บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. พืชทดลอง

1.1 พืชที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน คือ ข้าวปลูก *Oryza sativa* พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวป่าสายพันธุ์ *O. rufipogon*

1.2 พืชที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าว คือข้าวปลูก 3 สายพันธุ์ คือ ขาวดอกมะลิ 105 พิษณุโลก 80 และชัยนาท 80

2. สารเคมี

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนสูตรดัดแปลง (Modified N-free medium) (ภาคผนวก ก)

2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน โปรตีน กรดอินโดอะซีติก (IAA) และการจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน (ภาคผนวก ข)

3. อุปกรณ์

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ เช่น มีดผ่าตัด ไมโครปิเปต สไลด์ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ เครื่องวัด pH หม้อ autoclave ตู้ถ่ายเชื้อ

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และการสร้างกรดอินโดอะซีติก (IAA)

3.2.1 Gas chromatography ยี่ห้อ Shimatzu GC -14B

3.2.2 Ultraviolet Visible Spectrophotometer ;UV – 1601) ยี่ห้อ SHIMATSU

3.2.3 เครื่องชั่งแบบละเอียด ยี่ห้อ METTLER TOLEDO, PG2002-S

3.2.4 หลอดทดลอง

3.2.5 ขวดปรับปริมาตรขนาด 25 50 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.6 ปิเปต ไมโครปิเปต แท่งแก้วคนสาร หลอดหยดสาร

3.3 อุปรณ์ที่ใช้ในการปฏิบัติงานในแปลงปลูก

3.3.1 กระถางพลาสติก

3.3.2 วัสดุปลูก

3.3.3 ป้ายชื่อพร้อมปากกาเคมี

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ดี

1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์

แยกเชื้อและรวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวปลูก *O. sativa* พันธุ์หอมมะลิ 105 และข้าวป่า *O. rufipogon* โดยมีวิธีการ ดังนี้

1.1.1 นำรากพืชที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูก โดยทำการคัดเลือกแบบสุ่มชนิดละ 5 ตัวอย่าง ล้างให้สะอาดด้วยน้ำ ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 2 เซนติเมตร

1.1.2 นำมาทำการฆ่าเชื้อพื้นผิวภายนอกด้วยการแช่ด้วย แอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที แล้วตามด้วย 2% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 2 นาที และแอลกอฮอล์ 70% อีก 30 วินาทีตามลำดับ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้งและซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ปราศจากเชื้อ (Koomnok, 2006)

1.1.3 นำรากข้าวและหญ้าแฝกที่ฆ่าเชื้อผิวภายนอกแล้ว วางบนจากอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน (Modified N-free medium : Koomnok, 2006) บ่มรากพืชไว้ 3-7 วัน คัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่เจริญด้านข้างของรากพืชบนจานอาหาร ทำให้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บในอาหารวุ้นเอียง (Slant) เพื่อทำการเก็บรักษาไว้สำหรับทำการทดลองขั้นต่อไป

1.2 วัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

วัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน โดยวิธี Acetylene reduction assay (ARA method) มีวิธีการดังนี้

1.2.1 นำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนจาก ข้อ 1.1 ไปเพาะเลี้ยง ในอาหารกึ่งแข็งที่ปราศจากไนโตรเจนสูตรดัดแปลง (Semisolid N-free meium : Koomnok, 2006) ที่มีอาหาร 9 มิลลิลิตรต่อหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

1.2.2 ทำการเปลี่ยนฝาหลอดจากฝาพลาสติกเป็นจุกยาง เพื่อใช้เข็มฉีดยาเจาะผ่าน หลังจากเปลี่ยนฝาหลอดเรียบร้อยแล้วใช้เข็มเจาะเข้าไปในหลอด ดูดเอาอากาศออก 1 มิลลิลิตร จาก นั้นใส่ก๊าซอะเซทธิลีนแทนอากาศที่ดูดออกไป บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

1.2.3 เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำไปวัดปริมาณก๊าซเอทธิลีน (ethylene) ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC) ยี่ห้อ GC -14B โดยดูดเอาก๊าซภายในหลอดมา 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าไปในเครื่อง จากนั้นคำนวณปริมาณก๊าซเอทธิลีนจากตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟที่เกิดขึ้นจากก๊าซเอทธิลีนมาตรฐาน

1.2.4 นับปริมาณของเชื้อทั้งหมดที่เจริญในหลอดอาหารที่การตรึงไนโตรเจน โดยวิธี plate count technique และวัดปริมาณโปรตีนในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ข)

1.3 วัดประสิทธิภาพการสร้างกรดอินโดอะซีติก (IAA)

วัดความสามารถในการสร้างกรดอินโอะซีติก (Indole-3-acetic acid ; IAA) ของแบคทีเรียตรึงเอนโดไฟท์ไนโตรเจนด้วยวิธี Colorimetrically spectrophotometry โดยมีวิธีการดังนี้

1.3.1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนในอาหาร Tris-YMRT medium (ภาคผนวก ก) บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 วันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 50,000 รอบต่อนาที ส่วนที่เป็นสารละลายใสนำไปวิเคราะห์ปริมาณ IAA และนำส่วนที่เป็นตะกอนติดอยู่ที่ก้นหลอดหาปริมาณโปรตีน

1.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณ IAA โดยวิธีการของ Gordon and webber (1951) โดยการดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติม Salkvskii reagent (ภาคผนวก ก) 2 มิลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)

1.3.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน เพื่อให้ได้ค่า IAA ในหน่วยไมโครโมลต่อมิลิลิตร

1.4 คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนได้ดี

ทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้อ 1.1 โดยใช้หลักการของ Bergey's Manual of Determinative of Bacteriology nine Edition คัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ไอโซเลตที่ตรึงไนโตรเจนได้มากกว่า 100 นาโนโมลของเอทธิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และมีปริมาณ IAA สูง มากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าว

การทดลองที่ 2 ทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าว

การทดลองที่ 2.1 ผลของการปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ต่อการเจริญในระยะแรกของข้าว

2.1.1 ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอกของเมล็ดข้าวสายพันธุ์หอมมะลิ 105 ด้วยวิธี Triple surface sterile method (Koomnok, 2006) แล้วนำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อผิวภายนอกแล้วเพาะให้งอกใน water agar

2.1.2 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกไว้ จำนวน 6 ไอโซเลต คือ CMOS08, CMOR01, CMOR04, CMOR06, CMOR09 และ CMOR15 ในอาหาร Modified N-free medium จนมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.1.3 ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ให้กับต้นกล้าของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่งอกได้ 2 วัน โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้จนมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตรต่อกรรมวิธี เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 7 กรรมวิธี ๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ปลูกถ่ายเชื้อ)ให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก่อนนำไปปลูก
กรรมวิธีที่ 2 ปลูกถ่ายเชื้อ CMOS08 ให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก่อนนำไปปลูก
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกถ่ายเชื้อ CMOR01 ให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก่อนนำไปปลูก
กรรมวิธีที่ 4 ปลูกถ่ายเชื้อ CMOR04 ให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก่อนนำไปปลูก
กรรมวิธีที่ 5 ปลูกถ่ายเชื้อ CMOR06 ให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก่อนนำไปปลูก
กรรมวิธีที่ 6 ปลูกถ่ายเชื้อ CMOR09 ให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก่อนนำไปปลูก
กรรมวิธีที่ 7 ปลูกถ่ายเชื้อ CMOR15 ให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก่อนนำไปปลูก

2.1.4 นำต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนแล้วในข้อ 2.1.3 ย้ายต้นกล้าลงในกระถางขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 300 กรัม ซึ่งเตรียมโดยการเติมน้ำกลั่นให้ดินอยู่ในสภาพน้ำท่วมขังไว้แล้ว 2 วัน โดยใช้ต้นกล้า 2 ต้นต่อกระถาง เพาะเลี้ยงต้นกล้าเหล่านี้ในโรงเรือนทดลอง เป็นเวลา 30 วัน รักษาให้อยู่ในสภาพน้ำท่วมขังด้วยการเติมน้ำกลั่นให้มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตรเหนือดิน

2.1.5 เมื่อครบเวลา 30 วัน ทำการตัดต้นกล้าส่วนที่อยู่เหนือดิน ไปอบให้แห้งเพื่อชั่งหาน้ำหนักแห้งของส่วนลำต้น เปรียบเทียบกับต้นกล้าที่ไม่ได้รับการเพาะเชื้อเชื้อ

2.1.6 คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน ที่ให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของลำต้นสูง (เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เพาะเชื้อ) และปริมาณ N-uptake สูง จำนวน 2 ไอโซเลต เพื่อทำการศึกษาต่อไป

การทดลองที่ 2.2 ทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาพเรือนทดลอง

2.2.1 ทำการเตรียมต้นกล้าข้าว 3 สายพันธุ์ คือขาวดอกมะลิ 105 พิษณุโลก 80 และพันธุ์กข 29 เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

2.2.2 เตรียมดินปลูก 2 กิโลกรัมต่อกระถาง ด้วยการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง โดยแต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง เตรียมดินปลูกให้อยู่ในสภาพน้ำท่วมขังด้วยน้ำกลั่นก่อนกาย้ายปลูก 3 วัน

2.2.3 ทำการปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนที่เตรียมไว้เช่นเดียว กับข้อ 2.1.3 โดยวางแผนการทดลองแบบ (2x3)+1 แฟกทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ มี 2 ปัจจัย คือ
ปัจจัยที่ 1 ชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ตรึงไนโตรเจน 2 ชนิดคือ CMOR06 และ CMOR15
ปัจจัยที่ 2 พันธุ์ข้าวปลูก 3 พันธุ์ คือ ขาวดอกมะลิ 105 พิษณุโลก 80 และชัยนาท 80 รวมทั้งสิ้น 9 กรรมวิธี ๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่มีการปลูกถ่ายเชื้อก่อนนำไปปลูก (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 2 ปลูกถ่ายเชื้อ CMOR06 ให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก่อนนำไปปลูก
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกถ่ายเชื้อ CMOR15 ให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก่อนนำไปปลูก
กรรมวิธีที่ 4 ไม่มีการปลูกถ่ายเชื้อให้กับข้าวพิษณุโลก 80 ก่อนนำไปปลูก (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 5 ปลูกถ่ายเชื้อ CMOR06 ให้กับข้าวพิษณุโลก 80 ก่อนนำไปปลูก
กรรมวิธีที่ 6 ปลูกถ่ายเชื้อ CMOR15 ให้กับข้าวพิษณุโลก 80 ก่อนนำไปปลูก
กรรมวิธีที่ 7 ไม่มีการปลูกถ่ายเชื้อให้กับข้าวชัยนาท 80 ก่อนนำไปปลูก (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 8 ปลูกถ่ายเชื้อ CMOR06 ให้กับข้าวชัยนาท 80 ก่อนนำไปปลูก
กรรมวิธีที่ 9 ปลูกถ่ายเชื้อ CMOR15 ให้กับข้าวชัยนาท 80 ก่อนนำไปปลูก

2.2.4 ย้ายต้นกล้าอายุ 2 วันที่เตรียมไว้ลงในกระถาง จำนวน 2 ต้นต่อกระถาง หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 5 วันให้ถอนต้นกล้าให้เหลือ 1 ต้นต่อกระถาง รักษาสภาพน้ำท่วมขังด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งเก็บเกี่ยวที่อายุ 75 วัน โดยทำการวัดความสูง จำนวนกอต่อต้น ความสมบูรณ์ของกอ ในวันที่ 30 45 60 และ 75 วันหลังย้ายปลูก เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ปลูกที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

2.2.5 เมื่ออายุครบ 75 วัน ทำการถอนต้นข้าวออกจากกระถางด้วยความระมัดระวัง ตัดส่วนลำต้นที่อยู่เหนือดินและส่วนรากออกจากกัน นำไปล้างดินออก และนำนับจำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบในส่วนรากและลำต้น รวมทั้งนำส่วนรากและลำต้นไปอบหาน้ำหนักแห้ง

2.2.6 เปรียบเทียบการส่งเสริมการเจริญของข้าว ด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้งสองไอโซเลตที่คัดเลือกไว้