

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานจะเริ่มจากการเก็บตัวอย่างในแปลงเพาะปลูก เพื่อศึกษาความหลากหลายของชนิดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบในแหล่งปลูกพืชเป้าหมาย จัดจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ/หรือเทคนิคทางอณูชีววิทยา จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่เป็นชนิดเด่น ซึ่งจะพิจารณาจากความถี่ในการพบ คือ สามารถพบได้บ่อยในหลายแหล่งตัวอย่างหรือพบในปริมาณมากบริเวณรอบรากพืชเป้าหมายแต่ละกลุ่ม เมื่อคัดเลือกเชื้อราชนิดที่คาดว่าเหมาะสมแล้ว จึงเข้าสู่ขั้นตอนของการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ โดยนำเชื้อราชนิดเด่นมาคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณสปอร์ ซึ่งจะใช้พืชทดสอบในกลุ่มที่เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุสั้นและมีรากแขนงมาก เช่น ใต้แก่ ข้าวโพด ข้าวไร่ ข้าวฟ่าง ดาวเรือง ดาวเรือง ลูกเดือย ถั่วเหลือง เมื่อพบพืชอาศัยที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เพิ่มปริมาณของเชื้อราที่คัดเลือก จะปลูกเชื้อให้เจริญเติบโตร่วมกับพืชอาศัย เพื่อให้เชื้อราเจริญและเพิ่มปริมาณสปอร์

การดำเนินงานตามขั้นตอนทั้งหมดจะกล่าวถึงโดยแยกตามชนิดของพืชเป็น 4 ชนิด ดังนี้ พืชที่ใช้ผลิต biofuel (สบู่ดำ), พืชเครื่องคั้น (กาแฟ), พืชอาหาร ธัญพืช และถั่วกินเมล็ด และ พืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า

1. พืชที่ใช้ผลิต biofuel – สบู่ดำ

1.1 ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (AMF) ในต้นสบู่ดำ สถานที่และการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดินรอบรากและรากของสบู่ดำจาก 6 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ เชียงราย (2 แหล่งตัวอย่าง) เชียงใหม่ (4 แหล่งตัวอย่าง) ลำพูน (1 แหล่งตัวอย่าง) ขอนแก่น (1 แหล่งตัวอย่าง) หนองคาย (1 แหล่งตัวอย่าง) และเลย (1 แหล่งตัวอย่าง) กำหนดจุดเก็บตัวอย่างให้กระจายทั่วในแต่ละพื้นที่ พยายามหลีกเลี่ยงบริเวณทางเดินเก่า ขอบรั้ว คอกสัตว์ กองปุ๋ย ปูน หรือบริเวณที่คาดว่าจะปนเปื้อนสารเคมีใดๆ จากนั้นทำความสะอาดผิวดิน เก็บเศษพืชและหญ้าออกจากบริเวณทรงพุ่มให้หมด แล้วจึงขุดดินรอบต้นสบู่ดำ ต้นละ 4 จุด โดยใช้จอบ เสียม หรือพลั่วที่สะอาด ขุดเป็นหลุมรูปตัว V ลึกประมาณ 20 เซนติเมตร จากนั้นใช้พลั่วแซะดินด้านข้างของหลุมหนาประมาณ 3-5 เซนติเมตรจากปากหลุม ให้ขนานไปตามหน้าดินแล้วจัดขึ้นให้หน้าดินติดมากับพลั่ว ใช้มีดตัดดินบนพลั่วออกทั้ง 2 ข้าง เหลือดินตรงกลางไว้กว้างประมาณ 5 เซนติเมตร แยกเก็บดินใส่ถุงพลาสติกไว้ ล้างทำความสะอาดรากและเก็บในแอลกอฮอล์ 70% เพื่อเก็บรักษา โครงสร้างของเชื้อราเอ็นโดไมคอร์ไรซา (อาร์บัสคูล, เวสติเคิล และเส้นใย) ภายในรากพืช พร้อมทั้งบันทึกรายละเอียดของตัวอย่างตามแบบฟอร์ม (ภาพที่ 1) ประกอบด้วย หมายเลขแปลงที่เก็บ, ชื่อเจ้าของ, ความลึกของดินที่เก็บ, ที่ตั้งสถานที่เก็บ, วันที่เก็บและพืชที่ปลูก นำตัวอย่างมาศึกษาต่อไปในห้องปฏิบัติการ



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่.....15.10.2555
เลขทะเบียน.....248946
เลขเรียกหนังสือ.....

ในห้องปฏิบัติการ นำดินตัวอย่างบางส่วนไปอบเพื่อหาน้ำหนักแห้งของดิน ในตู้อบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 150°C จากนั้นชั่งน้ำหนักและคำนวณความชื้นในดิน และวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้ดินต่อน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 คนให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย pH meter

$$\text{ความชื้นในดิน} = \frac{\text{มวลของดินเปียก} - \text{มวลของดินแห้ง}}{\text{มวลของดินแห้ง}} \times 100$$

แปลงที่.....เจ้าของชื่อ.....
 ความลึกที่เก็บ.....
 เก็บจาก.....ตำบล.....
 อำเภอ.....จังหวัด.....
 วันที่เก็บ.....พืชที่ปลูก.....

ภาพที่ 1 แบบสำหรับบันทึกรายละเอียดของแหล่งตัวอย่างในแปลงสุ่มค่า

การตรวจสอบการเจริญของเชื้อราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาในดินและราก

การตรวจสอบการเจริญของเชื้อราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาจะแยกการตรวจสอบออกเป็น 2 ส่วน คือสปอร์ที่พบในดิน และ โครงสร้างของเชื้อราที่พบในราก

สำหรับตัวอย่างดินบริเวณรอบรากต้นสุ่มค่านำมาศึกษาความหลากหลายของสปอร์ AMF โดยผสมดินตัวอย่างละ 100 กรัมกับน้ำสะอาดแล้วคนให้เข้ากันจนแน่ใจว่าเม็ดดินแตกดีแล้ว ทำซ้ำแหล่งละ 3 ครั้ง ทิ้งไว้จนตกตะกอน แล้วเทน้ำผ่านตะแกรงกรองที่มีขนาด 750-, 250-, 106 และ 45 ไมโครเมตร ตามลำดับ ผสมน้ำลงในดินและกรองซ้ำจนกระทั่งน้ำใส จากนั้น ใช้น้ำสะอาดชะสิ่งที่ค้างอยู่บนแต่ละตะแกรงขนาด 250-, 106 และ 45 ไมโครเมตร ลงในหลอดขนาด 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวที่มีเศษต่างๆ ด้านบนทิ้ง จากนั้นเติมสารละลายซูโครส 50% เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารแขวนลอยด้านบนลงในตะแกรงขนาด 45 ไมโครเมตร แล้วล้างสารละลายซูโครส ในสารแขวนลอยบนตะแกรงออกให้หมด ด้วยน้ำสะอาด เทสิ่งที่ค้างอยู่บนตะแกรงขนาด 45 ไมโครเมตรนั้น ลงบนกระดาษกรองที่ต่ออยู่กับปั๊มสุญญากาศ ล้างสิ่งที่ติดบนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น 1-2 นาที แล้วจึงเก็บกระดาษกรองลงในจานแก้ว

ทำการแยกสปอร์เป็นกลุ่มด้วยอุปกรณ์ปลายแหลมเล็ก ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ที่ใช้ในการบ่งบอกชนิด เช่น ขนาด สี พื้นผิว เป็นต้น และนับจำนวนสปอร์ ซึ่งขั้นตอนในการระบุลักษณะและนับจำนวนนี้ทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ

นำตัวอย่างรากสปูดำที่แช่ใน 70% แอลกอฮอล์ มาตรวจสอบการเจริญของ AMF ตามวิธีของ Brundrett *et al.* (1996) โดยนำตัวอย่างรากมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด และตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่ลงในภาชนะแล้วเติม 10% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (10% KOH) นำไปเข้าหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นล้างรากด้วยน้ำเปล่าให้สะอาด เติมน้ำย้อม 0.05% ทริปแฟนบลู (0.05% Trypan Blue) ให้ท่วมราก แล้วนำไปเข้าหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที จากนั้นนำมาตรวจสอบโครงสร้างของ AMF ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสุ่มตัวอย่างราก ที่ย้อมแล้วมาวางบนแผ่นสไลด์ที่มีน้ำเปล่า ปิดด้วยแผ่นแก้วใส นับโครงสร้างของ AMF ที่ปรากฏภายในราก เช่น เวสสิเคิล อาร์บัสคูล หรือเส้นใย แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้าราก

$$\% \text{ การเข้ารากพืช} = \frac{\text{จำนวนพื้นที่ใต้กล้องจุลทรรศน์ที่พบโครงสร้างของเชื้อราในราก} \times 100}{\text{จำนวนพื้นที่ใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้งหมดของราก}}$$

1.2 การบ่งบอกชนิดของ AMF ที่พบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอณูชีววิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน ทำให้สามารถบ่งบอกชนิดของเชื้อราจากสปอร์ได้ โดยใช้ขนาดของสปอร์ สีของผนังสปอร์ พื้นผิวของสปอร์ รวมถึงลักษณะเฉพาะอื่นๆของสปอร์บางชนิด

เทคนิคทางอณูชีววิทยา

การยืนยันชนิดของเชื้อ AMF นั้นปัจจุบันนิยมใช้ข้อมูลทางอณูชีววิทยาเข้ามาช่วยสนับสนุนข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ในการทดลองนี้จึงนำเชื้อ AMF ชนิดเด่นที่ได้จากการสำรวจมาทำการศึกษา โดยนำสปอร์แต่ละชนิดชนิดละ 50 สปอร์ ที่จำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว รวมทั้งรากพืชอาศัย ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นปริมาณ 0.5 กรัม มาฆ่าเชื้อบริเวณผิวโดยใช้ 4% chloramin T, 0.02% streptomycin, 0.01% gentamicin เป็นเวลา 15 นาที (Hijri *et al.* 2002) DNA ของเชื้อราจะถูกสกัดออกจากสปอร์และรากด้วย the Power Soil™ DNA extraction Kit (MoBio Laboratories, Solano Beach, USA) และ the Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega, WI, USA) ตามลำดับ

ชิ้นส่วนของ SSU จะถูกเพิ่มปริมาณโดยใช้ universal eukaryotic primer NS31 (Simon *et al.*, 1992) และ primer AM1 ซึ่งจะเพิ่มปริมาณในส่วนที่บ่งบอกเชื้อราใน 3 สกุล ได้แก่ *Glomeraceae*, *Gigasporaceae* และ *Acaulosporaceae* (Helgason *et al.*, 1998) ทำปฏิกิริยานี้ใน 2x Master Mix (*i-taq*™)

(IntroBiotechnology, South Korea) โดยประกอบด้วย *Taq* DNA polymerase, buffer, dNTP's, proprietary chelator , แมกนีเซียมเข้มข้น และ primer ชนิดละ 10 pmol ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

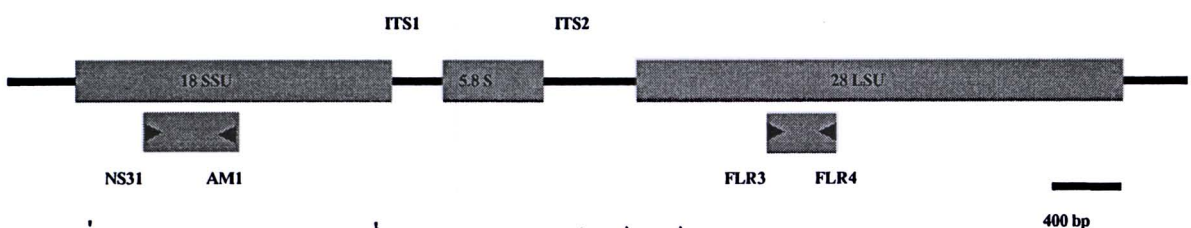
เข้าสู่ขั้นตอน Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้เครื่อง MJ Research PTC100 ทั้งหมด 30 รอบ ช่วงแรก 10 รอบที่อุณหภูมิ 95°C เวลา 1 นาที, 58°C เวลา 1 นาที และ 72°C เวลา 2 นาที ช่วงต่อมา 19 รอบ ที่อุณหภูมิ 95°C เวลา 30 วินาที, 58°C เวลา 1 นาที และ 72°C เวลา 3 นาที และช่วงสุดท้าย 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 95°C เวลา 30 วินาที, 58°C เวลา 1 นาที และ 72°C เวลา 10 นาที

ชิ้นส่วนของ LSU rDNA จะถูกจำลองด้วย primer FLR3 และ FLR4 ใน PCR master mix ชนิดเดียวกัน primer FLR3 จะจำลอง LSU rDNA ในช่วงโดเมน D1 และ D2 ในขณะที่ FLR4 อยู่ในโดเมน D2 (Gollotte *et al.*, 2004) (ภาพที่ 2)

สภาวะการทำ PCR คือ ที่อุณหภูมิ 94°C เวลา 2 นาที, 93°C เวลา 1 นาที, 58°C เวลา 1 นาที และ 72°C เวลา 1 นาที ทั้งหมด 39 รอบ จากนั้นใช้เครื่อง thermal cycler (PerkinElmer 9700) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ในแต่ละปฏิกิริยาด้วย 1.5% agarose gel ที่ 60 โวลต์ ใช้เวลา 60 นาที และทำให้บริสุทธิ์โดย NucleoSpin® Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany)

ปฏิกิริยาทั้งหมดจะถูกนำไปเรียงลำดับโดยใช้ automated sequencer ที่ Marcogen (Korea)



ภาพที่ 2 Fungal gene mapping ซึ่งเฉพาะเจาะจงกับ ไพร์เมอร์ NS31-AM1 และ FLR3-FLR4

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำลำดับเบสทั้งหมดที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ตรวจสอบโดยใช้ BLAST การจัดอันดับตามวิวัฒนาการ โดยใช้สารพันธุกรรมนอกกลุ่มเป้าหมายเพื่อเปรียบเทียบคือ เชื้อราชนิด *Amanita muscaria* ซึ่งจัดอยู่ใน Basidiomycota

ใช้โปรแกรม MEGA 4.1 BETA ในการทำแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) จากลำดับเบสที่ได้ (Tamura *et al.*, 2007; <http://www.megasoftware.net/>) การสร้างแผนภูมิจาก SSU จะอาศัยการวิเคราะห์ 1000-fold bootstrapped และ Neighbor-Joining ในการวิเคราะห์ LSU ด้วย Clustal W (Thompson, 1994) ใช้โปรแกรม Tree Explorer in MEGA4 ในการเขียนภาพ



1.3 การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อพืชสมุนไพร

การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสม จะพิจารณาจากเชื้อชนิดเด่น (dominant species) คือสามารถพบได้ ในหลายแหล่งตัวอย่าง หรือพบจำนวนมาก ประมาณ 50 สปอร์ขึ้นไปต่อดิน 100 กรัม นำไปเพิ่มปริมาณ ด้วยการปลูกในทราย (sand culture) ร่วมกับข้าวฟ่าง จากนั้นนำสปอร์ของเชื้อ แต่ละชนิดที่เพิ่มปริมาณได้ เป็นหัวเชื้อสำหรับปลูกกับสมุนไพร จากนั้นประเมินผลโดยตรวจวัดเปอร์เซ็นต์ การเข้าสู่รากของ AMF ตรวจนับปริมาณสปอร์ AMF เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของพืช โดยวัดน้ำหนักแห้งของยอดและราก วัดปริมาณการดูดใช้ธาตุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม หรือเปรียบเทียบปริมาณผลผลิต โดยวัดน้ำหนักเมล็ดเมื่อพืชเจริญเติบโตเต็มที่

การตรวจสอบผลของเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าชนิดเด่นที่มีต่อต้นกล้าสมุนไพร เพื่อจะนำไปใช้ทดแทนปุ๋ยเคมีนั้น ได้วางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCB) แบ่งเป็น 8 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 ใช้เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าชนิดเดียว คือ *Acaulospora* sp. No.19 จากดินตัวอย่าง จำนวน 100 สปอร์

กรรมวิธีที่ 2 ใช้เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าชนิดเดียว คือ *Acaulospora* sp. No.22 จากดินตัวอย่าง จำนวน 100 สปอร์

กรรมวิธีที่ 3 ใช้เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าชนิดเดียว คือ *Scutellospora* sp. AMF33 จำนวน 100 สปอร์ จากห้องปฏิบัติการของ ศ.ดร.เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กรรมวิธีที่ 4 ใช้เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าชนิดเดียว คือ *Glomus etunicatum* AMF05 จำนวน 100 สปอร์ จากห้องปฏิบัติการสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ ด้านการพัฒนาแบบยั่งยืนของทรัพยากรชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กรรมวิธีที่ 5 ใช้เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าชนิดเดียว คือ *Glomus* sp. จำนวน 100 สปอร์จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ในดิน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กรรมวิธีที่ 6 ใช้เชื้อผสมของทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Acaulospora* sp. No.19, *Acaulospora* sp. No.22, *Scutellospora* sp. AMF33, *Glomus etunicatum* AMF05 และ *Glomus* sp. ชนิดละ 20 สปอร์ รวมทั้งหมด 100 สปอร์

กรรมวิธีที่ 7 ใช้ผลิตภัณฑ์ทางการค้า คือ Myco star[®] (ภาพที่ 3) ตามอัตราที่แนะนำให้ใช้

กรรมวิธีที่ 8 ชุดควบคุม ไม่ใส่เชื้อ

ทำการวิธีละ 4 ซ้ำ เปรียบเทียบกันในกระถางพลาสติกขนาด 10 นิ้ว ที่บรรจุด้วยดิน:ทราย ในอัตราส่วน 1:1 น้ำหนัก 5 กิโลกรัม ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยให้สารละลายธาตุอาหาร (1X modified Hoagland) 1 ครั้งต่อสัปดาห์ จากนั้นเก็บเกี่ยวและบันทึกความสูง เส้นรอบวงของลำต้น น้ำหนัก

สดและน้ำหนักแห้ง ของลำต้นและรากของต้นกล้าสบูดำ จำนวนสปอร์ต่อดิน 100 กรัม และเปอร์เซ็นต์การเข้าราก วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย ANOVA โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.5

1.4 การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของ AMF ที่เหมาะสมต่อสบูดำ

การเพิ่มปริมาณสปอร์ของเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซาในพืชอาศัยให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อรา เอนโดไมคอร์ไรซา ในการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCB) โดยใช้พืชอาศัย 5 ชนิด คือ ข้าว ข้าวฟ่าง ข้าวโพด ลูกเดือย และดาวเรืองฝรั่งเศส ปลูกร่วมกับ เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซา 4 ชนิด ได้แก่ *Acaulospora tuberculata* AMF05 จากต้นสบูดำ, *Scutellospora* sp. และ *Acaulospora* sp. จากพืชไร่บนที่สูงในหมู่บ้านทิมะ จ. แม่ฮ่องสอน, *Glomus etunicatum* จากพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า และเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซา *Piriformospora indica* จาก Prof. Dr. R.J. Strasser, Laboratory of Bioenergetics and Microbiology, Department of Botany and Plant Biology, University of Geneva, Switzerland ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ โดยปลูกเชื้อจำนวน 100 สปอร์ หรือ เส้นใย 5 g (กรณี *P. indica* เนื่องจากเป็นเชื้อราแบบเส้นสายและสามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหาร PDB) กับต้นกล้าของพืชอาศัยแต่ละชนิด ในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว ที่บรรจุดิน:ทราย 2 kg ในอัตราส่วน 1:1 และรดด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรคัดแปลงของ Hoagland สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 4 เดือน ยกเว้นดาวเรืองฝรั่งเศสทำการทดลองเป็นเวลา 2 เดือน โดยงดการให้น้ำ 1 สัปดาห์ก่อนเก็บเกี่ยว แล้วเก็บเกี่ยวรากและดิน บันทึกจำนวนสปอร์ในดิน และเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่ราก



ภาพที่ 3 เชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ใช้ชื่อทางการค้าคือ MycoStar®

2. พีชเครื่องคืม – กาแฟ

2.1 ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา อาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซา (AMF) ในต้นกาแฟ

สถานที่และการเก็บตัวอย่าง

เก็บดินตัวอย่างจากแปลงปลูกกาแฟขนาดใหญ่ ในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย จำนวนทั้งหมด 9 แห่งตัวอย่าง โดยในจังหวัดเชียงใหม่ เก็บตัวอย่าง ที่อำเภอแม่แตง 3 แห่ง อำเภอคอกยสะเก็ด 2 แห่ง ส่วนในจังหวัดเชียงราย เก็บตัวอย่างที่วาวี ตำบลคอกย้าง อำเภอแม่สรวย 4 แห่ง ซึ่งที่ตั้งของแหล่งเก็บตัวอย่างดังกล่าว เป็นพื้นที่สูง และได้รับการส่งเสริมการปลูกกาแฟอาราบิก้าของจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย

สุ่มจุดเก็บตัวอย่างดินบริเวณโคนต้นกาแฟที่รากแผ่มาถึง โดยกำหนดจุดเก็บตัวอย่างให้ กระจายทั่วพื้นที่นั้น และพยายามหลีกเลี่ยงบริเวณทางเดินเก่า ขอบรั้ว คอกสัตว์ กองปุ๋ย ปูน หรือ สารเคมี จากนั้นทำความสะอาดผิวดินโดยเช็ดเศษพืชและหญ้าแห้งออกจากบริเวณทรงพุ่มที่ต้องการเก็บดินให้หมด แล้วจึงขุดดินรอบต้นกาแฟต้นละ 3 จุด โดยใช้เสียมขนาดเล็ก และช้อนปลูก ขุดเป็น รูปตัว V ลึกประมาณ 20 เซนติเมตร (cm.) จากนั้นแฉะดินด้านข้างของหลุมหนาประมาณ 3-5 เซนติเมตร จากปากหลุมให้ขนานไปตามหน้าดินที่ขุด จนถึงก้นหลุมแล้วจึงขึ้น ให้หน้าดินติดมากับช้อนปลูก ใช้มีดตัดดินบนช้อนปลูกหรือเสียมออกทั้ง 2 ข้าง เหลือดินตรงกลางไว้ ใช้ถุงพลาสติกใหม่ สวมปลายช้อนปลูกให้หุ้มดินตัวอย่างไว้ เทดินใส่ถุงพลาสติก พร้อมทั้งบันทึกรายละเอียดของตัวอย่าง เช่น ลักษณะและสีของดิน และพืชที่ปลูกร่วมกันในแปลง ร่มเงาจากต้นไม้อื่น หรือการดูแลรักษา เป็นต้น

การตรวจสอบการเจริญของเชื้อราอาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซาในดิน

นำดินตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งปลูกกาแฟมาแยกหาสปอร์ในดินโดยกระบวนการ wet sieving and 50% sucrose centrifugation method โดยใช้หลักการ คือการปั่นเหวี่ยงด้วยน้ำในชั้นแรก ทำให้ สปอร์แยกไปรวมกับอนุภาคดินที่อยู่ด้านล่างหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยสารละลายน้ำตาล 50% สปอร์จะแยกออกจากอนุภาคดิน และลอยขึ้นมาอยู่ในสารละลายน้ำตาล จากนั้นกรองและล้างสารละลายน้ำตาล ออกจากสปอร์อย่างรวดเร็ว

ขั้นตอนของ wet sieving and 50% sucrose centrifugation method เริ่มจาก นำดินที่เก็บจากแหล่งปลูกกาแฟมาชั่งให้ได้น้ำหนัก 100 กรัม ใส่ใน บีกเกอร์ (beaker) เหล็ก ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำปริมาตร 800 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วใช้ไม้พายสำหรับกวนสาร กวนดินในบีกเกอร์เบาๆ โดยกวนไปในทางเดียวกัน ประมาณ 1 นาที ค่อยๆ เทน้ำในบีกเกอร์ ให้ผ่านตะแกรง เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว (Humboldt, US standard sieve series) ขนาด 500 (U.S. Std No. 35 Mesh), 250 (U.S. Std No. 60 Mesh), 125 (U.S. Std No. 120 Mesh) และ 45 (U.S. Std No. 325 Mesh) ไมโครเมตร (μm) ตามลำดับที่ตั้งซ้อนกันไว้แล้ว หลังจากเทน้ำออกจากบีกเกอร์ผ่านตะแกรงจนหมด เติมน้ำปริมาตร 800 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์เดิม กวนดินและเทน้ำผ่านตะแกรง ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง จึงเก็บตัวอย่างที่ค้างอยู่บน ตะแกรงขนาด

250, 125 และ 45 ไมโครเมตร ลงในหลอดขนาด 150 มิลลิลิตรสำหรับนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ น้ำ กลั่นค้อยๆ ชะดินลง หลอด ดินแต่ละตัวอย่าง ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ได้ไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ น้ำกลั่นปรับสมดุล ที่ความ เร็ว 2,000 รอบ/นาที (round per minute หรือ rpm.) เป็นเวลา 5 นาที นำ หลอดออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงแล้วเทน้ำที่อยู่ด้านบนทิ้ง เก็บส่วนที่ เป็นตะกอนดินไว้ แล้วเติมสารละลาย น้ำตาล 50% ลงในหลอดที่มีตะกอนดิน ปรับสมดุลด้วยสาร ละลายน้ำตาล 50% และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เมื่อนำหลอดออกจาก เครื่องปั่นเหวี่ยงแล้ว เติสารละลาย ด้านบน ผ่านตะแกรงขนาด 45 ไมโครเมตร ใช้ น้ำกลั่นล้างสารละลายน้ำตาล 50% บนตะแกรงให้หมด และ ชะ สปอร์เชื้อรามายคอร์ไรซาบนตะแกรง ให้ตกลงไปบน กระดาษกรองที่ต่อเข้ากับชุดเครื่องกรองแบบลด ความดัน ร่อนน้ำผ่านกระดาษกรองหมด ใช้ปาก คีบค้อยๆ คีบกระดาษกรองออกมาวางบนลงบนจานเลี้ยง เชื้อ และปิดฝาเพื่อ ป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศลง ไปเจริญบนกระดาษกรอง จากนั้นนำสปอร์ไป ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.2 การบ่งบอกชนิดของ AMF ที่พบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำสปอร์ที่กรองได้จากดินตัวอย่าง (100 กรัม ทำ 3 ซ้ำ) มาตรวจนับความถี่และศึกษาลักษณะทาง สัณฐานวิทยา โดยตรวจสอบสปอร์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ และกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ ประกอบ สังเกตลักษณะต่างๆ ได้แก่ ลักษณะการเกิดและพัฒนาการของสปอร์ ลักษณะของผนังสปอร์ สี ของผนังสปอร์ ลักษณะ การเรียงตัว รูปร่าง และขนาดของสปอร์ และบ่งบอกชนิด โดยเปรียบเทียบกับ ตำรามาตรฐาน หรือสิ่งพิมพ์อิเล็กทรอนิกส์ (Schenck and Pérez, 1988; Brundett *et al.*, 1996; <http://www.agro.ar.szczecin.pl>; <http://invam.caf.wvu.edu>)

2.3 การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อกาแฟ

การทดลองนี้ ใช้เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอไรซาทั้งแบบชนิดเดียว (pure culture), หลายชนิด (mixed culture) และ เชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาที่มีขายในท้องตลาด นำมาทดสอบ ปลุกให้กับกล้า กาแฟอราบิก้าสายพันธุ์คาร์ติมอร์ โปรจีนี 90 (Progeny 90) โดยได้รับความอนุเคราะห์กล้าจากศูนย์วิจัย กาแฟที่สูง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่นำมาตรวจสอบแล้วไม่พบการติดเชื้อในราก ปลุก ในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ในอาคารเรือนเพาะชำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้รับแสงธรรมชาติ เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอไรซา ที่นำมาทดสอบ ประกอบด้วย *Gl. etunicatum*, *Ac. scrobiculata*, *Ac. morrowiae*, *Ac. mellea* และ เชื้อราที่ใช้ชื่อการค้า Myco star[®] ใช้วัสดุ ปลุกคือ ดินที่มีธาตุอาหารต่ำผสมทรายในอัตราส่วน 2:1 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ

ออกแบบการทดลองแบบ factorial จำนวน 8 ซ้ำ การเตรียมวัสดุปลุกใช้กระถางที่รองถุงพลาสติก ใส่ ใส่ดินที่มีธาตุอาหารต่ำผสมทราย ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาณ 2,800 กรัม รดน้ำพอชุ่มแล้วใส่พลาสติก

คลุมดินพักไว้ในกระถาง 2 วัน เตรียมกล้ากาแฟ ที่จะนำมาทดสอบ โดยนำกล้ากาแฟมาแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เขย่าเบาๆ แล้วทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ดินที่ติดบริเวณรากหลุดออก จากนั้นนำออกไปล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง การนำลงปลูกจะนำเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอไรซา ใส่รองที่ก้นหลุม แล้วจึงวางกล้ากาแฟลงไปในวัสดุปลูก เชื้อราที่ใช้ ได้แก่ *Glomus etunicatum*, *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora morrowae*, *Acaulospora mellea* และ เชื้อราผสมของทั้ง 4 ชนิด ทั้ง 5 treatments นี้เปรียบเทียบจำนวนสปอร์ คือใช้ทั้ง 50 และ 200 สปอร์ และเปรียบเทียบกับเชื้อทางการค้า ปริมาณ 20 กรัม ตามคำแนะนำการ ใช้ โดยมีดินที่ไม่ได้รับเชื้อเป็นกลุ่มควบคุม ทุกชุดการทดลองทำ 8 ซ้ำ

จัดวางกระถางกล้ากาแฟแบบสุ่ม โดยให้แต่ละต้นห่างกันประมาณ 30 เซนติเมตร รดน้ำกรองวันละ 80 มิลลิลิตร ให้ดินกล้าเจริญในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 120 วัน แล้ววัดความสูงต้น ความยาวราก การแผ่ขยายของราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง เปรียบเทียบกันทุกตัวอย่าง

2.4 การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของ AMF ที่คัดเลือก

2.4.1 ดินตัวอย่าง + กล้ากาแฟที่ปลอดเชื้อ + ทราย

เนื่องจากกาแฟอราบิก้าจัดเป็นพืชที่มีปริมาณการอาศัยร่วมกับเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอไรซาสูง (Miyasaka and Habte, 2001) จึงทดลองโดยใช้กาแฟอราบิก้าเป็นพืชอาศัย การทดลองนี้จะปลูกกล้ากาแฟในถุงดำ โดยรองถุงดำด้วยถุงพลาสติกใสแบบหนา ที่เจาะรูบริเวณก้นถุง นำทรายที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 1,200 กรัม ผสมกับดินตัวอย่างที่ใช้เป็นหัวเชื้อ ปริมาณ 300 กรัม คลุกให้เข้ากันทั่ว จากนั้น ใส่ลงในถุงดำ กดให้เป็นหลุม ใส่กล้ากาแฟปลอดเชื้อลงในถุง โดยในแต่ละถุงใส่กล้ากาแฟ 1 ต้น แล้วกลบหลุม ทำตัวอย่างดินละ 3 ซ้ำ รดต้นกล้าด้วยน้ำกรอง 30 มิลลิลิตร ทุกวัน และรดด้วยสารละลายธาตุอาหาร 30 มิลลิลิตร 2 ครั้ง/สัปดาห์ และปล่อยให้ต้นกล้าเจริญ ประมาณ 150 วัน จึงนำวัสดุปลูกมาตรวจสอบหาปริมาณสปอร์

2.4.2 ดินตัวอย่าง + ข้าวโพดหรือข้าวฟ่าง + ทราย

ทำการเพิ่มปริมาณ AMF โดยใช้ดินตัวอย่างเป็นหัวเชื้อ ทดสอบกับพืชอาศัย ได้แก่ ข้าวโพดและข้าวฟ่าง นำทรายฆ่าเชื้อ 800 กรัม ผสมกับดินตัวอย่าง 200 กรัม คลุกให้เข้ากัน แล้วนำกล้าข้าวโพดหรือข้าวฟ่างปลอดเชื้ออายุ 60 วัน ลงปลูกในกระถางที่รองด้านในด้วยถุงพลาสติก เจาะรูก้นถุง รดด้วยน้ำกรอง 30 มิลลิลิตร ทุกวัน และรดด้วยสารละลายธาตุอาหาร 30 มิลลิลิตรทุกๆ 2 วัน เลี้ยงให้ต้นข้าวโพดและข้าวฟ่างมีอายุ 120 วัน จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบหาปริมาณสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่ราก

3. พืชอาหาร รัญพืช และถั่วกินเมล็ด

การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อพืชอาหาร รัญพืช และถั่วกินเมล็ด

เก็บเมล็ดพืชอาหาร ได้แก่ ข้าวไร่ (*Oryza sativa* cv Bue Bang) ข้าวโพด (*Zea mays*) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) ลูกเดือย (*Coix lachryma-jobi*) ถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata*) และปะคะ (*Macaranga denticulata*) จากเกษตรกรในหมู่บ้านทิวชะ จ. แม่ฮ่องสอน นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70% แอลกอฮอล์ นาน 5 นาที และล้างในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง แล้วแยกเพาะเมล็ดพืชดังกล่าว 3 เมล็ด ลงในกระถางพลาสติก (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางปากกระถาง 21 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางก้นกระถาง 4 ซม. ลึก 16 ซม.) ที่บรรจุดินร่วนปนทรายที่ฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 2:1 โดยแต่ละกระถางผสมฟอสฟอรัส ปริมาณ 3 หรือ 30 กก. P/เฮกเตอร์ และใช้ดินที่มีเชื้อ AMF แบบผสม 5 ชนิด ประกอบด้วยเชื้อราในสกุล *Acaulospora*: *Glomus*: *Scutellospora*: *Achaeospora*/*Paraglomus* ในสัดส่วน 4:3:2:1 ซึ่งเก็บจากไร่บนที่สูง ในหมู่บ้านกระเหรี่ยงทิวชะ จังหวัดแม่ฮ่องสอน เป็นหัวเชื้อในปริมาณ 75 ก./กระถาง โดยแบ่งเป็นใช้หัวเชื้อที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อก่อน (AM0) และใช้หัวเชื้อที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (AM+) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ระหว่างการทดลองให้ธาตุอาหารพื้นฐานในรูปสารละลาย 100 กก. N/เฮกเตอร์ และ 50 กก. K/เฮกเตอร์ โดยรดสารละลาย 2 สัปดาห์ต่อครั้ง และรดน้ำทุกวัน จากนั้นประเมินผลโดยตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของ AMF ตรวจนับปริมาณสปอร์ AMF เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของพืช โดยวัดน้ำหนักแห้งของยอดและราก วัดปริมาณการดูดใช้ธาตุ NPK และเปรียบเทียบปริมาณผลผลิต โดยวัดน้ำหนักเมล็ดเมื่อพืชเจริญเติบโตเต็มที่

4. พืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า

4.1 ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา อาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซา (AMF)

สถานที่และการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างรากและดินบริเวณรอบต้นพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า 24 ชนิด (*Acrocarpus fraxinifolius*, *Balakata baccata*, *Castanopsis acuminatissima*, *Erythrina subumbrans*, *Ficus altissima*, *Ficus benjamina* var. *benjamina*, *Ficus glaberrima* var. *glaberrima*, *Ficus hispida* f. var. *hispida*, *Ficus racemosa* var. *racemosa*, *Ficus subulata* var. *subulata*, *Glochidion kerrii*, *Gmelina arborea*, *Heynea trijuga*, *Hovenia dulcis*, *Macaranga denticulata*, *Machilus bombycina*, *Melia toosendan*, *Michelia baillonii*, *Nyssa javanica*, *Prunus cerasoides*, *Rhus rhesoides*, *Sapindus rarak*, *Sarcosperma arboreum*, *Spondias axillaris*) จากบริเวณพื้นที่อุทยานแห่งชาติคอยสุเทพ-ปุย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ จุดเก็บตัวอย่างดินที่โคนต้นพืชดังกล่าวเช่นเดียวกับการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากต้นสนปูดำหรือกาแพ และบันทึกรายละเอียดของตัวอย่าง เช่น สภาพพื้นดิน การดูแล และพืชที่ปลูกร่วมในบริเวณแหล่งที่เก็บ การตรวจสอบการเจริญของเชื้อราอาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซาในดินและราก

นำตัวอย่างรากพืชจำนวน 30 รากต่อชนิดพืช ที่แช่ใน 50% แอลกอฮอล์ มาล้างด้วยน้ำเปล่า และตัดเป็นท่อนเล็กๆ ขนาด 1-2 ซม. ใส่ลงในภาชนะแล้วทำการเตรียมข้อมราก โดยมีขั้นตอนการข้อมเช่นเดียวกับ รากสนปูดำ จากนั้นนำไปตรวจสอบโครงสร้างของ AMF ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สำหรับตัวอย่างดินนำมาศึกษาโดย นำดินตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งปลูกพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า 24 ชนิด ตัวอย่างละประมาณ 100 ก. มาร่อนหาสปอร์ในดินโดยวิธี wet-sieving method โดยมีขั้นตอนเช่นเดียวกับดินจากต้นสนปูดำ

4.2 การบ่งบอกชนิดของ AMF ที่พบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการบ่งบอกชนิดของสปอร์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่นเดียวกับสปอร์จากต้นสนปูดำ

4.3 การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อพืชที่ใช้ในการปลูกป่า 24 ชนิด

คัดเลือก AMF ที่เหมาะสมต่อพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า โดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง

4.3.1 เพื่อทดสอบผลของ AMF กับการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส โดยปลูกต้นกล้าก่อเดือย (*Castanopsis acuminatissima*) ที่ได้จาก FORRU's nursery จำนวน 3 ต้นต่อกระถางดินเหนียว (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางปากกระถาง 22 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางก้นกระถาง 18 ซม. ลึก 19 ซม.) ที่บรรจุดินขาดธาตุ P และทรายที่ฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 2:1 แต่ละกระถางผสมฟอสฟอรัสปริมาณ 0, 50, 100, 150, 200 หรือ 250 ppm และไม่ใช้สปอร์ AMF หรือ ใช้สปอร์ *Acaulospora elegans*, *Glomus etunicatum*, *G. maosseae* หรือ สปอร์แบบผสม โดยใช้ AMF จำนวน 50 สปอร์ต่อกระถาง (เพิ่มปริมาณสปอร์ได้จาก การปลูก ข้าวโพด คาวเรือง ถั่ว

เหลือง ข้าวฟ่าง และข้าวไร้) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ระหว่างการทดลอง ให้สารละลาย Hoagland โดยรด สารละลาย 80 มล. 2 ครั้งต่อเดือน และรดน้ำทุก 2 วัน จากนั้น ประเมินผลโดยตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่ รากของ AMF ตรวจนับปริมาณสปอร์ AMF เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของพืชโดยวัดความสูงและขนาด เส้นรอบวงของลำต้นพืช วัดน้ำหนักแห้ง ของยอดและราก วัดปริมาณธาตุ P ในยอดและราก หลังจากย้าย ปลูกลงในเรือนเพาะชำของ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ได้ 4 เดือน

4.3.2 เพื่อทดสอบผลของ AMF กับการใช้ปุ๋ยแบบ slow-release โดยปลูกลงในถาดแก้วและปลูกลง เชื้อ AMF เช่นเดียวกับการทดลองแรกแต่ใช้สปอร์จำนวน 150 สปอร์ต่อกระถาง แต่ละกระถางใช้ปุ๋ยแบบ slow-release ปริมาณ 0 หรือ 375 มก./กก. วัสดุปลูก โดยใส่ปุ๋ย 3 เดือนต่อครั้ง และรดน้ำทุกวัน ทำการ ทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นประเมินผลโดยตรวจวัด เปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของ AMF ตรวจนับปริมาณสปอร์ AMF เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของพืช โดยวัดความสูงและขนาดเส้นรอบวงของลำต้นพืช วัดน้ำหนัก แห้งของยอดและราก วัดปริมาณธาตุ P ในยอดและราก หลังจากย้ายปลูกลงในเรือนเพาะชำของ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ได้ 6 เดือน

4.4 การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของ AMF ที่คัดเลือก

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มปริมาณสปอร์ชนิดที่คัดเลือกแล้วว่ามีความสามารถในการ เพิ่มการเจริญของพืชที่ใช้ในการปลูกป่า โดยการปลูกเชื้อลงในพืชอาศัยที่เหมาะสม จากนั้นจึงเก็บเกี่ยว วัสดุปลูกที่มีสปอร์ของเชื้อ AMF เพื่อนำไปใช้กับพืช

ทดลองเพิ่มปริมาณสปอร์ AMF 6 ชนิด ได้แก่ *Acaulospora elegans*, *A. mellea*, *A. scrobiculata*, *Glomus etunicatum*, *G. mosseae* และ *Scutellospira heterogama* โดยใช้พืชอาศัย 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพด ดาวเรือง ถั่วเหลือง ข้าวไร้ และข้าวฟ่าง นำดินและทรายอัตราส่วน 2:1 ที่ฆ่าเชื้อแล้ว บรรจุในกระถางดินเผา ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางปากกระถาง 22 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางก้นกระถาง 18 ซม. ลึก 19 ซม. แล้วนำ เมล็ดพืชแต่ละชนิดที่ปลอดเชื้อลงปลูกในกระถาง กระถางละ 3 เมล็ด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รดน้ำปริมาตร 500 มล. ทุก 2 วัน และรดด้วยสารละลายธาตุอาหาร 80 มล. ทุก 2 สัปดาห์ เลี้ยงให้ต้นพืชมีอายุ 4 เดือน จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบหาปริมาณสปอร์และเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่ราก

5. การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ AMF และการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการเก็บกักสปอร์ AMF

5.1 การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ AMF

วางแผนการทดลองเป็น Randomized complete block design (RCB) ทำ 4 ซ้ำ โดยพืชอาศัยที่นำมาศึกษาในขั้นตอนนี้ ประกอบด้วย ต้นเดือย (*Coix lachryma-jobi* L.) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* (Linnaeus) Moench) และหญ้ารูซี่ (*Bachiaria ruziziensis*) ซึ่งเป็นพืชที่มีอายุสั้นและมีการแผ่ขยายของรากมาก นำเมล็ดพืชที่จะใช้มาฆ่าเชื้อในสารละลาย 10 % chlorox เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 5 นาที อีก 3 ครั้ง โดยเขย่าตลอดเวลา จากนั้นเพาะเมล็ดให้เป็นต้นกล้าในสภาพปลอดเชื้อในสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

เชื้อ AMF ที่นำมาใช้ในขั้นตอนนี้ได้แก่ *Glomus* sp. (50 สปอร์) ซึ่งแยกจากผลิตภัณฑ์ Mycostar® ด้วยกรรมวิธีเดียวกับการแยกสปอร์จากดินตัวอย่าง, *Scutellospora* sp. (50 สปอร์) จากห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นเชื้อชนิดที่พบว่าสามารถเพิ่มการเจริญของพืชได้หลากหลายประเภทและผลิตภัณฑ์ Mycostar® (10 กรัม) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีการใส่เชื้อ

เตรียมดินที่มีธาตุอาหารต่ำ ผสมกับทรายในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ตักใส่ถุงพลาสติกให้ได้ น้ำหนัก 2 กิโลกรัม แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที 2 ครั้ง ให้แต่ละครั้งที่ช่วงห่างกัน 24 ชั่วโมง เป็นวัสดุปลูก กระจายสำหรับปลูกใช้กระถางพลาสติกสีดำ ขนาด 8 นิ้ว ฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลาย 10 % chlorox เวลา 10 นาที แล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำถุงพลาสติกใส่ที่เจาะรูแล้วเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำขัง ร่องลงไปในกระถางที่เตรียมไว้ นำถุงพลาสติกที่ไม่เจาะรูอีกถุงสวมกระถางด้านนอก ทำให้เป็นกระถางที่ไม่ให้มีการไหลออกของน้ำ บรรจุวัสดุปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปกระถางละ 2 กิโลกรัม จากนั้นใช้ช้อนกดผิวหน้าของวัสดุปลูกในกระถางให้เป็นหลุมตรงกลาง 1 หลุม ใส่ต้นกล้าปลอดเชื้อลงไป ในหลุม ใช้ปากคีบ คีบเอากระดากกรองที่มีสปอร์ AMF มาแตะกับรากของต้นกล้า ใช้น้ำกลั่นชะสปอร์และกระดากกรองให้ตกไปที่ก้นหลุม กลบดินมาปิดหลุมเบาๆ พรมน้ำให้ต้นกล้าเล็กน้อย รดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อทุกวัน ให้ปริมาณน้ำในดินอยู่ในระดับ field capacity เพื่อป้องกันน้ำขัง และให้ปุ๋ยสูตร Modified Hoagland's Nutrient Solution ทุก 7 วัน เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 1 สัปดาห์ ใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โรยบริเวณผิวหน้าวัสดุปลูก เพื่อรักษาความชื้น ปลูกพืชเป็นเวลา 90 วัน แล้วตรวจสอบผลโดยการหาเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของเชื้อและจำนวนสปอร์ที่พบในดิน

5.2 การคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการเก็บกักสปอร์ AMF

เตรียมวัสดุ 3 ชุด ได้แก่ ดินผสมทรายในอัตราส่วน 1:1, พีท (peat) 2000 มิลลิลิตร และ ดินผสมเพอร์ไลต์และทราย ในอัตราส่วน 2:1:1 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งวัสดุไว้ให้เย็น 1 วัน จากนั้นนำวัสดุไปทำการฆ่าเชื้ออีกครั้ง ดินที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ มีธาตุอาหารต่ำ โดยเฉพาะฟอสฟอรัส

พืชที่ใช้ในการทดลองคือหญ้ากินนีสีม่วง (*Panicum maximum*) และเบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium*) โดยนำเมล็ดหญ้ากินนีสีม่วงและยอดเบญจมาศมาฆ่าเชื้อในสารละลาย 10 % chlorox เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 5 นาที อีก 3 ครั้ง เพาะเมล็ดหญ้ากินนีสีม่วง บนสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อพรมให้ทั่ว ส่วนยอดของเบญจมาศจะปักชำในกระบะเพาะที่บรรจุซีเมนต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นรดน้ำทุกวันต้นกล้าจะเจริญเติบโตประมาณ 15-20 วัน จึงนำลงปลูกในกระถางขนาด 8 นิ้ว ที่มีถุงพลาสติกใสเจาะรู ป้องกันไม่ให้น้ำขังรองอยู่ นำกระถางวางลงในถาดรองกระถาง การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 ดินผสมทรายในอัตราส่วน 1:1

ชุดที่ 2 พีท (peat) 2000 มิลลิลิตร

ชุดที่ 3 ดิน: เพอร์ไลต์: ทราย ในอัตราส่วน 2:1:1

ชุดหลุมตรงกลางผิวหน้าวัสดุปลูกลึก 2 นิ้ว นำกล้าต้นหญ้ากินนีสีม่วง และเบญจมาศ ใส่งในหลุม โดยใช้หญ้ากินนีสีม่วง 3 ต้นต่อหนึ่งกระถาง และเบญจมาศ 1 ต้นต่อ 1 กระถาง แล้วจึงใช้ปากคีบ คีบกระดวยกรงที่มีสปอร์ของ *G. etunicatum* (50 สปอร์) และ *Scutellospora* sp. (50 สปอร์) มาแตะกับรากของต้นกล้า ใช้น้ำกลั่นชะสปอร์และกระดวยกรงให้ตกไปที่ก้นหลุม กลบดินปิดหลุมเบา ๆ พรมน้ำให้ต้นกล้าเล็กน้อย นำกระถางทั้งหมดไปวางสุมในเรือนเพาะชำ รดน้ำทุกวัน ให้ปริมาณน้ำในดินอยู่ในระดับ field capacity เพื่อป้องกันน้ำขัง และให้ปุ๋ยสูตร Modified Hoagland' s Nutrient Solution ทุก 7 วัน ปลูกพืชเป็นเวลา 60 วัน แล้วตรวจสอบผล โดยการหาเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของเชื้อและจำนวนสปอร์ที่พบในดิน

