บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. เห็ดเผาะ (*A. hygromitricus.*) สายพันธุ์ 1 ได้จาก จังหวัดยโสธร สายพันธุ์ 2 ได้จาก จังหวัดเชียงใหม่ สายพันธุ์ 3 ได้จาก จังหวัดขอนแก่น และ เห็ดตับเต่าดำ (*B. edulis.*) สายพันธุ์ 1 ได้จาก จังหวัดนนทบุรี สายพันธุ์ 2 ได้จาก จังหวัดเชียงใหม่ สายพันธุ์ 3 ได้จาก จังหวัดนครราชสีมา

2. วัสดุเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารและวิตามิน

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. Dextrose	Difco , U.S.A
2. Glucose	Merck - Schuchardt , Germany
3. Yeast Extract	Difco , U.S.A
4. Potato Dextrose Agar	Difco , U.S.A
5. Potato Dextrose Broth	Difco , U.S.A
6. Calcium chloride ($CaCl_2$)	May & Baker , England
7. Potassium phosphate (KH_2PO_4)	May & Baker , England
8. Bacto - peptone	Difco , U.S.A
9. Bacto - saccharose	Merck - Schuchardt , Germany
10. Malt - Extract	Difco , U.S.A
11. Agar	-
12. Ammonium chloride (NH_4Cl)	May & Baker , England
13. Ammonium phosphate [$(NH_4)_3HPO_4$]	May & Baker , England
14. Benlate (benomyl)	คูปองท์
15. Boric acid (H_3BO_3)	May & Baker , England
16. Hydrochloric acid (HCl)	May & Baker , England
17. Cupper (II) sulphate ($CuSO_4 . 5H_2O$)	May & Baker , England

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
18. di - Potassium Hydrogen Phosphate (K_2HPO_4)	May & Baker , England
19. Ethanol (C_2H_5OH)	Merck - Schuchardt , Germany
20. Ferric chloride ($FeCl_3 . 6H_2O$)	May & Baker , England
21. Magnesium sulphate ($MgSO_4 . 7H_2O$)	May & Baker , England
22. Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Methenson Colemen
23. Manganese chloride ($MnCl_2 . 4H_2O$)	May & Baker , England
24. Zinc sulphate ($ZnSO_4 . 7H_2O$)	Sigma Chemicals , U.S.A
25. Thiamine - HCl	May & Baker , England
26. Sodium nitrate ($NaNO_3$)	May & Baker , England
27. Sodium chloride (NaCl)	Fluka
28. Sodium hydroxide (NaOH)	May & Baker , England

3. อุปกรณ์และครุภัณฑ์

ชนิดเครื่องมือ	แบบรุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. ขวดทดลอง (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร	Pyrex	Bibby , England
2. ขวดทดลอง (erlenmeyer flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร	Pyrex	Bibby , England
3. จานเลี้ยงเชื้อ (Petridish)	Pyrex	Bibby , England
4. หม้อนึ่งความดันไอ	ไฟฟ้า	Ta Chang MedicalInstrument Factory Taiching , Taiwan , R. O . C
5. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Memmert	Memmert ,Western Germany

ชนิดเครื่องมือ	แบบรุ่น	บริษัทผู้ผลิต
6. ตู้ถ่ายเชื้อ	"ISSCO" Laminar Flow Model H - 124	International Scientific Supply Co., Thailand.
7. เครื่องชั่งละเอียด	Precisa 80 - A - 200M	Memmert ,Westen Germany.
8. pH meter (Digital)	Meiji Model - 5002	Meiji - Labax , Japan.
9. Vaccuum Pump	Hunter	Hamburg , Germany.
10. Critical Point Dryer	Sandri 780	JOEL , Japan
11. Ion Spatter	Balzers SCD 040	JOEL , Japan
12. Scanning Electron Microscope	JEOL ISM-T220 A	JOEL , Japan
13. Atomic Absorption Spectrophotometry	HITACHI 170 - 30	Hitachi , Japan
14. Spectrophotometry	Spectronic 21	Milton Roy Co.

4. วัสดุปลูก ได้แก่ ขุยมะพร้าว เวอร์มิคิวไลท์ ทราย และวัสดุอื่นๆ ได้แก่ cork borrer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เข็มเขี่ยเชื้อ กระดาษกรองเบอร์ 1 กระดาษอลูมิเนียม สำลี และกล้องถ่ายภาพ

วิธีการทดลอง

1.<u>การแยกราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าให้บริสุทธิ์และเพาะขยายราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่า</u>

ทำการแยกเส้นใยของราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าจากเนื้อเยื่อของเห็ดตับเต่าดำ (*B. edulis.*) 3 สายพันธุ์และเห็ดเผาะ (*A. hygrometricus*) 3 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อโดยมี pH ประมาณ 5 และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ121องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 28 - 30 องศาเซลเซียสประมาณ 4 สัปดาห์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเส้นใยราที่แยกได้โดยเขี่ยเส้นใยของราที่แยกได้ลงบนแผ่นสไลด์ ย้อมสีด้วย lactophenol cotton bule ศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยดูลักษณะพิเศษของราใน

กลุ่ม Basidiomycetes คือ clamp connection จากนั้นเพาะขยายเส้นใยบริสุทธิ์ที่ได้จากเนื้อเยื่อเห็ดทั้งสองชนิดในจานเลี้ยงเชื้อ เพื่อใช้ทำการศึกษาในขั้นต่อไป.

2. ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของเส้นใยราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่า

2.1เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าเห็ดเผาะ (*A. hygrometricus*) 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 1 , 2 และ 3 เห็ดตับเต่าดำ (*B. edulis*) 3 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ 1 , 2 และ 3 ในอาหารธรรมชาติ Potato Dextrose Both (PDB) และ Malt Extract Media (ME) อาหารกึ่งสังเคราะห์ Modified Melin & Norkrans Media (MMN) , Hagem Media (HM) และอาหารสังเคราะห์ Palmer Media (PM) (ภาคผนวก ก) เพื่อคัดเลือกหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าดังกล่าวโดยเลี้ยงเส้นใยเห็ดเผาะ (*A. hygrometricus*) สายพันธุ์ 1 , 2 และ 3 เห็ดตับเต่าดำ (*B. edulis*) สายพันธุ์ 1 , 2 และ 3 บนอาหารเลี้ยง Potato Dextrose Agar เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าบริเวณรอบนอกของโคโลนีที่มีการเจริญดีด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรเพื่อให้ได้ inoculum มาตรฐาน แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักชิ้นวุ้นดังกล่าวย้ายลงบนอาหารเหลวดังกล่าวข้างต้น 100 มิลลิลิตรในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28 - 30 องศาเซลเซียส) ในสภาพนิ่ง

วัดผลการทดลองโดยชั่งหาน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยทุกๆ 5 วันเป็นเวลา 30 วัน โดยกรองเส้นใยด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยใช้ vacuum pump แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วย hot air oven นำข้อมูลวิเคราะห์ทางสถิติชุดการทดลองทำ 4 ซ้ำ แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยวิธี Duncan ' s New Multiple - Range Test (DMRT) เพื่อหาชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่า สังเกตการเจริญและการพัฒนาของเส้นใย ได้แก่ ความหนาแน่นของเส้นใย ลักษณะโคโลนี และ การเปลี่ยนสีของเส้นใย

2.2 ศึกษาผลของความเป็นกรด - ด่าง (pH) ต่อการเจริญของเส้นใยราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 โดยทำเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ทำการปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวลงในจานเลี้ยงเชื้อ เมื่ออาหารเย็นวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยราขนาด 5 มิลลิเมตรลงบนอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส)

วัดผลการทดลองโดยการวัดหาเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีด้วยไม้บรรทัดทุกวันจนกระทั่งเส้นใยราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อคำนวนหาค่าเฉลี่ย นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติชุดการทดลองทำ 4 ซ้ำ แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan 's New Multiple - Range Test (DMRT) เพื่อหาความเป็นกรด - ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าสังเกตการเจริญและพัฒนาเส้นใยของราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่า ได้แก่ ความหนาแน่นของเส้นใย ลักษณะโคโลนี การเปลี่ยนสีของเส้นใย

2.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของเส้นใยราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เหมาะสมและที่ pH ที่เหมาะสม โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 และปรับ pH ที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 มาศึกษาที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ (Incubator). วัดผลการทดลองโดยการวัดหาเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีคำนวนหาค่าเฉลี่ยเช่นเดียวกับข้อ2.2 เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่า สังเกตการเจริญและพัฒนาของเส้นใยเช่นเดียวกับข้อ 2.2.

ตัวอย่างผังการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ทรีตเมนต์ ชุดการทดลอง 4 ซ้ำ ซึ่งเท่ากับ 20 หน่วยการทดลอง

T_1R_1	T_1R_3	T_1R_2	T_1R_4
T_2R_2	T_2R_3	T_2R_4	T_2R_1
T_3R_4	T_3R_1	T_3R_3	T_3R_2
T_4R_3	T_4R_2	T_4R_1	T_4R_4
T_5R_1	T_5R_4	T_5R_2	T_5R_3

T = ทรีตเมนต์ R_n = ซ้ำที่ n โดยที่ n = 1, 2, 3, 4

หมายเหตุ หน่วยทดลองวางในผังการทดลองแบบสุ่ม

3. การเพิ่มจำนวนราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่า

คัดเลือกราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าที่มีการเจริญเติบโตดีมาทำการเพิ่มจำนวนเส้นใย โดยเตรียมวัสดุที่ใช้เลี้ยงราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าเพื่อทำ inoculum ซึ่งประกอบด้วยเวอร์มิคิวไลท์ กับดินพรุ (peat moss) และ ขุยมะพร้าวกับดินพรุ โดยหาอัตราส่วนผสมทั้งสองเพื่อให้ได้ผลของ pH เหมาะสมต่อการเจริญของราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าที่เลือกตามผลการทดลองในข้อ 2.2 (ภาคผนวก ข) บรรจุวัสดุดังกล่าวลงในขวดทดลองขนาด 2000 มิลลิลิตร ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมตามผลการทดลองข้อ 2.1 ในอัตราส่วนวัสดุที่ใช้ทำ inoculum ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 2 : 1 โดยปริมาตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่อง autocalve ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมงจำนวน 2 ครั้งโดยทิ้งช่วงเวลาในการนึ่งครั้งที่สองห่างจากครั้งแรกนาน 24 ชั่วโมง ใส่ราที่คัดเลือกและเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ลงในวัสดุที่ใช้ทำ inoculum ดังกล่าว บ่ม inoculum ที่อุณหภูมิเหมาะสมตามผลการทดลองข้อ 2.3 เป็นเวลา 2 - 3 เดือน ตรวจสอบการปนเปื้อนของรา ชนิดอื่นปนเข้ามาใน inoculum โดยการสังเกตดูด้วยตาเปล่าและกล้องจุลทรรศน์

4.ทดสอบการสร้างเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าของราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าและเปรียบเทียบอัตราการเจริญของกล้าสนสามใบ (*Pinus kesiya*.)ที่มีการใส่ราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าและชุดควบคุมที่ใส่ราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าโดยผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

4.1 เตรียมเมล็ดสนสามใบที่ใช้ในการทดลอง โดยนำเมล็ดสนสามใบที่ได้จากฝ่ายวนวัฒน์วิจัย กรมป่าไม้ ซึ่งเก็บจากท้องที่หนองกระทิง จังหวัดเชียงใหม่เมื่อปี พ.ศ 2530 มาทำการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวของเมล็ด โดยแช่เมล็ดสนสามใบลงในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตกค้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง เป็นเวลานานครั้งละ 5 นาที ตามรายงานของศราวุธ หุ่นโตภาพ (2535)

4.2 เตรียมวัสดุการเพาะกล้าสนสามใบ โดยนำกระบะพลาสติกขนาด 20 × 50 ×18 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวกระบะพลาสติก โดยล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วใช้เอทธานอล 70 เปอร์เซนต์เช็ดให้ทั่วด้านในของกระบะ นำทรายผสมกับขุยมะพร้าวด้วยอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร ซึ่งได้ผ่านการนึ่งฆ่า 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ผสมคลุกเคล้ากับ inoculum ที่เตรียมได้จากข้อ 3 ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกรองเพื่อชะอาหารเลี้ยงเชื้อออกจาก inoculum โดยมีอัตราส่วน 9 : 1 โดยปริมาตร บรรจุลงในกระถางพลาสติก ทำชุดการทดลองควบคุม โดยใช้ inoculum ของรา *A. hygromitricus* ที่เจริญในขุยมะพร้าว (CCA) inoculum ของรา *A. hygromitricus* ที่เจริญในเวอร์มิคิวไลท์ (CVA) inoculum ของรา *B. edulis* ที่เจริญในขุยมะพร้าว (CCB) inoculum ของรา *B. edulis* ที่เจริญใน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวอร์มิคิวไลท์ (CVB) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.3 ทำการเพาะเมล็ดสนสามใบ โดยนำเมล็ดสนสามใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วในการทดลองข้อ 4.1 โรยลงในกระบะที่มีวัสดุเพาะที่เตรียมไว้ดังข้อ 4.2 กระบะละ 150 เมล็ด การทดลองนี้ใช้แผ่นการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design , RCBD) และทำการทดลอง 4 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan 's New Multiple - Range Test (DMRT) ทำการรดน้ำต้นกล้าสนสามใบในกระบะทั้งหมดให้ชุ่มพอประมาณทุกวัน และใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในระดับปานกลาง (ภาคผนวก ก.) ทุกๆ 2 สัปดาห์เป็นระยะเวลา 5 เดือน

4.4 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของกล้าสนสามใบ (*Pinus kesiya*.) ที่มีการใส่ราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าและชุดควบคุมที่ใส่ราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าโดยแล้วผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่อต้นกล้าอายุ 5 เดือน ทำการสุ่มถอนกล้าสนสามใบออกจากกระบะๆละ 5 ต้นทุกกระบะล้างส่วนของรากให้สะอาด จากนั้นตรวจสอบการเจริญของสนสามใบที่ให้ราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าเปรียบเทียบกับที่ไม่ให้ราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่า โดยติดตามข้อมูลดังต่อไปนี้

4.4.1 เปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดสนสามใบ โดยทำการนับจำนวนต้นกล้าที่งอกหลังจากเพาะเมล็ดได้ 15 วัน คำนวณหาเปอร์เซนต์การงอก

4.4.2 เปอร์เซนต์การอยู่รอดของกล้าสนสามใบ โดยนับจำนวนต้นกล้าสนสามใบเมื่ออายุ 5 เดือนเปรียบเทียบกับจำนวนต้นกล้าที่งอกทั้งหมด คำนวณหาเปอร์เซนต์การอยู่รอด

4.4.3 ตรวจสอบและหาเปอร์เซนต์การติดเชื้อ (percent infection) ที่รากของกล้าสนสามใบ โดยตัดรากออกเป็นชิ้นๆให้มีความยาวประมาณชิ้นละ 1 เซนติเมตร จำนวน 50 ชิ้น ย้อมสีรากด้วยวิธีของ Phillips และ Hayman (1970) นับจำนวนชิ้นรากที่ติดเชื้อราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา ซึ่งจะสังเกตเห็นเส้นใยราเอ็กโตไมคอร์ไรซ่าที่ชิ้นส่วนของราก คำนวณหาเปอร์เซนต์การติดเชื้อ

4.4.4 น้ำหนักสดของลำต้นใบและราก มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน(น้ำหนักแห้งของลำต้นและใบ) มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน(น้ำหนักแห้งของราก) และ มวลชีวภาพรวม (น้ำหนักแห้งของลำต้น ใบ และราก)ของกล้าสนสามใบ โดยแยกต้นกล้าสนสามใบออกเป็นส่วนของลำต้นเหนือดินและรากใต้ดิน นำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักสดของแต่ละส่วน จากนั้นนำทั้ง 2 ส่วน ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ด้วย hot air oven จนกว่าน้ำหนักแห้งของตัวอย่างคงที่

4.4.5 ความสูงของลำต้น ความยาวราก เส้นผ่าศูนย์กลางระดับคอราก และอัตราส่วนระหว่างความสูงกับเส้นผ่าศูนย์กลางระดับคอราก โดยวัดความสูงจากโคนต้นตรง

คอรากจนถึงปลายยอด วัดความยาวของรากจากคอรากถึงปลายรากและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางระดับคอรากด้วยเวอร์เนีย

4.4.6 ตรวจหาปริมาณธาตุอาหาร ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและ โพแทสเซียม ในใบและลำต้น นำส่วนของลำต้นและใบที่อบแห้งแล้วไปบด ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ภาควิชาปฐพี คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เพื่อหาปริมาณ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม โดยนำไปทำ semi-micro digestion ซึ่งใช้ H_2SO_4 , Na_2SO_4 และ Se (ทัศนีย์ อัตตะนันทน์ และ จงรักษ์ จันทร์เจริญสุข, 2527) นำไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี semi-micro kjeldalh method วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสด้วยวิธี vanadomolybdophosphoric yellow method แล้ววัดด้วยเครื่อง spectrophotometer และหาปริมาณธาตุโพแทสเซียม โดยใช้เครื่อง atomic absorption spectrophotometry

4.4.7.การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของรากกล้าสนสามใบที่มีรา เอ็กโตไมคอร์ไรซ่าด้วยตาเปล่าและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด(Scanning Electron Microscope)

นำตัวอย่างรากต้นกล้าสนสามใบที่ล้างสะอาดแล้ว มาศึกษาลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่าแล้ว นำตัวอย่างรากที่มีราเอ็กโตไมโคซ่าตัดเป็นชิ้นเล็กๆยาวขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตรด้วยใบมีด แช่รากใน 2.5 เปอร์เซนต์ Glutaraldehyde ใน 0.05 M Cacodylate buffer pH 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อ fix ตัวอย่างแล้วนำชิ้นส่วนรากมาผ่านกระบวนการ dehydration โดยแช่ใน 30 , 50 , 70 และ 90 เปอร์เซนต์ และแอบซาลูทแอลกอฮอล์ในแต่ละสารละลาย 15 นาที ตามลำดับ นำชิ้นรากทำให้แห้งภายใต้เครื่อง Critical Point Dryer ซึ่งเครื่องปล่อย liquid CO_2 เข้าไปแทนที่แอลกอฮอล์ในเซลของตัวอย่าง เมื่อเพิ่มความดันจนถึงจุดวิกฤต คือ อุณหภูมิ 31.5 องศาเซลเซียส ความดัน 1,100 Dsi liquid CO_2 จะเปลี่ยนไปเป็น CO_2 gas ทำให้ผิวหน้าของตัวอย่างไม่เสียรูปนำชิ้นรากมาติดบน stub ด้วยเทปกาวสองหน้า เชื่อมชิ้นตัวอย่างบน stub ด้วย Carbon paint เพื่อให้เกิดการนำไฟฟ้าได้ดี นำตัวอย่างมา ฉาบทองด้วยเครื่อง Ion Spatter ยี่ห้อ BALZERS รุ่น SCD 040 ตัวอย่างที่ได้นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM - T220 A โดยมี accelerrating 20 kV ถ่ายรูปลักษณะของรากภายใต้กล้องถ่ายรูป Mamiya ด้วยฟิลม์โกดัก

ตัวอย่างผังการทดลองแบบ Randomied Complete Block Design (RCBD) จำนวน 4 บล็อคประกอบด้วย 8 ทรีตเมนต์ๆละ 150 เมล็ด สุ่มเก็บตัวอย่างกล้าสนสามใบเมื่ออายุ 5 เดือน ทรีตเมนต์ละ 5 ต้น

บล็อค 1

CCA	CA	CVA	VA	CCB	CB	CVB	VB

บล็อค 2

CA	CCA	CB	CVA	VB	CCB	CVB	VA

บล็อค 3

VB	CVB	CA	CCB	CB	CCA	VA	CVA

บล็อค 4

CCB	VA	CVB	VB	CCA	CA	CB	CVA