บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การวิจัยแบ่งงานออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

3.1 การศึกษาชนิดและสัดส่วนของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในหัวเชื้อผสม (mixed soil inoculum)

นำหัวเชื้อผสมเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ได้แก่ หัวเชื้อผสม D_3 และ KN ซึ่งเป็นหัวเชื้อผสมที่เคยใช้ทดสอบมาแล้วและได้ผลดีกับสตรอเบอรี่มาแยกสปอร์ด้วยวิธีซึ่งดัดแปลงจาก sucrose gradient centrifugation ของ Dodd และ Philliph(1997) โดยนำตัวอย่างหัวเชื้อ 250 มล. ผสมลงในน้ำประปา 1000 มล. คนของผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนนอนก้นประมาณ 2-3 วินาที เทของผสมเพื่อแยกตะกอนขนาดใหญ่ออกโดยการนำไปร่อนด้วยตะแกรงขนาด 800 และ 500 ไมครอน ล้างน้ำบนตะแกรงเพื่อให้แน่ใจว่าตะกอนขนาดเล็กได้หลุดผ่านออกมาหมดแล้ว หลังจากนั้นนำของผสมที่แยกตะกอนขนาดใหญ่ออกไป ตั้งทิ้งไว้ 2-3 วินาที แล้วนำไปเทใส่บนตะแกรงขนาด 250 ไมครอน 125 ไมครอน และ 45 ไมครอนตามลำดับ ล้างตะกอนบนตะแกรงแต่ละขนาดให้สะอาด เทตะกอนแต่ละขนาดลงในบีกเกอร์เพื่อแยกสปอร์โดยวิธีปั่นเหวี่ยง(centrifuge)ต่อไป ในการแยก สปอร์ใช้ของเหลวผสมตะกอนที่ได้จากตะแกรงขนาดต่างๆ จำนวน 6 มล. ใส่ลงในหลอด centrifuge ใช้ syring ดูดสารละลายกลูโคส ที่มีความเข้มข้น 60 % จำนวน 6 มล. เติมลงไปใต้ของเหลวผสมตะกอนของหัวเชื้อ แล้วนำไปปั่นด้วย centrifue เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดเอาสปอร์ซึ่งอยู่ในชั้น กึ่งกลางระหว่างน้ำตาลความเข้มข้น 60% และของเหลวผสมตะกอนใส่ลงบนตะแกรงขนาด 45 ไมครอน ล้างน้ำตาลออกด้วยน้ำกลั่น แล้วล้างสปอร์ลงบนกระดาษกรองที่ขีดเส้นขนานเป็นช่องห่างกัน 0.5 ซม. วางกระดาษกรองที่มีสปอร์ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปตรวจนับสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 3 มิติ (stereoscopic microscope) แยกสปอร์เป็นกลุ่มๆ ตามลักษณะสีและรูปร่าง นำสปอร์แต่ละกลุ่มมา 10-20 สปอร์ มาศึกษารูปร่างลักษณะต่างๆ ของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound เพื่อจำแนกชนิดเชื้อรา อาบัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา แล้วนำมาคำนวณสัดส่วนของเชื้ออาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละจีนัส

3.2 ศึกษาอิทธิพลของระดับปุ๋ยและชนิดของหัวเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ที่เหมาะสมกับสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทาน 50 พันธุ์โตโยโนกะ (Toyonoka) และพันธุ์เนียวโฮ (Nyoho)

ปลูกสตรอเบอรี่ในเรือนทดลองโดยใช้ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในถุงพลาสติกขนาด 3x5 นิ้วซึ่งบรรจุวัสดุปลูก คือ แกลบและดินในอัตรา 1:1 การฆ่าเชื้อในแกลบใช้วิธีการนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้งที่อุณหภูมิ 180 ^{0}C และความดัน 1.2 กก./ซม^{3}เป็นเวลา 1 ชั่วโมงส่วนดินใช้การอบฆ่าเชื้อด้วยบาร์ซามิดจี ในอัตราที่แนะนำ คือ 400 กรัมต่อพื้นที่ 10 m^{2} ใช้ความหนาของดินประมาณ 25 ซม. ซึ่งดินดังกล่าวมี pH 4.14, ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Bray II) 5.2 ppm, โปแตสเซียมที่สกัดได้ (1 N NH_4OAc pH 7) 5.33 ppm เปอร์เซ็นต์ของอินทรีย์วัตถุในดินเท่ากับ 0.23 ธาตุอาหารปริมาณน้อย (trace element) ที่สกัดโดยใช้น้ำยา DTPA ได้แก่ Zn 1.3 ppm, Cu 0.83 ppm, Ca 103 ppm, Mg 48 ppm, Fe 4.3 ppm และ Mn 25 ppm

จัดตำรับการทดลองแบบ 3x3 factorial โดยใช้แผนการทดลองแบบ Randomized complete block design(RCBD) มี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยต้นกล้าสตรอเบอรี่จำนวน 2 ต้น การทดลองประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ การใส่ปุ๋ยและหัวเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

ตำรับที่เกี่ยวข้องกับการใส่ปุ๋ย มี 3 ตำรับ คือ

1. ไม่ใส่ปุ๋ย (control)

2. ใส่ปุ๋ยเกรด 30-20-10 อัตรา1/4 ของอัตราแนะนำ โดยใช้ปุ๋ยดังกล่าวละลายน้ำในอัตรา 2.5 กรัม ต่อน้ำ 10 ลิตร สารละลายปุ๋ยที่เจือจางแล้วมีความเข้มข้นของ N 75 ppm P 21.8 ppm และK 20.74 ppm และในการใส่ให้กับพืช ใช้วิธีการฉีดพ่นให้แก่ต้นสตรอเบอรี่โดยใช้ต้นละ 20 มล. หลังจากย้ายปลูกได้ 15 วัน

3. ใส่ปุ๋ยน้ำหมักจากปลาที่เจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นน้อยลง 100 เท่าของความเข้มข้นเดิม สำหรับน้ำหมักจากปลามี pH 4.12 ความเข้มข้นของธาตุอาหารดังนี้ มี N 56 ppm P 52 ppm และ K 42 ppm ในการใส่ปุ๋ยน้ำหมัก ใช้วิธีการฉีดพ่นให้แก่พืช ในอัตรา 20 มล. ต่อต้นเช่นเดียวกับการใช้ปุ๋ยเคมี

ตำรับที่เกี่ยวกับหัวเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามี 3 ตำรับ ดังนี้

1. ไม่ใส่หัวเชื้อ (control)

2. ใส่หัวเชื้อ D_3

3. ใส่หัวเชื้อ KN

หัวเชื้อ D_3และ หัวเชื้อ KN เป็นหัวเชื้อที่อยู่ในรูปของ soil inoculum ซึ่งผลิตจากสปอร์ของเชื้อราชนิดต่างๆที่มีอยู่ในดินอำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแกน้อยตามธรรมชาติ ตามลำดับ การใส่หัวเชื้ออาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดใช้อัตรา

500 สปอร์ต่อต้น โดยใส่หัวเชื้อใต้รากต้นอ่อนในช่วงที่มีการย้ายปลูก หลังจากปลูกได้ 15 วัน จึงเริ่มให้ปุ๋ยทุก 2 สัปดาห์ เมื่อต้นสตรอเบอรี่อายุได้ 40 และ 80 วัน บันทึกน้ำหนักแห้งของส่วนที่อยู่เหนือดิน การสะสมไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโปแตสเซียมในส่วนที่อยู่เหนือดินและการติดเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในรากสตรอเบอรี่ที่ระยะ 40 และ 80 วันหลังการย้ายปลูก ในการตรวจสอบการติดเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในรากสตรอเบอรี่ มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

การตรวจสอบการติดเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

นำตัวอย่างพืชมาตัดรากและเตรียมตัวอย่างด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1) นำรากมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา แล้วแช่ในสารละลาย KOH ความเข้มข้น 2.5% (w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) นำรากมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา แล้วแช่ในสารละลาย HCl ความเข้มข้น 1% (w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) นำรากมาล้างออกด้วยน้ำประปา แล้วแช่ในสารสำหรับย้อมสี water blue 0.06% ซึ่งประกอบด้วย water blue 0.6 g lactic acid 200 มล. glycerine 400 มล. และปรับปริมาตรเป็น 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 คืน (Koske and Gemma, 1989)

4) นำรากที่ย้อมสีแล้วตัดเป็นท่อนขนาดประมาณ 1 ซม. วางบนสไลด์ หยดสารละลาย glycerine แล้วปิดทับสไลด์ด้วยแผ่นปิดสไลด์ โดยตัดรากจำนวน 10 รากต่อสไลด์ และทำ 3 สไลด์ต่อต้น ตรวจสอบการติดเชื้อในรากด้วยกล้องจุลทรรศน์ compound และประเมินเปอร์เซนต์ความหนาแน่นของการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อในรากพืชตามวิธีการของ Trouvelet และคณะ(1985)ซึ่งอ้างโดยโสภณ (2540) โดยประมาณค่าการเข้าอาศัยทั้งหมดโดยรวมผลของเส้นใย อาบัสคูล และเวสิเคิลที่สังเกตเห็นในรากแต่ละชิ้น ซึ่งเกณฑ์การประเมิน แบ่งเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0 ไม่พบเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในราก
ระดับ 1 พบเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่ำกว่า 1%ของพื้นที่ราก
ระดับ 2 พบเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 1 - 10%ของพื้นที่ราก
ระดับ 3 พบเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 11-50 %ของพื้นที่ราก
ระดับ 4 พบเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 51-90 %ของพื้นที่ราก
ระดับ 5 พบเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามากกว่า90%ของพื้นที่ราก

แล้วคำนวณหาความหนาแน่นของการเข้าอยู่อาศัยในรากพืชของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยสมการ

$$\% I = (95n_5+70n_4+30n_3+5n_2+n_1)/N$$

เมื่อ $\%I$ = % ความหนาแน่นของการเข้าอยู่อาศัยในรากพืช

N = จำนวนชิ้นรากทั้งหมดที่พบการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ซา

$n_5, n_4, .., n_1$ = จำนวนชิ้นรากที่ตรวจพบการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ระดับ 5, 4, 3,...,1 ตามลำดับ

95. 70. 30. 5. 1 = ค่าเฉลี่ย % การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากพืช ที่ระดับต่างๆ

การวิเคราะห์ธาตุอาหาร N P และ K

นำส่วนเหนือดินของต้นสตรอเบอรี่มาอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 °C จนน้ำหนักของตัวอย่างคงที่ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักตัวอย่างภายหลังอบ หลังจากนั้นนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง และร่อนตัวอย่างที่บดแล้วด้วยตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ตัวอย่างที่ร่อนแล้ว จะใช้ในการวิเคราะห์ N P และ K ทั้งหมดต่อไป ในการวิเคราะห์ตัวอย่างใช้ตัวอย่างที่อบแห้งและเก็บไว้ในโถดูดความชื้น(dessicator) ประมาณ 0.5 กรัม ใส่ในหลอดย่อยขนาดความจุ 112 มล. เติมกรดผสมลงไป 7 มล. ทิ้งค้างคืนก่อนนำไปย่อยด้วย digestion block จนได้สารละลายใส นำสารละลายดังกล่าวมาปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำใน volumetric flask ขนาด 100 มล.จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 และนำสารละลายที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารต่อไป สำหรับกรดผสมที่ใช้ย่อยใช้วิธีการเตรียมที่เสนอแนะโดย Bergensen *et al.*(1988) แต่ใช้ Na_2SO_4 แทน K_2SO_4 ในส่วนผสมดังนี้ กรดกำมะถัน A.R. grade เข้มข้น(H_2SO_4) 98% 1,000 มล., Na_2SO_4 100 กรัม และ Se 1 กรัม กรดผสมดังกล่าวเตรียมโดยอุ่นของผสมบน hot plate จนกระทั่งส่วนผสมที่เป็นของแข็งละลาย สารละลายที่ได้จะมีลักษณะใสและมีสีเหลืองจาง

ในการวิเคราะห์ N (Bremner, 1996) ใช้วิธีการกลั่น โดยดูดสารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่าง 50 มล. นำไปกลั่นโดยใช้เครื่องกลั่นไนโตรเจนและใช้สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 40% ปริมาตร 30 มล. และเก็บ distillate ที่ได้ใน boric acid 2% ซึ่งมี mixed indicator (methyl red + bromcresol green) ผสมอยู่(Bremner and Mulvaney, 1983) จากนั้นนำ distillate ไปไตเตรทกับกรดมาตรฐาน H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.05 N เพื่อคำนวนหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่อไป

ในการวิเคราะห์ธาตุ P (ศรีสม, 2544) ใช้วิธีการพัฒนาสีด้วย ammonium vanadomolybdate โดยดูดสารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่าง 5 มล. ลงใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มล. เติมสารละลาย mixed reagent 5 มล. เขย่าแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 25 มล. ด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ 20 นาที ทำการวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร สำหรับ mixed reagent ประกอบด้วย ammonium vanadate 1.25 กรัม

HNO_3 158.42 มล. ละลายในน้ำอุ่น 200 มล. ผสมกับ ammonium molybdate tetrahydate 25 กรัม ที่ละลายในน้ำอุ่น 300 มล. แล้วปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1,000 มล. ด้วย volumetric flask ขนาด 1,000 มล.

ในการวิเคราะห์ธาตุ K (Helmke, 1996) ใช้วิธีการหาโดย flame photometer โดยดูดสารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่าง 5 มล. ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มล. ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มล. ด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดด้วยเครื่อง flame photometer

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในการเพาะปลูกสตรอเบอรี่ภายใต้สภาพไร่นา

ผลิตไหลสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทาน 50 โดยใช้พื้นที่แปลงเกษตรกร บ้านบ่อแก้ว อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่โดย(รูปที่ 1)ใช้หัวเชื้อ D_3 และ KN ซึ่งเป็นหัวเชื้อที่ผลิตจากสปอร์ของเชื้อราชนิดต่างๆที่มีอยู่ในดินอำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแก้อย ตามธรรมชาติตามลำดับและไม่ใส่หัวเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา โดยใช้พื้นที่แปลงเกษตรกร บ้านบ่อแก้ว อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่(รูปที่ 2) ดินที่ใช้ผลิตไหลมี 2 ชนิด คือ ดินที่มีฟอสฟอรัสต่ำผสมทราย และดินในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกร หัวเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ใช้อยู่ในรูป soil inoculum และใช้ในอัตรา 500 สปอร์ต่อไหล 1 ต้น โดยใช้หัวเชื้อรองใต้รากไหลที่ปลูกในถุงพลาสติกสีดำขนาด 6x9 cm. วิธีการจัดการในการผลิตไหลเป็นไปตามวิธีที่เกษตรกรปฏิบัติ จากนั้น นำไหลทั้งหมดที่ใส่เชื้อและไม่ได้ใส่เชื้อไปปลูกในพื้นที่เกษตรกร 4 ราย ณ บ้านทุ่งหลุก - ป่าจี้ และ บ้านแม่งอน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ใช้แผนการทดลองแบบ RCBDโดยถือว่าเกษตรกรแต่ละรายเป็นตัวแทน block มี 4 ซ้ำ การทดลองสำหรับเกษตรกรแต่ละราย มี 2 การทดลอง การทดลองแรกเป็นการปลูกสตรอเบอรี่โดยใส่ปุ๋ยตามวิธีการของเกษตรกร (ตารางที่ 2) ส่วนการทดลองที่สองใส่ปุ๋ยยูเรียในอัตรา 12 กก.N/ไร่ แต่ละการทดลองใช้ไหลสตรอเบอรี่จำนวน 45 ต้นต่อซ้ำ ซึ่งผลิตด้วยวิธีการต่างๆ 6 ตำรับการทดลอง ต่อดังนี้

1.ไม่ใส่หัวเชื้อในวัสดุปลูกซึ่งเป็นดินที่มี P ต่ำผสมทราย
2.ใส่หัวเชื้อD_3 ผสมกับวัสดุปลูกซึ่งเป็นดินที่มี P ต่ำผสมทราย
3.ใส่หัวเชื้อKN ผสมกับวัสดุปลูกซึ่งเป็นดินที่มี P ต่ำผสมทราย
4.ไม่ใส่หัวเชื้อและใช้วัสดุปลูกซึ่งเป็นดินพื้นที่ของเกษตรกร
5.ใส่หัวเชื้อD_3 และใช้วัสดุปลูกซึ่งเป็นดินพื้นที่ของเกษตรกร
6.ใส่หัวเชื้อKN และใช้วัสดุปลูกซึ่งเป็นดินพื้นที่ของเกษตรกร

ก่อนการย้ายปลูกไหลสตรอเบอรี่ เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ของเกษตรกรแต่ละรายเพื่อนำไปวิเคราะห์หาสมบัติดิน ได้แก่ pH(ดิน:น้ำ 1:1) available P(Bray II) exchageable K (NH_2OAc pH 7) และ extractable trace element ได้แก่ Fe Cu Mn และ Zn(DTPA) ตลอดจนอินทรีวัตถุ บันทึกข้อมูลด้านเปอร์เซนต์ความหนาแน่นของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากสตรอเบอรี่ทั้งก่อนและหลังการย้ายปลูกไหลเป็นเวลา 47 และ 87 วัน บันทึกน้ำหนักแห้ง การสะสมไนโตรเจนและฟอสฟอรัสระยะ 87 วัน บันทึกคุณภาพของผล ได้แก่ ความแน่นเนื้อและปริมาณน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรต(Soluble sugars and carbohydrate)ที่ 87 วันหลังปลูกและน้ำหนักสดของผลตลอดฤดูปลูก ในการเก็บตัวอย่างผลผลิตผลสดใช้ตัวอย่างพืชจำนวน 10 ต้นต่อตำรับจำนวน 4-5 ต้นต่อตำรับ และเก็บผลผลิตวันเว้นวัน โดยเริ่มตั้งแต่เดือน มกราคม จนถึง มีนาคม พอถึงเดือนเมษายนซึ่งเป็นช่วงที่ให้ผลผลิตสูงสุดเก็บผลผลิตทุกวัน จนกระทั่งหมดฤดูกาลผลิต(ปลายเดือนเมษายน) สำหรับการตรวจสอบความหนาแน่นในการติดเชื้อในรากใช้ตัวอย่างพืชจำนวน 5 ต้นต่อตำรับต่อครั้ง และใช้ตัวอย่างจำนวน 90 รากในการตรวจสอบ

ตารางที่ 2 การจัดการกับแปลงปลูกก่อนการย้ายกล้าสตรอเบอรี่ในแปลงปลูกเกษตรกร

การจัดการ [1]	นายเมฆ	นายประเสริฐ	นางประคอง	นายทนง
การใส่ปูนขาว	200(กก./ไร่)	183(กก./ไร่)	200(กก./ไร่)	-
เกรดปุ๋ยที่ใช้	15-15-15	15-15-15	13-13-21	15-15-15
อัตราปุ๋ย	3กก./น้ำ200 ลิตร	3กก./น้ำ200ลิตร	20 กรัม/4 ต้น	3กก./น้ำ200ลิตร
ใส่ปุ๋ยครั้งแรก (หลังปลูก)	10 วัน	7วัน	15วัน	4 วัน
ความถี่ในการใส่ปุ๋ย	ทุก 30 วัน	ทุก 7 วัน	ทุก 15 วัน	ทุก 14 วัน
วันปลูก	24 ต.ค. 43	6 พ.ย. 43	6 พ.ย. 43	6 พ.ย. 43

[1] เป็นวิธีการที่เกษตรกรแต่ละรายปฏิบัติ ข้อมูลได้จากการสอบถาม

รูปที่ 1 ต้นไหลที่ผลิตในพื้นที่ของเกษตรกร บ้านบ่อแก้ว อ. สะเมิง จ. เชียงใหม่

รูปที่ 2 พื้นที่เกษตรกร 4 ราย ที่ อ. ฝาง จ. เชียงใหม่ ซึ่งใช้เป็นแปลงทดลอง