# วิธีทดลอง

**<u>การทดลองที่ 1</u> ผลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งโรครากเน่าของต้นกล้าส้ม**

1. การทดลองนี้ประกอบด้วยตำรับการทดลองแบบ factorial ของ 3 ปัจจัย ได้แก่ ส้ม 6 ชนิด (ส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้ง ส้มเขียวหวานพันธุ์คลีโอพัตรา ส้มลูกผสมพันธุ์ทรอเยอร์ ส้มลูกผสมพันธุ์สวิงเกิล มะนาวแป้น และส้มโอ) เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (ใส่ และไม่ใส่เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา) และเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรครากเน่า (ใส่ และไม่ใส่เชื้อรา *P. parasitica*) การทดลองนี้มีทั้งหมด 4 ซ้ำ

2. นำเมล็ดพันธุ์ของพืชสกุลส้มที่ใช้ในการวิจัย มาลอกเปลือกนอกของเมล็ดออก นำเมล็ดส้มแต่ละชนิดไปเพาะในดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าแล้ว ในถาดหลุมเพาะกล้าโดยปลูก 1 เมล็ดต่อหนึ่งหลุม รดน้ำวันละ 1-2 ครั้ง และเมื่อกล้าส้มมีอายุประมาณ 1 เดือน

3. ย้ายต้นกล้าส้มที่มีอายุ 1 เดือน ไปปลูกในการถางทดลองที่มีดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าแล้ว กระถางละ 5 กิโลกรัม สำหรับชุดทดลองที่มีเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ใส่สปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดต่างๆที่อยู่ในดินประมาณ 400 สปอร์ ที่ก้นหลุมในกระถางปลูกก่อนวางรากต้นกล้าส้มเพื่อให้เชื้อราอยู่ใกล้รากมากที่สุด จากนั้นกลบดินแล้วรดด้วยน้ำ โดยรดน้ำวันละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 2 เดือน

4. หลังจากนั้น ทำการใส่เชื้อรา *P. parasitica* ประมาณ $10^5$ สปอร์ต่อกระถาง ที่บริเวณรอบระบบรากของต้นกล้าส้ม ลงในชุดทดลองที่มีเชื้อรา *P. parasitica* และตรวจสอบอาการของโรคที่ระยะเวลาประมาณ 1 เดือน หลังการใส่เชื้อรา *P. parasitica*

**<u>การทดลองที่ 2</u> ผลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของตาส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้งบนต้นตอส้มชนิดต่าง ๆ**

1. การทดลองนี้มีตำรับการทดลองแบบ factorial ของ 2 ปัจจัย ได้แก่ ส้ม 5 ชนิด (ส้มเขียวหวานพันธุ์คลีโอพัตรา ส้มลูกผสมพันธุ์ทรอเยอร์ ส้มลูกผสมพันธุ์สวิงเกิ้ล มะนาวแป้น และส้มโอ) และเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (ใส่ และไม่ใส่เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา) การทดลองนี้มีทั้งหมด 4 ซ้ำ

2. ต้นส้มชนิดต่างๆ 5 ชนิดที่ปลูกเตรียมไว้ มีอายุประมาณ 7 เดือน (เพื่อให้ได้ขนาดของลำต้นที่พอจะใช้เป็นต้นตอได้) โดยมีทั้งชุดที่ไม่ใส่ และชุดที่ใส่เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาไว้แล้ว จากนั้นจึงทำการเสียบยอดของส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้ง (เสียบตาของส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้ง) บนต้นตอส้มทั้ง 5 ชนิดดังกล่าว โดยนำกิ่งพันธุ์ส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้ง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

ต้นประมาณ 0.25-0.30 เซนติเมตร (ซ.ม.) มี 3-5 ตา มาต่อบนต้นตอด้วยวิธีการเสียบยอดแบบเสียบลิ่ม จากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกขนาด 20 x 28 นิ้ว มัดปากถุงให้แน่นเพื่อควบคุมความชื้นภายในป้องกันลมและน้ำจากภายนอก พรางแสงประมาณ 70 - 80% เป็นเวลา 1 เดือน

3. เมื่อตาของกิ่งพันธุ์ส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้งเริ่มเจริญ นำถุงพลาสติกที่คลุมออก พรางแสงประมาณ 50% เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วให้ได้รับแสงแดดปกติ

4. เมื่อเสียบยอดครบ 3 เดือน ทำการวัดความสูงยอดส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้งบนต้อตอส้มชนิดต่างๆ ตัดส่วนของกิ่งพันธุ์ส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เจริญบนต้นตอ ชั่งน้ำหนักแห้งของส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้ง ตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน (Kjedahl method) ฟอสฟอรัส (Dry ashing and molypdovanado-phosphoric acid) โปตัสเซียม (Dry ashing and atomic absorption spectrophotometer method) และแมกนีเซียม (Dry ashing and atomic absorption spectrophotometer method)

5. นำรากของต้นตอส้มชนิดต่างๆ มาตรวจเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในราก ตรวจนับปริมาณสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

**การตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ colonization ในรากของต้นส้ม**

แยกรากตัวอย่างที่ออกจากตัวอย่างดินที่เก็บมา นำรากมาล้างด้วยน้ำประปา และตัดรากเป็นท่อนๆ ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่ตัวอย่างรากในขวดปากกว้าง แล้วเติม 10% KOH ลงในตัวอย่างรากที่ตัดได้ และนำไปนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นล้าง KOH ออกจากรากด้วยน้ำประปา โดยล้างบนตะแกรง จากนั้นใช้ปากคีบนำตัวอย่างรากใส่ในขวด แล้วเติมสีย้อม 0.05% trypan blue ใน lactoglycerol แล้วนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที สุ่มตัวอย่างรากที่ผ่านการย้อมแล้วนี้ มาอย่างน้อย 30 ชิ้น ต่อหนึ่งตัวอย่างที่เก็บจากสวนส้ม ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ colonization ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในราก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ โดยใช้วิธีการของ McGonigle et al. (1990)

**การตรวจสอบสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา**

แยกสปอร์จากตัวอย่างดินด้วยวิธีการ wet sieving and 50% sucrose centrifugation method (Brundrett et al., 1996) แล้วเก็บกระดาษกรองที่มีสปอร์ไว้ในจานเลี้ยงเชื้อ กระดาษกรองที่ขีดตารางขนาดประมาณ 7 ตารางมิลลิเมตร นับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ นำสปอร์แบบต่างๆที่พบไปทำ wet mount บนกระจกสไลด์ ตรวจสอบลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ