บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

1. การทดสอบหาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากส่วนต่างๆ ของต้นแปะก๊วย

ทำการเก็บตัวอย่างใบ ก้านใบ และกิ่งอ่อนจากต้นแปะก๊วยที่มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง และไม่แสดงอาการของโรคจำนวน 2 ต้นซึ่งประกอบไปด้วยต้นตัวผู้และต้นตัวเมียอย่างละหนึ่งต้น ที่เจริญเติบโตอยู่ในบริเวณมหาวิทยาลัยมิเอะ จังหวัดมิเอะ ประเทศญี่ปุ่น นำมาทดสอบหาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ โดยวิธีแรกจะทำการกำจัดเชื้อที่ผิวโดยการปล่อยน้ำประปาไหลผ่านตัวอย่างพืชเป็นเวลาหนึ่งคืน ส่วนวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 จะทำการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยการแช่ตัวอย่างพืชใน 70% ethanol เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นย้ายชิ้นพืชไปแช่ใน (1% และ 2.5%) sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที เสร็จแล้วจึงล้างตัวอย่างพืชด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีกจำนวน 2 ครั้ง ซึ่งในวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 นี้มีความแตกต่างกันในความเข้มข้นของ sodium hypochlorite ที่ใช้ โดยใช้ 1% sodium hypochlorite และ 2.5% sodium hypochlorite ในแต่ละวิธีการตามลำดับ และวิธีสุดท้ายนั้นนำมาใช้เป็นตัวควบคุม โดยทำการแยกเชื้อโดยตรงจากตัวอย่างที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธีการใดๆ หลังจากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากแต่ละวิธีการมาผึ่งให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow chamber) ก่อนนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 mm จากนั้นนำไปวางบนผิวหน้าอาหาร half-strength PDA (½PDA) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri-dish) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลาหลายวัน เมื่อพบเชื้อจึงทำการบ่งชนิด และหาค่า Isolation Frequency (IF) ของเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้ในแต่ละวิธีนำมาเปรียบเทียบกัน เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการนำไปใช้แยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากเนื้อเยื่อในส่วนต่างๆ ของต้นแปะก๊วย โดยรายละเอียดของแต่ละวิธีการดังแสดงในตารางที่ 3

2. ตัวอย่างพืชและการเก็บตัวอย่าง

สถานที่เก็บตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือบริเวณภายในมหาวิทยาลัยมิเอะ จังหวัดมิเอะ ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งตั้งอยู่บนตำแหน่ง 34°44'N, 136°31'E สูงจากระดับน้ำทะเล 1 m มีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดปี 15.5 °C และมีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำฝนตลอดปีอยู่ที่ 1650.3 mm

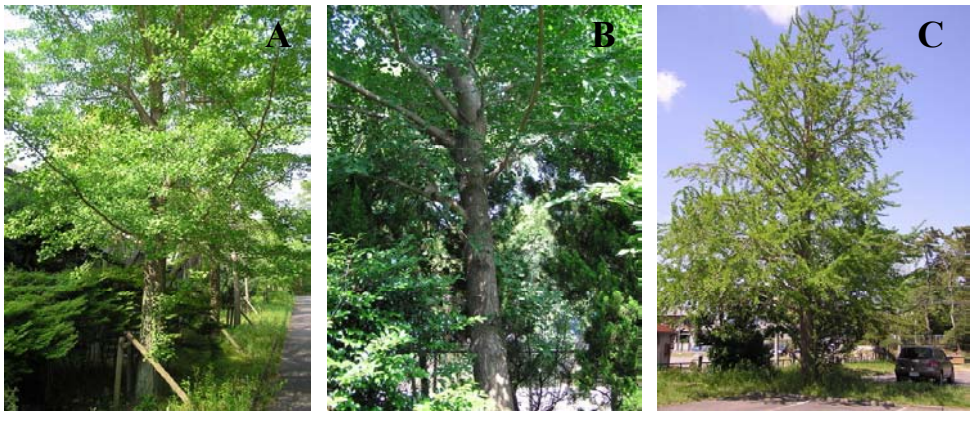
พืชที่นำมาศึกษาคือต้นแปะก๊วยจำนวน 3 ต้น (ภาพที่ 1) ที่มีการนำเข้ามาปลูกไว้ในบริเวณมหาวิทยาลัยโดยการขุดย้ายมาจากบริเวณอื่นภายในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งในจำนวนสามต้นนี้ประกอบไปด้วยต้นตัวผู้หนึ่งต้นและต้นตัวเมียสองต้น โดยกระจายตัวอยู่ในบริเวณที่แตกต่างกันภายในบริเวณที่ทำการศึกษา สำหรับความแตกต่างระหว่างต้นแปะก๊วยตัวผู้กับต้นตัวเมียนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สังเกตได้จากต้นตัวผู้มีเกสรตัวผู้อยู่ภายนอกดอกลักษณะคล้ายหางแมวเรียกว่า แคทคิน (catkin) ส่วนต้นตัวเมียจะพบผลอ่อนของแปะก๊วยมีสีเหลืองยาวประมาณ 1 นิ้ว มีเปลือกสีเงินห่อหุ้มอยู่ภายนอก (ภาพที่ 2) ทำการเก็บตัวอย่างใบแปะก๊วยในทุกเดือนเป็นระยะเวลาประมาณ 1 ปี แต่เนื่องจากต้นแปะก๊วยเป็นไม้ยืนต้นผลัดใบ (deciduous gymnosperm) ดังนั้นการเก็บตัวอย่างจึงแบ่งออกเป็นสองช่วงคือ การเก็บตัวอย่างใบสดในช่วงระหว่างฤดูใบไม้ผลิจนถึงฤดูใบไม้ร่วง และการเก็บตัวอย่างใบร่วงซึ่งเริ่มตั้งแต่ฤดูใบไม้ร่วงไปจนถึงต้นฤดูใบไม้ร่วงของปีถัดไป

ตารางที่ 3 วิธีการต่างๆ ที่นำมาใช้ทดสอบหาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากต้นแปะก๊วย

วิธีที่	การกำจัดเชื้อที่ผิว	ระยะเวลา
1	ปล่อยน้ำประปาไหลผ่าน	ตลอดคืน
2	-70% ethanol -1% NaOCl -ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจำนวน 2 ครั้ง	30 วินาที 3 นาที -
3	-70% ethanol -2.5% NaOCl -ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจำนวน 2 ครั้ง	30 วินาที 3 นาที -
ตัวควบคุม	ไม่มีการฆ่าเชื้อที่ผิว	-



ภาพที่ 1 ต้นแปะก๊วยจำนวน 3 ต้นที่นำมาใช้ในการศึกษา
(A = ต้นหมายเลข 1, B = ต้นหมายเลข 2, และ C = ต้นหมายเลข 3)

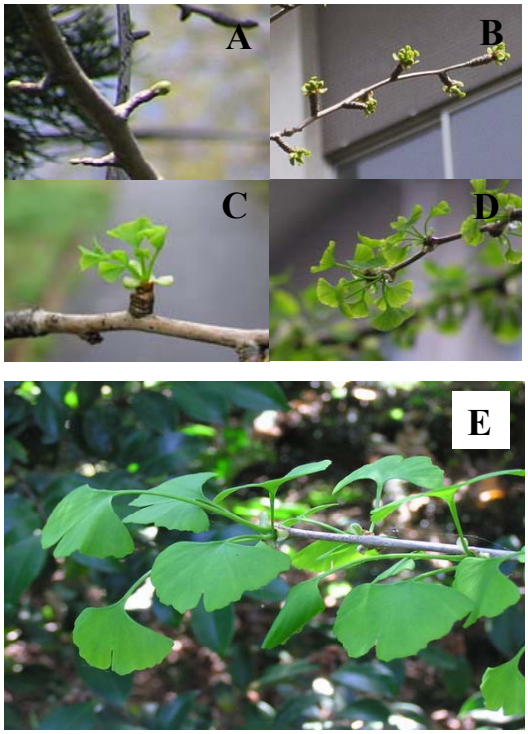
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2 ความแตกต่างของต้นแปะก๊วยตัวผู้กับต้นตัวเมีย
(A = ต้นตัวผู้พบเกสรตัวผู้ภายนอกดอก และ B = ต้นตัวเมียพบผลอ่อนของแปะก๊วยมีสีเหลือง)

2.1 การเก็บตัวอย่างใบสด (living leaves)

การเก็บตัวอย่างใบสดทำโดยใช้กรรไกรตัดในส่วนของกิ่งอ่อนที่มีช่อใบติดอยู่ โดยสุ่มเก็บแต่ละช่อที่อยู่บริเวณกิ่งแขนงที่แตกต่างกันในต้นแปะก๊วยแต่ละต้น โดยเริ่มเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 เมื่อสังเกตพบตาใบเกิดขึ้นในช่วงต้นฤดูใบไม้ผลิ ซึ่งตัวอย่างในครั้งที่ 1 นี้ได้ทำการเก็บแค่ในส่วนของตาใบมาทำการศึกษา ส่วนตัวอย่างตั้งแต่ครั้งที่สองเป็นต้นไปได้ทำการเก็บตัวอย่างในทั้ง 3 ส่วนของพืชคือใบ ก้านใบ และกิ่งอ่อนที่เกิดขึ้นใหม่ในแต่ละปี (current-year twig) ซึ่งการเก็บตัวอย่างในช่วงแรก คือในเดือนเมษายน 2547 จนถึงช่วงต้นเดือนพฤษภาคม 2547 นั้นได้ทำการเก็บตัวอย่างในทุกสัปดาห์ในช่วงที่ใบมีการพัฒนาคือตั้งแต่เกิดตาใบเรื่อยไปจนใบอ่อนพัฒนาขึ้นเป็นใบที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 3) ภายหลังจากใบแปะก๊วยมีการคลี่ตัวโดยสมบูรณ์แล้วจึงทำการการเก็บตัวอย่างเดือนละ 1 ครั้ง โดยเริ่มต้นตั้งแต่กลางเดือนพฤษภาคม 2547 จนถึงระยะที่ใบแก่ก่อนการผลัดใบ (senescent leaves) ในช่วงประมาณเดือนพฤศจิกายน 2547 รวมระยะเวลาทั้งหมด 8 เดือน โดยในช่วงเวลาที่ทำการศึกษาใบสดนั้นประกอบไปด้วย ฤดูใบไม้ผลิ ฤดูฝน ฤดูร้อน และฤดูใบไม้ร่วง ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



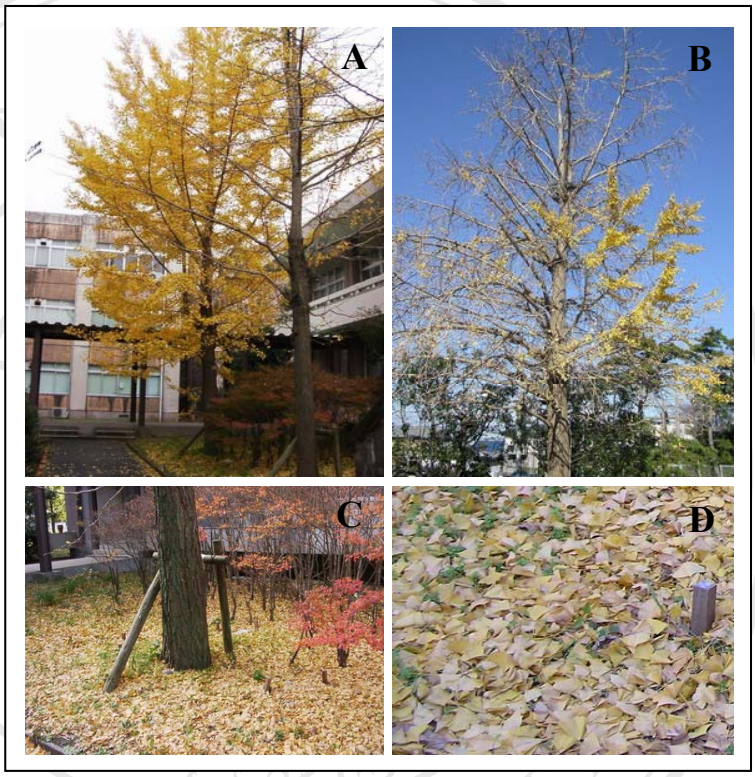
ภาพที่ 3 พัฒนาการของใบแปะก๊วยตั้งแต่มีการผลิตาใบไปจนถึงระยะที่ใบเจริญเต็มที่ (A = ตาใบ B = ตาใบแตก C = ผลิใบอ่อน D = ใบอ่อนมีการคลี่ตัวออก และ E = ใบที่เจริญเต็มที่ โดยที่ภาพ A, B, C, และ D มีระยะเวลาห่างกันภาพละ 7 วัน)

2.2 การเก็บตัวอย่างใบร่วง (leaf litter)

ในขั้นตอนนี้ตัวอย่างที่นำมาศึกษาประกอบไปด้วยใบแปะก๊วยที่เพิ่งร่วงหล่น (freshly fallen leaves) กับใบร่วงที่เริ่มมีการย่อยสลาย (leaf litter) ซึ่งตัวอย่างใบร่วงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือใบ และก้านใบ วิธีการเก็บตัวอย่างทำโดยการเขย่ากิ่งก้านของต้นแปะก๊วยที่กำลังมีการผลัดใบในช่วงฤดูใบไม้ร่วงกลางเดือนพฤศจิกายน 2546 ซึ่งในขณะนั้นใบแปะก๊วยได้แก่ตัวเต็มที่โดยสังเกตได้จากสีของใบซึ่งเปลี่ยนเป็นสีเหลืองโดยสมบูรณ์ทั้งต้น และมีใบบางส่วนเริ่มร่วงหล่นสู่พื้น (ภาพที่ 4) การเก็บตัวอย่างใบร่วงนั้นทำโดยนำผ้าตาข่ายมารองรับใบที่ร่วงหล่นจากการเขย่ากิ่งอยู่ภายใต้ต้นแปะก๊วย โดยพยายามไม่ให้ใบเหล่านั้นร่วงลงสู่พื้นดินก่อนนำมาศึกษา ซึ่งตัวอย่างใบร่วงใหม่ (freshly fallen leaves) ที่เก็บได้จากวิธีการเขย่าต้นส่วนหนึ่งนำกลับมาแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ในห้องปฏิบัติการ อีกส่วนหนึ่งนำไปบรรจุลงในถุงตาข่าย vinyl ที่มีรูตาข่าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 µm โดยเรียกถุงเหล่านี้ว่าถุง litter bag นำมาใช้ศึกษาความต่อเนื่องของเชื้อราเอนโดไฟต์ และเชื้อราทั้งหมดภายในใบที่มีการย่อยสลายในระยะเวลา 1 ปี



ภาพที่ 4 ต้นแปะก๊วยในฤดูใบไม้ร่วงมีใบสีเหลืองทั้งต้นและเริ่มร่วงลงสู่พื้นดิน (A =ใบแก่เป็นสีเหลืองทั้งต้น B = ใบเริ่มร่วง C = ใบที่ร่วงทับถมกันใต้ต้น และ D = leaf litter ของแปะก๊วย)

การศึกษาเชื้อราภายในใบแปะก๊วยที่ร่วงหล่นและเริ่มมีการย่อยสลายในช่วงระยะเวลา 1 ปี ทำโดยการนำใบแปะก๊วยที่เพิ่งร่วงใหม่มาบรรจุลงในถุง litter bag ซึ่งขนาดของถุงที่ใช้มี 2 ขนาดคือ ถุงขนาดเล็กซึ่งมีขนาด 15x20 cm โดยบรรจุใบร่วงไว้ถุงละ 7 ใบ และถุงขนาดใหญ่ซึ่งมีขนาด 25x35 cm โดยบรรจุใบร่วงไว้ถุงละ 40 ใบ ภายหลังบรรจุใบร่วงลงไปในถุง litter bag แล้วจึงทำการปิดปากถุงด้วยเทปกาว หลังจากนั้นนำไปแขวนและวางไว้ใน 2 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน คือตำแหน่งบริเวณพื้นดินภายใต้ต้นแปะก๊วย (ภาพที่ 5) และตำแหน่งบริเวณกิ่งก้านบนต้นแปะก๊วย (ภาพที่ 6) โดยการวางถุง litter bag ในตำแหน่งบริเวณพื้นดินภายใต้ต้นแปะก๊วยได้ใช้ถุงขนาดใหญ่ จำนวน 3 ถุงต่อหนึ่งต้น โดยใช้หมุดไม้ทำการตอกตรึงถุง litter bag ไว้กับพื้นดิน เพื่อป้องกันการสูญหาย และเพื่อให้แน่ใจว่าใบร่วงที่อยู่ภายในถุงนั้นสัมผัสกับผิวหน้าดินตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา ส่วนถุง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

litter bag ขนาดเล็ก ได้นำไปแขวนไว้บนต้นแปะก๊วย โดยใช้เส้นลวดผูกติดไว้กับกิ่งก้านของต้น เพื่อป้องกันการหลุดปลิวขณะที่มีลมแรง โดยทำการผูกไว้จำนวน 15 ถุงต่อ 1 ต้น การสุ่มเก็บตัวอย่างจากถุง litter bag ขนาดเล็กที่แขวนอยู่บริเวณบนต้นแปะก๊วยนั้นทำโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างครั้งละ 1 ถุง นำกลับมาแยกเชื้อที่ห้องปฏิบัติการ แต่ในกรณีของถุง litter bag ขนาดใหญ่ที่วางอยู่บริเวณพื้นดินนี้ ได้ทำการเก็บตัวอย่างโดยเปิดปากถุง และเก็บตัวอย่างใบร่วงที่เริ่มย่อยสลายมาศึกษาครั้งละ 7 ใบ ซึ่งภายหลังจากเก็บตัวอย่างแล้วจึงทำการปิดปากถุง litter bag ให้เหมือนเดิมอีกครั้ง สำหรับการสุ่มเก็บตัวอย่างนั้นได้ทำในทุกเดือนในทั้ง 2 ตำแหน่งของต้นแปะก๊วย โดยเริ่มต้นการทดลองตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2546 ถึงเดือนกันยายน 2547 ซึ่งในช่วงเวลานี้ประกอบไปด้วย ฤดูใบไม้ร่วง ฤดูหนาว ฤดูใบไม้ผลิ ฤดูฝน และฤดูร้อน ตามลำดับ ซึ่งการศึกษาใบร่วงนั้นได้ทำการศึกษาครบทุกฤดูกาล โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 1 ปี

ภาพที่ 5 การวางถุง litter bag ขนาดใหญ่บริเวณพื้นดินภายใต้ต้นแปะก๊วย
(A = ถุง litter bag ที่วางไว้บริเวณใต้ต้นแปะก๊วยในฤดูใบไม้ร่วง
B = ถุง litter bag ที่วางไว้บริเวณใต้ต้นแปะก๊วยในฤดูหนาว
C = การวางถุง litter bag ขนาดใหญ่บริเวณพื้นดินภายใต้ต้นแปะก๊วย และ
D = หมุดไม้ที่ตอกไว้เพื่อตรึงถุง litter bag ให้สัมผัสผิวหน้าดินตลอดเวลา)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเก็บตัวอย่างใบสด และตัวอย่างใบร่วงได้ทำในทุกเดือน โดยเริ่มการทดลองในเดือนพฤศจิกายน 2546 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2547 เป็นระยะเวลาประมาณ 1 ปี การเก็บตัวอย่างในทุกครั้งได้มีการจดบันทึก และถ่ายภาพในสถานที่เก็บตัวอย่าง และนำตัวอย่างกลับมายังห้องปฏิบัติการภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง และทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากตัวอย่างภายใน 48 ชั่วโมงภายหลังจากทำการเก็บตัวอย่าง

ภาพที่ 6 การแขวนถุง litter bag ขนาดเล็กบริเวณบนต้นแปะก๊วย
(A = การแขวนถุง litter bag ครั้งแรกในฤดูใบไม้ร่วง และ
B = ถุง litter bag ที่ถูกแขวนไว้บริเวณกิ่งก้านของต้นแปะก๊วยในฤดูหนาว)

3. การแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของต้นแปะก๊วย

นำตัวอย่างพืชที่เก็บได้ในแต่ละเดือนมาตัดแยกออกเป็นส่วนๆ ก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่ผิว โดยในตัวอย่างใบสดนั้นแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือใบ ก้านใบ และกิ่งอ่อน ส่วนในตัวอย่างใบร่วงนั้นแบ่งออกเป็นสองส่วนคือใบ และก้านใบ จากนั้นนำตัวอย่างจากส่วนต่างๆ ของแปะก๊วยไปฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ชิ้นส่วนพืชใน 70% ethanol เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นย้ายตัวอย่างไปแช่ใน 1% sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำตัวอย่างพืชที่ได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพื่อล้างสารเคมีส่วนเกินออก ซึ่งขั้นตอนนี้ได้ทำซ้ำ 2 ครั้ง ภายหลังจากขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวจึงนำตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาวางบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อเพื่อซับน้ำส่วนเกินออก แล้วผึ่งให้แห้งโดยนำไปวางไว้ในตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow chamber) ก่อนนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 mm จากนั้นนำไปวางบนผิวหน้าอาหาร half-strength PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri-dish) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm จำนวน 7-8 ชิ้นต่อหนึ่งจานอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เลี้ยงเชื้อ (plate) ให้ได้ทั้งหมดจำนวน 30 ชิ้น (7 ชิ้น / plate และ 8 ชิ้น / plate จำนวนอย่างละ 2 plate รวมเป็น 4 plate) ต่อตัวอย่างพืชจากแต่ละส่วนในแต่ละต้น แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 1 เดือน

4. การหาค่าความถี่ในการแยกพบเชื้อ หรือค่า Isolation Frequency (IF)

ภายหลังจากการแยกเชื้อในขั้นตอนการบ่มเชื้อได้ทำการเฝ้าสังเกตเส้นใยของเชื้อราทั้งหมดที่เกิดขึ้นในแต่ละวัน หลังจากนั้นจึงทำเครื่องหมายเมื่อพบเส้นใยของเชื้อราแต่ละชนิดเจริญออกมาจากชิ้นพืช และตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อราทั้งหมดที่เกิดขึ้นในแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นจึงทำการย้ายเส้นใยของเชื้อรา (subculture) ทุกชนิดที่พบไปยังอาหาร half-strength PDA จานใหม่ และทำการบ่งชนิด (identification) ของเชื้อราที่แยกได้ในระดับ genus โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้นำมาเปรียบเทียบกับ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีการระบุชนิดไว้แล้ว ซึ่งภายหลังจากการตรวจนับความถี่ของเชื้อราแต่ละชนิดแล้วจึงนำค่าที่ตรวจนับได้นั้นไปประเมินหาค่าความถี่ในการแยกพบเชื้อ หรือค่า Isolation Frequency (IF) ซึ่งอัตราความถี่ในการแยกพบเชื้อแต่ละชนิดนั้นจะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยมีสูตรการคำนวณหาค่า IF ดังต่อไปนี้

สูตรการหาค่าความถี่ในการแยกพบเชื้อ หรือค่า Isolation Frequency (IF)

$$IF = (Ni / Nt) \times 100$$

ซึ่งจากสูตรดังกล่าว ***Ni*** คือ จำนวนเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้จากชิ้นส่วนพืชนั้น

Nt คือ จำนวนชิ้นส่วนตัวอย่างพืชทั้งหมดที่นำมาแยกเชื้อ

5. การกำหนดเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักของต้นแปะก๊วย (dominant endophytic fungi)

นำข้อมูลที่ได้จากการคำนวณหาค่า IF ของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อในส่วนต่างๆ ของตัวอย่างใบสด (living leaves) มาใช้กำหนดเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลัก (dominant endophytic fungi) ของแปะก๊วย โดยดูจากเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดที่มีค่า IF สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดอื่นๆ ที่แยกได้ ซึ่งส่วนใหญ่มีค่า IF สูงกว่า 10% เมื่อทำการกำหนดเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักของแปะก๊วยได้แล้ว จึงทำการศึกษาความผันแปรของเชื้อราเอนโดไฟต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชนิดหลักในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างพืช โดยเริ่มตั้งแต่ระยะเวลาที่ใบอ่อนยังคงอยู่ในตาใบไปจนถึงระยะที่ใบแก่ก่อนร่วง ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 10 ครั้งรวมเป็นระยะเวลา 8 เดือน

6. การติดตามความต่อเนื่องของเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักของต้นแปะก๊วยภายหลังจากใบร่วง

ทำการติดตามความต่อเนื่องของเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักภายหลังจากใบแปะก๊วยร่วงในฤดูใบไม้ร่วง และในใบที่เริ่มมีการย่อยสลายตลอดระยะเวลา 1 ปีจากตัวอย่างภายในถุง litter bag ที่แขวนไว้บริเวณบนต้น และที่วางไว้บริเวณภายใต้ต้นแปะก๊วย โดยศึกษาจากค่า IF ของเชื้อราที่แยกได้ในแต่ละครั้งจำนวน 14 ครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่างในระยะเวลา 1 ปี

7. การวิเคราะห์ C:N ratio ในตัวอย่างใบร่วง (leaf litter)

การวิเคราะห์การสูญเสียน้ำหนักมวลรวม (mass loss) ของตัวอย่างใบร่วงในระยะเวลาที่ใบมีการย่อยสลาย และการประเมินอัตราการย่อยสลายของใบร่วงทำโดยการวิเคราะห์หาอัตราส่วนของ คาร์บอน และไนโตรเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบภายในใบพืช โดยทำการเก็บตัวอย่างใบร่วงในขณะที่ใบเริ่มมีการย่อยสลายจากถุง litter bag ที่วางไว้บริเวณใต้ต้นและที่แขวนไว้บริเวณบนต้นแปะก๊วย โดยนำใบร่วงจำนวน 4 ใบต่อตัวอย่างต่อต้นมาอบความร้อนในตู้อบความร้อน (oven) ที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นนำใบที่ผ่านการอบแห้งมาทำการบดด้วยโกร่งจนเป็นผงละเอียด จากนั้นนำผงตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่า C:N ratio โดยใช้เครื่อง Fullautomatic N.C Analyzer (SUMIGRAPH NC-800)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved