บทที่ 3
ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการ

3.1 วัสดุอุปกรณ์

- เครื่องแก้วและสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลินทรีย์
- วัสดุทางการเกษตร เช่น ปุ๋ยเคมี เมล็ดพันธุ์มะละกอ ระบบน้ำหยด กระถาง เป็นต้น
- เครื่องปั่นเหวี่ยง

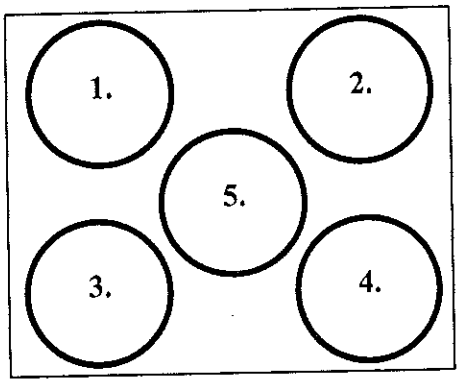
3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงาน

โครงการวิจัยย่อยที่ 1.

1. การสำรวจเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกมะละกอ

ทำการสำรวจ และเก็บตัวอย่างรากมะละกอและดินที่อยู่บริเวณรอบๆ ราก ซึ่งเจริญในแปลงเพาะปลูกในจังหวัดมหาสารคาม ขอนแก่น กาฬสินธุ์ และ ร้อยเอ็ด ทั้งนี้ เนื่องจาก เชื้อรา อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้แตกต่างกัน ทั้งนี้ เนื่องจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น ความเป็นกรด ด่างของดิน โครงสร้างของดิน อุณหภูมิ และสารอาหารในดิน เป็นต้น ดังนั้น การคัดเลือกเชื้อราที่มีอยู่ในพื้นที่เพาะปลูกเป็นสิ่งสำคัญ หากนำเชื้อรานั้นไปใช้จริงในสภาพแปลงปลูก โดยทำการเก็บตัวอย่างตามวิธีของ โสภณ (2540) โดยขุดดินรอบๆ รากต้นพืชที่เจริญในดินดังกล่าว

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างรากมะละกอและดินรอบๆ รากต้นมะละกอ ในแปลงปลูกมะละกอใน บ. บะตะกา อ.โพนทอง จ. ร้อยเอ็ด ทำการเก็บดินและราก จากแปลงปลูกมะละกอทั้งหมด 4 แปลง ซึ่งมีขนาดแปลงๆ ละ 8 ไร่ โดยในแต่ละแปลง ทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจำนวน 5 จุด จุดละ 2 ซ้ำ (ภาพที่ 1) รวมจำนวนตัวอย่างดินและรากทั้งสิ้น จำนวนอย่างละ 40 ตัวอย่าง นำทั้งรากและดินใส่ถุงสำหรับเก็บตัวอย่าง และนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการต่อไป



แผนภาพบริเวณการเก็บดินรอบรากมะละกอ และรากมะละกอ ในแปลงเกษตรกรรม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ระดับ 0 หมายถึง ไม่พบการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซาในราก

ระดับ 1 หมายถึง การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซาในรากน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์

ระดับ 2 หมายถึง การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซาในรากน้อยกว่า เปอร์เซ็นต์

ระดับ 3 หมายถึง การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซาในราก 11-50 เปอร์เซ็นต์

ระดับ 4 หมายถึง การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซาในราก 51-90 เปอร์เซ็นต์

ระดับ 5 หมายถึง การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซาในราก มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

คำนวณหาค่าความหนาแน่นของการเข้าอยู่อาศัยในรากพืชของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา โดย

สมการ $\%M = (90n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1)/N$

เมื่อ %M = เปอร์เซ็นความหนาแน่นของการเข้าอยู่อาศัยในรากพืช

N = จำนวนชิ้รากทั้งหมดที่นำมาตรวจการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา ในรากพืช

$n_5\ n_4,\ldots n_1$ = จำนวนชิ้นรากที่พบการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา ในรากพืชที่ระดับ 5,4,....1 ตามลำดับ

4. การเพิ่มปริมาณสปอร์เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดต่างๆ

การเพิ่มปริมาณเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทำโดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณในกระถาง (pot culture) โดยแยกสปอร์จากดินตัวอย่างตามวิธีของ Gerdemann และ Nicolson (1969) มาฆ่าเชื้อที่ผิวสปอร์โดยวิธีของ สาวิตรี (2536) แล้วปลูกลงในกระถางบรรจุดินที่อบฆ่าเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 นิ้ว โดยใช้ข้าวโพดเป็นพืชอาศัยซึ่งต้องฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วย sodium hypochlorite เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการปลูกทดลองเป็นเวลา 90 วัน ในเรือนทดลอง และตรวจวัดผล โดยการตรวจนับจำนวนสปอร์ ของเชื้อราและตรวจวัดการเข้าอยู่ อาศัยของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากพืช โดยปฏิบัติตามวิธีในข้อ 1 และ 2 ตามลำดับ

4.1 การเตรียมกล้าเชื้อรา อาร์บัสคูลาร์ ไมคอไรซา

นำสปอร์ในแต่ละตัวอย่างดิน มาทำการเพิ่มปริมาณในกระถาง (pot cullture) โดยแยกสปอร์ด้วยวิธี Wet sieving and decating (Gerdemann และ Nicolson, 1969) แล้วล้างฆ่าเชื้อที่ผิวสปอร์ด้วยสารละลายคลอรามีน-ที (chloramin-T) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง (สาวิตรี, 2536)

4.2 การเตรียมเมล็ดพืช

ใช้เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นพืชอาศัยสำหรับการเพิ่มปริมาณสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา โดยนำเมล็ดข้าวโพดแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที และล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วเพาะเมล็ดในจานอาหารที่มีความชื้น 2-3 วัน

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

4.3 การเตรียมดิน

โดยใช้ดินซึ่งมีลักษณะเป็นดินร่วนปนทรายเก็บเศษก้อนหิน เศษไม้ และเศษพืชต่างๆออก เก็บใส่ถุงพลาสติก 2 ชั้น ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งค้างคืนแล้วนำไปอบฆ่าเชื้ออีกครั้ง โดยใช้อุณหภูมิ ความดัน และเวลาเท่าเดิม แล้วบรรจุในกระถางเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว

4.4 การปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา

นำเมล็ดข้าวโพดที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2 ไปปลูกในกระถางพลาสติกที่เตรียมไว้ในข้อ 4.3 กระถางละ 5 เมล็ด นำสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา ชนิดต่างๆ ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 ใส่ลงไปรอบๆ เมล็ดข้าวโพดกลบดิน รดด้วยน้ำกรอง เมื่อต้นกล้าเจริญได้ 1 สัปดาห์ จึงถอนต้นที่อ่อนแอ หรือต้นที่มีขนาดเล็กทิ้งไป เหลือต้นที่แข็งแรง และมีขนาดใกล้เคียงกัน 3 ต้น รดน้ำทุกวัน ทำการปลูกทดลองเป็นเวลา 90 วัน

4.5 การตรวจวัดผล

4.5.1 การตรวจนับการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.

4.5.2 การตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2.

5. การแยกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (Phosphate Solubilizing Bacteria, PSB)

นำตัวอย่างดินจากบริเวณแปลงปลูกมะละกอจากข้อที่ 1. โดยแช่ดินตัวอย่างในถังน้ำแข็งในระหว่างขนส่ง แล้วนำดินมาทำเจือจางแบบ 10 fold serial dilution ที่ระดับ 10^{-4} ถึง 10^{-6} แล้วนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar (Pikovskaya, 1948) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน แล้วตรวจสอบแบคทีเรีย PSB ซึ่งสร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

6. การตรวจสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย PSB

นำตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้ตามวิธีในข้อ 5 ทั้งหมด มาเลี้ยงเชื้อในอาหาร Pikovskaya's broth บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 72 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสข้างบน (supernatant) มาตรวจหาปริมาณฟอสเฟตด้วยวิธี molybdenum blue method (Murphy และ Riley, 1985) โดย ดูดสารละลายส่วนใส 2 ml มาใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml จากนั้นเติม Vanadate-Molybdate reagent ปริมาตร 10 ml ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 100 ml ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัด % Transmission ที่ความยาวคลื่น 420 nm นำค่าที่ได้คำนวณค่าฟอสเฟตของตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

โครงการวิจัยย่อยที่ 2

ปีที่ 2 ศึกษาปริมาณธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียมและการเจริญเติบโตของมะละกอในสภาพแปลงปลูก

2.1 การเตรียมต้นกล้ามะละกอ

รวบรวมเมล็ดพันธุ์มะละกอแขกดำที่มีคุณภาพดี เปอร์เซ็นต์การงอกสูง เพาะในถุงดำขนาด 3 นิ้ว ถุงละ 2-3 ต้น รดน้ำให้ชุ่มทุกวัน หลังจากต้นกล้างอกได้ประมาณ 2 อาทิตย์ รดด้วยปุ๋ยยูเรียและให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ประมาณ 4-5 เม็ด/ต้น เมื่อต้นกล้าอายุ 45 วัน ให้นำต้นกล้าทำ hardening เพื่อเตรียมย้ายกล้าลงกระบะปลูก

2.2 การเตรียมกระบะปลูก/ย้ายปลูก

เตรียมแปลงปลูกมะละกอ ขนาดหลุม 50x50x50 ซม. ตากดินไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ นำปูนขาวอัตรา 1 kg/กระบะ ผสมกับดินให้เข้ากัน ตากไว้ประมาณ 1 อาทิตย์ เตรียมหลุมปลูกให้ได้ 5 หลุม/กระบะ โดยนำปุ๋ยคอกอัตรา 20 กรัม/หลุม ปูนมาร์ส์ 10 กรัม/หลุม ร๊อคฟอสเฟต 10 กรัม/หลุม ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ปริมาณ 10 กรัม/หลุม ผสมให้เข้ากันกับหน้าดิน หลังจากนั้นนำต้นกล้ามะละกอที่ผ่านการทำ hardening มาแล้วลงปลูก 2-3 ต้น/หลุม เมื่อมะละกอออกดอกแรกให้คัดเลือกเฉพาะต้นมะละกอสมบูรณ์เพศไว้ หลุมละ 1 ต้น รดน้ำทุกอาทิตย์ให้ชุ่ม และมีการใส่ปุ๋ยทุกเดือนตามระยะการเจริญเติบโตของมะละกอ

2.3 การวิเคราะห์ดิน

สุ่มดินในกระบะๆ ละ 10 จุด มาวิเคราะห์หาธาตุอาหารหลักประกอบด้วยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ตามวิธีการของ บรรยง (2536) โดยสุ่มเก็บดินในกระบะปลูก 2 ครั้ง คือ ก่อนการทดลองและหลังการทดลองใส่เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

2.4 การวิเคราะห์ธาตุอาหารหลักจากใบ

นำชิ้นส่วนใบมะละกอเพสาดระหว่างคู่ใบที่ 3-4 เมื่อมะละกออายุ 3 เดือน, อายุ 5 เดือน และอายุ 7 เดือน มาทำความสะอาด นำตัวอย่างใบอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วบดให้ละเอียดเก็บตัวอย่างในตู้ดูดความชื้น หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์หาไนไตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ตามวิธีการของบรรยง (2536)

2.5 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Factorial Randomized Completely Block Design (RCBD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 ชนิดของเชื้อราอาร์บัสไมคอรไรซา จำนวน 3 ชนิด

ปัจจัยที่ 2 อายุของมะละกอ ช่วงอายุ 1 เดือน- 8 เดือน

2.6 การบันทึกข้อมูล

1. ปริมาณธาตุไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในดินก่อนการปลูกมะละกอและหลังจากการปลูกเชื้อ (มะละกออายุ 8 เดือน)

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2. ปริมาณธาตุไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในใบมะละกอเมื่อมะละกอมีอายุ 3 เดือน, 5 เดือน และ 7 เดือน

3. ความสูงของต้นหลังจากย้ายกล้าจนถึงเก็บเกี่ยวผลผลิตทุกเดือน

4. เส้นรอบวงโคนต้นหลังจากย้ายกล้าจนถึงเก็บเกี่ยวทุกเดือน

5. จำนวนวันเมื่อออกดอกแรก

6. สีดอก/สีใบ/สีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย/สีโคนต้น

7. ปริมาณผล/ต้น

8. น้ำหนักผล/ลูก

9. สีเนื้อ, สีเมล็ด

10. ความหวาน (B^0)

11. ขนาดผล/ลูก

12. โรค/แมลงที่พบ

3.1 แผนการดำเนินงานโครงการวิจัย

แผนการดำเนินงานวิจัย	งบประมาณ 2552				งบประมาณ 2553			
	ปีที่ 1	ปีที่ 1	ปีที่ 1	ปีที่ 1	ปีที่ 2	ปีที่ 2	ปีที่ 2	ปีที่ 2
	1-3	4-6	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12
1. เก็บตัวอย่างดินและรากมะละกอ				←				
2. คัดแยก และเพิ่มปริมาณเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินบริเวณรอบรากมะละกอ				←	→			
3. คัดเลือกเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของมะละกอ				←	→			
4. จำแนกชนิดเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา				←	→			
5. คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ส่งเสริมการเจริญให้กับพืชจากดินบริเวณรอบรากมะละกอและดินบริเวณผิวรากมะละกอ				←	→			
6. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะละกอ					←	→		

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

	งบประมาณ 2552				งบประมาณ 2553			
7. จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ส่งเสริมการเจริญให้กับพืชโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีและชีวโมเลกุล				↔	↔			
8. รวบรวมเมล็ดพันธุ์มะละกอ/ปลูกทดสอบความงอกและใช้ในการคัดเลือกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและเชื้อแบคทีเรีย					↔			
9. ศึกษาปริมาณธาตุไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมจากใบมะละกอในสภาพแปลงปลูก				↔	↔	↔	↔	
10. เตรียมต้นกล้ามะละกอเพื่อปลูกในแปลงทดสอบ					↔			
11. เตรียมกระบะปลูก/ย้ายปลูกมะละกอ					↔	↔		
12. วิเคราะห์ดิน						↔		
13. วิเคราะห์ธาตุอาหารหลักจากใบมะละกอ					↔	↔	↔	
14. ศึกษาการเจริญเติบโตด้านลำต้นมะละกอ					↔	↔	↔	
15. ศึกษาคุณภาพผลผลิตมะละกอ						↔	↔	
16. Data analysis								↔
17. จัดทำรายงานความก้าวหน้าและฉบับสมบูรณ์และเตรียมเขียนผลงานและต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์		↔	↔			↔		↔

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY