บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. สำรวจเก็บตัวอย่างเห็ด *Pisolithus tinctorius* จากแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย

สำรวจและเก็บตัวอย่าง เห็ด *P. tinctorius* จากแหล่งต่าง ๆ ในธรรมชาติ ทั้งในป่าสนเขา และสวนป่ายูคาลิปตัส ในพื้นที่ 20 จังหวัด (ภาพที่ 3) ของภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก ระหว่างช่วงฤดูฝนของแต่ละปี ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ถึงกันยายน 2539 และระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึงกันยายน 2540 ลักษณะดอกเห็ดมีสีแตกต่างกัน ตั้งแต่สีเบจ (beige) จนถึงสีน้ำตาล (mustard) (Rice & Beebee, 1980) ดอกเห็ด *P. tinctorius* ที่พบในป่าสน (ภาพที่ 4) จะมีสีค่อนข้างเข้มกว่าดอกเห็ด *P. tinctorius* ที่พบในสวนป่ายูคาลิปตัส (ภาพที่ 5) พบว่าดอกเห็ด *P. tinctorius* ไม่มีก้านดอกที่แท้จริง ความสูงวัดจากฐานถึงปลายดอก ประมาณ 2-20 เซนติเมตร (ภาพที่ 6) เส้นรอบวงของดอกวัดได้ประมาณ 7- 44 เซนติเมตร เมื่อตัดดอกเห็ดตามยาวจะเห็นลักษณะเป็นชั้น 2 ชั้น ประกอบด้วยชั้นของสปอร์ มีลักษณะคล้ายเม็ดแคปซูล (seedlike capsule) เชื่อมติดกันด้วยสารเหนียวสีดำ และชั้นของ Peridioles (ภาพที่ 6) สปอร์มีรูปร่างค่อนข้างกลม สีน้ำตาล ผนังขรุขระเป็นหนาม (spiny) ขนาดของสปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8.46 ไมโครเมตร (ภาพที่ 7)

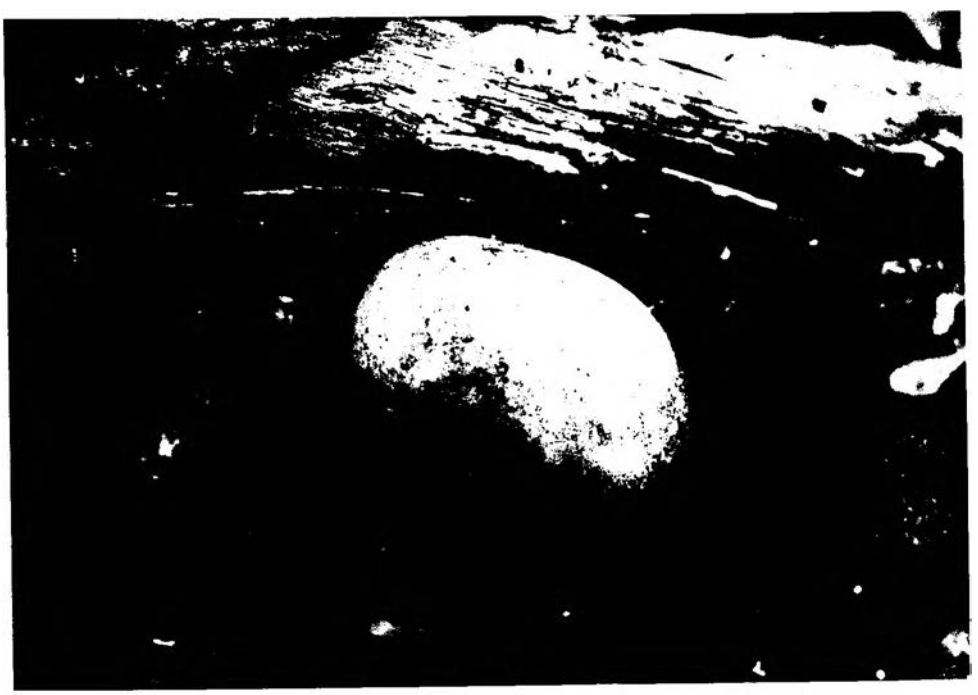
2. การแยกเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซ่าจากดอกเห็ด *P. tinctorius* ให้ได้เส้นใยที่บริสุทธิ์

แยกเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดที่เก็บได้ในข้อ 1 เลือกเห็ดดอกอ่อนที่มีสภาพสมบูรณ์ ไม่มีรอยฉีกขาด ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเนื้อเยื่อที่อยู่ภายใน นำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Modiffied Melin-Norkrans (MMN) (Molina & Palmer, 1982) ในจานเลี้ยงเชื้อ โดยมี pH ประมาณ 5.7-5.8 และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (24-25 องศาเซลเซียส) ประมาณ 3-4 สัปดาห์ ทำการ subculture จนกระทั่ง ได้เส้นใยของราที่บริสุทธิ์ ตรวจยืนยันความบริสุทธิ์ของเส้นใยที่แยกได้ โดยเขี่ยเส้นใยของรา ลงบนแผ่นสไลด์ ย้อมด้วย Lactophenol cotton blue ศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยดูลักษณะพิเศษของราในกลุ่ม Basidiomycetes คือ เส้นใยมี Clamp connection และไม่สร้างสปอร์ เพาะขยายเส้นใยบริสุทธิ์ที่ได้เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

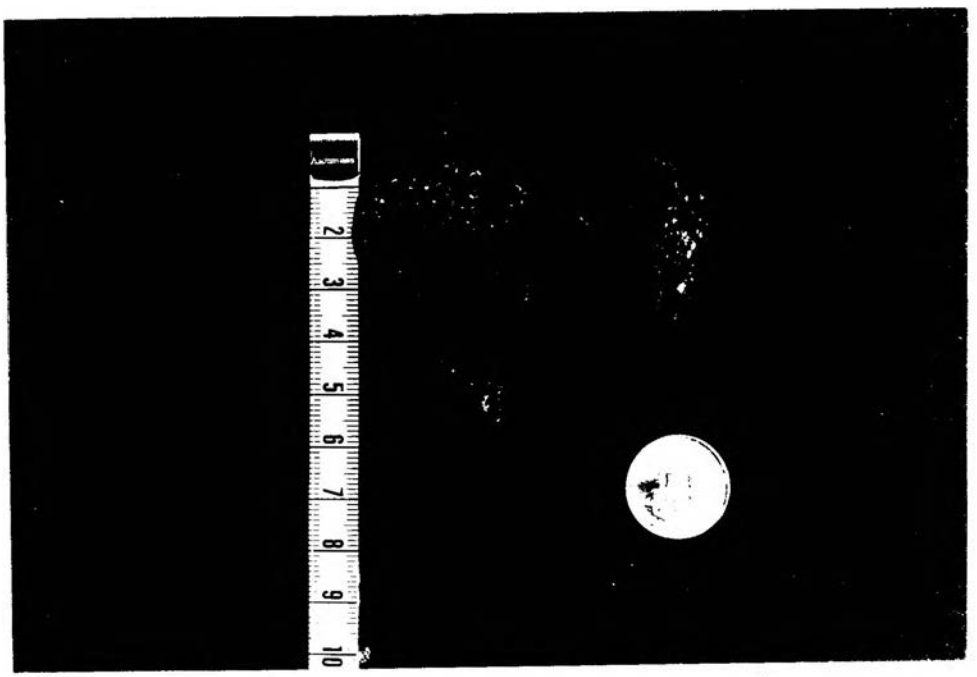
จากการสำรวจเก็บตัวอย่างเห็ด *P. tinctorius* ที่รวบรวมได้ เมื่อนำมาแยกเส้นใยจากเนื้อเยื่อเห็ดด้วยวิธีดังกล่าว สามารถแยกเส้นใยได้เส้นใยที่บริสุทธิ์ จำนวนทั้งสิ้น 14 สายพันธุ์ (ภาพที่ 8 และตารางที่ 3) แต่มีบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถแยกเส้นใยที่บริสุทธิ์ของเห็ด *P. tinctorius* บางสายพันธุ์ได้ เนื่องจากมีอัตราการเจริญช้ามาก จนทำให้มีการปนเปื้อนของราชนิดอื่น ทั้ง 14 สายพันธุ์นี้ จะนำไปใช้ทดสอบในการทดลองขั้นต่อไป

ภาพที่ 3. การกระจายของราเอคโตไมคอร์ไรซ่า *P. tinctorius* ในประเทศไทย สำรวจเก็บตัวอย่างระหว่างปี พ.ศ. 2539-2540

ภาพที่ 4. ลักษณะของดอกเห็ด *P. tinctorius* ที่ขึ้นอยู่ในป่าสนเขาธรรมชาติ

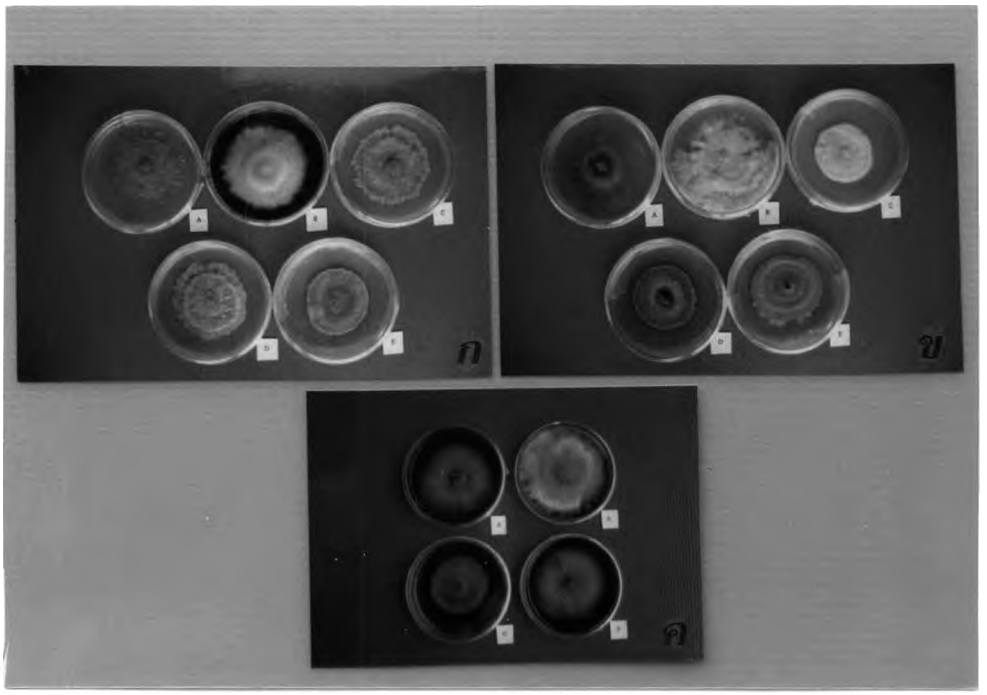


ภาพที่ 5. ลักษณะของดอกเห็ด *P. tinctorius* ที่ขึ้นอยู่ในสวนป่ายูคาลิปตัส



ภาพที่ 6. ลักษณะภายในของดอกเห็ด *P. tinctorius* เมื่อผ่าตามยาวแสดงชั้นของสปอร์ (หัวลูกศร 1) และ Peridioles (หัวลูกศร 2)

ภาพที่7. ลักษณะของสปอร์รา *P. tinctorius* เมื่อศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภาพขยาย 2000 เท่า



ภาพที่ 8. ลักษณะการเจริญของรา *P. tinctorius* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้ เส้นใยบริสุทธิ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN ระยะเวลา 2- 3 สัปดาห์

ก) A คือสายพันธุ์ที่ 1, B คือสายพันธุ์ที่ 2, C คือสายพันธุ์ที่ 3, D คือสายพันธุ์ที่ 4, E คือสายพันธุ์ที่ 5

ข) A คือสายพันธุ์ที่ 6, B คือสายพันธุ์ที่ 7, C คือสายพันธุ์ที่ 8, D คือสายพันธุ์ที่ 9, E คือสายพันธุ์ที่ 10

ค) A คือสายพันธุ์ที่ 11, B คือสายพันธุ์ที่ 12, C คือสายพันธุ์ที่ 13, D คือสายพันธุ์ที่ 14

ตารางที่ 3 สายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า *P. tinctorius* ที่สามารถแยกได้เส้นใยที่บริสุทธิ์

สายพันธุ์ที่	พืชอาศัย	แหล่งที่อยู่	ปีที่แยกเชื้อ
1	*E. camaldulensis*	สวนป่ายูคาลิปตัส ต.ตาดทอง อ.เมือง จ.ยโสธร	2539
2	*E. camaldulensis*	สวนป่ายูคาลิปตัส อ.ทองแสนขัน จ.อุตรดิตถ์	2539
3	*P. kesiya*	ป่าสนเขา อ.ฮอด จ.เชียงใหม่	2539
4	*P. kesiya*	ป่าสนเขา อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่	2539
5	*E. camaldulensis*	สวนป่ายูคาลิปตัส อ.สิรินธร จ.อุบลราชธานี	2539
6	*E. camaldulensis*	สวนป่ายูคาลิปตัส อ.ลานสัก จ.อุทัยธานี	2539
7	*E. camaldulensis*	สวนป่ายูคาลิปตัส อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์	2539
8	*E. camaldulensis*	สวนป่ายูคาลิปตัส อ.สามง่าม จ.พิจิตร	2539
9	*E. camaldulensis*	สวนป่ายูคาลิปตัส อ.มโนรมย์ จ.ชัยนาท	2539
10	*E. camaldulensis*	สวนป่ายูคาลิปตัส อ.นิคมคำสร้อย จ.มุกดาหาร	2539
11	*E. camaldulensis*	สวนป่ายูคาลิปตัส ต.ทุ่งแต้ อ.เมือง จ.ยโสธร	2539
12	*E. camaldulensis*	สวนป่ายูคาลิปตัส ศูนย์ฝึกอบรมการป่าไม้ อ.เมือง จ.ตาก	2539
13	*P. kesiya*	ป่าสนเขา อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว อ.น้ำหนาว จ.เพชรบูรณ์	2540
14	*P. kesiya*	ป่าสนเขา อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว อ.น้ำหนาว จ.เพชรบูรณ์	2540

ตารางที่ 4 ลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN ของราเอคโตไมคอร์ไรซ่า *P. tinctorius* แต่ละสายพันธุ์ ที่สามารถแยกได้เส้นใยที่บริสุทธิ์

สายพันธุ์ที่	ลักษณะการเจริญ
1	เส้นใยเจริญแผ่แบนราบ โคโลนีค่อนข้างกลม เส้นใยไม่ฟู ลักษณะคล้ายแผ่นหนังสีน้ำตาลทอง
2	เส้นใยเจริญแผ่แบนราบ โคโลนีค่อนข้างกลม เส้นใยฟูเล็กน้อย สีน้ำตาล สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีเข้ม เมื่อมีการเจริญมากขึ้น
3	เส้นใยเจริญแผ่แบนราบ ไม่ฟู โคโลนีค่อนข้างกลม ลักษณะคล้ายแผ่นหนังสีน้ำตาลทอง
4	เส้นใยเจริญแผ่แบนราบ ไม่ฟู โคโลนีค่อนข้างกลม ลักษณะคล้ายแผ่นหนังสีน้ำตาลทอง
5	เส้นใยเจริญแผ่แบนราบ เส้นใยไม่ฟู มีลักษณะคล้ายแผ่นหนังสีน้ำตาล โคโลนีค่อนข้างกลม ขอบโคโลนีเรียบ
6	เส้นใยเจริญแผ่แบนราบ โคโลนีค่อนข้างกลม ขอบโคโลนีเรียบ ลักษณะคล้ายแผ่นหนังสีน้ำตาลทอง
7	เส้นใยสีเหลืองเจริญแผ่กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยฟูบ้างเล็กน้อย
8	เส้นใยเจริญแผ่แบนราบบนผิวอาหาร โคโลนีค่อนข้างกลม เส้นใยสีเหลือง ฟูบ้างเล็กน้อย
9	เส้นใยเจริญแผ่แบนราบ ไม่ฟู ขอบโคโลนีเรียบ ลักษณะคล้ายแผ่นหนังสีน้ำตาลทอง
10	เส้นใยเจริญแผ่แบนราบ บาง ไม่ฟู ขอบโคโลนีเรียบ ลักษณะคล้ายแผ่นหนังสีน้ำตาลทอง
11	เส้นใยเจริญแผ่แบนราบ คล้ายแผ่นหนังสีน้ำตาลทอง ขอบโคโลนีเรียบ สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีเข้ม เมื่อเส้นใยมีการเจริญมากขึ้น
12	เส้นใยเจริญแผ่กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร เส้นใยสีเหลืองฟูบ้างเล็กน้อย สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีเข้ม เมื่อเส้นใยมีการเจริญมากขึ้น
13	เส้นใยเจริญแผ่แบนราบ คล้ายแผ่นหนังสีน้ำตาลทอง ขอบโคโลนีค่อนข้างเรียบ เส้นใยไม่ฟู สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีเข้ม เมื่อเส้นใยมีการเจริญมากขึ้น
14	เส้นใยเจริญแผ่แบนราบ คล้ายแผ่นหนังสีน้ำตาลทอง ขอบโคโลนีค่อนข้างเรียบ เส้นใยไม่ฟู สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีเข้ม

3. การทดสอบเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซา *P. tinctorius* ที่แยกได้ เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการจะนำไปทำหัวเชื้อ

3.1 การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) เพื่อใช้ทดสอบ

โดยเลี้ยงเส้นใยรา *P. tinctorius* สายพันธุ์ต่าง ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยรา *P. tinctorius* บริเวณขอบรอบนอกของโคโลนีที่มีการเจริญดีด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จะได้น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 5.55 มิลลิกรัมต่อชิ้น เพื่อให้ได้หัวเชื้อมาตรฐาน

3.2 เปรียบเทียบทดสอบการเจริญของเส้นใยรา *P. tinctorius* โดยการแปรผันปัจจัยด้านอุณหภูมิ

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ ตักชิ้นวุ้นหัวเชื้อ ในข้อ 3.1 ย้ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ (incubator) เป็นระยะเวลา 30 วัน วัดผลการทดลองโดยการกรองเส้นใยด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยใช้เครื่องปั๊ม (vacuum pump) แล้วนำเส้นใยไปอบแห้งที่ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน desicator นำมาชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักแห้งคงที่ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง ใช้แผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) (ภาคผนวก ข) นำข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SigmaStat เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan 's new multiple-range test (DMRT) เพื่อหาระดับของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยรา *P. tinctorius* สังเกตลักษณะเจริญ และการพัฒนาของเส้นใย เช่น ลักษณะโคโลนี, การสร้าง aerial mycelium, สีของเส้นใย, การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3 เปรียบเทียบทดสอบการเจริญของเส้นใยรา *P. tinctorius* โดยการแปรผันปัจจัยความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN แล้วปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3, 5, 6 ด้วยกรดซัลฟุริก ความเข้มข้น 1 นอร์มัล (1 N H_2SO_4) และ pH 7,9 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล (1 N NaOH) บรรจุลงในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 50 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เมื่ออาหารเย็นลง ใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักชิ้นวุ้นหัวเชื้อ ดังข้อ 3.1 ย้ายลงในอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C ตามผลการทดลองข้อจากข้อ 3.2 เป็นระยะเวลา 30 วัน เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใย เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2 เพื่อหาระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยรา *P. tinctorius* แต่ละสายพันธุ์ สังเกตลักษณะการเจริญและการพัฒนาของเส้นใย เช่น ลักษณะของโคโลนี สีของเส้นใย การเปลี่ยนสีของอาหาร และการเปลี่ยนแปลงของ pH

4. ทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่าของรา *P. tinctorius* และเปรียบเทียบอัตราการเจริญของกล้าไม้สนสามใบ และยูคาลิปตัส ที่มีการใส่หัวเชื้อเส้นใยรา และชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อเส้นใยราซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

4.1 การเตรียมหัวเชื้อเส้นใย (pure mycelial inoculum) รา *P. tinctorius* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ คัดเลือกสายพันธุ์รา *P. tinctorius* ที่มีการเจริญดี มาทำการเพิ่มจำนวนเส้นใย ด้วยการเพาะเลี้ยงในวัสดุผสมเวอร์มิคิวไลท์ (vermiculite) และดินพรุ (peat) (Marx et al., 1984a) โดยหาอัตราส่วนผสมทั้งสอง เพื่อให้ได้ระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยรา บรรจุวัสดุดังกล่าวในขวดทดลองขนาด 1,000 มิลลิลิตร ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN ที่มี pH เหมาะสมตามผลการทดลองที่ได้ในข้อ 3.3 ในอัตราส่วนวัสดุที่ใช้ทำหัวเชื้อ ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 2 : 1 โดยปริมาตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง โดยทิ้งช่วงเวลาในการนึ่งครั้งที่ 2 ห่างจากครั้งแรก นาน 24 ชั่วโมง ใส่รา *P. tinctorius* ที่คัดเลือก ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MMN ที่มีระดับอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสม เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ลงในวัสดุที่ใช้ทำหัวเชื้อ ดังกล่าว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.1 เป็นเวลาประมาณ 3-4 เดือน เมื่อจะนำมาใช้ ให้ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากหัวเชื้อ ด้วยน้ำสะอาดกรองด้วยผ้าขาวบาง บีบเอาน้ำออกให้หมาด พร้อมที่จะนำไปผสมกับวัสดุที่ใช้ปลูกต่อไป

4.2 การเตรียมเมล็ดไม้สนสามใบ และยูคาลิปตัส

4.2.1 การคัดเลือกเมล็ดสนสามใบ และยูคาลิปตัสเพื่อนำมาใช้ทดสอบ นำเมล็ดไม้ทั้ง 2 ชนิด มาแช่ในน้ำกลั่น 24 ชั่วโมง คัดเมล็ดที่ลอยน้ำทิ้งไป เก็บเมล็ดที่จมน้ำไว้ทำการทดลองต่อไป

4.2.2 การฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ด นำเมล็ดที่เก็บได้จากข้อ 4.2.1 มาฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ในเอทธานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3-5 นาที จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 และ 30 นาที สำหรับเมล็ดไม้ยูคาลิปตัส และสนสามใบ ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง (Brundrett et al., 1996)

4.3 การเตรียมวัสดุที่จะใช้ในการเพาะกล้าไม้สนสามใบ และยูคาลิปตัส

4.3.1 การเตรียมถาดเพาะชำ นำถาดเพาะชำทรงสูง แบบหลุม ขนาด 9×14×7 นิ้ว ชนิด 24 หลุม มาฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวของถาดเพาะ โดยล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วใช้เอทธานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ดให้ทั่วด้านในของถาดเพาะ

4.3.2 การเตรียมวัสดุที่ใช้เพาะ นำทรายผสมกับขุยมะพร้าว เปลือกถั่ว และหน้าดินจาก สวนป่ายูคาลิปตัส (top soil) ด้วยอัตราส่วน 2:1:1 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร (pH ของวัสดุที่ใช้เพาะเท่ากับ 6.0) ซึ่งได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผสมคลุกเคล้ากับหัวเชื้อเส้นใย ที่เตรียมได้จากข้อ 4 ด้วยอัตราส่วน 8:1 โดยปริมาตร (สมบูรณ์, 2533) บรรจุลงในถาดเพาะชำแบบหลุมที่ได้เตรียมไว้ในข้อ 4.3.1 เตรียมชุดการทดลองควบคุม โดย

ใช้หัวเชื้อเส้นใยของ *P. tinctorius* ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 มานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผสมกับดินเพาะที่เตรียมได้ข้างต้น นำเมล็ดไม้ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2.2 มาหยอดลงในวัสดุเพาะในหลุมถาดเพาะชำ โดยใส่หลุมละ 2-3 เมล็ด สำหรับสนสามใบ และหลุมละ 3-5 เมล็ด สำหรับยูคาลิปตัส ใช้การทดลองแบบ Randomized complete block design (ภาคผนวก ข) แต่ละชุดการทดลองทำ 4 block

4.4 การดูแลรักษากล้าไม้ รดน้ำกล้าไม้ในกระถางทั้งหมด ให้ชุ่มพอประมาณ อย่าให้แฉะเกินไป ในตอนเช้า และเย็นอย่างสม่ำเสมอ จนกล้าอายุครบ 6 เดือน ซึ่งเสร็จสิ้นการทดลอง ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในระดับปานกลาง (ภาคผนวก ก.) ทุก ๆ 2 สัปดาห์

4.5 การเก็บข้อมูล เปรียบเทียบหาอัตราการเจริญเติบโตของกล้าไม้สนสามใบ และยูคาลิปตัส ที่มีการใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า และชุดควบคุมที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่ออายุ 6 เดือน สุ่มถอนกล้าสนสามใบ และยูคาลิปตัสจากถาดเพาะชำ ชนิดละ 4 ต้น โดยวัด

4.5.1 ความสูงของลำต้น และเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้น เมื่อกล้าไม้อายุครบ 6 เดือน

4.5.2 หามวลชีวภาพในแต่ละส่วนของกล้าไม้ แยกเป็นส่วนของลำต้น ใบ และรากของแต่ละต้น จากนั้นนำทั้ง 3 ส่วน ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้งเพื่อหามวลชีวภาพส่วนต่าง ๆ ของกล้าไม้แต่ละต้นต่อไป

4.5.3 หาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (percent Infection) ของรา *P. tinctorius* ของกล้าไม้สนสามใบ และยูคาลิปตัส โดยดัดรากออกเป็นชิ้น ให้มีความยาวประมาณชิ้นละ 1-1.5 เซนติเมตร ย้อมสีรากตามวิธีของ Phillips และ Hayman (1970) สุ่มชิ้นส่วนของรากที่ย้อมสีแล้วมา 50 ชิ้น วางบนแผ่นสไลด์ ครั้งละ 5 ชิ้น นับจำนวนชิ้นส่วนของรากที่พบว่ามีเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซ่า *P. tinctorius* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของแต่ละชุดการทดลอง เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ

4.5.4 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตของความสูงลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้น อัตราส่วนระหว่างความสูงกับเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้น มวลชีวภาพส่วนต่าง ๆ ของกล้าไม้ อัตราส่วนมวลชีวภาพส่วนเหนือดินต่อส่วนใต้ดิน ในแต่ละชุดการทดลองของกล้าไม้ และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ *P. tinctorius* เมื่ออายุครบ 6 เดือน โดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) หากมีนัยสำคัญทางสถิติ ก็ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan 's new multiple-range test (DMRT)