บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตรวจสอบ และ แยกราเอคโตไมคอร์ไรซ่า(Mycorrhizal fungi) จากรากของกล้าสนเขา ตรวจสอบ และ แยกราเอคโตไมคอร์ไรซ่า จากรากของกล้าสนสองใบ (*Pinus merkusii* Jungh&D.vriese) สนสามใบ(*Pinus kesiya* Royle ex Gordon) และ สนคาร์ริเบียน(*Pinus caribaea* Morelet) ที่เพาะชำจากแหล่งต่างๆในประเทศได้แก่ จังหวัดตาก จังหวัดพิษณุโลก จังหวัดสุรินทร์ จังหวัดสระบุรี และ จังหวัดอุบลราชธานี ตามตารางที่ 5 โดย

1.1 ตรวจสอบหารากของกล้าสนที่ติดราเอคโตไมคอร์ไรซ่า นำกล้าสนสองใบ สนสามใบและสนคาร์ริเบียนที่มีอายุประมาณ 2 ปี มาล้างดินออกจากรากด้วยน้ำประปา ตรวจสอบราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่รากของกล้าสนภายใต้กล้องจุลทรรศน์สองตา โดยสังเกตรากที่มีการติดเชื้อรา ซึ่งรากที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซ่าอาศัยอยู่จะมีรากหาอาหาร ที่มีลักษณะแตกต่างจากรากทั่วไปคือมีลักษณะคล้ายส้อมเสียง และมีสายใยราพันรอบราก

1.2 หาระยะเวลาที่เหมาะต่อการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวของรากเพื่อแยกราเอคโตไมคอร์ไรซ่า เนื่องจากบริเวณที่ผิวของรากสนจะมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมากซึ่งเป็นการยากที่จะแยกให้ได้เชื้อไมคอร์ไรซ่าที่บริสุทธิ์ดังนั้นจึงต้องหาวิธีที่จะทำลายเชื้อที่มีอยู่ที่ผิวของรากสนเสียก่อน โดยปกติการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวของราก จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารเคมีที่ใช้และระยะเวลา ซึ่งในการนี้จำเป็นจะต้องหาสารเคมี และระยะเวลาที่ดีที่สุดที่ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่บริเวณผิวรากได้ดีแต่ไม่ทำลายราเอคโตไมคอร์ไรซ่า การทดลองทำโดยการนำเอารากสน ที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซ่าติดอยู่มาทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่บริเวณผิวราก ด้วยการล้างชิ้นส่วนของรากสนที่ตัดออกมาในขั้นแรก ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ผสมด้วย Tween 80 โดยใช้อัตราส่วน Tween 80 จำนวน 0.2 มล. ต่อน้ำ 1 ลิตร แล้วนำมาแช่ในเมอร์คิวริคคลอไรด์ (mercuric chloride) เข้มข้น 100 ppm ด้วยระยะเวลาต่างๆกัน คือ 0.5, 1, 2 , 3 และ 4 นาทีตามลำดับแล้วล้างเมอคิวริคคลอไรด์ออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 5 นาที

ตารางที่ 5 แสดงถึงแหล่งของกล้าสนเขาที่นำมาใช้ในการศึกษา

แหล่งที่มา	ชนิดของกล้าสน	ลักษณะของพื้นที่ที่เพาะกล้าสน
1. หน่วยพัฒนาต้นน้ำที่ 32 ดอยมูเซอร์ อ.แม่สอด จ.ตาก	สนสามใบ	ความสูงจากระดับน้ำทะเลโดยประมาณ 870 เมตร อุณหภูมิเฉลี่ย 18.7-29.0 องศาเซลเซียส
2. ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์ไม้สนสองใบ โขงเจียม-ดงตาหวัง อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	สนสองใบ	ความสูงจากระดับน้ำทะเลโดยประมาณ 150 เมตร อุณหภูมิเฉลี่ย 15.0-41.0 องศาเซลเซียส
3. สถานีทดลองปลูกพันธุ์ไม้ สระบุรี อ.เมือง จ.สระบุรี	สนคาร์ริเบียน	ความสูงจากระดับน้ำทะเลโดยประมาณ 40 เมตร อุณหภูมิเฉลี่ย 22.7-34.7 อาศาเซลเซียส
4. สถานีปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่าทุ่ง แสลงหลวง อ.นครไทย จ.พิษณุโลก	สนสามใบ	ความสูงจากระดับน้ำทะเลโดยประมาณ 600 เมตร อุณหภูมิเฉลี่ย 17.0-35.0
5. สวนอนุรักษ์พันธุ์ไม้ป่าหนองคู อ.สังขะ จ.สุรินทร์	สนสองใบ	ความสูงจากระดับน้ำทะเลโดยประมาณ 160 เมตร อุณหภูมิเฉลี่ย 15.0-41.0

1.3 ทำการแยกราเอคโตไมคอร์ไรซ่าจากรากของกล้าสน โดยวางรากที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซ่าซึ่งได้ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวในข้อ 1.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดแข็ง (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเห็นสายใยของราที่งอกออกจากรากและเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการ subculture หลายครั้งจนกระทั่งได้เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่บริสุทธิ์ เลี้ยงราเอคโตไมคอร์ไรซ่าบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดแข็งแล้วนำมาบ่มเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.4 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ จัดกลุ่มและหาตัวแทนกลุ่มของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ โดยเขี่ยราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ลงบนแผ่นสไลด์ ย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue ศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยดูลักษณะของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ที่มีลักษณะและขนาดเหมือนกันและเนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซ่าส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes จึงสังเกตการสร้างลักษณะพิเศษของราในกลุ่มนี้คือบนสายใยจะมี clamp connection ปรากฏอยู่ จัดกลุ่มราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ออกเป็นกลุ่มโดยอาศัยลักษณะและขนาดของสายใย และลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดแข็ง โดยให้ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ซึ่งมีลักษณะและขนาดของสายใย และ ลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดแข็งที่เหมือนกันอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ที่เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 1 ชนิด เพื่อใช้เป็นตัวแทนของกลุ่มในการทดลองต่อไป

2. การเตรียม Inoculum medium ของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้เพื่อใช้ทำ Inoculum โดยทั่วไปในการทำ Inoculum เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ Marx(108) ได้แนะนำให้เตรียม Inoculum medium สำหรับราเอคโตไมคอร์ไรซ่า เพื่อใช้ในการทำ Inoculum โดยการใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าลงใน Inoculum medium ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดเหลว เวอร์มิคิวไลท์ และพีท ซึ่งได้ทำการทดลองหาอัตราส่วนต่างๆที่เหมาะสมต่อการเจริญของราไมคอร์ไรซ่าที่ใช้ในการทดลองแล้ว เนื่องจากเวอร์มิคิวไลท์เป็นแร่ชนิดหนึ่งซึ่งมักจะมีคุณสมบัติเฉพาะตัวเป็นด่าง Marx จึงได้เสนอแนะให้ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 5 - 5.5 โดยใช้พีทซึ่งโดยปกติจะมีคุณสมบัติเป็นกรด วิทยา สุริยาภณานนท์ รายงานถึงเวอร์มิคิวไลท์ที่ได้มาจากแหล่งต่างๆว่ามีค่าความเป็นกรดด่างต่างกันจาก 6 ถึง 8 (128) และจากการที่ประเทศไทยไม่มีพีทจึงใช้ดินพรุซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกันทดแทนซึ่งดินพรุนี้จะมีค่าความเป็นกรดด่างจาก 3.4 ถึง 5.0(129) จึงจำเป็นที่จะต้องหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของดินพรุ ต่อ เวอร์มิคิวไลท์ ซึ่งเมื่อนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN เหลวในอัตราส่วนดินพรุและเวอร์มิคิวไลท์ ต่อ อาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดเหลว เท่ากับ 2 ต่อ 1 แล้วจะยังคงทำให้มีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วงความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดเหลวเริ่มต้นคือ 5.0 ถึง 5.5 เพื่อที่จะได้นำสูตร Inoculum medium ที่ได้ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.1 หาองค์ประกอบของ Inoculum ที่เหมาะสมต่อการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซ่า

2.1.1 เตรียมอัตราส่วนเวอร์มิคิวไลท์กับดินพรุ เวอร์มิคิวไลท์มีลักษณะตามธรรมชาติเป็นแผ่นซ้อนๆกันเป็นชั้นๆภายในมีช่องว่างหรือรูพรุนเป็นจำนวนมากซึ่งสามารถช่วยป้องกันราเอคโตไมคอร์ไรซ่าจากสภาวะแวดล้อมบางประการที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าช่วยป้องกันราเอคโตไมคอร์ไรซ่าจากจุลินทรีย์อื่นๆ และจากลักษณะที่เป็นรูพรุนทำให้เวอร์มิคิวไล์สามารถดูดซับอาหารเลี้ยงเชื้อเอาไว้ได้เป็นจำนวนมากพอต่อการนำไปใช้ของราเอคโตไมคอร์ไรซ่า และด้วยคุณสมบัติที่เป็นแผ่นซ้อนกันนี้จะเป็นการช่วยเพิ่มเนื้อที่ในการเจริญให้กับราเอคโตไมคอร์ไรซ่าโดยราเอคโตไมคอร์ไรซ่าจะเข้าไปเจริญในระหว่างชั้นของเวอร์มิคิวไลท์ดังกล่าว สำหรับดินพรุนั้นมีสารอินทรีย์วัตถุเป็นองค์ประกอบเป็นจำนวนมากดินพรุจึงเป็นแหล่งอาหารของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าด้วยอีกส่วนหนึ่ง เนื่องจากเวอร์มิคิวไลท์และดินพรุที่มาจากแหล่งต่างๆกันจะมีค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกันออกไป โดยเวอร์มิคิวไลท์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีแหล่งมาจากประเทศจีน และ ดินพรุที่ใช้มีแหล่งมาจากจังหวัดนราธิวาส

ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องทำการทดลองเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมขององค์ประกอบทั้งสอง โดยการนำดินพรุซึ่งร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh และ เวอร์มิคูไลท์ มาวัดเพื่อหาค่าความเป็นกรดด่างโดยการนำน้ำกลั่นและอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดเหลว มาวัดค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น จากนั้นนำดินพรุ และ เวอร์มิคูไลท์ มาผสมกับน้ำกลั่นในขวดแก้วรูปชมพู่(Erlenmeryer flask) ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร ต่อ ปริมาตรวัดค่าความเป็นกรดด่าง นำดินพรุ และเวอร์มิคูไลท์ มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อMMN ชนิดเหลวในขวดแก้วรูปชมพู่ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร ต่อ ปริมาตร วัดค่าความเป็นกรดด่าง จากนั้นผสมดินพรุกับเวอร์มิคูไลท์ในอัตราส่วนปริมาตร ต่อ ปริมาตรต่างๆกันคือ 1:10, 1:25, 1:30,1:40, 1:50 และ 1:60 จำนวน 600 มล. ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 1000 มล.เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดเหลวลงไปในปริมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตรรวมของดินพรุ และเวอร์มิคูไลท์ ที่ผสมตามอัตราส่วนต่างๆข้างต้น นำไปวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ในข้อ 1 ลงเลี้ยงใน Inoculum medium ที่เตรียมได้นั้นนำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดอัตราการเจริญโดยวิเคราะห์หาปริมาณของเอ็นอะซิทิลกลูโคซามีน ตามวิธีของ Coehransและ Vercellotti (130) เนื่องจากปริมาณของเอ็นอะซิทิลกลูโคซามีนในผนังเซลของราเป็นดัชนีเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญซึ่งวิธีการทำโดยเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 2,4,6 และ 8 สัปดาห์ มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 12 ชม.นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้ว 0.2 กรัมไปย่อยเพื่อสกัดกลูโคซามีนด้วยกรดเกลือเข้มข้นจำนวน 5 มล.บ่มในน้ำเดือดจนครบ 2 ชั่วโมงแล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่อรอบ 10,100 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 30 % แล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่อรอบ 10,100 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสมาปรับให้ได้ปริมาตรครบ 10 มล. แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ กลูโคซามีนโดยกำหนดให้การเจริญเติบโตของเชื้อรา Inoculum medium เป็น มก. ของกลูโคซามีนต่อน้ำหนัก Inoculum medium หนึ่งกรัม

2.1.2 <u>การวิเคราะห์ กลูโคซามีน</u> เพื่อวัดการเจริญของราที่เจริญในเวอร์มิคิวไลท์และดินพรุที่มีอัตราส่วนต่างกัน โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายกลูโคซามีนที่มีความเข้มข้น 25 ถึง 200 ไมโครกรัม ต่อ มล. มา 1 มล. ทำปฏิกริยากับสารละลายของ อะซิทิล อะซิโตน (acetyl acetone) ซึ่งเตรียมโดยให้มี อะซิทิล อะซิโตน 4 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1.25 โมล่าร์ จำนวน 1 มล. ในน้ำเดือด นาน 20 นาที ทิ้งไว้ให้

เย็นแล้วเติมเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 10 มล. และ เติม Erhlich's reagent ซึ่งประกอบด้วย p-Dimethylamino benzaldehyde 2.67 เปอร์เซ็นต์ ใน กรดเกลือ ต่อเอทธานอล 1 ต่อ 1 อีก 1 มล. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ก่อนวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของ กลูโคซามีนไฮโดรครอไรด์ (Glucosamine hydrochloride)

2.2 การเตรียม Inoculum ของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ โดยใส่ตัวแทนของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้จากข้อ 1 ได้แก่ Surin 1 ,Pisanulok 2 ,Saraburi 3 ,Tak 4 ,Ubolrachathani 3 ลงเลี้ยงใน Inoculum medium ที่มีสูตรเหมาะสมต่อการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าจากผลการทดลองในข้อ 2.1 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อที่จะนำมาใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.หาสภาวะเหมาะสมต่อการฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดสนสามใบ เนื่องจากเมล็ดสนสามใบที่นำมาใช้ในการทดลองจะมีจุลินทรีย์ติดปนเปื้อนโดยธรรมชาติอยู่ที่บริเวณผิวของเปลือกเมล็ดซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้อาจเป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืชหรือราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่ติดปนเปื้อนมา จึงต้องทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดสนสามใบให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

3.1 การฆ่าเชื้อบนผิวเมล็ดสนสามใบ ทำโดยการแช่เมล็ดสนสามใบในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (30 % Hydrogen peroxide) ด้วยระยะเวลาต่างๆกันคือ 0.5, 1, 2, 3 และ 4 นาที ตามลำดับจากนั้นจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.2 ทดสอบการปราศจากเชื้อจุลินทรีย์บนผิวเมล็ดสนสามใบโดยวางเมล็ดสนที่ได้จากข้อ 3.1 จำนวน 10เมล็ด ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดแข็ง โดยให้มีจำนวนเมล็ดสนสามใบ 4 เมล็ด ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อMMN 1 จานและสังเกตนับจำนวนเมล็ดสนสามใบที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้น นับจำนวนเมล็ดสนสามใบที่งอกและเจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 10 วัน โดยเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากชุดควบคุม ซึ่งทำการแช่เมล็ดสนสามใบในน้ำกลั่นด้วยระยะเวลาต่างๆกันคือ 0.5, 1, 2, 3 และ 4 นาที ตามลำดับ

4. เปรียบเทียบอัตราการเจริญของสนสามใบ ที่ใส่รำเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้จากกล้าสนที่ได้จากแหล่งต่างๆในงานวิจัยนี้จัดเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่ม จึงต้องทำการทดสอบเพื่อคัดเลือกหาราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของกล้าสนสามใบที่ใส่ตัวแทนราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ทั้ง 5 กลุ่ม ได้แก่ Surin 1,Pisanulok 2 ,Saraburi 3, Tak 4 และ Ubolrachathani 3 กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า โดยมีการวัดเปรียบเทียบ parameter ต่างๆได้แก่ ความยาวของลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสดของลำต้น น้ำหนักสดของราก น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของราก เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อที่บริเวณราก เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแตสเซี่ยมที่มีในกล้าสนสามใบ โดยทำการทดลองเป็นขั้นตอนตามลำดับดังนี้

4.1 เตรียมเมล็ดสนสามใบที่ใช้ในการทดลอง โดยนำเมล็ดสนสามใบที่ได้จากฝ่ายวนวัฒน์วิจัย กรมป่าไม้ ซึ่งเก็บจากดอยอินทนนท์ เมื่อปี พ.ศ. 2532 มาทำการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวของเมล็ด โดยแช่เมล็ดสนสามใบลงในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที ตามผลการทดลองในข้อ 3 จากนั้นล้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตกค้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 ครั้ง เป็นเวลานานครั้งละ 5 นาที

4.2เตรียมวัสดุการเพาะกล้าสนสามใบ โดยนำกระบะพลาสติกขนาด 50 x 60 x 75 ซม. ที่ได้ทำการเจาะรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซ็ม. ที่ก้นกระบะเพื่อการระบายน้ำแล้วทำการฆ่าเชื้อที่บนผิวของกระบะพลาสติก โดยล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วจึงใช้เอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์เช็ดให้ทั่วด้านในของกระบะทราย ใช้ตาข่ายไนล่อนที่เช็ดให้ทั่วแล้วด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปูที่ก้นของกระบะพลาสติกแล้วจึงนำกากมะพร้าวซึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้วเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง วางรองด้านในของกระบะทรายโดยให้มีปริมาตร 1 ใน 3 ของกระบะทรายแล้วจึงนำทรายที่ได้ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้วเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใส่ลงในกระบะพลาสติกให้เต็ม

4.3 ทำการเพาะเมล็ดสนสามใบ โดยนำเมล็ดสนสามใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในการทดลองข้อ 4.1 โรยลงในกระบะทราย แล้วนำทรายที่ได้ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มาโรยกลบเมล็ด

สนสามใบให้ทั่ว รดน้ำให้ชุ่มวันละ 2 ครั้ง ซึ่งจะใช้เวลานาน 7 ถึง 10 วัน กล้าสนสามใบจึงจะงอกออกจากเมล็ด นำกล้าสนสามใบซึ่งมีอายุ 2 อาทิตย์ทำการย้ายชำในกระบะทรายที่เตรียมไว้ในการทดลองข้อ 4.2 โดยที่ผสม Inoculum ของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ซึ่งเตรียมไว้ในข้อ 2.2 เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ โดยใช้อัตราส่วน Inoculum ต่อ ทราย เท่ากับ 8 ลิตร ต่อ 1 ลบ.ม. คลุกให้ทั่ว สำหรับชุดการทดลองควบคุมให้ผสมทรายในกระบะพลาสติกด้วย Inoculum medium ที่ไม่ได้ใส่ราไมคอร์ไรซ่าในแต่ละกระบะทำการปลูกกล้าสนสามใบ กระบะละ 50 ต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง รดน้ำให้ชุ่มทุกวัน จนกว่ากล้าไม้จะตั้งตัวได้หรือนานประมาณ 1 อาทิตย์ จากนั้นจึงรดน้ำวันเว้นวัน ทำการให้ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแตสเซี่ยม ในระดับต่ำ(ภาคผนวก ข) แก่กล้าสนอาทิตย์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 2 อาทิตย์ จากนั้นเปลี่ยนเป็นให้ปุ๋ย 2 อาทิตย์ ต่อ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 5 เดือน

4.4 <u>เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสนสามใบระหว่างชุดการทดลองที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า กับ ชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า</u> ภายหลัง 5เดือน ที่ได้ทำการเพาะกล้าสนสามใบโดยดึงกล้าสนออกล้างน้ำแล้วนำมาวัด parameter ต่างๆดังนี้

4.4.1 ทำการวัดความยาวของลำต้นและความยาวของราก ด้วยไม้บรรทัด ส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น วัดด้วยเวอร์เนีย

4.4.2 นำสนสามใบที่ได้มาชั่งน้ำหนักบนตาชั่ง Top balance เพื่อหาน้ำหนักสดของราก และ ลำต้น

4.4.3 นำสนสามใบที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมงจนได้น้ำหนักคงที่ นำมาชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้งของราก และ ลำต้น

4.4.4 วัดเปอร์เซ็นต์การติดราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่รากของสนสามใบ ตามวิธีของ Linderman และ Call(131) โดยนำรากมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา แล้วนำรากนั้นมาตัดออกเป็นชิ้นๆ มีความยาวชิ้นละประมาณ 1 ซม. สุ่มชิ้นส่วนรากที่ตัดแล้ว 50 ชิ้น มาสำรวจการติดราเอคโตไมคอร์ไรซ่า ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สองตา ซึ่งจะสังเกตเห็นสายใยราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่ชิ้นส่วนของราก นับจำนวนชิ้นส่วนของรากที่พบว่ามีราเอคโตไมคอร์ไรซ่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำนวนหาเปอร์เซ็นต์การติดราไมคอร์ไรซ่าที่บริเวณราก

4.4.5 นับจำนวนสนสามใบที่ได้จากการทดลองทุกชุดการทดลองเพื่อเปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด

4.4.6 วิเคราะห์หาปริมาณธาตุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โปแตสเซี่ยมที่มีในสนสามใบที่ได้จากการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณของธาตุดังกล่าวที่กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตร และ สหกรณ์ โดยวิธีของ AOAC(132)

4.4.7 วิเคราะห์ข้อแตกต่างโดยวิธีทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์หา Duncan multiple range test (133)

5. ตรวจสอบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซ่า และ ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่ใช้เป็น Inoculum เพื่อตรวจสอบยืนยันชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่อาศัยที่บริเวณรากสนสามใบทุกชุดการทดลองที่เพาะได้ในข้อ 4.3 ว่าเป็นราเอคโไมคอร์ไรซ่าชนิดเดียวกันกับที่ได้ใส่ลงไปในการทดลองที่ 4.3 หรือไม่ โดย

5.1 ตรวจดูลักษณะการติดเชื้อที่บริเวณราก โดยตรวจดูสายใยราที่บริเวณรากสนสามใบที่เพาะได้จากการทดลองในข้อ 4.3 ด้วยกล้องจุลทรรศน์

5.2 ทำการแยกราเอคโตไมคอร์ไรซ่า จากรากสนสามใบที่ได้จากการทดลองทุกชุดการทดลอง โดยทำการแยกราเอคโตไมคอร์ไรซ่าจากรากสนสามใบที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.3 ตามวิธีการจากการทดลองข้อ1.1 ศึกษาลักษณะของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่ได้โดยดูลักษณะภายนอกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดแข็งและดูลักษณะของสายใยด้วยกล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่ใช้เป็น Inoculum ทั้ง 5 Isolates เพื่อตรวจสอบยืนยันชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซ่า ที่อาศัยที่บริเวณรากสนสามใบทุกชุดการทดลองที่เพาะได้ในข้อ 4.3