บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 ตรวจสอบลักษณะเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในธรรมชาติ

เก็บดินจากบริเวณรอบรากพืชผัก (Rhizosphear) มาคัดแยกชนิดของสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา โดยวิธี wet-sieving และ50% sucrose gradient centifugation (Brundrett *et al*., 1996) จากนั้นคัดแยกชนิดของสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาออกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยตรวจสอบจากลักษณะต่างๆ คือ รูปร่างสปอร์ สีและขนาดของสปอร์ โดยนำสปอร์แต่ละชนิดมาทำสไลด์กับสารละลาย PVLG (polyvinyl lactoglycerol) และสารละลายผสมของ PVLG + Melzer's reagent (1 : 1 v/v) (Gai *et al.*,2006) โดยหยดสารทั้ง 2 ชนิด คนละจุดบนแผ่นสไลด์ เพื่อเปรียบเทียบการติดสี แล้วใช้พู่กันเขี่ยสปอร์ให้ติดอยู่ปลายพู่กัน เพื่อนำมาใส่ในสารละลายทั้ง 2 จุด แล้วปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์และจัดจำแนกชนิดของสปอร์โดยใช้ข้อมูล Taxonomic criteria (Schenck and Perez, 1990) โดยตรวจดูรูปร่าง ขนาด สี ลักษณะผิวของสปอร์ จำนวนชั้นของสปอร์ และการจัดเรียงตัวของสปอร์ (สมจิตร, 2549)

3.1.1 การคัดแยกและการนับสปอร์

โดยนำดินประมาณ 100 กรัม แช่ในน้ำ 400 มล. แช่ทิ้งไว้นาน 30 นาที จากนั้นคนด้วยแท่งแก้ว 10 นาที ปล่อยไว้ให้ตกตะกอน 1 นาที แล้วเทผ่านตะแกรงขนาด 2.0 มม., 850, 500, 250 และ 125 μm. ล้างดินส่วนที่ค้างในตะแกรงขนาด 125 μm. ไปปั่นเหวี่ยงกับน้ำสะอาด ที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำใสและตะกอนที่ลอยอยู่ด้านบนทิ้ง และเหลือตะกอนดินอยู่ก้นหลอด จากนั้นเติมสารละลาย 50% sucrose แล้วเขย่าเพื่อให้ตะกอนก้นหลอดกระจายตัวอยู่ในสารละลาย แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที สปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา จะลอยอยู่ในสารละลาย sucrose จากนั้นเทสารละลาย sucrose ลงในภาชนะรองที่มีขนาด 20 μm. แล้วล้างน้ำให้สะอาด (Brundrett *et al*., 1996) จากนั้นล้างสปอร์ที่ติดบนตะแกรงลงบนกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 ทำการเก็บสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ที่กำลังขยาย 4 เท่า หรือเก็บสปอร์ไว้ใน Ringer solution(Frank *et al*., 2000) ซึ่งเป็นสารละลายที่ช่วยรักษาการรอดชีวิตของสปอร์ (ตารางภาคผนวกที่ 5) จากนั้นนำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สปอร์ใส่ใน Ringer's solution โดยวัดปริมาตร 25 ml. คนให้สปอร์กระจายตัวในสารละลาย แล้วใช้กระบอกตวงมา 1 ml. ใส่กระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 ทำการนับสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ที่กำลังขยาย 4 เท่า โดยทำการนับ 5 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย นำมาเปรียบเทียบกับปริมาตร 25 ml.(Millner and Kitt, 1992) นำมาคำนวณเป็นจำนวนสปอร์ / มิลลิลิตร

3.2 การเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง

เนื่องจากสปอร์ที่เก็บในแปลงผักมีปริมาณน้อย จึงจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณสปอร์ โดยการปลูกเชื้อ สกุล *Glomus* sp. และ สกุล *Gigaspore* sp. กับผักกาดหอมใบแดง เนื่องจากสปอร์ที่ได้นี้ เก็บมาจากแปลงปลูกผักกาดหอมใบแดง โดยใช้สปอร์จำนวน 50 สปอร์/ต้น เนื่องจากจำนวน 50 สปอร์นี้เป็นจำนวนที่ต่ำสุดที่จะสามารถเข้ารากได้ (สมจิตร, 2549) ตามวิธีข้อที่ 3.2.1 เมื่อครบ 1 เดือน (Lee and George, 2005) นำมาเพิ่มจำนวนโดยวิธีของระบบไฮโดรโพนิคแบบ Deep water culture ในถังสารละลายธาตุอาหารขนาด 5 ลิตร ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศ ผ่านหินพรุน (Hawkins and George, 1997) เป็นเวลา 1 เดือน โดยเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารใหม่ทุกๆ 1 สัปดาห์ และปรับค่า pH ให้อยู่ที่ 6.8 ทุกวัน จากนั้นทำการคัดแยกสปอร์ตามวิธีข้อที่ 3.1.1 เพื่อให้ได้ปริมาณสปอร์ที่มากกว่าและเป็นการทดสอบเชื้อเบื้องต้นว่าสามารถขยายพันธุ์ในระบบไฮโดรโพนิคได้หรือไม่ ครั้งนี้พบว่าสกุล *Gigaspore* sp. ไม่พบการเข้ารากจึง ทำการปลูกเฉพาะเชื้อ สกุล *Glomus* sp.

3.2.1 การปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและการเพาะกล้าผักกาดหอมใบแดง

โดยการนำสปอร์ใส่หลอด centrifute เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว หยด Tween 80 1 หยด นำไปปั่นเหวี่ยง 1-2 นาที เทน้ำออก เติม 2% chloramin T นำไปปั่นเหวี่ยง 10 นาที 2 ครั้ง แล้วเทน้ำออก แล้วเติมส่วนผสมของ streptomycin sulphate และ 0.5% gentamycin sulphate นำไปปั่นเหวี่ยง 1-2 นาที 5 ครั้ง เทน้ำออก (ST-Arnaud, 1996) นำสปอร์ที่ได้มาใส่ในทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตร.ม. ใส่ในถาดเพาะสำหรับปลูกพืชในระบบไฮโดรโพนิคส์ขนาด 30 ml. จากนั้นเพาะเมล็ดผักกาดหอมใบแดงที่ผ่านการฆ่าเชื้อผิว โดยเทเมล็ดที่จะเพาะทั้งหมดใส่ใน 70% ethanol เขย่า 5 นาที แล้วเทสารละลาย sodium hypochlorite (0.9% e/v, available chlorine) ใส่ในขวดเมล็ดเขย่า 20 นาที เทสารละลายออก แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจนแน่ใจว่าสะอาด (Cao *et al*., 2004) หลังจากนั้นปลูกลงในทรายที่เตรียมไว้แล้วจำนวน 3 เมล็ด/หลุม นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C ภายใต้แสงที่มีความเข้ม 75,000 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชม./วัน เมื่อต้นกล้างอกถอนแยกให้เหลือจำนวน 1 ต้น รดด้วยสารละลาย ¼

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Hoagland จนครบ 1 เดือน เนื่องจากจำเป็นต้องเลี้ยงต้นผักกาดหอมใบแดงให้มีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นก่อน

3.3 การทดสอบปริมาณสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิด *Glomus* sp. ที่มีต่อการเข้ารากของผักกาดหอมทั้ง 4 สายพันธุ์

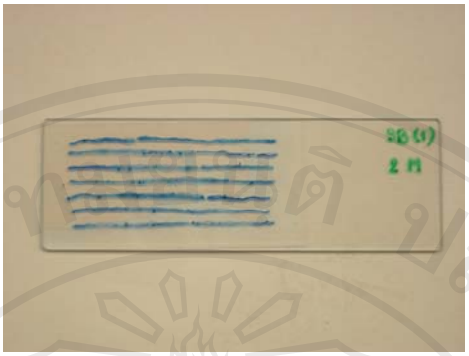
เมื่อคัดแยกสปอร์ได้แล้วจึงทำการคัดเลือกเฉพาะเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสกุล *Glomus* sp. มาทำการทดลองต่อ เพื่อให้ทราบปริมาณสปอร์และชนิดของผักกาดหอมที่เหมาะสมต่อการเข้าราก โดยวางแผนการทดลองเป็น Factorial แบบ CRD โดยมี 2 ปัจจัย จำนวน 5 ซ้ำ โดยปัจจัยที่1 คือ จำแนกสปอร์ชนิด *Glomus* sp. มีทั้งหมด 5 ระดับ ได้แก่ 0, 25, 50, 75, 100 และ 200 สปอร์ โดยใช้สปอร์ที่ขยายพันธุ์จากระบบไฮโดรโพนิคข้อที่ 3.2 ปัจจัยที่ 2 คือ สายพันธุ์ผักกาดหอมมี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ R1 (Red leaf), As (Asmerunda), Cos (สลัดCos) และHead ทำโดยนำจำนวนสปอร์ไมคอร์ไรซาชนิด *Glomus* sp. แต่ละระดับ ทำการทดสอบหาปริมาณสปอร์ที่น้อยที่สุดที่สามารถเข้ารากได้ โดยนำเมล็ดผักกาดหอมทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ R1, As, Cos และ Head มาทำการปลูกเชื้อ *Glomus* sp. แต่ละระดับ ตามวิธีข้อที่ 3.1.2 จากนั้นนำไปตรวจสอบการเข้ารากผักกาดหอมของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ตามวิธีข้อที่ 3.1.3 ดังรูปที่ 3

3.3.1 วิธีการตรวจสอบการเข้าราก

ทำโดยการ นำตัวอย่างรากของต้นผักกาดหอมที่ปลูกเชื้อไมคอร์ไรซานาน 1 เดือน ล้างให้สะอาด แล้วผ่านกระบวนการ clearing root โดยใช้สารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH solution) เข้มข้น 10% (w/v) แช่ไว้เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำรากมาล้างด้วยน้ำสะอาด และแช่ในสารละลายไฮโดรคลอริก (HCL solution) เข้มข้น 1% (v/v) เป็นเวลา 24 ชม. แล้วนำมาล้างด้วยน้ำสะอาดและนำมาแช่ในสารละลาย water blue 0.06% (ตารางภาคผนวกที่ 2) เพื่อย้อมสีราก จากนั้นนำรากที่ย้อมสีแล้วมาตัด (section) แล้ววางบนสไลด์ที่หยดสารละลายกลีเซอรีน วางในแนวขวาง โดยทำการตัดรากให้มีความยาวแถวละ 4.5 ซม. จำนวน 7 แถว/สไลด์ แล้วปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ (รูปที่ 2) จากนั้นนำไปตรวจสอบการเข้ารากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้ารากตามสูตรดังนี้ (Asif, 1997)

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2 ลักษณะการ section ราก

รูป 3 การปลูกผักกาดหอมทดสอบปริมาณสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิด *Glomus* sp. ที่มีต่อการเข้ารากของผักกาดหอมทั้ง 4 สายพันธุ์

3.4 การทดสอบชนิดของสารละลายต่อการเจริญเติบโตของพืชอาศัยและการผลิตสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

เมื่อทราบชนิดสปอร์ และปริมาณสปอร์ที่เหมาะสมต่อการเข้ารากของผักกาดหอมแต่ละชนิดแล้ว จึงนำมาทำการทดสอบว่าสารละลายชนิดใดที่เหมาะสมต่อการเข้าราก โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำทำการปลูกเชื้อ โดยใช้จำนวน 50 สปอร์ ที่ได้จากการขยายโดยระบบไฮโดรโพนิคที่เก็บไว้ 1เดือน เนื่องจากการทดลองที่ 3 จำนวนสปอร์ 50 สปอร์/ต้น เป็นจำนวนน้อยสุดที่ทำให้เกิดการเข้ารากได้อย่างน้อย 5 เปอร์เซ็นต์ (Mosse and Thompson, 1979) โดยนำเมล็ดผักกาดหอม มาทำการปลูกเชื้อ *Glomus* sp. ตามวิธีข้อที่ 3.1.2 เมื่อครบ 1 เดือน ย้าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลงสารละลายธาตุอาหาร 4 สูตร ได้แก่ สูตรสารละลายธาตุอาหารของ Hoagland (Millner and Kitt, 1992), modified Hoagland, Elems& Mosse (Elems and Moss, 1984) และ Warner *et al.* (Sieverding, 1991) ซึ่งสูตร modified Hoagland เป็นสูตรที่ใช้ความเข้มข้นเพียง ¼ เท่า ของสารละลาย Hoagland (Millner and Kitt, 1992) เนื่องจากสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะเจริญได้ดีในสารละลายธาตุอาหารต่ำ ใส่ในถังสารละลายธาตุอาหารขนาด 5 ลิตร ในระบบ Deep Water Culture เป็นเวลา 1 เดือน โดยเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารใหม่ทุกๆ 1 สัปดาห์ และปรับค่า pH ให้อยู่ที่ 6.8 ทุกวัน (Jarstfer and Sylvia, 1993) ทำการเจริญเติบโต โดยการวัดความสูงและความกว้างทรงพุ่ม ชั่งน้ำหนักสดหลังสิ้นสุดการทดลอง ตรวจสอบปริมาณการเข้าราก ตามวิธีข้อที่ 3.3.1และปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาตามวิธีข้อที่ 3.1.1 ดังรูปที่ 4

รูป 4 การทดสอบชนิดของสารละลายต่อการเจริญเติบโตของพืชอาศัยและการผลิตสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

3.5 การใช้บัฟเฟอร์ในสารละลายต่อการเข้าราก การสร้างสปอร์ และการเจริญเติบโตของพืช

เมื่อทราบชนิดผักกาดหอม จำนวนสปอร์และสูตรสารละลายที่เหมาะสมแล้ว จึงนำมาทำการทดลองการใช้บัฟเฟอร์ในสารละลายว่ามีผลต่อการเข้าราก การสร้างสปอร์ และการเจริญเติบโตของพืชอาศัยหรือไม่ เนื่องจากการปลูกในระบบไฮโดรโพนิคจะต้องมีการปรับค่า pH ทุกวัน ดังนั้นจึงต้องการใช้บัฟเฟอร์ในการชะลอการเพิ่มขึ้นของ pH วางแผนการทดลองโดยวิธี split-split plot แบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ มี 3 ปัจจัยคือ สารละลายธาตุอาหารสูตร A B และ C เป็น main plot, การปรับ pH เป็น sub plot และ ใส่ MES buffer เป็น sub sub plot โดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลายสูตร C คือสูตรของ Warner *et al*. (Sieverding , 1991) ส่วนสูตร A และB ดัดแปลงมาจากสูตรของ Warner *et al*. (Sieverding, 1991) ซึ่งสูตร A ใช้แหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนจาก NH_4 และสูตร B ใส่ Tace element ในปริมาณที่ต่างกับสูตร C ดังตารางที่ 1 ปัจจัยที่ 2 คือ MES buffer 0.3 mMol (การใส่และไม่ใส่) เพื่อช่วยในการรักษาระดับ pH และปัจจัยที่ 3 เป็น การปรับ pH ทุกๆวัน(ปรับและไม่ปรับ) โดยใช้สปอร์จำนวน 50 สปอร์ ที่ได้จากระบบไฮโดรโพนิคที่เก็บไว้จนแห้ง มาทำการปลูกเชื้อ *Glomus* sp. ตามวิธีข้อที่ 3.1.2 เมื่ออายุครบ 1 เดือน จึงย้ายลงในสารละลายธาตุอาหาร 3 สูตร เปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารใหม่ทุก 1 เดือน นำมาหาน้ำหนักต้นสด, น้ำหนักรากสด, เปอร์เซ็นต์การเข้ารากและจำนวนสปอร์เมื่อสิ้นสุดการทดลองตามวิธีข้อที่ 3.1.1 และ 3.1.3

ตาราง 1 แสดงปริมาณธาตุอาหารของสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร

ธาตุ	**สูตรที่ 1(mg L^{-1})**	**สูตรที่ 2(mg L^{-1})**	**สูตรที่ 3(mg L^{-1})**
N	3.8(NH_4)	3.8(NO_3)	3.8(NO_3)
P	0	0	0
K	10.8	10.8	10.8
Ca	55.9	55.9	55.9
Mg	4.3	4.3	4.3
S	10.04	10.04	10.04
Mn	0.05	50	0.05
Zn	0.05	50	0.05
Cu	0.02	22	0.02
Fe	5.5	5.6	5.6
Mo	0.118	120	0.118
B	0.49	500.2	0.49
Co	0.011	14	0.011
Ca_3PO_4	0.086	0.086	0.086

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 การเปรียบเทียบการสร้างสปอร์ในพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิคแบบ NFT

โดยใช้สปอร์ 3 ชนิด คือ

1. *Glomus* sp 1 (สปอร์ขนาด 125-250 μm.)
2. *Glomus* sp 2 (สปอร์ขนาด 45–125 μm.ที่ได้จากการisolateของ *Glomus*sp1)
3. สปอร์ไมคอร์ไรซาทางการค้า

เมื่อทราบชนิดสปอร์ ปริมาณสปอร์ ชนิดผักกาดหอม และสูตรสารละลายที่เหมาะสมแล้ว จึงนำมาเพาะเชื้อร่วมกับเมล็ดผักกาดหอมใบแดง เนื่องจากผักกาดหอมเป็นพืชอาศัยชนิดหนึ่งของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีปริมาณการเข้ารากสูง เหมาะสมที่จะนำมาเป็นพืชอาศัยในการผลิตหัวเชื้อในอนาคต เพราะเป็นพืชผักทีมีปริมาณรากมาก มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว อายุการเก็บเกี่ยวสั้น (Lee and George, 2005) ทำโดยนำเมล็ดผักกาดหอม มาทำการปลูกเชื้อ *Glomus* sp. แต่ละชนิด โดยใช้สปอร์จำนวน 200 สปอร์ที่ได้จากระบบไฮโดรโพนิค เพื่อให้ได้ปริมาณสปอร์จำนวนมากเมื่อเทียบกับการต้องใช้สารละลายเท่าเดิม ตามวิธีข้อที่ 3.2.1 จำนวน 4 ซ้ำ หลังจากนั้นนำต้นกล้าอายุ 1 เดือนไปปลูกลงในรางระบบ NFT ซึ่งเป็นการปลูกพืชโดยให้รากแช่อยู่ในสารละลายโดยตรง สารละลายจะไหลผ่านรากพืชเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ (โดยทั่วไปมักกำหนดให้น้ำที่ไหลผ่านมีความหนาประมาณ 2-3 mm.) สารละลายไหลหมุนเวียนผ่านรากตลอดเวลา ความยาวของระบบมีตั้งแต่ 5-20 m. แต่ไม่ควรเกิน 20 m. เนื่องจากจะทำให้เกิดความแตกต่างของปริมาณออกซิเจนระหว่างหัวและท้ายระบบได้ ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลายจะมีอิทธิพลต่อความสามารถในการดูดซับธาตุอาหารของรากพืช (อานัฐ, 2548) ดังรูปที่ 5 และใช้ผ้ากรองสปอร์ขนาด 20 μm. เพื่อไม่ให้สปอร์ไหลไปปนกันดังรูปที่ 6 โดยใช้สารละลายธาตุอาหารสูตรของ Warner *et al*. (Sieverding, 1991) เนื่องจากไมคอร์ไรซาสามารถเจริญเติบโตในสารละลายที่ธาตุอาหารต่ำได้ และหลังจากนั้นทำการเก็บข้อมูลน้ำหนักต้นสด, น้ำหนักรากสด, เปอร์เซ็นต์การเข้ารากและจำนวนสปอร์ ตามวิธีข้อที่ 3.1.1 และ3.3.1 ตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง คือ 1, 2 และ 3 เดือน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 5 พืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิคแบบ NFT

รูป 6 ผ้ากรองสปอร์ขนาด 20 μm. ที่ใช้ในระบบ NFT

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7 ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อที่ผลิตได้

ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อด้วยวิธี MPN (most propable number) ซึ่งการหาเปอร์การเข้ารากจะบอกได้เฉพาะปริมาณที่เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ในรากเท่านั้น แต่การหาค่าของ MPN เป็นการหาจำนวนของส่วนขยายพันธุ์ทั้งหมดได้แก่ สปอร์ในดิน สปอร์ในรากและส่วนที่เป็นเส้นใย (Bernhard, 2002) วางแผนการทดลอง Factorial แบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ โดยนำทรายติดเชื้อของสปอร์แต่ละชนิดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในการทดลองที่ 3.6 มาทำการเจือจางระบบ 10 เท่า (10 fold) จาก 10 ถึง 10^{-5} ด้วยทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 5 ซ้ำ โดย dilution 1ใช้หัวเชื้อ 50 ml. ผสมกับทรายที่ฆ่าเชื้อแล้ว 450 ml. คลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วจึงทำ

dilution 2 โดยการนำทรายจาก dilution 1 ปริมาตร 25 ml. ผสมกับทรายที่ฆ่าเชื้อแล้ว 225 ml. ทำเช่นเดียวกันจนถึงdilution 6 หลังจากนั้นเพาะเชื้อร่วมกับเมล็ดผักกาดหอมใบแดงลงในแต่ละความเข้มข้นที่นำมาเจือจาง (Asif, 1997) โดยทำการฆ่าเชื้อที่เมล็ดและทรายตามวิธีข้อที่ 3.2.1 เป็นเวลา 1 เดือน โดยรดสารละลาย ¼ Hoagland (low P) ทุกๆ 1 สัปดาห์ เก็บข้อมูลโดยบันทึกผลการเข้ารากและจำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาตามวิธีการข้อที่ 3.1.1 และ 3.3.1 นำไปเทียบหาจำนวนสปอร์ในตาราง MPN เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการเข้ารากของหัวเชื้อที่ผลิตได้ ดังสูตรคำนวณดังนี้

ปริมาณเชื้อ (ส่วนขยายพันธุ์/มิลลิลิตร) = MPNในตาราง × dilution สุดท้ายที่นำมาคำนวณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved