ่งหัวเชื้อจากต่างประเทศทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถหาปริมาณเชื้อโดยวิธีการนับสปอร์ได้ และต้องใช้วิธีการหาปริมาณเชื้อในหัวเชื้อด้วยวิธี plant infect count เท่านั้น สำหรับลักษณะของหัวเชื้อแต่ละชนิดที่ใช้ในงานทดลองแสดงในรูปที่ 2 โดยใส่หัวเชื้อได้รากของต้นอ่อนของสตรอเบอร์รี่ในช่วงย้ายปลูก หลังการย้ายปลูก 4 สัปดาห์ใส่สารละลาย Hoagland ที่ปราศจาก P ความเข้มข้น $\frac{1}{4}$ เท่าของความเข้มข้นปกติ โดยใช้ดินละ 100 มล. เก็บตัวอย่างที่ระยะ 2 เดือนหลังการย้ายปลูก โดยเก็บตำรับละ 4 ต้น (4 ซ้ำ) ในทุกตำรับของการทดลองแต่ละการทดลอง บันทึกน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน จำนวนใบ จำนวนไหล น้ำหนักสดของราก การสะสมไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในส่วนที่อยู่เหนือดิน การติดเชื้อราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

ภายในราก และจำนวนสปอร์ในวัสดุปลูก สำหรับสตรอเบอร์รี่ที่เหลืออีก 4 ต้น/ดำรับ ทำการเก็บข้อมูลด้านการเกิดไหล

ขั้นตอนที่ 2

การศึกษาอัตราการใส่หัวเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ผลิตเป็นการค้าสำหรับการปลูกสตรอเบอร์รี่พันธุ์ต่างๆ

ในขั้นตอนนี้ประกอบด้วย การทดลอง 5 การทดลอง ใช้หัวเชื้อจากประเทศเยอรมันสำหรับการทดลองที่ 1 – 4 โดยใช้สตรอเบอร์รี่พันธุ์พระราชทานเบอร์ 20, 50, 70 และพันธุ์เนียวโฮ ตามลำดับ ส่วนการทดลองที่ 5 ใช้หัวเชื้อจากประเทศญี่ปุ่นกับสตรอเบอร์รี่พันธุ์พระราชทานเบอร์ 50 เพียงพันธุ์เดียว เนื่องจากมีปริมาณของหัวเชื้อไม่พอสำหรับการทดลองทุกพันธุ์ แต่ละการทดลองประกอบด้วย การทดลอง 7 ดำรับ ดังนี้

ดำรับที่ 1 control ไม่มีการใส่เชื้อ

ดำรับที่ 2 – 7 ใช้หัวเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละชนิด ในอัตรา 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มล. ต่อต้น ซึ่งเท่ากับ การใส่เชื้อในอัตรา 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 infective unit (ifu) ในกรณีที่เป็นหัวเชื้อจากประเทศเยอรมัน ส่วนหัวเชื้อจากประเทศญี่ปุ่น ให้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 150, 300, 450, 600, 750 และ 900 ifu ตามลำดับ

การทดลองในขั้นตอนที่ 2 ทุกการทดลองใช้วิธีการปลูก การดูแลรักษา ภาชนะปลูก วัสดุปลูก ตลอดจนวิธีการใส่หัวเชื้อ ในขั้นตอนที่ 2 เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1 และใช้แผนการทดลองแบบ RCB มี 8 ซ้ำ เก็บตัวอย่างที่ระยะ 2 เดือนหลังการย้ายปลูก โดยเก็บตัวอย่างดำรับละ 4 ต้น บันทึกน้ำหนักแห้ง ส่วนเหนือดิน จำนวนใบ จำนวนไหล น้ำหนักสดของราก การสะสมไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียมในส่วนที่อยู่เหนือดิน การติดเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในราก และจำนวนสปอร์ในวัสดุปลูก สำหรับสตรอเบอร์รี่ที่เหลืออีก 4 ต้น/ดำรับ ทำการเก็บข้อมูลด้านการเกิดไหล

ขั้นตอนที่ 3

การศึกษาผลของการตอบสนองของสตรอบอร์รี่พันธุ์ต่างๆ ต่อการใส่หัวเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ร่วมกับการใส่ปุ๋ยอัตราต่างๆ

ในขั้นตอนที่ 3 ใช้ดินอ่อนของสตรอบอร์รี่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้วิธีการปลูก ภาชนะปลูก และวัสดุปลูก เช่นเดียวกับการทดลองในขั้นตอนแรก การทดลองประกอบไปด้วย 4 การทดลองย่อย โดยใช้สตรอบอร์รี่พันธุ์พระราชทานเบอร์ 20, 50, 70 และพันธุ์เนียวไฮ สำหรับการทดลองที่ 1-4 ตามลำดับ แต่ละการทดลองจัดดำเนินการทดลองเป็นแบบ 2 X 4 factorial ประกอบด้วยปัจจัยการทดลอง 2 ปัจจัย คือ การใส่ปุ๋ยและหัวเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

คำรับที่เกี่ยวข้องกับการใส่ปุ๋ยมี่ดังนี้

ไม่ใส่ปุ๋ย

ปุ๋ยเกรด 30-20-10 ในอัตราแนะนำ

ปุ๋ยเกรด 30-20-10 ในอัตรา ¼ อัตราแนะนำ

สารละลาย Hoagland ที่ปราศจาก P

ในการใส่ปุ๋ยสำหรับดำเนินการทดลองที่ 1 และ 2 ใช้ปุ๋ยละลายน้ำสำหรับอัตราการแนะนำใช้ปุ๋ย 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ใช้สารละลายปุ๋ยในดำเนินการทดลองที่ 1 และ 2 รดต้นพืชต้นละ 20 มล. ส่วนสารละลาย Hoagland ที่ปราศจาก P ความเข้มข้น ¼ เท่าของความเข้มข้นปกติ ใช้ต้นละ 100 มล. หัวเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา มี 2 คำรับดังนี้

หัวเชื้อที่มีการนำเข้าจากประเทศเยอรมัน

หัวเชื้อที่ผลิตเป็นการค้าจากประเทศญี่ปุ่น

แต่ละการทดลองย่อยใช้แผนการทดลองแบบ RCB มี 8 ซ้ำ อัตราการใส่หัวเชื้อในการทดลองคือ 300 infective unit ต่อต้น สำหรับหัวเชื้อจากประเทศเยอรมัน หรือปริมาณ 6 มล.ต่อต้น ซึ่งเป็นอัตราแนะนำ ส่วนหัวเชื้อจากประเทศญี่ปุ่นใช้ในอัตรา 300 สปอร์ต่อต้น หรือปริมาณ 2 มล.ต่อต้น ซึ่งเป็นอัตราแนะนำเช่นกัน ใส่หัวเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้รากอ่อนในช่วงย้ายปลูก หลังจากปลูกได้ 4 สัปดาห์ เริ่มให้ปุ๋ยทุกสัปดาห์ เมื่อต้นสตรอบอร์รี่อายุ 8 สัปดาห์ บันทึกน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน

จำนวนใบ จำนวนไหล น้ำหนักสดของราก การสะสมไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในส่วนที่อยู่เหนือดิน การติดเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในราก และจำนวนสปอร์ในวัสดุปลูก ส่วนสตรอบอร์รี่ที่เหลืออีก 4 ต้น/ตำรับ ทำการเก็บข้อมูลด้านการเกิดไหล

ทุกการทดลองจะใช้วิธีการตรวจสอบการติดเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในราก จำนวนสปอร์ และการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ N, P และ K ในตัวอย่างพืชดังนี้

การตรวจสอบการติดเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในราก (ดัดแปลงจาก McGonigle, 1990)

ในการตรวจสอบการติดเชื้อราในราก พิจารณาจากความยาวของรากที่มีการติดเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (root length colonization) ซึ่งคิดเป็นร้อยละของความยาวรากทั้งหมดที่ใช้ตรวจสอบ วิธีการตรวจสอบมีดังนี้

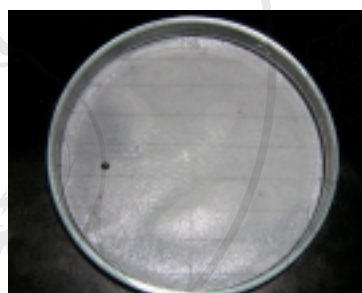
1. นำรากมาล้างน้ำให้สะอาดแล้วแช่ลงในสารละลาย KOH ความเข้มข้น 2.5% (w/v) ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
2. ล้างรากที่ผ่านการแช่ KOH แล้วแช่ลงในสารละลายกรด HCL ความเข้มข้น 1% (v/v) ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
3. ล้างรากที่ผ่านการแช่ KOH และ HCL มาล้างออกด้วยน้ำอีกครั้ง จึงย้อมสีด้วย water blue 0.06% ซึ่งประกอบด้วย water blue 0.6 g, lactic acid 400 ml, glycerine 400 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 ml (Koske and Gamma, 1989 อ้างโดย Suwanarit *etal*, 1994)
4. Destain ตัวอย่างรากที่ย้อมสีแล้ว ด้วยสารละลาย lactoglycerol ที่ประกอบด้วย lactic acid 400 มล. glycerine 400 มล. และน้ำกลั่น 200 มล. ก่อนนำไปตรวจสอบการติดเชื้อราในราก
5. นำรากที่ย้อมสีแล้วมาตัดแล้ววางบนสไลด์ในแนวขวาง (รูปที่ 3) โดยทำการตัดรากให้มีความยาวแถวละ 4.5 ซม. จำนวน 7 แถวต่อสไลด์ หยดสารละลายกลีเซอรินแล้วปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound โดยใช้กำลังขยาย 10 เท่า
6. คำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากจากสูตรต่อไปนี้ (Brundrett *etal*, 1996)

$$\%RLC = \frac{100 \times \text{จำนวน field ที่มีการติดเชื้อรา}}{\text{จำนวน field ที่ตรวจสอบทั้งหมด}}$$

การตรวจสอบหาจำนวนสปอร์ในดิน

วิธีการตรวจสอบหาจำนวนสปอร์ของเชื้อราอับัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในดิน (ดัดแปลงจาก Dodd and Phillip, 1996) มีดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัมลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 ml
2. ใส่น้ำกลั่นแล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 2000 rpm นาน 5 นาที
3. เทเอาส่วนใส่ออก ใส่น้ำตาลซูโครส 50% แล้วปั่นเหวี่ยง ที่ 2000 rpm นาน 1 นาที
4. กรองเอาส่วนใสด้วยตะแกรงละเอียด แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง whatman No. 2
5. นำกระดาษกรองที่มีสปอร์วางบนจานเพาะเชื้อขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. แล้วนับจำนวนสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ที่กำลังขยาย 4 เท่า (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 สไลด์รากสตรอเบอร์รี่หลังจากย้อมสี

รูปที่ 4 จานเพาะเชื้อที่มีสปอร์ที่ได้หลังจาก

ด้วย 0.06% water blue

การปั่นเหวี่ยง

การวิเคราะห์ตัวอย่างพืช

การเตรียมตัวอย่างพืช

อบตัวอย่างพืชที่ทำความสะอาดแล้วในตู้อบที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท และบดด้วยเครื่องบด Willey Mill การย่อยตัวอย่างใช้ตัวอย่างพืชที่บดแล้ว (ประมาณ 0.5 กรัม) และกรดย่อย 7 มล. (ประกอบด้วย Na_2SO_4 98% 1000 มล., K_2SO_4 100 กรัม และ Se 1 กรัม โดยต้มจน K_2SO_4 และ Se ละลายจนหมด) ย่อยตัวอย่างโดยใช้ digestion block จนได้สารละลายใส ปรับปริมาตรสารละลายดังกล่าวให้เป็น 100 มล. โดยใช้น้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรอง No. 5 และนำสารละลายดังกล่าวไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหาร N, P และ K ตามวิธีการในตารางที่ 1 และรายละเอียดในภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างพืช

การวิเคราะห์	วิธีการหาความเข้มข้น*	เอกสารอ้างอิง
Total N	การกลั่นด้วย NaOH 40% พัฒนาสีด้วย ammonium vanado phospho molybdate	Bremer, 1996
Total P	วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer Flame photometer	ศรีสม, 2544 Helmke and Sparke, 1996
Total K		

* หลังการย่อยตัวอย่างด้วยกรดผสม

หลักการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราอับสคูลารีไมคอร์ไรซา (Silverding, 1991)

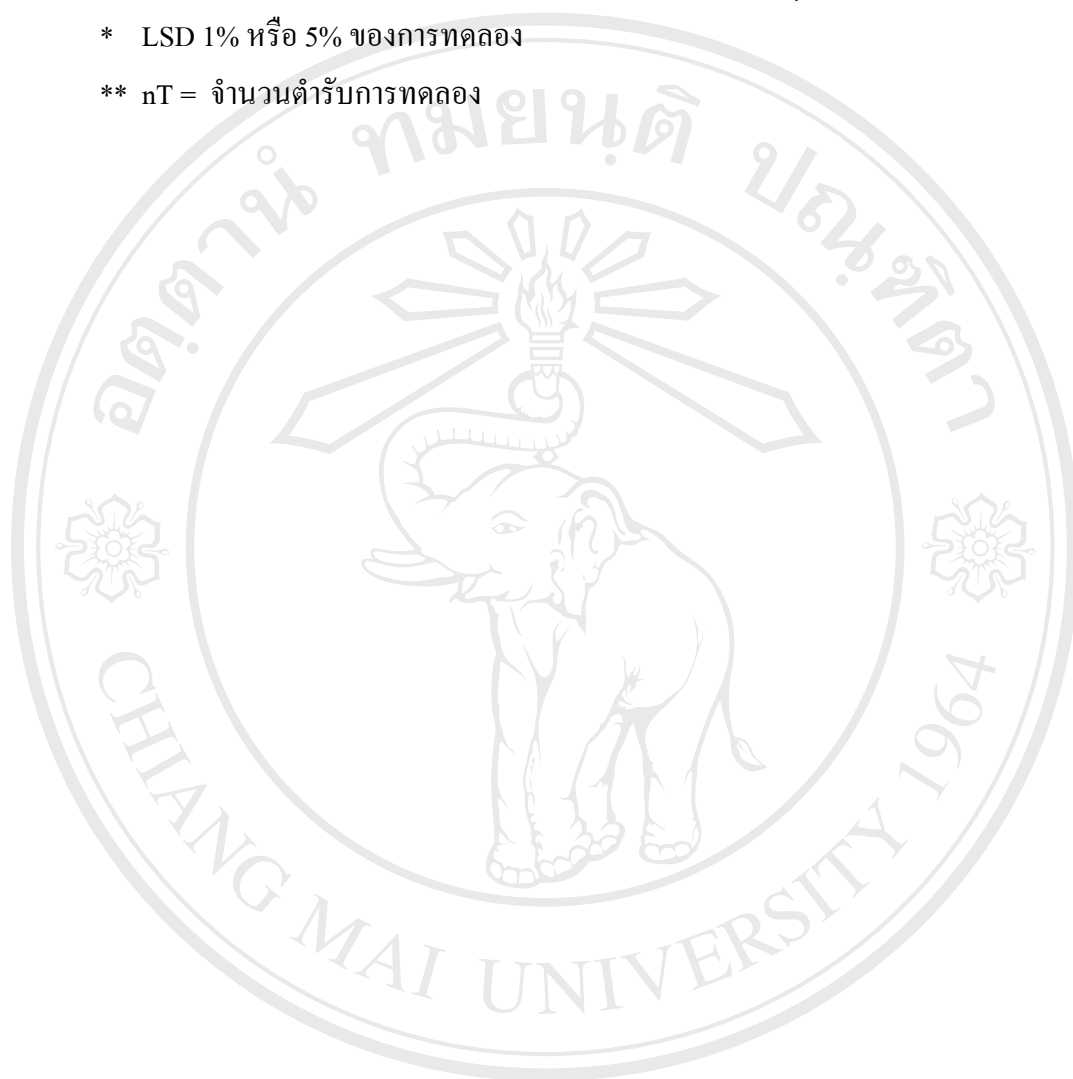
ในการทดลองขั้นตอนที่ 1 และ 2 ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราอับสคูลารีไมคอร์ไรซาโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้าน การเจริญเติบโต การสะสมธาตุอาหาร N P และ K ในส่วนเหนือดิน และการติดเชื้อในรากของต้นพืชที่ได้รับการใส่เชื้อราอับสคูลารีไมคอร์ไรซากับต้นพืชที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ และค่าเฉลี่ยของข้อมูลแต่ละข้อมูลสำหรับการทดลองแต่ละการทดลอง หากการใส่เชื้อให้ผลไม่แตกต่างจากการไม่ใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ถือว่าเชื้อที่ใส่ไม่มีประสิทธิภาพ (Non effective, NE) แต่ถ้าการใส่เชื้อให้ผลดีกว่าและแตกต่างจากการไม่ใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ถือว่าเชื้อมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่ารับที่ใส่เชื้อแต่ละค่ารับกับค่าเฉลี่ยของการทดลอง เชื้อที่มีประสิทธิภาพต่ำ (slightly effective) จะให้ค่าเฉลี่ยต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของการทดลอง ในขณะที่เชื้อที่มีประสิทธิภาพปานกลาง (moderate effective) จะให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับหรือมากกว่าค่าเฉลี่ยของการทดลอง แต่ความแตกต่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง (highly effective) จะให้ค่าเฉลี่ยสูงกว่าและแตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับค่า LSD 0.01 หรือ LSD 0.05 ที่จะใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่ารับที่ใส่เชื้อแต่ละค่ารับกับค่าเฉลี่ยของการทดลอง จำนวนนี้ได้ดังนี้ (Lochow and Schuster, 1961 อ้างโดย Silverding, 1991)

$$\text{LSD 1\% หรือ 5\% to trail average} = \text{LSD 1\% หรือ 5\%} * \frac{\sqrt{nt^{**} - 1}}{\sqrt{2nt}}$$

* LSD 1% หรือ 5% ของการทดลอง

** nt = จำนวนตัวรับการทดลอง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved