บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองได้ดำเนินการ ณ สาขาวิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การศึกษาวิจัยแบ่งงานออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

3.1 การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์

ทำการคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ที่แยกได้จากงานทดลองของ ยุพา (2552) โดยเลือกเชื้อสกุล (genus) ที่ต่างกันมาทุกสกุล (6 สกุล) ส่วนในเชื้อในสกุลเดียวกันนั้นได้เลือกจากลักษณะกายภาพ (phenotype) ที่ปรากฏให้เห็นภายนอกซึ่งเป็นผลมาจากยีนที่ต่างกัน โดยการตรวจสอบข้อมูลจากงานทดลองของยุพา (2552) นำเชื้อที่คัดเลือกได้จาก stock culture ที่ยุพาได้เก็บไว้ใน glycerol 10 เปอร์เซ็นต์ ผสม DMSO (diemethyl sufoxide) 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาขยายโดยเลี้ยงบนอาหาร IMA2 (Inhibitory Mold Agar 2) (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อแต่ละ Isolate เจริญเต็มที่แล้วซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 7 - 14 วัน ขึ้นอยู่กับลักษณะการเจริญของเชื้อแต่ละ Isolate จึงนำเชื้อไปใช้ในการศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การประเมินความสามารถเชิงปริมาณของเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ในการละลายธาตุอาหารพืชออกจากแร่ธรรมชาติ

3.2.1 การวิเคราะห์หาความสามารถเชิงปริมาณในการละลายฟอสฟอรัส จากแคลเซียมฟอสเฟต, อะลูมิเนียมฟอสเฟต และ หินฟอสเฟต

การวิเคราะห์หาความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสจาก แคลเซียมฟอสเฟต, อะลูมิเนียมฟอสเฟต และหินฟอสเฟต ของเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Pikovskaya, 1948) ทำโดยการ เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ในอาหาร IMA 2 ประมาณ 7 วัน ทำการเจาะเส้นใยบริเวณรอบโคโลนีด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิเมตร โดยได้เลือกบริเวณที่มีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันลงในอาหาร Pikovskaya's Broth (ภาคผนวก ก) 25 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนผสมของสารตั้งต้นในการละลายฟอสฟอรัสเพียง 1 ชนิด คือ 0.5 % แคลเซียมฟอสเฟต, 0.5 % อะลูมิเนียมฟอสเฟต หรือ 0.5% หินฟอสเฟตบด และชุดควบคุม (control) ใส่อาหาร Pikovskaya's Broth 25 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร มีการบรรจุแหล่งสารตั้งต้นในการละลายฟอสฟอรัส แต่ไม่มีการเติมเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ โดยมีการทดลอง 3 ซ้ำ นำอาหารที่ใส่เชื้อไปบ่มโดยเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบ/ นาที เป็นระยะเวลา 7 วัน ของแต่ละเชื้อในแต่ละแหล่งฟอสฟอรัส เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำอาหารที่มีเชื้อเจริญมาแยกส่วนสารละลายใสโดยการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 (Whatman no. 5) นำสารละลายใสไปวัด pH ทันทีโดยใช้ pH meter และวิเคราะห์หาฟอสฟอรัส ส่วนตะกอนเซลล์ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของเชื้อโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และนำมาชั่งด้วยเครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทำโดยการไปเปตสารละลายเชื้อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก ทำการเติมสารละลาย color reagent 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 820 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 วิเคราะห์หาความสามารถเชิงปริมาณในการละลายโพแทสเซียมจากแร่เฟลด์สปาร์

การวิเคราะห์หาความสามารถในการละลายโพแทสเซียมจากแร่เฟลด์สปาร์ ของเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Hebei Academy of Science, 1996) เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ในอาหาร IMA 2 ประมาณ 7 วัน ทำการเจาะเส้นใยบริเวณรอบโคโลนีด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิเมตร (ต้องเลือกบริเวณที่มีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน) ลงในอาหาร Silicate bacteria (ภาคผนวก ก) ที่มีแร่เฟลด์สปาร์เป็นแหล่งให้โพแทสเซียมจำนวน 25 ml /flask โดยการชั่งแร่ใส่ลงใน flask แต่ละใบในปริมาณที่ให้ K 0.15 g K/l และทำชุดควบคุม (control) โดยไม่มีการเติมเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำเชื้อที่ได้ไปบ่มโดยเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 7 วัน นำเชื้อที่ได้มาแยกส่วนสารละลายใสโดยการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 นำส่วนละลายใสไปวิเคราะห์หาโพแทสเซียม และนำตะกอนเซลล์ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของเชื้อโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และนำมาชั่งด้วยเครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง การวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมในสารละลายทำโดยการไปเปตสารละลายเชื้อตัวอย่าง 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตร แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของโพแทสเซียมที่ละลายได้โดยใช้ Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 766.5 นาโนเมตร ที่ slit width เท่ากับ 0.7 nm และที่ Energy อยู่ในช่วง 66 - 70

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์

คัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมสูง (จากข้อ 3.2) และเชื้อไอโซเลท TGsL-02-05 เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิต IAA สูงที่สุด (ยุพา, 2552) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการเข้าสู่รากด้วยวิธีการปลูกเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ลงในกล้าส้ม และเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกล้าส้มกับกล้าส้มที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ได้ทำการทดลองในกระถาง ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ และให้แสงนาน 14 ชม. ต่อ วัน ณ ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ดิน สาขาวิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) แบ่งการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ออกเป็น 2 ชุด แยกจากกันตามแหล่งธาตุอาหารพืช คือ ชุดที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อร่วมกับหินฟอสเฟต (Total P = 4.996%) และ ชุดที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อร่วมกับแร่โพแทสเฟลด์สปาร์ (Total K = 3%) ทำการทดลองชุดละ 6 ซ้ำ ใช้ระยะเวลาปลูกประมาณ 3 เดือน

กรรมวิธีการทดลองของชุดที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อร่วมกับหินฟอสเฟต

วางแผนการทดลองแบบ CRD 7 กรรมวิธี 6 ซ้ำ (ชุด 1 เดือน 3 ซ้ำ และ ชุด 3 เดือน 3 ซ้ำ) คือ

กรรมวิธี 1 เป็นกรรมวิธีควบคุม (control)
(ไม่ใส่เชื้อ, ไม่ใส่หินฟอสเฟต)

กรรมวิธี 2 วัสดุปลูก + หินฟอสเฟต (ไม่ใส่เชื้อ) (control+RP)

กรรมวิธี 3 วัสดุปลูก + หินฟอสเฟต + เชื้อไอโซเลท TGsR-03-02

กรรมวิธี 4 วัสดุปลูก + หินฟอสเฟต + เชื้อไอโซเลท TGsR-03-06

กรรมวิธี 5 วัสดุปลูก + หินฟอสเฟต + เชื้อไอโซเลท TGsL-02-04

กรรมวิธี 6 วัสดุปลูก + หินฟอสเฟต + เชื้อไอโซเลท TGsL-02-05

กรรมวิธี 7 วัสดุปลูก + หินฟอสเฟต + เชื้อไอโซเลท TGcL-04-60

กรรมวิธีการทดลองของชุดที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อร่วมกับแร่โพแทสเฟลด์สปาร์

วางแผนการทดลองแบบ CRD 7 กรรมวิธี 6 ซ้ำ (ชุด 1 เดือน 3 ซ้ำ และ ชุด 3 เดือน 3 ซ้ำ) คือ

กรรมวิธี 1 เป็นกรรมวิธีควบคุม (control)
(ไม่ใส่เชื้อ, ไม่ใส่แร่โพแทสเฟลด์สปาร์)

กรรมวิธี 2 วัสดุปลูก + แร่โพแทสเฟลด์สปาร์ (ไม่ใส่เชื้อ) (control+K-FS)

กรรมวิธี 3 วัสดุปลูก + แร่โพแทสเฟลด์สปาร์ + เชื้อไอโซเลท TGsR-03-02

กรรมวิธี 4 วัสดุปลูก + แร่โพแทสเฟลด์สปาร์ + เชื้อไอโซเลท TGsR-03-06

กรรมวิธี 5 วัสดุปลูก + แร่โพแทสเฟลด์สปาร์ + เชื้อไอโซเลท TGsL-02-04

กรรมวิธี 6 วัสดุปลูก + แร่โพแทสเฟลด์สปาร์ + เชื้อไอโซเลท TGsL-02-05

กรรมวิธี 7 วัสดุปลูก + แร่โพแทสเฟลด์สปาร์ + เชื้อไอโซเลท TGcL-04-60

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.1 การเตรียมวัสดุปลูก

นำวัสดุปลูก (ภาคผนวก ข) ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ในการทดลองชุดที่ 1 ใช้วัสดุปลูกที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1000 กรัม ผสมกับหินฟอสเฟต 3.5 กรัม คลุกให้เข้ากัน บรรจุลงถุงแล้วเติมเชื้อแอกติโนไมซิสต์ครั้งที่ 1 ตามกรรมวิธีการทดลองที่ระดับความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร ต่อถุง คลุกเคล้าเชื้อและวัสดุปลูกให้เข้ากัน ทำให้ครบตามกรรมวิธีการทดลอง ยกเว้นกล้าส้มกรรมวิธีควบคุม และ กรรมวิธี control + RP ไม่มีการปลูกเชื้อ ส่วนการทดลองชุดที่ 2 ใช้แร่โพแทสเฟลด์สปาร์ 0.335 กรัม ต่อ วัสดุปลูก 1000 กรัม บรรจุลงถุงแล้วเติมเชื้อครั้งที่ 1 ตามกรรมวิธีการทดลอง ที่ระดับความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร ต่อถุง คลุกเคล้าเชื้อและวัสดุปลูกให้เข้ากัน ทำให้ครบตามกรรมวิธีการทดลอง ยกเว้นกล้าส้มกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธี control + K-FS ไม่มีการปลูกเชื้อ จากนั้นหมักทิ้งไว้ 1 เดือนก่อนที่จะนำมาปลูกกล้าส้ม

3.3.2 การเพาะกล้าส้ม

วิธีการเพาะต้นกล้าส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ทำโดยการนำเมล็ดส้มที่ได้ล้างน้ำให้สะอาดและผึ่งลมให้แห้ง ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยแช่ alcohol ที่มีความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อประมาณ 4-5 ครั้ง นำเมล็ดส้มวางบนจานเพาะเชื้อที่บรรจุทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ปรับให้มีความชื้นในปริมาณที่เหมาะสม ทำการเพาะไว้ ประมาณ 7 วัน จึงย้ายกล้าส้มลงในกระถางที่บรรจุวัสดุปลูกที่ได้ทำการผสมแหล่งให้ธาตุอาหารพืชและผ่านการหมัก ตามกรรมวิธีของแต่ละชุดการทดลอง 2 ชุด (หินฟอสเฟต หรือ แร่เฟลด์สปาร์) หลังจากการปลูกประมาณ 1 สัปดาห์ ให้ทำการปลูกเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ ครั้งที่ 2 ลงในดินบริเวณรอบๆ ของรากต้นกล้าส้ม ที่ระดับความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตรต่อต้น ตามกรรมวิธีทดลอง ยกเว้นกล้าส้มกรรมวิธีควบคุม, กรรมวิธี control + RP และกรรมวิธี control + K-FS ในทุกๆสัปดาห์ให้สารละลายธาตุอาหารพืช คือ Hogland nutrient solution (ภาคผนวก ข) โดยทำการเจือจางลง 10 เท่า ก่อนที่จะนำไปรดกล้าส้ม ในปริมาณ 70 มล./ต้น/สัปดาห์ โดยในชุดที่ผสมหินฟอสเฟตไม่ใส่ธาตุฟอสฟอรัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และชุดที่ผสมแร่โพแทสเฟลด์สปาร์ไม่ใส่โพแทสเซียม เพื่อเพิ่มธาตุอาหารให้แก่กล้าส้ม สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ใช้ระยะเวลาปลูกประมาณ 3 เดือน และมีการรดน้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

3.3.3 การตรวจสอบผลของแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ต่อการเจริญเติบโตและการดูดธาตุอาหารของกล้าส้ม

ได้ทำการบันทึกเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกล้าส้ม และ ทำการวิเคราะห์ธาตุอาหารในกล้าส้ม หลังทำการปลูกเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ ครั้งที่ 2 ที่ระยะเวลา 1 และ 3 เดือน

1) ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ต่อการเจริญเติบโตของกล้าส้ม

เมื่อครบระยะเวลา 1 และ 3 เดือน วัดและบันทึกการเจริญเติบโตของกล้าส้ม โดยวัดความยาวราก, ความสูง, น้ำหนักสดและแห้งส่วนเหนือดิน และน้ำหนักสดราก (ภาคผนวก ข) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

2) ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์ต่อการดูดธาตุอาหารของกล้าส้ม

ทำการวิเคราะห์กล้าส้มส่วนเหนือดิน โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุไนโตรเจน (%N), ฟอสฟอรัส (%P) และโพแทสเซียม (%K) (Bremner, 1965; ศรีสม, 2544; Kalra, 1998) (ภาคผนวก ก) และคำนวนการดูดใช้ ไนโตรเจน (N uptake), ฟอสฟอรัส (P uptake) และโพแทสเซียม (K uptake) จากความเข้มข้นของธาตุอาหารที่วิเคราะห์ได้

3) การตรวจสอบการเข้ารากของเชื้อแอกติโนไมซิสต์เอนโดไฟท์

เมื่อครบระยะเวลาปลูกประมาณ 1 เดือนหลังจากวัดการเจริญเติบโตของกล้าส้มแล้ว จากนั้นนำรากออกมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วแช่ในสารละลาย KOH 10 เปอร์เซ็นต์ นำไปนึ่งด้วยหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำรากมาล้างด้วยน้ำสะอาด และแช่ในสารละลาย HCl 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้งแล้วนำมาแช่ในสารละลาย water blue 0.06 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) เพื่อย้อมสีราก จากนั้นนำรากที่ย้อมมาตัด (section) ให้มีความยาว 1.5 ซม. จำนวน 5 แถวต่อสไลด์ วางบนแผ่นสไลด์ (ภาคผนวก ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ แล้วนำไปตรวจสอบการเข้ารากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบและคำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้าราก (colonization) โดยใช้สูตรในการคำนวณดังนี้

$$\% \text{ Colonization} = \frac{\text{จำนวน field ที่มีการติดเชื้อ}}{\text{จำนวน field ที่ตรวจสอบทั้งหมด}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved