บทที่ 3
วิธีการวิจัยและสถานที่ดำเนินการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 การรวบรวม คัดเลือกโดยเก็บ และทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไมคอร์ไรซาต่อการดูดซับฟอสฟอรัสของข้าวไร่ และข้าวโพด

1. การรวบรวมสายพันธุ์เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาท้องถิ่นจากพื้นที่ต่างๆ ที่อยู่ภายใต้การดูแลของโครงการขยายผลโครงการหลวงโป่งคำ

1.1) รวบรวมข้อมูลดินประกอบด้วยข้อมูลการใช้ประโยชน์ที่ดิน สมบัติของดินวิเคราะห์ค่า EC, pH และธาตุอาหารในดินของพื้นที่โครงการขยายผลโครงการหลวงโป่งคำ

1.2) การเก็บตัวอย่างดิน เก็บแบบ Composite sample ระดับความลึก 0-15 cm จากแปลงเกษตรกรในพื้นที่ขยายผลโครงการหลวงโป่งคำ โดยเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่การใช้ที่ดินแบบต่างๆ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงพื้นที่การใช้ที่ดินจากป่ามาเป็นพื้นที่ทำการเกษตรมีผลต่อชนิดและจำนวนของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ตลอดจนสมบัติของดินมีความสัมพันธ์อย่างไรต่อจำนวนและชนิดเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมบัติของดินที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากการเกษตร ซึ่งได้เก็บตัวอย่างดินจำนวน 10 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วย

1. เก็บตัวอย่างดินในบริเวณป่าชุมชนจุดที่ 1 มีพันธุ์ไม้หลากหลาย แต่มีไม้เด่น คือ ประดู่และยางนา โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณในป่าลึก จำนวน 1 ตัวอย่าง
2. เก็บตัวอย่างดินในบริเวณป่าชุมชนจุดที่ 2 มีพันธุ์ไม้หลากหลาย แต่มีไม้เด่น คือ ประดู่และยางนา โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณบริเวณในป่าลึก โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณข้างในป่า จำนวน 1 ตัวอย่าง
3. เก็บตัวอย่างดินในบริเวณป่าชุมชน มีพันธุ์ไม้หลากหลาย แต่มีไม้เด่นคือประดู่และยางนา โดยเก็บดินในพื้นที่ใต้ต้นไม้ 1 ตัวอย่าง
4. เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบป่าชุมชน จุดที่ 1 มีพันธุ์ไม้หลากหลาย แต่มีไม้เด่น คือ ประดู่และยางนา โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณชายป่า จำนวน 1 ตัวอย่าง
5. เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบป่าชุมชน จุดที่ 2 มีพันธุ์ไม้หลากหลาย แต่มีไม้เด่น คือ ประดู่และยางนา โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณชายป่า จำนวน 1 ตัวอย่าง
6. เก็บตัวอย่าง ดินในแปลงปลูกข้าวโพดของนางดวงนภา มีลักษณะเป็นพื้นที่ลาดชัน มีเศษซังข้าวโพดปกคลุมทั่วพื้นที่ จำนวน 1 ตัวอย่าง

7. เก็บตัวอย่างดินในแปลงปลูกข้าวโพด นายอินปัน มีลักษณะเป็นพื้นที่ลาดชัน มีเศษซังข้าวโพดปกคลุมทั่วพื้นที่ จำนวน 1 ตัวอย่าง

8. เก็บตัวอย่างดินในแปลงปลูกข้าวไร่ นายจันทร์ มีลักษณะเป็นพื้นที่ลาดชัน มีเศษตอซังข้าวปกคลุมทั่วพื้นที่ จำนวน 1 ตัวอย่าง

9. เก็บตัวอย่างดินในแปลงปลูกข้าวไร่นางคำผง มีลักษณะเป็นพื้นที่ลาดชัน มีต้นหญ้าและเศษตอซังข้าวปกคลุมทั่วพื้นที่ จำนวน 1 ตัวอย่าง

10. เก็บตัวอย่าง ดินในแปลงปลูกข้าวไร่นางบุญเรือง มีลักษณะเป็นพื้นที่ลาดชัน มีต้นหญ้าและเศษตอซังข้าวปกคลุมทั่วพื้นที่ จำนวน 1 ตัวอย่าง

1.3) การแยกสปอร์เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดิน โดยชั่งดินสด 100 กรัม เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที แล้วคนต่ออีก 10 นาที นำดินไปร่อนผ่านตะแกรงร่อนดินขนาด 500, 250, 125 และ 45 ไมโครเมตร แล้วนำดินที่ร่อนแบ่งใส่หลอดเซนติฟิวส์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 2000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 5 นาที รินน้ำส่วนที่ใสทิ้ง แล้วเติมซูโครส 50% ลงไปในหลอดเซนติฟิวส์นำไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที สปอร์อาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะลอยอยู่บนซูโครส จากนั้นเทซูโครสลงในตะแกรงร่อนขนาด 45 ไมโครเมตร ชะส่วนที่เหลือจากตะแกรงลงหลอดเซนติฟิวส์หรือบีกเกอร์ด้วยสารละลายริงเกอร์ (Ringer's Solution) ใช้ไมโครปิเปตดูดสปอร์วางบนกระดาษกรอง ส่องสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า แล้วนำสปอร์ที่ได้เก็บในขวดที่มีสารละลายริงเกอร์ (Ringer's Solution) ซึ่งเป็นสารละลายที่ช่วยรักษาการรอดชีวิตของสปอร์

1.4) การจำแนกชนิดของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา โดยวิธีของ Morton and Benny (1990)

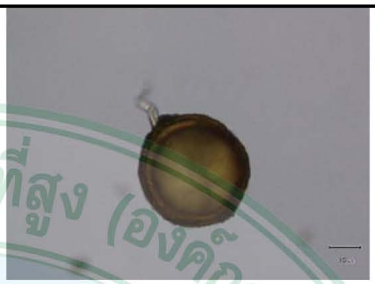
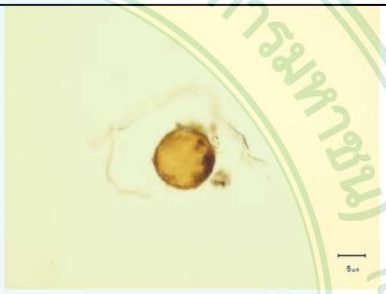
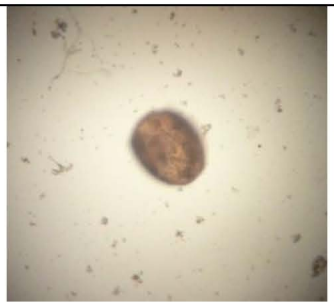
2. คัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในการทดสอบการดูดซับฟอสฟอรัสของข้าวไร่และข้าวโพด โดยอ้างอิงจากเชื้อไมคอร์ไรซาที่สามารถดูดซับฟอสฟอรัสได้สูงในงานวิจัยเดิม และชนิดเชื้อไมคอร์ไรซาที่พบปริมาณสูงในตัวอย่างดินจากโครงการขยายผลโครงการหลวงโป่งคำ

ชนิดของสายพันธุ์เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณนั้น สามารถบ่งบอกถึงความสามารถในการอยู่รอดหรือความสามารถในการปรับตัวได้ของเชื้อราดังกล่าว

คัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในการทดสอบการดูดซับฟอสฟอรัสของข้าวไร่และข้าวโพด โดยอ้างอิงจากเชื้อไมคอร์ไรซาที่สามารถดูดซับฟอสฟอรัสได้สูงในงานวิจัยเดิมและ

ชนิดเชื้อไมคอร์ไรซา ที่พบปริมาณสูงในตัวอย่างดิน จากโครงการขยายผลโครงการหลวงโป่งคำ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดเชื้อไมคอร์ไรซา ที่พบปริมาณสูงในตัวอย่างดิน

เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	รูปเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา
G. geosporum	
G. etunicatum	
G. geosporum + *G. etunicatum*	
A. foveata	
G. mosseae	

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

3. ขยายสายพันธุ์เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในการทดสอบการดูดซับฟอสฟอรัสในกระถาง

วิธีดำเนินการ

นำดินชุดน้ำพอง (ช่วงเพาะขยายของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เพราะดินน้ำพองมีลักษณะเป็นดินเนื้อหยาบ เป็นดินที่มีธาตุอาหารต่ำโดยเฉพาะฟอสฟอรัส ทำให้เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเข้าสู่รากของพืชได้เร็ว เหมาะแก่การนำมาเพาะและขยายสปอร์หัวเชื้อ (ธงชัย , 2550)) มาผึ่งให้แห้งด้วยลม แล้วร่อนผ่านตะแกรง 2 มิลลิเมตรผสมกับทรายละเอียดอัตราส่วน 1:1 เตรียมท่อขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร จากนั้นนำดินอบฆ่าเชื้อในดินด้วยการอบด้วยกำลังความร้อนแสงอาทิตย์ ซึ่งคลุมดินที่อบด้วยพลาสติกใสหนานาน 7 วัน

เตรียมสปอร์เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 5 ชนิด ดังนี้

ตารางที่ 5 ชนิดของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและปริมาณการใช้

ชนิดของเชื้อ	กรัม/ท่อ
G. geosporum	200
G. etunicatum	200
G. geosporum* + *G. etunicatum	200
A. foveata	200
G. mosseae	200

ตารางที่ 6 คุณสมบัติของดินน้ำพอง

คุณสมบัติ	ปริมาณ
pH	6.56
EC	2.46 µS/m
%OM	1.72%
PO_4-P	4.45 mg kg^{-1}

ภาพที่ 1 เตรียมท่อเพื่อขยายสปอร์เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (15 กุมภาพันธ์ 57)

ภาพที่ 2 นำดินที่ร่อนผสมทรายอัตราส่วน 1:1 (17 กุมภาพันธ์ 57)

นำหัวเชื้อดินมาใส่รองก้นหลุมปลูก จากนั้นนำต้นกล้าข้าวโพด อายุ 7 วัน มาปลูกลงในกระถาง

ภาพที่ 3 ข้าวโพดหลังปลูกได้ 15 วัน (25 มีนาคม 57)

ตารางที่ 7 ต้นทุนโดยประมาณการในการผลิตหัวเชื้อดินในสภาพแปลงขนาด 1 x 3 เมตร เพื่อให้ปุ๋ยหัวเชื้อดิน 1,000 กิโลกรัม

รายละเอียด	บาท
1. ค่ายกร่องแปลง	20
2. แผ่นพลาสติกคลุมแปลง	60
3. เมล็ดข้าวโพด	15
4. น้ำ	20
5. แม่ปุ๋ยยูเรีย ,0-46-0 และ 0-0-60	20
6. สปอร์หัวเชื้อ	0
ทั้งหมด	**135**

4. ทดสอบสายพันธุ์เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีความสามารถในการดูดซับฟอสฟอรัสในการปลูกข้าวไร่และข้าวโพดในสภาพกระถาง

4.1) แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 4 ซ้ำ โดยมี 6 ทรีทเมนต์ ดังนี้ ทรีทเมนต์ที่ 1 Control (ไม่ใส่เชื้อไมคอร์ไรซา) ทรีทเมนต์ที่ 2 ใส่หัวเชื้อ *G.geosporum* 25 กรัมต่อต้น ทรีทเมนต์ที่ 3 ใส่หัวเชื้อ *G. etunicatum* 25 กรัมต่อต้น ทรีทเมนต์ที่ 4 ใส่หัวเชื้อ *G. geosporum*+ *G. etunicatum* 25 กรัมต่อต้น ทรีทเมนต์ที่ 5 ใส่หัวเชื้อ *A. foveata* 25 กรัมต่อต้น ทรีทเมนต์ที่ 6 ใส่หัวเชื้อ *G. mosseae* 25 กรัมต่อต้น

ตารางที่ 8 ชนิดของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและปริมาณการใช้

ชนิดของเชื้อ	สัญญาลักษณ์	กรัม/กระถาง	สปอร์/ดินหัวเชื้อ 25กรัม
G. geosporum	(GG)	25	115
G. etunicatum	(GE)	25	106
G. geosporum*+ *G. etunicatum	(G+E)	25	112
G. mosseae	(GM)	25	98
A. foveata	(AF)	25	103

4.2) การเพาะและขยายสปอร์ของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในสภาพกระถาง (Pot culture)

การเพาะเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา สามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรานี้ให้เจริญร่วมกับข้าวโพด โดยการนำดินชุดน้ำพองและทรายมาผึ่งลมให้แห้ง แล้วร่อนผ่านตะแกรง 2 มิลลิเมตรผสมกับทรายละเอียดอัตราส่วน 1-1 เตรียมท่อขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร จากนั้นนำดินอบฆ่าเชื้อในดินด้วยการอบด้วยกำลังความร้อนแสงอาทิตย์ ซึ่งคลุมดินที่อบด้วยพลาสติกใสหนานาน 7 วัน นำหัวเชื้อดินมาใส่รองก้นหลุมปลูก จากนั้นนำต้นกล้าข้าวโพด อายุ 7 วัน มาปลูกลงในกระถาง เมื่อข้าวโพดอายุ 12 สัปดาห์ ได้ตัดต้นข้าวโพดออกโดยเหลือไว้เฉพาะรากข้าวโพดและดินหัวเชื้อ จากนั้นทำการเก็บดินหัวเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

4.3) การเตรียมดินปลูกและต้นพืชทดลอง

ข้าวไร่สายพันธุ์พื้นเมือง

นำดินจากพื้นที่โป่งคำ จ . น่าน ที่เก็บที่ระดับ 0-10 เซนติเมตร (pH = 5.01, Available P = 7.60 mg kg^{-1}, Exchage.K = 6.7 mg kg^{-1}, Extrac. Ca = 188 mg kg^{-1}, SOC = 3.4 % และเนื้อดินร่วนปนทราย (Sand (38.5 %) Clay (33.5 %) และ Silt (28 %)) มาผึ่งให้แห้งด้วยลม แล้วร่อนผ่านตะแกรง 2 มิลลิเมตร ชั่งดิน 3,000 กรัม ใส่กระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 × สูง 7.5 เซนติเมตร นำสปอร์ของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่เตรียมไว้รองก้นหลุมปลูก 25 กรัมต่อต้น แล้วนำต้นเมล็ดข้าวไร่ที่แช่น้ำไว้ 1 คืน มาปลูก โดยปลูกกระถางละ 1 ต้น ที่ระดับความลึกของดิน 2 เซนติเมตร มีการให้น้ำนั้นมีการควบคุมความชื้นที่ระดับ 0.3 bar ของดินดังกล่าวโดยการชั่งน้ำหนักก่อนการให้น้ำแต่ละวัน โดยมีน้ำหนักทั้งหมดประมาณ 3,429 กรัมต่อกระถาง การใส่ปุ๋ยครั้งที่ 1ใส่ปุ๋ยหลังปลูก 20 วัน ใช้ปุ๋ยแอมโมเนียมฟอสเฟตสูตร 16-20-0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่รวมกับปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ (0-0-60) อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ และการใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยหลังปลูก 20 วัน ใช้ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต (21-0-0) อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวอายุได้ 60 วัน ทำการเก็บเกี่ยว และนำตัวอย่างพืชดำเนินการวิเคราะห์ธาตุอาหารต่อไป

ภาพที่ 4 การเตรียมดินเพื่อปลูกข้าวไร่สายพันธุ์พื้นเมือง

ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พันธุ์ CP888

นำดินจากพื้นที่โปงคำ จ . น่าน ที่เก็บที่ระดับ 0-10 เซนติเมตร (pH = 5.20, Available P = 7.20 mg kg^{-1}, Exchage.K = 68.7 mg kg^{-1}, Extrac. Ca = 38 mg kg^{-1}, SOC = 2.9 % และเนื้อดินร่วนปนทราย (Sand (38.5 %) Clay (33.5 %) และ Silt (28 %)) ขั้นตอนต่อมา ปฏิบัติเช่นเดียวกับการปลูกข้าวไร่ ดังได้กล่าวไว้ข้างต้น แต่นำต้นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ CP888 มาปลูกโดยปลูกกระถางละ 1 ต้น

ภาพที่ 5 การเตรียมดินเพื่อปลูกข้าวโพดพันธุ์ CP888

4.4) การตรวจหาเชื้อราอาบัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซาในรากข้าว (Root colonization)

การตรวจหาเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากด้วยการย้อมสีรากพืช ตามวิธีของ Mc Gonigle และคณะ (Mc Gonigle et al., 1990) โดยนำตัวอย่างรากพืชมาล้างน้ำให้สะอาด ตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 10 เซนติเมตร นำไปต้มในน้ำยาโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (10% KOH) อุณหภูมิประมาณ 121 องศาเซลเซียส นานประมาณ 4 นาที แล้วล้างด้วยน้ำจนไม่มีน้ำยา KOH ติดอยู่ จากนั้นซับพอหมาด นำไปย้อมด้วย 0.05% trypan blue ใน lactoglycerol ที่อุณหภูมิไม่เกิน 121 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จากนั้นนำรากวางบนสไลด์แล้วส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์

4.5) การบันทึกผลการทดลอง

วัดความสูงของต้น โดยใช้ตลับเมตรวัดทุก ๆ 7 วันหลังปลูก (วัดจากโคนลำต้นถึงยอด) นำต้นข้าวไปอบด้วยอุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้งและทำการวิเคราะห์ธาตุ P (HNO_3 + $HClO_4$) (Jackson, 1973)

4.6) การคำนวณ

$$\text{Mycorrhizal responsiveness (MR)} = \frac{[Plant\ dw\ (+AMF) - Plant\ dw\ (-AMF) \times 100]}{\text{Plant dw(-AMF)}}$$ (Hetrick *et al.*, 1992)

$$\text{Mycorrhizal P (responsiveness (MPR))} = \frac{[P\ uptake(+AMF) - P\ uptake\ (-AMF) \text{x} 100]}{\text{P uptake (-AMF)}}$$

4.7) การวิเคราะห์ข้อมูล

หาความสัมพันธ์ระหว่าง MR และ MPR แล้วนำไปหาความสัมพันธ์กับค่า P uptake โดยคำนวณค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) และสมการทดถอย และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยใช้วิธี LSD (Least significant difference)

กิจกรรมที่ 2 ผลิตหัวเชื้อเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อส่งมอบให้สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูงไปทดสอบในแปลงเกษตรกร

1. อบฆ่าเชื้อดินที่จะใช้ขยายหัวเชื้อไมคอร์ไรซาด้วยความร้อนจากแสงอาทิตย์ แล้วคลุมดินที่อบด้วยพลาสติกใสหนานาน 7 วัน
2. ปลูกข้าวโพดเป็นพืชอาศัย แล้วใส่สปอร์ของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา
3. เก็บเกี่ยวข้าวโพดอายุประมาณ 12 สัปดาห์ ซึ่งจะเป็นระยะที่มีการผลิตสปอร์เต็มที่ โดยการตัดพืชเหนือดิน
4. เก็บดินพร้อมรากพืชอาศัย นำมาผึ่งให้แห้งด้วยลม แล้วใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง แต่การผลิตหัวเชื้อวิธีนี้จะต้องควบคุมการที่ถูกปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ดังนั้นจึงควรมีการดูแลรักษาแปลงปลูกอย่างดี เพื่อให้ได้เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ปราศจากการปนเปื้อน
5. ส่งมอบหัวเชื้อไมคอร์ไรซาเพื่อให้สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูงไปทดสอบในแปลงเกษตรกร

สถานที่ดำเนินการวิจัย

พื้นที่ทำงานวิจัย : คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้