

การคัดเลือกกราเดอโตไมคอร์ไรซาที่ทนโลหะหนัก



นายจตุรงค์ พูลทวี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SELECTION FOR HEAVY METAL-TOLERANT ECTOMYCORRHIZAL FUNGI



Mr. Jaturong Pooltavee

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

จตุรงค์ พูลทวี : การคัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ทนโลหะหนัก. (SELECTION FOR HEAVY METAL-TOLERANT ECTOMYCORRHIZAL FUNGI) อ. ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร.ประภคิต์สิน สีहनนท์, อ. ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์ร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตตรา เพ็ญเขียว, 119 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ที่ทนทานต่อโลหะหนัก ได้แก่
 สังกะสี ทองแดง ตะกั่ว และแคดเมียม และศึกษาการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีราเอคโต-
 ไมคอร์ไรซาในภาวะที่มีโลหะหนัก เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับการปลูกสร้างสวนป่าในบริเวณที่
 ปนเปื้อนโลหะหนักในอนาคต โดยราเอคโตไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากแหล่งตามธรรมชาติของ
 ประเทศไทยอยู่ในกลุ่ม Gasteromycetes ประกอบด้วย 3 สกุล คือ *Astraeus* *Pisolithus*
 และ *Scleroderma* รวมทั้งหมด 43 ไอโซเลต เมื่อทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง
 modified Melin-Norkrans (MMN) pH 4.3 ที่ใส่ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ และ $CdSO_4$
 เปรียบเทียบการเจริญโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกสัปดาห์ และหาน้ำหนักแห้งของ
 เส้นใยราเมื่อครบ 4 สัปดาห์ นำค่าน้ำหนักแห้งมาสร้างกราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้ง
 การเจริญร้อยละ 50 (EC_{50}) พบว่า *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42 มีค่า EC_{50} ทนทานต่อ
 $ZnSO_4$ ที่ความเข้มข้น 7.5 มิลลิโมลาร์ *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32 มีค่า EC_{50} ทนทาน
 ต่อ $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้น 7.1 มิลลิโมลาร์ *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 มีค่า EC_{50}
 ทนทานต่อ $Pb(NO_3)_2$ ที่ความเข้มข้น 5.8 มิลลิโมลาร์ และ *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต
 Aa11 มีค่า EC_{50} ทนทานต่อ $CdSO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.047 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทดสอบ
 การเจริญของกล้าไม้ยางนาพร้อมกับราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ผ่านการคัดเลือกในวัสดุปลูกที่ใส่
 โลหะหนัก พบว่าทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการเจริญทุกด้าน
 ทั้งความสูงของลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของส่วน
 เหนือดิน (ลำต้นและใบ) และส่วนใต้ดิน (ราก) และไม่พบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา
 ที่รากของกล้าไม้ยางนาทุกชุดการทดลอง

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
 ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนิสิต จตุรงค์ พูลทวี
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ดร.ประภคิต์สิน
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม จิตตรา เพ็ญเขียว

497 22423 23 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : ECTOMYCORRHIZA / HEAVY METALS / TOLERANCE / SEEDLING

JATURONG POOLTAVEE : SELECTION FOR HEAVY METAL-TOLERANT
ECTOMYCORRHIZAL FUNGI. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PRAKITSIN
SIHANONTH, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. JITTRA
PIAPUKIEW, Ph.D., 119 pp.

This study was to select ectomycorrhizal fungi which were tolerant to heavy metals including zinc, copper, lead and cadmium and to examine the growth of *Dipterocarpus alatus* Roxb. seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi when exposed to heavy metals in order to use as future trends in remedial plantings on heavy metal-contaminated sites. Forty-three ectomycorrhizal fungal isolates of Gasteromycetes including *Astraeus* sp., *Pisolithus* sp. and *Scleroderma* sp. collected from several natural sites of Thailand were tested for heavy metals tolerance on modified Melin-Norkrans (MMN) agar, pH 4.3 supplemented with $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ and $CdSO_4$. The colony diameter and the mycelia dry weight of each isolate were determined every week and 4 weeks after inoculation respectively to compare the fungal growth and also analyse the effective concentration of heavy metals inhibiting growth by 50%, EC_{50} . The results exhibited that *Scleroderma* sp. isolate Ssp42 showed high zinc tolerance with the EC_{50} value of 7.5 mM. High copper tolerance with the EC_{50} value of 7.1 mM was detected in *Pisolithus* sp. isolate Psp32. *Pisolithus albus* isolate Pa33 showed high lead tolerance with the EC_{50} value of 5.8 mM. Whereas, *Astraeus asiaticus* isolate Aa11 showed high cadmium tolerance with the EC_{50} value of 0.047 mM. The most four ectomycorrhizal fungal isolates tolerant of each heavy metal were inoculated in *Dipterocarpus alatus* Roxb. seedlings and then grown in substrate culture with addition of heavy metal. The results showed that there was no statistically significant differences between inoculated and uninoculated seedlings in terms of height, root collar diameter, fresh and dry matter of shoot and root. Furthermore, the ectomycorrhizal infection on the seedlings was not observed in all treatments.

Field of Study : Biotechnology

Academic Year : 2009

Student's Signature Jaturong Pooltavee

Advisor's Signature Prakitsin Sihanonth

Co-Advisor's Signature Jittra Piapukiew

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประทีปดีสิน สีนันทน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางการวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ฐนีย์วัน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และอาจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการเรียน และการทำวิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ณ ห้องปฏิบัติการ 401 402 407 และ 408 ตลอดจนเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ได้เรียน และทำกิจกรรมร่วมกัน รวมทั้งให้ความช่วยเหลือทั้งกำลังใจและกำลังกาย รวมทั้งให้คำปรึกษาที่ดีและเป็นประโยชน์สำหรับงานวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณนางสาววิไลสา คำจริง ผู้มอบสิ่งดีงามให้แก่งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยเหลืองานวิจัยด้านต่าง ๆ ทั้งให้คำปรึกษา แนะนำ สนับสนุนด้านกำลังใจและเป็นกำลังใจด้วยดีเสมอมา รวมทั้งช่วยค้นหาหาข้อมูลทางวิชาการ เรียบเรียง ตรวจสอบ และแก้ไขปรับปรุงจนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และน้องสาว ที่ให้การสนับสนุนด้านต่าง ๆ ทั้งด้านทุนทรัพย์สำหรับการศึกษา การวิจัย และการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ความรัก ความเข้าใจ คำปรึกษา คำแนะนำ แนวทางการตัดสินใจ ทัศนคติที่ดีในการทำวิจัย ตลอดจนเป็นกำลังใจด้วยดีเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฒ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ชนิดของราไมคอร์ไรซา	3
2.2 ลักษณะของรากพืชที่ติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา	8
2.3 ชนิดและพืชอาศัยของราเอคโตไมคอร์ไรซา	10
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา	17
2.5 ประโยชน์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา	20
2.5.1 ประโยชน์ต่อพืช	20
2.5.2 ประโยชน์ต่อระบบนิเวศน์	21
2.5.3 ประโยชน์ต่อมนุษย์	22
2.6 โลหะหนัก	23
2.6.1 แหล่งกำเนิดโลหะหนัก	24
2.6.2 การทำเหมืองแร่กับปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนัก	24
2.7 กลไกการทนโลหะหนักของราเอคโตไมคอร์ไรซา	28
2.7.1 กลไกภายนอกเซลล์	28
2.7.2 กลไกภายในเซลล์	31

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับราเอคโตไมคอร์ไรซากับความเป็นพิษ ของโลหะหนัก	33
3 วิธีดำเนินการวิจัย	37
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	37
3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	38
3.3 วัสดุปลูก วัสดุอุปกรณ์อื่น ๆ และเมล็ดพันธุ์ไม้ยางนา	39
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย	39
3.4.1 สํารวจและเก็บตัวอย่าง	39
3.4.2 แยกเส้นใยราให้บริสุทธิ์	39
3.4.3 คัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ทนโลหะหนัก	40
3.4.4 ทดสอบการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ผ่านการคัดเลือก	40
3.4.5 เตรียมหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา	41
3.4.6 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา ที่ผ่านการคัดเลือกในวัสดุปลูกที่ใส่โลหะหนัก	41
3.4.7 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	43
4 ผลการวิจัย	44
4.1 สํารวจและเก็บตัวอย่าง	44
4.2 คัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ทนโลหะหนัก	50
4.3 ทดสอบการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ผ่านการคัดเลือก	56
4.3.1 ทดสอบการเจริญบนอาหารที่ใส่ $ZnSO_4$	56
4.3.2 ทดสอบการเจริญบนอาหารที่ใส่ $CuSO_4$	59
4.3.3 ทดสอบการเจริญบนอาหารที่ใส่ $Pb(NO_3)_2$	62
4.3.4 ทดสอบการเจริญบนอาหารที่ใส่ $CdSO_4$	65
4.4 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา ที่ผ่านการคัดเลือกในวัสดุปลูกที่ใส่โลหะหนัก	68
4.4.1 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาในวัสดุปลูกที่ใส่ $ZnSO_4$	68
4.4.2 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาในวัสดุปลูกที่ใส่ $CuSO_4$	68
4.4.3 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาในวัสดุปลูกที่ใส่ $Pb(NO_3)_2$.	68

4.4.4 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาในวัสดุปลูกที่ใส่ CdSO_4	69
5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	73
รายการอ้างอิง	79
ภาคผนวก	92
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสูตรปุ๋ย	93
ภาคผนวก ข สารเคมี	95
ภาคผนวก ค ลักษณะการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา 43 ไฮโซเลต	97
ภาคผนวก ง สถิติ	106
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	119



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ลักษณะของราไมคอร์ไรซาชนิดต่าง ๆ	7
2.2 ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา	11
2.3 ชนิดพืชที่มีความสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซา	15
4.1 ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่สามารถแยกเส้นใยได้บริสุทธิ์	48
4.2 การเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ไม่ใส่และใส่โลหะหนัก ได้แก่ ZnSO ₄ , CuSO ₄ , Pb(NO ₃) ₂ และ CdSO ₄ ความเข้มข้น 2, 2, 2 และ 0.06 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	52
4.3 เพอร์เซ็นต์ความทนทานของราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อ แข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่โลหะหนัก ได้แก่ ZnSO ₄ , CuSO ₄ , Pb(NO ₃) ₂ และ CdSO ₄ ความเข้มข้น 2, 2, 2 และ 0.06 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	54
4.4 เส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Scleroderma</i> sp. ไอโซเลต Ssp42 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ ZnSO ₄ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่โลหะหนัก เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	57
4.5 เส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Pisolithus</i> sp. ไอโซเลต Psp32 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่มี CuSO ₄ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CuSO ₄ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	60
4.6 เส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Pisolithus albus</i> ไอโซเลต Pa33 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ Pb(NO ₃) ₂ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ Pb(NO ₃) ₂ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	63

ตารางที่	หน้า
4.7 เส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Astraeus asiaticus</i> ไocyเลต Aa11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CdSO ₄ ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่โลหะหนัก เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	66
4.8 การเจริญด้านต่าง ๆ ของกล้าไม้ยางนาที่มีและไม่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Scleroderma</i> sp. ไocyเลต Ssp42 ในวัสดุปลูกที่ไม่ใส่และใส่ ZnSO ₄ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์	69
4.9 การเจริญด้านต่าง ๆ ของกล้าไม้ยางนาที่มีและไม่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Pisolithus</i> sp. ไocyเลต Psp32 ในวัสดุปลูกที่ไม่ใส่และใส่ CuSO ₄ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์	70
4.10 การเจริญด้านต่าง ๆ ของกล้าไม้ยางนาที่มีและไม่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Pisolithus albus</i> ไocyเลต Pa33 ในวัสดุปลูกที่ไม่ใส่และใส่ Pb(NO ₃) ₂ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์	71
4.11 การเจริญด้านต่าง ๆ ของกล้าไม้ยางนาที่มีและไม่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Astraeus asiaticus</i> สายพันธุ์ที่ Aa11 ในวัสดุปลูกที่ไม่ใส่และใส่ CdSO ₄ ความเข้มข้น 0.03 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์	72

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของรากไมคอร์ไรซาชนิดต่าง ๆ	8
2.2 รูปแบบของรากเอคโตไมคอร์ไรซา	9
2.3 ภาพตัดตามขวางของรากพืชเมล็ดเปลือย (gymnosperms) และพืชดอก (angiosperms) ที่ติดเชื้รากเอคโตไมคอร์ไรซา	10
2.4 กลไกภายนอกเซลล์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาเพื่อลดปริมาณโลหะหนักเข้าสู่เซลล์พืช...	31
2.5 กลไกภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนโลหะหนักของรากเอคโตไมคอร์ไรซา	33
4.1 ลักษณะของดอกเห็ดสกุล <i>Astraeus</i>	45
4.2 ลักษณะของดอกเห็ดสกุล <i>Pisolithus</i>	46
4.3 ลักษณะของดอกเห็ดสกุล <i>Scleroderma</i>	47
4.4 ลักษณะการเจริญของรากเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Scleroderma</i> sp. ไอโซเลต Ssp42 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $ZnSO_4$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	56
4.5 การเจริญของรากเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Scleroderma</i> sp. ไอโซเลต Ssp42 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $ZnSO_4$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	57
4.6 เส้นผ่านศูนย์กลางที่ถูกยับยั้งของรากเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Scleroderma</i> sp. ไอโซเลต Ssp42 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $ZnSO_4$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	58
4.7 น้ำหนักแห้งที่ถูกยับยั้งของรากเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Scleroderma</i> sp. ไอโซเลต Ssp42 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $ZnSO_4$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	58

ภาพที่	หน้า
4.8 ลักษณะการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Pisolithus</i> sp. ไอโซเลต Psp32 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CuSO_4 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	59
4.9 การเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Pisolithus</i> sp. ไอโซเลต Psp32 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CuSO_4 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	60
4.10 เส้นผ่านศูนย์กลางที่ถูกยับยั้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Pisolithus</i> sp. ไอโซเลต Psp32 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CuSO_4 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	61
4.11 น้ำหนักแห้งที่ถูกยับยั้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Pisolithus</i> sp. ไอโซเลต Psp32 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CuSO_4 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	61
4.12 ลักษณะการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Pisolithus albus</i> ไอโซเลต Pa33 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	62
4.13 การเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Pisolithus albus</i> ไอโซเลต Pa33 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	63
4.14 เส้นผ่านศูนย์กลางที่ถูกยับยั้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Pisolithus albus</i> ไอโซเลต Pa33 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	64

ภาพที่	หน้า
4.15 น้ำหนักแห้งที่ถูกยับยั้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Pisolithus albus</i> ไอโซเลต Pa33 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	64
4.16 ลักษณะการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Astraeus asiaticus</i> ไอโซเลต Aa11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $CdSO_4$ ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่โลหะหนัก เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	65
4.17 การเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Astraeus asiaticus</i> ไอโซเลต Aa11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $CdSO_4$ ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $CdSO_4$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	66
4.18 เส้นผ่านศูนย์กลางที่ถูกยับยั้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Astraeus asiaticus</i> ไอโซเลต Aa11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $CdSO_4$ ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $CdSO_4$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	67
4.19 ...น้ำหนักแห้งที่ถูกยับยั้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา <i>Astraeus asiaticus</i> ไอโซเลต Aa11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $CdSO_4$ ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $CdSO_4$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	67
ค.1 ลักษณะการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา 43 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่โลหะหนัก ได้แก่ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ และ $CdSO_4$ ความเข้มข้น 2, 2 และ 0.06 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่โลหะหนัก เมื่อบ่มที่ อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	97

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	เปอร์เซ็นต์
>	=	มากกว่า
ซม.	=	เซนติเมตร
มก.	=	มิลลิกรัม
mM	=	มิลลิโมลาร์
ppm	=	part per million (ส่วนในล้านส่วน)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่เหมืองแร่ร้างกระจายอยู่ตามจังหวัดต่าง ๆ ทั่วประเทศไม่น้อยกว่า 300,000 ไร่ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2553) ดินบริเวณนี้มีสภาพพื้นที่เป็นเนินสูง ๆ ต่ำ ๆ เนื้อดินมีกรด หิน และทรายปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดินเหมืองแร่ร้างเป็นดินไม่มีโครงสร้าง มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ อีกทั้งแร่ธาตุอาหารในดินถูกชะล้างออกไปในระหว่างขั้นตอนการทำเหมืองแร่ จึงทำให้ดินบริเวณนี้มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ นอกจากนี้ยังมีภาวะแห้งแล้ง อุณหภูมิสูง และปัญหาการปนเปื้อนของโลหะหนัก เช่น สังกะสี ทองแดง ตะกั่ว และแคดเมียมปริมาณสูง เป็นสาเหตุให้การปลูกป่าเพื่อฟื้นฟูปื้นที่เหมืองแร่ร้าง ต้องประสบกับปัญหาต้นกล้าที่นำมาปลูกมีอัตราการรอดตายต่ำและแคระแกรน ซึ่งมีผลทำให้โครงการปลูกป่าไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร จึงควรมีการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างต้นไม้อัจฉริยะที่อาศัยอยู่ในดิน เพื่อให้ต้นไม้อัจฉริยะเจริญได้ในพื้นที่ที่ไม่เหมาะสม

เอคโตไมคอร์ไรซา คือ ความสัมพันธ์ระหว่างรากกับรากพืชชั้นสูง โดยรานั้นต้องไม่ใช่ราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช และรากพืชนั้นต้องเป็นรากที่มีอายุน้อย (Mikola, 1973, Hawksworth และคณะ, 1995) การอยู่ร่วมกันนี้เป็นการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ได้ประโยชน์ร่วมกันทั้งสองฝ่าย (symbiosis) โดยราได้รับสารอาหารจากพืชผ่านมาทางระบบราก เช่น แป้ง น้ำตาล กรดอะมิโน และวิตามิน ในขณะที่เดียวกันพืชก็ได้รับน้ำ แร่ธาตุ และสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตจากรา เช่น ฮอร์โมนพืช และสารปฏิชีวนะบางชนิด (HacsKaylo, 1973; Slankis, 1973) นอกจากนี้ราเอคโตไมคอร์ไรซายังสามารถเร่งการเจริญของพืช โดยเส้นใยของราจะทำหน้าที่คล้ายรากฝอยของพืช ทำให้พืชมีเนื้อที่ในการดูดซึมน้ำและแร่ธาตุเพิ่มขึ้น ช่วยเปลี่ยนแร่ธาตุในดินให้อยู่ในสภาพที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ป้องกันรากพืชจากแมลง ไล่เดือนฝอย และราโรคพืชบางชนิด อีกทั้งยังพบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาช่วยให้รากพืชมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ทนต่อความแห้งแล้ง ทนต่อสภาพดินที่มีความเป็นกรด-ด่างที่สูงหรือต่ำมาก ๆ หรือความเป็นพิษของดินอันเนื่องมาจากโลหะหนัก (Marx, 1973; Bradley และคณะ, 1981; Agrios, 1988) ราเอคโตไมคอร์ไรซามี 7,000-10,000 ชนิด ส่วนใหญ่จัดเป็นราชั้นสูงจัดจำแนกอยู่ใน Phylum Basidiomycota และมีบางส่วนอยู่ใน Phylum Ascomycota และ Phylum Zygomycota เช่น *Amanita* spp., *Astraeus* spp., *Suillus* spp., *Scleroderma* spp. และ *Pisolithus* spp.

เจริญร่วมกับไม้หลายวงศ์ที่ใช้ในการปลูกสร้างสวนป่า ได้แก่ วงศ์ไม้สนเขา (Pinaceae) วงศ์ไม้ก่อ (Fagaceae) วงศ์ไม้ยูคาลิปตัส (Myrtaceae) และวงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae) เป็นต้น (อนิวรรณ เฉลิมพงษ์, 2539; Chalermpongse, 1993; Brundrett และคณะ, 1996) สำหรับประเทศไทยการปลูกสร้างสวนป่านิยมใช้ไม้วงศ์ยูคาลิปตัสซึ่งเป็นไม้โตเร็ว และไม้วงศ์ยางซึ่งเป็นไม้เศรษฐกิจ เช่น เต็ง รัง และยางนา โดยพบว่าไม้เหล่านี้มีการเจริญร่วมกับราเอคโตไมคอร์ไรซา และสามารถเจริญได้ในดินที่ค่อนข้างแห้งแล้ง จึงเหมาะสำหรับนำมาทดลองปลูกในบริเวณเหมืองแร่

ดังนั้น การคัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศเขตร้อน (tropical zone) ของประเทศไทย และสอดคล้องกับสภาพพื้นที่เหมืองแร่ร้างซึ่งปนเปื้อนโลหะหนัก อีกทั้งสามารถกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้ทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงมีความจำเป็น และสำคัญต่อการนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา ก่อนนำไปใช้ปลูกสร้างสวนป่าในพื้นที่เหมืองแร่ร้าง เพื่อให้โครงการปลูกสร้างสวนป่าในพื้นที่ดังกล่าวประสบความสำเร็จ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. คัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ที่ทนทานต่อโลหะหนัก
2. ศึกษาการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาในวัสดุปลูกที่ใส่โลหะหนัก

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ราเอคโตไมคอร์ไรซาไอโซเลตที่ทนทานต่อโลหะหนัก และสามารถกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้ยางนาในภาวะที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับการปลูกสร้างสวนป่าในบริเวณเหมืองแร่ร้าง ซึ่งจะนำไปสู่การฟื้นฟูและอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมที่ยั่งยืนต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การอยู่ร่วมกันระหว่างรากกับรากพืชถูกพบครั้งแรกโดย Unger ในปี 1840 ต่อมาในปี 1885 Frank นักโรควิทยาป่าไม้ชาวเยอรมันได้ศึกษาระบบรากของพืช และเรียกความสัมพันธ์ของรากกับระบบรากของพืชนี้ว่า ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) (Trappe และ Berch, 1985) ซึ่งเป็นคำมาจากภาษากรีกว่า mykes แปลว่า รา และ rhiza แปลว่า ราก โดยจากรากนั้นต้องไม่ใช่รากที่เป็นสาเหตุของโรคพืช และรากพืชต้องเป็นรากที่มีอายุน้อย (Mikola, 1973, Hawksworth และคณะ, 1995) การอยู่ร่วมกันนี้เป็นการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน โดยได้รับประโยชน์ร่วมกันทั้งสองฝ่าย (symbiosis) ราจะได้รับสารอาหารจากพืชผ่านทางระบบราก เช่น แป้ง น้ำตาล กรดอะมิโน และวิตามิน ขณะเดียวกันพืชจะได้รับน้ำ แร่ธาตุ และสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตจากราก เช่น ฮอริโมนพืช และสารปฏิชีวนะบางชนิด (Hacskeylo, 1973; Slankis, 1973) โดยพบว่า 95% ของพืชทั้งหมดมีการเจริญร่วมกับราไมคอร์ไรซา รากพืชที่มีราไมคอร์ไรซาเจริญอยู่จะมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชและระบบนิเวศของป่าไม้ ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตรวดเร็วและทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี (Marx และ Barnett, 1974)

2.1 ชนิดของราไมคอร์ไรซา

Harley และ Smith (1983) ได้รวบรวมรายงานเกี่ยวกับไมคอร์ไรซา และจัดแบ่งราไมคอร์ไรซาออกเป็น 7 กลุ่ม ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาที่แตกต่างกัน รวมทั้งชนิดของรา และชนิดของพืชอาศัยด้วย (Smith และ Read, 1997) (ภาพที่ 2.1 และตารางที่ 2.1) ดังนี้

2.1.1 เอกโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) เป็นราไมคอร์ไรซาที่มีเส้นใยของราเจริญสานตัวกันเป็นแผ่น (sheath หรือ mantle) อยู่รอบ ๆ รากพืช เส้นใยบางส่วนจากบริเวณนี้จะเจริญเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิส (epidermis) กับเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ (cortex) ประสานกันเป็นร่างแหอยู่รอบเซลล์ เรียกว่า hartig net (Atkinson, 1975; Warcup, 1980) ราเอกโตไมคอร์ไรซามี 7,000-10,000 ชนิด (Taylor และ Alexander, 2005) ส่วนใหญ่เป็นราชั้นสูงใน Phylum Basidiomycota ซึ่งสามารถสร้างดอกเห็ด (mushroom) และพัพบอลล์ (Puffball) โผล่ขึ้นเหนือผิวดินให้เห็นได้ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ใน Phylum Ascomycota และ

Phylum Zygomycota (Harley และ Smith, 1983; Molina และคณะ, 1992) ราเอดโตไมคอร์ไรซา เจริญร่วมกับพืชในเขตภูมิอากาศต่าง ๆ ทั่วโลก ประมาณ 2,000 ชนิด หรือ คิดเป็น 10% ของพืช เมล็ดเปลือย (gymnosperms) และพืชดอก (angiosperms) เช่น วงศ์ไม้สนเขา (Pinaceae) วงศ์ไม้เครือม่วย (Gnetaceae) วงศ์ไม้ก้ำล้งเสื่อโคร่ง (Betulaceae) วงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae) วงศ์ไม้ยูคาลิปตัส (Myrtaceae) วงศ์ไม้มะค่าโมง (Casuarinaceae) วงศ์ไม้ก่อ (Fagaceae) วงศ์ไม้สนทะเล (Casuarinaceae) วงศ์ไม้กุหลาบพันปี (Ericaceae) วงศ์ไม้ถั่ว (Leguminosae) เป็นต้น (Trappe, 1987; Brundrett, 2009)

2.1.2 อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhiza) หรือเวสสิคูลาร์-อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (vesicular-arbuscular mycorrhiza, VAM) หรือเอนโดไมคอร์ไรซา (endomycorrhiza) เป็นราไมคอร์ไรซาที่มีเส้นใยเจริญอยู่รอบ ๆ รากพืชอย่างหลวม ๆ หรือยื่นออกจากรากพืชสู่ดินประมาณ 1 เซนติเมตร และจะแทงเส้นใยผ่านผนังเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิสเข้าไปเจริญในเซลล์ (intracellular) และอาจเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ (intercellular) ของรากพืชในชั้นคอร์เทกซ์เท่านั้น โดยไม่เข้าไปในชั้นเซลล์เจริญ (meristematic cells) หรือชั้นเอนโดเดอร์มิส (endodermis) ราในกลุ่มนี้ยังสร้างโครงสร้างพิเศษ 2 โครงสร้าง สำหรับสะสมธาตุอาหารขึ้นภายในชั้นคอร์เทกซ์ คือ เวสสิเคิล (vesicle) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีผนังบาง รูปร่างกลมคล้ายรูปไข่ และอาร์บัสคูล (arbuscule) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีผนังหนาจัดเป็นวงหรืออาจจะมีการแตกแขนงแบบ 2 แฉก (dichotomous) จนเกือบเต็มเซลล์ ทำให้มีลักษณะคล้ายกะหล่ำดอกหรือคล้ายต้นไม้ (tree-like) อยู่ในเซลล์พืช ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซานี้เป็นราที่จัดอยู่ใน Phylum Glomeromycota จำแนกได้ประมาณ 150 ชนิด ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Acaulospora* *Entrophospora* *Gigaspora* *Glomus* *Sclerocystis* และ *Scutellospora* (Schenck และ Perez, 1987; Schübler และคณะ, 2001) ราชนิดนี้สามารถเจริญร่วมกับพืชประมาณ 80% ของพืชทั้งหมด ทั้งพืชที่มีความสำคัญทางการเกษตร ไม้ผล และพืชป่าไม้ เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่างมันสำปะหลัง ยาสูบ อ้อย ส้ม สัก ประดู่ เป็นต้น (ประภคิต์สิน สีहनนท์, 2523; ออมทรัพย์ นพอมรบดี, 2523; Wang และ Qiu, 2006) โดยไม่ทำให้รากของพืชมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ แต่รากพืชบางชนิดอาจพบการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอ่อนและไม่มีรากขน ซึ่งสีเหลืองนี้จะจางหายไปเมื่อถูกแสงสว่าง และความเข้มของสีขึ้นอยู่กับปริมาณการเข้าสู่รากของรา (Harley และ Smith, 1983)

2.1.3 เอกเทโนโดไมคอร์ไรซา (ectendomycorrhiza) หรือ ชูโตไมคอร์ไรซา (pseudomycorrhiza) เป็นราไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะอยู่ระหว่างราเอกโดไมคอร์ไรซาและราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา อาจพบเส้นใยเกาะกันอย่างหลวม ๆ รอบ ๆ รากพืชหรือไม่พบเลย เส้นใยบางส่วนเจริญเข้าสู่เซลล์พืชแล้วขดเป็นวง (coil) อยู่ภายในเซลล์ บางครั้งพบเส้นใยเจริญเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ในชั้นคอร์เทกซ์ และสร้างเส้นใยสานกันเป็นร่างแห (hartig net) อยู่รอบเซลล์ ราที่มีการดำรงชีวิตแบบนี้เส้นใยจะมีผนังกัน มีสีเข้ม จัดอยู่ใน Phylum Basidiomycota และ Phylum Ascomycota บางครั้งพบการสร้างคลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) อยู่ภายในเส้นใยที่โป่งบวม ไม่พบโคนิเดีย (conidia) และโครงสร้างสืบพันธุ์อื่น ๆ ตัวอย่างราเอกเทโนโดไมคอร์ไรซา เช่น *Rhizoctonia sylvestris* และ *Phialocephala dimorphospora* โดยมีพืชอาศัยร่วมกับรากไม้ ได้แก่ สน (pine), สปรูซ (spruce) และบีช (beech) (Mikola, 1965; Harley และ Smith, 1983)

2.1.4 อีริคอยด์ไมคอร์ไรซา (ericoid mycorrhiza) เป็นราไมคอร์ไรซาของพืชใน Order Ericales Family Ericaceae (Subfamily Ericoideae, Vaccinioideae และ Rhododendroideae) Family Epacridaceae และ Family Empetraceae (Harley และ Smith, 1983) ลักษณะสำคัญของอีริคอยด์ไมคอร์ไรซา คือ เส้นใยของราชนิดนี้จะผนังกัน บางชนิดเป็นราใน Phylum Ascomycota เช่น *Pezizella ericae* บางชนิดเป็นราใน Phylum Basidiomycota เช่น *Clavaria* sp. ราจะเจริญเข้าสู่เซลล์พืชแล้วม้วนขดเป็นวง (coil) อยู่ในเซลล์ของคอร์เทกซ์ ไม่สร้างเส้นใยสานกันเป็นแผ่น (sheath) ล้อมรอบราก หรือเส้นใยสานกันเป็นร่างแห (hartig net) อยู่รอบเซลล์ อีริคอยด์ไมคอร์ไรซาเป็นไมคอร์ไรซาที่มีความสำคัญต่อพืชและระบบนิเวศ เช่นเดียวกับไมคอร์ไรซาชนิดอื่น แต่ที่สำคัญ คือ อีริคอยด์ไมคอร์ไรซามีบทบาทสำคัญมากสำหรับระบบนิเวศของไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ที่ปลูกในดินบริเวณที่ไนโตรเจนถูกตรึงอยู่กับสารอินทรีย์ต่าง ๆ ในดิน (Peterson และคณะ, 2004) Read (1978) ได้ศึกษาผลของอีริคอยด์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญของ *Erica bauera* ซึ่งพืชประจำถิ่นแอฟริกาใต้ที่ออกดอกในฤดูแล้ง พบว่า *E. bauera* ที่มีอีริคอยด์ไมคอร์ไรซาอยู่ด้วย มีความสามารถในการดูดธาตุไนโตรเจนและสะสมไว้ในฤดูสืบพันธุ์ได้สูงกว่าพืชที่ไม่มีไมคอร์ไรซา

2.1.5 อาร์บิวทอยด์ไมคอร์ไรซา (arbutoid mycorrhiza) เป็นราไมคอร์ไรซาของพืชใน Order Ericales อีกชนิดหนึ่ง โดยราที่อยู่ร่วมกับรากจะสร้างเส้นใยสานกันเป็นแผ่น (sheath) ล้อมรอบราก เส้นใยบางส่วนเจริญเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ในชั้นคอร์เทกซ์ สร้างเส้นใยสานกันเป็น

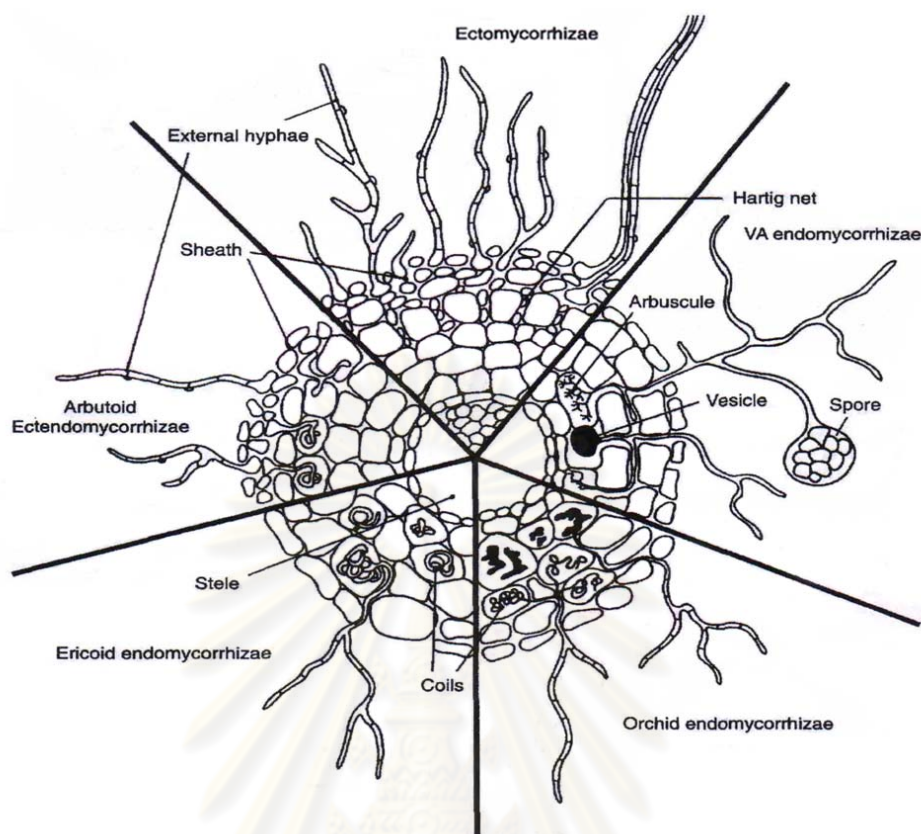
ร่างแห (hartig net) อยู่รอบเซลล์ และมีเส้นใยเล็ก ๆ งอกแทงเข้าสู่เซลล์แล้วเจริญขดม้วนเป็นวง (coil) อยู่ภายในเซลล์ มักพบในต้นไม้และไม้พุ่มที่โตเต็มที่แล้ว ราที่มีความสัมพันธ์กับพืชแบบนี้ เป็นราใน Phylum Basidiomycota ซึ่งบางครั้งอาจจะมีความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซาหรือ เอคเทเนโดไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยชนิดอื่น เช่น *Cortinarius zakii* ซึ่งเป็นอาร์บุดอยด์ไมคอร์ไรซากับพืช *Arbutus menziesii* และเป็นเอคโตไมคอร์ไรซากับพืช *Pseudotsuga douglasii* และพืช *Abies grandis* เป็นต้น (Zak, 1973; Duddridge, 1980)

2.1.6 ไมโนโทรปอยด์ไมคอร์ไรซา (monotropoid mycorrhiza) เป็นราไมคอร์ไรซาที่พบในพืช Family Monotropaceae ซึ่งเป็นพืชที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ มีระบบรากเป็นรากแก้ว รากแขนง และรากฝอย บริเวณรากแขนงจะพบเส้นใยของราสานกันหนา 2-3 ชั้น เป็นแผ่น (sheath) และมีเส้นใยสานกันเป็นร่างแห (hartig net) ล้อมรอบเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิสและชั้นคอร์เทกซ์ของพืช นอกจากนี้เส้นใยของรบบางส่วนแทงเข้าไปในเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิส แล้วเจริญเป็นโครงสร้างดูดอาหาร (haustoria) ที่ไม่แตกแขนง พืชอาศัยที่มีการศึกษากันมาก คือ *Monotropa hypopitys* มักพบไมคอร์ไรซาชนิดนี้เจริญอยู่ร่วมกับไม้ป่าหลายชนิด เช่น บีช (beech) สน (pine) ราที่เป็นไมคอร์ไรซาชนิดนี้จัดอยู่ใน Phylum Basidiomycota เช่น *Boletus* sp. เป็นต้น (Harley และ Smith, 1983)

2.1.7 ออร์คิดไมคอร์ไรซา (orchid mycorrhiza) เป็นราไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่กับพืชใน Family Orchidaceae พบในรากล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ รวมทั้งในเมล็ดกล้วยไม้ช่วงพัฒนาจากต้นอ่อนไปเป็นต้นกล้า มีความสัมพันธ์กับราใน Phylum Basidiomycota โดยเฉพาะอย่างยิ่งราในสกุล *Rhizoctonia* เมื่อเส้นใยแทงผ่านผนังเซลล์เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ (plasmalemma) แล้วเส้นใยจะเจริญขดม้วนเป็นวง (coil) อยู่ภายในเซลล์ เรียกว่า peloton บางชนิดที่สามารถย่อยเซลลูโลสและลิกนินได้ ไมคอร์ไรซาชนิดนี้มีความสำคัญในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพืชและให้สารอาหารที่ต้นกล้าพืชต้องการในการเจริญเติบโต (Warcup, 1975)

ตารางที่ 2.1 ลักษณะของราไมคอร์ไรซาชนิดต่าง ๆ (ที่มา: Harley, 1991)

ลักษณะ	เอคโตไมคอร์ไรซา	อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	เอคเทนโดไมคอร์ไรซา	อีริคอยด์ไมคอร์ไรซา	อาร์บู่ทอยด์ไมคอร์ไรซา	โมนโนโทรปอยด์ไมคอร์ไรซา	ออร์คิดไมคอร์ไรซา
เส้นใยรา	มีผนังกัน (septate)	+	-	+	+	+	+
	ไม่มีผนังกัน (aseptate)	(+)	+	-	-	-	-
การเจริญของเส้นใยภายในเซลล์	-	+	+	+	+	+	+
แผ่นเส้นใย (sheath) ล้อมรอบราก	+	-	+/-	-	+	+	-
เส้นใยร่างแห (hartig net) รอบเซลล์	+	-	+	-	+	+	-
ขดเส้นใย (coils) ภายในเซลล์	-	+	+	+	+	-	+
เวสสิเคิลภายในเซลล์	-	+ (-)	-	-	-	-	-
อาร์บัสคูล	dichotomous	-	+	-	-	-	-
	not dichotomous	-	-	-	-	+	+/-
พืชอาศัยไม่มีคลอโรฟิลล์	-	- (+)	-	-	- (+)	+	+
Phylum ของราที่อาศัย	Basidiomycota		Basidiomycota	Ascomycota	Basidiomycota	Basidiomycota	Basidiomycota
	Ascomycota	Glomeromycota	Ascomycota	(Basidiomycota)			
	Zygomycota						
รากของพืชอาศัย		Bryophytes			Ericales	Monotropaceae	Orchidaceae
	Gymnosperms	Pteridophytes	Gymnosperms	Ericales			
	Angiosperms	Gymnosperms	Angiosperms				
		Angiosperms					

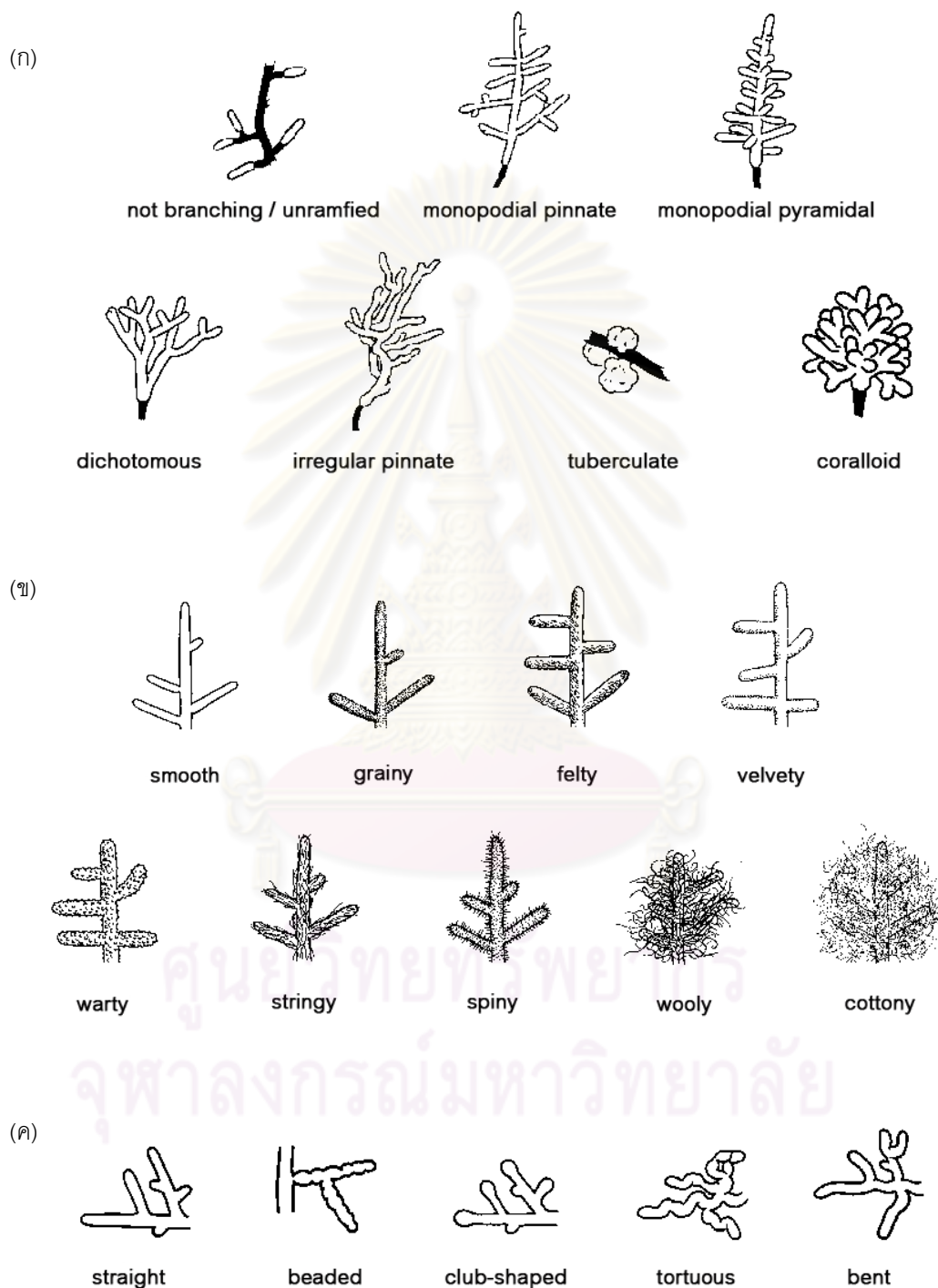


ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของราไมคอร์ไรซาชนิดต่าง ๆ (ที่มา: Selosse และ Le Tacon, 1998)

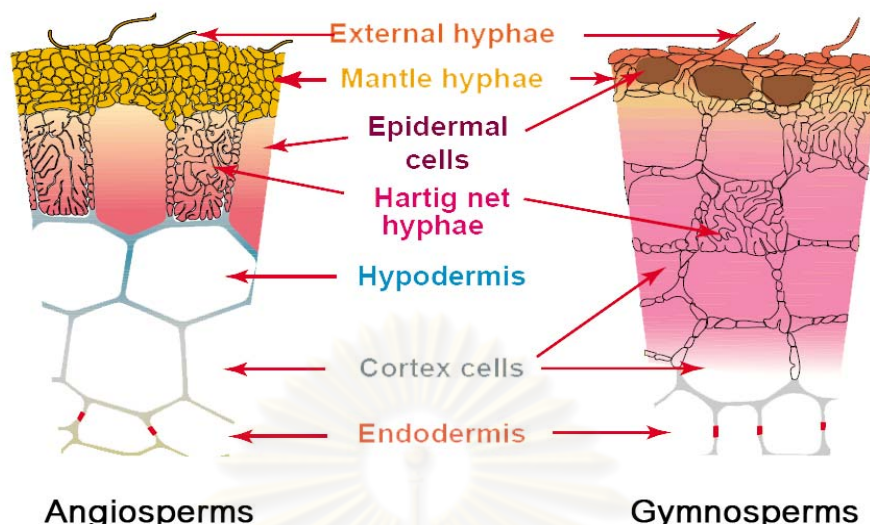
2.2 ลักษณะของรากพืชที่ติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

รากพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญอยู่จะมีลักษณะทางสัณฐานเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีความแตกต่างจากรากพืชที่ไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างเห็นได้ชัด เช่น รูปร่าง สี และลักษณะของผิวราก เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซาสร้างเส้นใยสานตัวกันเป็นแผ่น (sheath หรือ mantle) อยู่รอบ ๆ รากพืช มีความหนาประมาณ 20-40 ไมโครเมตร และมีน้ำหนักแห้งคิดเป็น 25-40% ของน้ำหนักแห้งของรากทั้งหมด ทำให้รากพืชพองออก มีความยาวลดลง และมีการแตกแขนงมากขึ้น ขนรากและหมวกรากจะหายไป สีของรากจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ส้ม เหลือง น้ำตาล ขาว หรือไม่มีสีขึ้นอยู่กับชนิดของรา ลักษณะผิวรากและการแตกแขนงของรากมีหลายแบบขึ้นกับชนิดของพืช ในพืชเมล็ดเปลือย (gymnosperms) เช่น พืชตระกูลสน จะมีการแตกแขนงแบบ 2 แฉกเป็นรูปตัว Y (dichotomous) ในขณะที่พืชดอก (angiosperms) เช่น ไม้ค (oak) บีช (beech) และเบิร์ช (birch) จะแตกแขนงออกด้านข้าง (monopodial) (ภาพที่ 2.2) เมื่อตัดรากพืชตามขวาง (cross section) จะเห็นเส้นใยราเจริญเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิส (epidermis) กับเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ (cortex) ประสานกันเป็นร่างแหอยู่รอบเซลล์ เรียกว่า hartig net แต่ไม่พบเส้น

ใยเจริญเข้าไปภายในเซลล์ หรือเจริญผ่านชั้นเอนโดเดอริส (endodermis) เข้าไปสู่ส่วนของท่อลำเลียงน้ำและอาหารแต่อย่างใด (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.2 รูปแบบของรากเอกโตไมคอร์ไรซา (ก) การแตกแขนง (ข) ลักษณะผิว และ (ค) รูปแบบปลาย (ที่มา: Durall และคณะ, 1996)



ภาพที่ 2.3 ภาพตัดตามขวางของรากพืชเมล็ดเปลือย (gymnosperms) และพืชดอก (angiosperms) ที่ติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา (ที่มา: Brundrett และคณะ, 1996)

2.3 ชนิดและพืชอาศัยของราเอคโตไมคอร์ไรซา

ราเอคโตไมคอร์ไรซามี 7,000-10,000 ชนิด ส่วนใหญ่จัดเป็นราชั้นสูงใน Phylum Basidiomycota มี 27 family และยังสามารถจัดจำแนกอยู่ใน Phylum Ascomycota ซึ่งมี 8 family และ Phylum Zygomycota ซึ่งมี 1 genus (ตารางที่ 2.2) ในจำนวนนี้มีประมาณ 80% สามารถสร้างดอกเห็ด (mushrooms) หรือพัฟบอลล์ (puffballs) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ โผล่ขึ้นมาเหนือผิวดินให้เห็นได้ แต่บางชนิดก็สร้างโครงสร้างดังกล่าวไว้ใต้ดินที่เรียกว่าทรัฟเฟิล (truffles) รูปร่างของดอกเห็ดที่มีลักษณะเฉพาะสามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาได้ง่าย แต่ดอกเห็ดจะขึ้นเฉพาะฤดูฝนในพื้นที่เขตร้อน หรือฤดูใบไม้ร่วงในพื้นที่เขตอบอุ่นเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาจากลักษณะดอกเห็ดได้ในช่วงอื่น อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคทางพันธุกรรมจะสามารถช่วยในการจำแนกชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาได้หลากหลายมากยิ่งขึ้น (Peterson และคณะ, 2004) ราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ในรากพืชจำพวกไม้ยืนต้น ตั้งแต่ไม้พุ่มที่มีขนาดเล็กตลอดจนไม้ป่าที่มีขนาดใหญ่และพบได้บ้างในพืชล้มลุก เช่น *Kobresia* และ *Polygonum* เป็นต้น (ตารางที่ 2.3) โดยพบแพร่กระจายทั่วไปในป่าไม้และทุ่งหญ้าทุกเขตภูมิอากาศต่าง ๆ ทั่วโลก ทั้งในเขตอบอุ่น เขตร้อน เขตป่าดิบชื้น และเขตเทือกเขาหรือเขตหนาวทางตอนเหนือซึ่งพบเป็นส่วนมาก โดยในรากพืชชนิดหนึ่งอาจมีราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยได้มากกว่า 1 ชนิด (Meyer, 1973; Alexander, 1989; Brundrett, 1991)

ตารางที่ 2.2 ชนิดของราเห็ดโตไม้คอร์ไรซา

Class	Order	Family	Genera
Phylum Basidiomycota			
Homobasidiomycetes	Agaricales	Amanitaceae	<i>Amanita</i>
			<i>Limacella</i>
		Hygrophoraceae	<i>Hygrophorus</i>
		Tricholomataceae	<i>Tricholoma</i>
			<i>Catathelasma</i>
			<i>Armillaria</i>
			<i>Leucopaxillus</i>
			<i>Melanoleuca</i>
			<i>Laccaria</i>
			Entolomataceae
		Cortinariaceae	<i>Rozites</i>
			<i>Descolea</i>
			<i>Cortinarius</i>
			<i>Inocybe</i>
			<i>Hebeloma</i>
		Paxillaceae	<i>Paxillus</i>
			<i>Neopaxillus</i>
			Gomphidiaceae
		<i>Chroogomphus</i>	
<i>Cystogomphus</i>			
<i>Gomphogaster</i>			
<i>Brauniellula</i>			
Boletaceae	<i>Amanitopsis</i>		
	<i>Boletinus</i>		
	<i>Boletus</i>		
	<i>Fistulinella</i>		

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Class	Order	Family	Genera
			<i>Gyrodon</i>
			<i>Gyroporus</i>
			<i>Leccinum</i>
			<i>Suillus</i>
			<i>Tylopilus</i>
			<i>Xerocomus</i>
		Strobilomycetaceae	<i>Boletellus</i>
			<i>Strobilomyces</i>
	Russulales	Russulaceae	<i>Lactarius</i>
			<i>Russula</i>
		Elasmomycetaceae	<i>Elasmomyces</i>
			<i>Gymnomyces</i>
			<i>Martellia</i>
			<i>Zelleromyces</i>
	Gautieriales	Gautieritaceae	<i>Gautieria</i>
	Aphylophorales	Cantharellaceae	<i>Cantharellus</i>
			<i>Craterellus</i>
		Clavariaceae	<i>Aphelaria</i>
			<i>Clavaria</i>
			<i>Clavariadelphus</i>
			<i>Clavicornia</i>
			<i>Clavulina</i>
			<i>Clavulinopsis</i>
			<i>Ramariopsis</i>
		Corticiaceae	<i>Amphinema</i>
			<i>Byssocorticium</i>
			<i>Byssosporia</i>
			<i>Piloderma</i>

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Class	Order	Family	Genera
		Hydnaceae	<i>Hydnum</i>
		Thelephoraceae	<i>Thelephora</i>
			<i>Boletopsis</i>
Gasteromycetes	Hymenogastrales	Octavianinaceae	<i>Octavianina</i>
			<i>Sclerogaster</i>
		Hymenogastraceae	<i>Hymenogaster</i>
		Rhizopogonaceae	<i>Truncocolumella</i>
			<i>Rhizopogen</i>
		Hydnangiaceae	<i>Hydnangium</i>
	Phallales	Hysterangiaceae	<i>Hysterangium</i>
	Lycoperdales	Mesophelliaceae	<i>Mesophellia</i>
	Melanogastrales	Melanogastraceae	<i>Melanogaster</i>
		Leucogastraceae	<i>Leucogaster</i>
			<i>Leucophleps</i>
	Sclerodematales	Sclerodemataceae	<i>Scleroderma</i>
			<i>Pisolithus</i>
		Astraceae	<i>Astraeus</i>
Phylum Ascomycota			
Discomycetes	Pezizales	Pezizaceae	<i>Pachyphloeus</i>
		Balsamiaceae	<i>Balsamia</i>
		Geneaceae	<i>Genea</i>
		Helvellaceae	<i>Helvella</i>
		Pyronemataceae	<i>Geopora</i>
			<i>Lachnea</i>
			<i>Sepultaria</i>
		Terfeziaceae	<i>Mukomyces</i>
			<i>Picoa</i>

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Class	Order	Family	Genera
			<i>Terfezia</i>
			<i>Tirmania</i>
		Tuberaceae	<i>Tuber</i>
Plectomycetes	Eurotiales	Elaphomycetaceae	<i>Elaphomyces</i>
Phylum Zygomycota			
	Endogonales	Endogonaceae	<i>Endogone</i>
Phylum Deuteromycota			
			<i>Cenococcum</i> *

* *Cenococcum geophilum* ที่จัดจำแนกใน Phylum Deuteromycota เชื่อว่าน่าจะเป็นระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) ของ *Elaphomyces* ใน Phylum Ascomycota (Miller, 1982)

(ที่มา: Miller, 1982; Harley และ Smith, 1983; Kendrick และ Birch, 1985; Brundrett และคณะ, 1996)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 ชนิดพืชที่มีความสัมพันธ์กับโรคโคโรนาไวรัส

Family	Genera
พืชเมล็ดเปลือย (Gymnosperms)	
Gnetaceae	<i>Gnetum</i>
Pinaceae	<i>Abies, Cathaya, Cedrus, Keteleeria, Larix, Picea, Pinus, Pseudolarix, Pseudotsuga, Tsuga</i>
พืชดอก (Angiosperms)	
พืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledons)	
Cyperaceae	<i>Kobresia</i>
พืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledons)	
Aceraceae	<i>Acer</i>
Betulaceae	<i>Alnus, Betula, Carpinus, Corylus, Ostrya, Ostryopsis, Ostryopsis</i>
Bignoniaceae	<i>Jacaranda</i>
Caesalpiniaceae	<i>Afzelia, Anthonotha, Aphanocalyx, Berlinia, Brachystegia, Cassia, Cryptosepalum, Dicycme, Didelotia, Eperua, Gilbertiodendron, Gleditsia, Intsia, Isoberlinia, Julbernardia, Microberlinia, Monopetalanthus, Paraberlinia, Paramacrolobium, Pellegriniodendron, Tetraberlinia, Toubaouate</i>
Caprifoliaceae	<i>Sambucus</i>
Casuarinaceae	<i>Allocasuarina, Casuarina</i>
Cistaceae	<i>Cistus, Fumana, Helianthemum, Hudsonia, Lechea, Tuberaria</i>
Compositae	<i>Lactuca (Mycelis)</i>
Cupressaceae	<i>Cupressus, Juniperus</i>
Dipterocarpaceae	<i>Anisoptera, Baranocarpus, Cotylelobium, Dipterocarpus, Dryobalanops, Hopea, Marquesia, Monotes, Pakaraimaea, Shorea, Vateria, Vateriopsis, Vatica</i>
Elaeagnaceae	<i>Shepherdia</i>

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

Family	Genera
Ericaceae	<i>Arbutus, Arctostophylos, Chimaphola, Gaultheria, Kalmia, Ledum, Leucothoe, Rhododendron, Vaccinium, Dillwynia, Eutaxia</i>
Euphorbiaceae	<i>Ampera, Poranthera, Uapaca</i> (now placed in Vapaceae)
Fagaceae	<i>Castanea, Castanopsis, Fagus, Lithocarpus, Nothofagus, Pasania, Quercus, Trigonobalus</i>
Goodeniaceae	<i>Brunonia, Goodenia</i>
Hammamelidaceae	<i>Parrotia</i>
Junglandaceae	<i>Carya, Engelhardtia, Juglans, Pterocarya</i>
Meliaceae	<i>Owenia</i>
Mimosaceae	<i>Acacia, Bartonina, Calliandra</i>
Myricaceae	<i>Comtonia, Myrica</i>
Myrtaceae	<i>Allosyncarpia, Agonis, Angophora, Baeckea, Callistemon, Campomanesia, Eucalyptus, Leptospermum, Melaleuca, Tristania, Tristaniopsis</i>
Nyctaginaceae	<i>Guapira, Neea, Pisonia, Torrubia</i>
Oleaceae	<i>Fraxinus</i>
Papilionaceae	<i>Aldinia, Gastrolobium, Gompholobium, Jacksonia, Lonchocarpus, Mirbelia, Oxylobium, Pericopsis</i>
Platanaceae	<i>Platanus</i>
Polygonaceae	<i>Coccoloba, Polygonum</i>
Pyrolaceae	<i>Pyrola</i>
Rhamnaceae	<i>Cryptandra, Pomederris, Rhamnus, Spyridium, Trymalium</i>
Rosaceae	<i>Chaembatia, Circocarpus, Crataegus, Dryas, Malus, Prunus, Pyrus, Rosa, Sorbus</i>
Rubiaceae	<i>Galium, Opercularia</i>
Salicaceae	<i>Populus, Rubia, Salix</i>

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

Family	Genera
Sapindaceae	<i>Alophylus, Nephelium</i>
Sapotaceae	<i>Glycoxylon, Manikara</i>
Sarcolaenaceae	<i>Leptolaena, Sarcolaena, Schizolaena</i>
Saxifragaceae	<i>Ribes</i>
Sterculiaceae	<i>Lasiopetalum, Thomasia</i>
Stylidiaceae	<i>Stylidium</i>
Thymeliaceae	<i>Pimelia</i>
Tiliaceae	<i>Tilia</i>
Ulmaceae	<i>Celtis, Ulmus</i>
Vitaceae	<i>Vitis</i>

(ที่มา: Harley และ Smith, 1983; Brundrett, 2009)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา

การเจริญและการติดเชื้อในรากพืชของราเอคโตไมคอร์ไรซา มีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ดังนี้

2.4.1 อุณหภูมิ อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีความสำคัญยิ่งต่อการเจริญและการอยู่รอดของราเอคโตไมคอร์ไรซา ราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดมีช่วงของอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกันออกไป อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 8-27 องศาเซลเซียส (Theodorou และ Bowen, 1971) ในขณะที่ราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำ เช่น *Pisolithus tinctorius* สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Hagem ที่อุณหภูมิสูงถึง 42 องศาเซลเซียส (Momah และ Gbadegesin, 1980) ส่วน *Paxillus involutus* สามารถเจริญและมีชีวิตรอดได้ที่ อุณหภูมิ -11 ถึง -12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน (Harley และ Smith, 1983)

2.4.2 ความเป็นกรด-ด่าง ราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน ส่วนใหญ่มักเจริญได้ดีในภาวะที่เป็นกรดอ่อน โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 4.0-5.5 (Harley, 1972) สภาพดินที่เป็นด่างจะยับยั้งการเจริญและการเข้าสู่รากพืชของราเอคโตไมคอร์ไรซา อย่างไรก็ตามการ

สลายตัวของฟอสเฟตในดินด้วยกรดออกซาลิกที่ราหลังออกมานั้น จะทำให้เกิดตะกอนที่ไม่ละลายน้ำของแคลเซียม เหล็ก และอะลูมิเนียม (Honston, 1956) ซึ่งช่วยให้พืชบางชนิดมีความทนทานต่อภาวะดินที่เป็นด่างได้ (Clement และคณะ, 1977)

2.4.3 ความชื้น ปริมาณความชื้นในดินมีความสำคัญต่อการอยู่รอด การเจริญ และกิจกรรมต่าง ๆ ของราเอคโตไมคอร์ไรซา ราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญได้ดีที่ระดับความชื้นในดิน 10-15% และสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในภาวะแห้งแล้งหรือในบริเวณที่มีระดับความชื้นในดินต่ำ โดยที่ระดับความชื้นประมาณ 2-7% ราเอคโตไมคอร์ไรซายังสามารถเจริญอยู่ได้ และพบว่ารา *Cenococcum geophilum* เป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาที่สามารถทนต่อความแห้งแล้งสูงได้เป็นพิเศษ ซึ่งสามารถเจริญร่วมกับพืชได้ในบริเวณแห้งแล้ง (Harley และ Smith, 1983) นอกจากนี้ความชื้นในดินยังมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานของราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยพบว่าเมื่อใส่ราในอิฐมวลที่แห้งจะทำให้เกิดการพัฒนารูปเป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีสีดำ แต่ถ้าใส่เชื้อในสภาพที่มีความชื้นจะพัฒนารูปเป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีสีสว่างกว่า (Hatch, 1937; Mikola, 1948)

2.4.4 แหล่งคาร์บอน ราเอคโตไมคอร์ไรซาใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา ราเอคโตไมคอร์ไรซาส่วนมากมักใช้กลูโคสและฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนแมนโนสและซูโครสจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนบ้างเป็นส่วนน้อย ในขณะที่ราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิด สามารถย่อยสลายแป้งและเซลลูโลสได้เมื่อมีกลูโคสในตอนเริ่มต้น นอกจากนี้ยังพบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดสามารถใช้เพคตินเป็นแหล่งคาร์บอนได้ สำหรับลักษณะนั้นแทบจะไม่พบว่าถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับราเอคโตไมคอร์ไรซาเลย (Kaul, 2002)

2.4.5 แหล่งไนโตรเจน ราเอคโตไมคอร์ไรซาใช้แหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเหมือนกับราชนิดอื่น ๆ โดยราเจริญดีที่สุดเมื่อใช้สารอินทรีย์หรือสารอินทรีย์ของแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนกรดอะมิโนและสารประกอบอินทรีย์ของไนโตรเจนอย่างง่ายบางชนิดใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ในราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิด ในขณะที่การใช้ไนโตรเจนอย่างจำกัด ทั้งนี้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ราเอคโตไมคอร์ไรซาต้องการ ไม่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดหรือสายพันธุ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่อย่างใด (Harley และ Smith, 1983) นอกจากนี้ Read และคณะ (1989) พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถใช้โปรตีนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายโปรตีนและดูดซึมเข้าเซลล์ได้ทันที ซึ่งเรียกราดเอคโตไมคอร์ไรซานี้ว่า protein fungi

2.4.6 แหล่งฟอสเฟต ราเอคโตไมคอร์ไรซามีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุให้แก่พืชอาศัย โดยฟอสเฟตซึ่งเป็นสารประกอบรูปหนึ่งของฟอสฟอรัส ถือเป็นสารอาหารที่จำเป็นของราเอคโตไมคอร์ไรซาทุกชนิด ในอาหารเทียม (artificial media) ฟอสเฟตมักอยู่ในรูปของสารอนินทรีย์โพแทสเซียมฟอสเฟต ส่วนในชีวมีสฟอสเฟตจะอยู่รูปของสารประกอบอินทรีย์ เช่น อินโนซิทอลฟอสเฟต Sharples และ Cairney (1997) พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาที่อาศัย อยู่กับ *Pisonia grandis* สามารถใช้ทั้งฟอสเฟตอินทรีย์และเกลือของอินโนซิทอลฟอสเฟต เป็นแหล่งฟอสฟอรัสได้ นอกจากนี้ยังพบว่าดินที่มีธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสมากจะยับยั้งการเข้าสู่รากของราเอคโตไมคอร์ไรซาและทำให้มีการติดเชื้อลดลง เนื่องจากพืชจะนำไนโตรเจนและฟอสฟอรัสไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนพลาสม่าที่รวดเร็ว ทำให้ผนังเซลล์รากมีความหนาเพิ่มมากขึ้น Mason และคณะ (1999) ได้ศึกษาอิทธิพลของฟอสฟอรัสต่อราไมคอร์ไรซาและการเจริญของ *Eucalyptus globules* Labill พบว่าเมื่อให้ฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากลดลง

2.4.7 ความเข้มแสง แสงมีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลที่เก็บไว้ที่ราก (Marks และ Foster, 1973) ถ้าพืชได้รับแสงมาก จะทำให้พืชสังเคราะห์แสงได้น้ำตาลเป็นจำนวนมาก น้ำตาลที่พืชสะสมไว้ที่รากนี้เป็นสิ่งจำเป็นที่ราเอคโตไมคอร์ไรซานำไปใช้ในการเจริญ

2.4.8 สารเคมีทางการเกษตร ยาฆ่ารา (fungicides) ที่ใช้ป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา มีผลต่อราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ ยาฆ่าราบางชนิดจะไปยับยั้งการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา (Mardisubroto และ Wardana, 1982) หรืออาจจะไปกระตุ้นให้ราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญเร็วขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์อื่นบริเวณรากถูกทำลายลงไป (Torstensson และ Wessen, 1984) ยาฆ่ารา copper oxychloride และ propiconazole มีผลยับยั้งการเกิดเอคโตไมคอร์ไรซาใน scot pine และทำให้ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เกิดขึ้นมีลักษณะต่างไปจากเดิม (Manninen และคณะ, 1998) ราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดมีความสามารถทนทานต่อยาฆ่าราแต่ละชนิดในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แตกต่างกัน Reddy และ Natarajan (1994) พบว่ายาฆ่าแมลง fenvalerate ที่ความเข้มข้นต่ำจะกระตุ้นการเจริญของ *Thelephora terrestris* ได้ แต่ที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลยับยั้งการเจริญ

2.4.9 จุลินทรีย์อื่นในดิน ราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดไม่สามารถเจริญหรือแก่งแย่งกับจุลินทรีย์อื่นที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากได้ จุลินทรีย์บางชนิดสังเคราะห์ขึ้นในดิน เช่น gliotoxin หรือ griseofulvin ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา (Jackson และ Mason, 1984) Levisohn (1960) พบว่า *Alternaria tenuis* มีความสามารถขัดขวางการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา เช่น ราในสกุล *Boletus* และ *Rhizopogen* หลายชนิด

2.5 ประโยชน์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา

2.5.1 ประโยชน์ต่อพืช

2.5.1.1 เพิ่มการดูดซึมน้ำและแร่ธาตุอาหาร รากพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอยู่ด้วยจะมีขนาดใหญ่ขึ้น และเส้นใยของราทำหน้าที่เปรียบเสมือนรากฝอยที่แพร่กระจายอยู่ในดิน เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของรากและช่วยในการดูดซึมน้ำและแร่ธาตุอาหารต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ให้กับพืช ซึ่งมีผลทำให้พืชมีการเจริญเพิ่มมากขึ้น Marx และ Ruehle (1988) พบว่า รากของต้นสน *Pinus taeda* ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus arhizus* ภายหลังจากย้ายปลูก 2 ปี จะสังเกตเห็นเส้นใยของราแผ่ไปในดินได้ไกลถึง 3 เมตร ซึ่งช่วยดูดน้ำและแร่ธาตุอาหารในบริเวณที่รากพืชเจริญไปไม่ถึงส่งผลให้พืชมีการเจริญดีขึ้น นอกจากนี้ราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลในดินซึ่งไปขัดขวางการดูดซึมน้ำในโตรเจนของพืช (Bending และ Read, 1997) และสามารถผลิตฮอร์โมน เช่น ออกซิน ไซโตไคนิน เอทิลีน และจิบเบอเรลลิน เพื่อกระตุ้นการเจริญของพืชได้ (Slankis, 1973; Gogala, 1991; Beyrle, 1995)

2.5.1.2 เปลี่ยนแปลงแร่ธาตุอาหารให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ ราเอคโตไมคอร์ไรซาผลิตเอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase) ออกมาย่อยสลายฟอสฟอรัสจากแหล่งฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำยาก เช่น KH_2PO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ และ Fe-phytate (McElhinney และ Mitchell, 1995) และ/หรือสร้างกรดอินทรีย์ออกมาย่อยสลาย FePO_4 , AlPO_4 และหินฟอสเฟต (Griffiths และคณะ, 1994) ซึ่งพืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดย 90% ของฟอสฟอรัสที่ถูกดูดซับไว้โดยเส้นใยของราเอคโตไมคอร์ไรซา จะถูกเคลื่อนย้ายมาเก็บสะสมไว้ที่ชั้นแมนเทิลในรูปของ soluble orthophosphate (Harley และ Loughman, 1963) polyphosphate dispersed (Ashford และคณะ, 1999) หรือ polyphosphate granule (Ashford และคณะ, 1994) ขึ้นอยู่กับชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา ก่อนที่จะส่งถ่ายให้กับรากพืชอาศัยเมื่อพืชมีความต้องการแร่ธาตุอาหาร

2.5.1.3 ส่งถ่ายธาตุอาหารระหว่างพืช ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถถ่ายทอดคาร์บอนจากรากพืชอาศัยต้นหนึ่งไปยังรากพืชอาศัยอีกต้นหนึ่งที่ขาดแคลนอาหาร ทำให้พืชมีชีวิตอยู่รอดได้ ซึ่งเป็นการลดการแข่งขันระหว่างพืช อีกทั้งยังช่วยให้เกิดความเสถียรและความหลากหลายของระบบนิเวศได้ (Simard และคณะ, 1997) นอกจากนี้ยังสามารถส่งถ่ายแร่ธาตุอาหารจากต้นพืชที่ตายแล้วไปสู่ต้นพืชอื่นที่ยังมีชีวิตได้ (Eason และคณะ, 1991)

2.5.1.4 ป้องกันโรคของระบบรากพืช ราเอคโตไมคอร์ไรซาทำหน้าที่ป้องกันการเข้าทำลายของราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้ โดยเส้นใยราที่สานกันเป็นแผ่น (sheath) รอบราก รวมทั้งเส้นใยราที่สานกันเป็นร่างแห (hartig net) อยู่รอบเซลล์จะทำหน้าที่เปรียบเสมือนเกราะป้องกันเชื้อโรคที่จะเข้ามาทำลายรากของต้นไม้ (Marx, 1969) นอกจากนี้ ราเอคโตไมคอร์ไรซายังสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อโรค Marx และ Davey (1969) สามารถสกัดสารปฏิชีวนะ diatretyne nitrile และ diatretyne จากรากสนที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซา *Leucopaxillus cerealis* var. *piceina* ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านรา *Phytophthora cinnamomi* ได้

2.5.1.5 เพิ่มความทนทานของรากพืชต่อความเป็นพิษของดิน ราเอคโตไมคอร์ไรซาช่วยให้รากพืชมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิสูง ความแห้งแล้ง ความเป็นกรด-ด่างที่มากหรือน้อยเกินไป และความเป็นพิษของโลหะหนัก เป็นต้น Mikola (1970) รายงานว่าเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาที่สานกันเป็นแผ่น (sheath) หรือเป็นเยื่อหุ้ม (mantle) รอบราก จะทำหน้าที่เปรียบเสมือนฟองน้ำช่วยดูดซับความชื้นให้แก่กล้าไม้ และช่วยให้กล้าไม้มีชีวิตอยู่รอดได้ในภาวะแห้งแล้ง Aggangan และคณะ (1996) พบว่า *Pisolithus* spp. และ *Scleroderma cepa* สามารถกระตุ้นการเจริญของยูคาลิปตัสเมื่อปลูกในดินที่มีความเป็นกรดสูงได้ Jones และ Hutchinson (1988) พบว่า *Scleroderma flavinum* สามารถกระตุ้นการเจริญของต้นเบิร์ชในดินที่มีการปนเปื้อนของนิกเกิลปริมาณสูงได้

2.5.2 ประโยชน์ต่อระบบนิเวศ

2.5.2.1 หมุนเวียนธาตุอาหาร ราเอคโตไมคอร์ไรซามีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุอาหารในดิน และป้องกันการสูญเสียออกนอกระบบ โดยเฉพาะธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม เมื่อราเอคโตไมคอร์ไรซาตายลงธาตุอาหารทั้งหลายที่สะสมอยู่ภายในก็จะถูกปลดปล่อยกลับคืนสู่ดิน (Harley และ Smith, 1983)

2.5.2.2 แหล่งอาหารที่สำคัญของสัตว์ ดอกเห็ดของราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิดทั้งที่เจริญอยู่บนดินและใต้ดิน เป็นอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีรก (placental mammals) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีถุงหน้าท้อง (marsupial mammals) (Reddell และคณะ, 1997; Mcilwee และ Johnson, 1998; Claridge, 2002) รากพืชเอคโตไมคอร์ไรซาและดอกเห็ดเป็นอาหารและที่อยู่ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Fogel และ Peck, 1975; Lawrence และ Milner, 1996) นอกจากนี้เส้นใยราที่อยู่ในดินเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของแมลงและสัตว์ขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ในดิน (Ingham และ Massicotte, 1994; Setälä, 1995)

2.5.2.3 ส่งถ่ายคาร์บอนจากรากพืชอาศัยสู่จุลินทรีย์อื่นในดิน คาร์บอนเป็นแหล่งอาหารสำคัญต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่อาศัยอยู่ในดิน การเจริญของจุลินทรีย์ในสภาพของดินป่าจะเป็นไปอย่างค่อนข้างช้า เนื่องจากในดินมีฮิวมัสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญสูงถึง 80-90% ราเอคโตไมคอร์ไรซาจะมีบทบาทสำคัญในการส่งถ่ายคาร์บอนที่ได้รับจากรากพืชอาศัย คาร์บอนที่เหลือจากการนำไปใช้ในการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาจะถูกเคลื่อนย้ายสู่ดินโดยโครงข่ายของเส้นใยรา (mycelial network) ซึ่งจุลินทรีย์อื่นในดินสามารถนำคาร์บอนนี้ไปใช้เพื่อช่วยในการเจริญได้

2.5.3 ประโยชน์ต่อมนุษย์

2.5.3.1 แหล่งอาหาร ราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิดสร้างดอกเห็ดที่สามารถนำมารับประทานได้ เช่น เห็ดเสม็ด (*Tyropilus plumbeoviolaceus*) เห็ดระโงกขาว (*Amanita princeps*) เห็ดระโงกเหลือง (*Amanita hemibapha* subsp. *javanica*) เห็ดฟานเหลืองทอง (*Lactarius hygrophoroides* Berk. et Curt.) เห็ดน้ำแป้งหรือเห็ดข้าวแป้ง (*Russula alboleolata* Hongo) เป็นต้น เห็ดบางชนิดนอกจากรับประทานเพื่อความอร่อยแล้วยังมีสรรพคุณทางยา เช่น เห็ดเผาะหรือเห็ดถอบ (*Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan) เป็นเห็ดที่มีรสเย็น หวาน โดยมากใช้เป็นอาหารบำรุงร่างกาย ชูกำลัง และแก้ไข้ใน เห็ดตับเต่าหรือเห็ดผึ้งคราม (*Boletus colossus* Heim) และเห็ดตับเต่าขมบั้งกระโหลก (*Boletus edulis* Bull. ex Fr.) มีสรรพคุณช่วยบำรุงสุขภาพ บำบัดอาการปวดหลัง ปวดข้อ ปวดเส้นเอ็นและกระดูก เห็ดหล่มกระเชียวหรือเห็ดโคล (*Russula virescens* Fr.) ช่วยลดไข้ บำรุงสายตา บำรุงตับ บำรุงร่างกาย และบำรุงเลือดลม เป็นต้น (กิตติมา ดั่งวงศา, 2552)

2.5.3.2 **สีย้อม** ดอกเห็ดของราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถนำมาสกัดเป็นสีย้อมเส้นไหมพรมได้หลายชนิดสี และให้สีที่ติดแน่นกับเส้นไหมพรมได้ดี เช่น *Cortinarius semisanguineus* ให้สารสกัดสีแดงหรือสีชมพู *Cortinarius albviolaceus* ให้สารสกัดสีม่วง *Cortinarius zakii* ให้สารสกัดสีเหลือง *Boletus edulis* ให้สารสกัดสีส้ม *Pisolithus tinctorius* ให้สารสกัด สีน้ำตาลหรือสีดำ *Paxillus atrotomentosus* ให้สารสกัดสีน้ำตาลหรือสีเขียวมะกอก เป็นต้น (Rice และ Beebe, 1980)

2.5.3.3 **ตัวชี้วัดคุณภาพสิ่งแวดล้อม** ราเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นตัวชี้วัดถึงความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศป่าไม้ ถ้าป่ามีจำนวนราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิดแสดงว่าเป็นป่าที่สมบูรณ์ แต่ถ้ามีราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดเดียวแสดงว่าเป็นป่าที่เสื่อมโทรม และมีความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อมสูง Fellner (1989) รายงานว่า ในสภาวะแวดล้อมปกติของป่าเขตอบอุ่นมีราไมคอร์ไรซา 40-60% ของราทั้งหมด แต่มลพิษทางอากาศมีผลทำให้ความหลากหลายของราไมคอร์ไรซา ลดลงเหลือน้อยกว่า 40% ขณะที่ Arnolds (1991) รายงานว่าการเกิดสภาวะฝนกรดมีผลต่อการลดลงของจำนวนชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา

2.6 โลหะหนัก

โลหะหนัก (heavy metals) หมายถึง ธาตุที่มีความหนาแน่นมากกว่า 5 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร หรือมีความถ่วงจำเพาะมากกว่า 5 ขึ้นไป และส่วนใหญ่เป็นธาตุที่อยู่ในกลุ่มโลหะทรานซิชัน (transition metals) ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต โลหะหนักเป็นสารที่คงตัว ไม่สามารถสลายตัวได้ในกระบวนการธรรมชาติ มีทั้งหมด 23 ชนิด ได้แก่ ทองแดง เงิน ทองคำ ทองคำขาว สังกะสี ตะกั่ว ดีบุก โครเมียม แคดเมียม ปรอท บิสมีต์ พลวง โคบอลต์ ยูเรเนียม นิกเกิล แมงกานีส สารหนู เหล็ก วาเนเดียม ซีเรียม แกลเลียม เทลลูเรียม และทอเรียม (Glanze, 1996) ระดับความเป็นพิษของโลหะหนักขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของโลหะหนัก และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น ความชื้น ความเป็นกรด-ด่างของดิน นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารพิษ โลหะหนักบางชนิดเป็นสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น สังกะสี ทองแดง เหล็ก และแมงกานีส ในปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์และโปรตีนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ แต่ถ้าได้รับในความเข้มข้นที่สูงเกินไปก็จะก่อให้เกิดพิษต่อสิ่งมีชีวิตนั้น ส่งผลให้การเจริญของจุลินทรีย์และพืชลดลง อีกทั้งก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของคนและสัตว์ โดยกระบวนการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง การเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือด และส่งผลเสียต่อการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ใน

ร่างกาย รวมทั้งก่อให้เกิดมะเร็ง ภูมิแพ้ และโรคต่าง ๆ เมื่อได้รับสารพิษในระยะยาว สำหรับโลหะหนักบางชนิดจัดเป็นสารพิษต่อสิ่งมีชีวิต ในระดับความเข้มข้นที่มากเกินไปเกินระดับความทนทานของสิ่งมีชีวิต เช่น ตะกั่ว แคดเมียมปรอท และสารหนู เป็นต้น (Trevors และคณะ, 1986; Alloway และ Ayres, 1997; Hall, 2002; Kvesitadze และคณะ, 2006)

2.6.1 แหล่งกำเนิดโลหะหนัก

2.6.1.1 เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โลหะหนักเป็นธาตุที่พบในหินเปลือกโลกน้อยกว่า 1% ส่วนอีก 99% เป็นธาตุอาหารหลัก (macroelements) เช่น แคลเซียม โซเดียม ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม เป็นต้น (Alloway และ Ayres, 1997) การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพของเปลือกโลก รวมทั้งการย่อยสลาย การกัดกร่อน และการผุพังตามธรรมชาติของหน้าดินจนถึงชั้นของหินที่มีแร่ธาตุต่าง ๆ และโลหะหนักอยู่ เป็นแหล่งที่มาของการปนเปื้อนโลหะหนักลงสู่แหล่งน้ำ เนื่องจากกระบวนการกัดกร่อนและผุพังตามธรรมชาติจะอาศัยตัวกลาง เช่น น้ำหรือสนามโน้มถ่วง เพื่อพัดพามวลสารต่าง ๆ ไปทับถมยังบริเวณที่มีระดับความลาดชันต่ำลงมานอกจากนี้การเคลื่อนที่ของสารโลหะหนักจากชั้นบรรยากาศในรูปของฝุ่นละอองหรือไอ ซึ่งเมื่อน้ำฝนไหลผ่านก็จะชะล้างโลหะหนักลงสู่แหล่งน้ำ และก่อให้เกิดการสะสมในตะกอนดินต่อไป

2.6.1.2 เกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ กิจกรรมของมนุษย์เป็นแหล่งกำเนิดของโลหะหนักที่มีบทบาทสูงมาก เนื่องจากโลหะหนักเป็นวัตถุพิษที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลายภาคส่วนด้วยกันทั้งในด้านอุตสาหกรรม เช่น การผลิตพลาสติก พีวีซี สี และถ่านไฟฉาย ด้านการเกษตรใช้เป็นส่วนผสมของยาฆ่าแมลงและปุ๋ยเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของพืช หรือด้านการแพทย์ที่ใช้โลหะหนักเป็นส่วนผสมของยา อุปกรณ์ทางการแพทย์ และเครื่องสำอาง ของเสียจากกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมต่าง ๆ เหล่านี้จึงมีโอกาที่จะปนเปื้อนโลหะหนักด้วย เมื่อของเสียเหล่านี้ถูกปลดปล่อยออกมาในสิ่งแวดล้อมทั้งแหล่งน้ำ ดิน และอากาศ โดยขาดการจัดการที่ดีหรือมีการกำจัดอย่างผิดวิธี จึงส่งผลให้สภาพแวดล้อมบริเวณนั้นมีการปนเปื้อนของโลหะหนักได้ อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในแหล่งนั้น ๆ ด้วย

2.6.2 การทำเหมืองแร่กับปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนัก

แร่ (minerals) เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยกระบวนการทางธรณีซึ่งเกิดภายในโลกและที่ผิวโลก แร่ถือเป็นทรัพยากรที่มีความสำคัญต่อมนุษย์ทุกยุคทุกสมัย โดยนำแร่มา

มาก โดยใช้ซุบเหล็กเพื่อป้องกันการฟูก่อนหรือเกิดสนิม ใช้เป็นโลหะผสมในชิ้นส่วนยานยนต์ อุปกรณ์เครื่องใช้ในบ้าน ผลิตภัณฑ์อลูมิเนียม อุตสาหกรรมยางรถยนต์ เซรามิก สี และอาหารสัตว์ ใช้เป็นส่วนผสมในปุ๋ยเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของพืช ถึงแม้ว่าสังกะสีจัดเป็นสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของมนุษย์และสัตว์ โดยช่วยสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้อยู่ในระดับที่ปกติ ช่วยกระตุ้นระบบสมองให้ทำงานดีขึ้น และช่วยสร้างเซลล์ผิวหนังใหม่ มนุษย์ได้รับสังกะสีจากการบริโภคอาหารในแต่ละวัน ซึ่งพบมากในเนื้อสัตว์ ปลา ข้าว ธัญพืช และผักใบเขียว อย่างไรก็ตาม การได้รับสังกะสีในปริมาณมาก ๆ จากอาหาร จะมีพิษต่อร่างกายและเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการอ่อนเพลีย วิงเวียนศีรษะ และอาการท้องร่วง ถ้าได้รับไอฝุ่นของสังกะสีเข้าร่างกายมาก ๆ จะเกิดอาการไข้ที่เรียกว่า zinc chills ซึ่งมีอาการจับไข้ หนาวสั่น ปวดกล้ามเนื้อ และอาเจียน

ทองแดง (Cu) เป็นโลหะค่อนข้างอ่อน สีน้ำตาลแดง พบตามธรรมชาติในรูปของทองแดงบริสุทธิ์ แร่ซัลไฟด์ หรือ แร่ออกไซด์ ทองแดงเป็นโลหะที่ใช้ประโยชน์และมีความสำคัญในด้านอุตสาหกรรมเป็นที่สองรองจากเหล็ก มีความเหนียวสามารถขึ้นรูปได้ง่าย นำไฟฟ้าได้ดี และทนต่อการกัดกร่อน ใช้ทำลวดไฟฟ้า ทำโลหะผสมใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ และใช้ทำเหรียญกษาปณ์ สารประกอบทองแดงใช้เป็นยาฆ่าเชื้อโรคและราในแหล่งน้ำได้ ทองแดงเป็นธาตุโลหะที่ร่างกายต้องการในปริมาณเล็กน้อย ใช้ในกระบวนการทางชีวเคมีเฉพาะอย่าง ซึ่งถ้าขาดทองแดงอาจทำให้เกิดความบกพร่องในการสังเคราะห์ไขมันบางชนิด รวมทั้งทำให้เกิดโรคโลหิตจางเพราะร่างกายดูดซึมเหล็กไม่ได้ แต่ถ้าได้รับในปริมาณมากจะทำให้เกิดการระคายเคืองและอักเสบที่ผิวหนังและผมเปลี่ยนสี ประสาทรับรสสัมผัสเสีย คลื่นไส้ อาเจียน เป็นไข้ (metal fume fever) และเป็นพิษต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น

ตะกั่ว (Pb) เป็นโลหะมีสีเทาเงินหรือแกมน้ำเงิน เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ในเปลือกโลกมีตะกั่วประมาณ 10–15 ppm สามารถถูกชะล้างออกจากบรรยากาศได้โดยฝน ตะกั่วถูกนำมาใช้เป็นวัตถุเติมในอุตสาหกรรมจำนวนมาก ใช้สังเคราะห์สารเตตระเอทิลเลด (tetraethyllead, TEL $Pb(C_2H_5)_4$) ในเบนซินเพื่อเพิ่มค่าออกเทน ใช้ทำอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์ ใช้ในแบตเตอรี่ การหุ้มสายเคเบิล และกระสุน นอกจากนี้ยังพบในเม็ดสี พลาสติกพีวีซี ดินสอ และยาฆ่าแมลง ตะกั่วเข้าสู่ร่างกายได้ 3 ทาง คือ ทางอาหาร ทางการหายใจ และทางผิวหนัง สารตะกั่วมีพิษมากโดยเฉพาะในเด็กซึ่งอาจมีผลทำให้สมองพิการ ส่วนในผู้ใหญ่มีผลต่อระบบทางเดินอาหารและระบบประสาท เมื่อสารตะกั่วเข้าสู่ร่างกาย ส่วนใหญ่จะจับยึดอยู่กับเม็ดเลือดแดง ไปยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮีโม (heme) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเม็ดเลือดแดง

นอกจากนี้ตะกั่วยังมีผลต่อตับ ไต หัวใจ ภาวะเจริญพันธุ์ โครโมโซม และก่อให้เกิดโรคมะเร็งอีกด้วย

แคดเมียม (Cd) เป็นโลหะอ่อน สีเงิน มีอยู่น้อยตามธรรมชาติ แคดเมียมเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการทำเหมืองแร่สังกะสีและตะกั่ว แคดเมียมมักถูกนำมาใช้เป็นวัตถุเติมในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ เช่น แบตเตอรี่ พลาสติก เม็ดสี ยาง ยาสูบ ทำโลหะผสมชุบโลหะ เป็นต้น โดยทั่วไปจะได้รับแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายจากอาหารที่บริโภคและได้รับจากอากาศโดยการหายใจ แคดเมียมถูกดูดซับ 15–50% ในระบบทางเดินหายใจ และถูกดูดซับในลำไส้ประมาณ 2–7% โดยมีอวัยวะเป้าหมายหลักที่แคดเมียมเข้าไปทำปฏิกิริยา คือ ตับ ไต สมอง ปอด และกระดูก โรคที่เกิดจากพิษของแคดเมียมเรียกว่า โรคอิไต-อิไต (Itai-itai disease) มีผลให้กระดูกเปราะและปวดอย่างรุนแรง ถ้าได้รับสารในปริมาณน้อยแต่เป็นเวลานานจะก่อให้เกิดโรคความดันโลหิตสูง ไตทำงานผิดปกติ ภาวะกระดูกพรุน ชาติสมาธิ ความจำเสื่อม บางครั้งซึมเศร้า บางครั้งร่าเริง (manic depressive behaviour) ถ้ามีอาการอ่อนเพลียอาจหมดสติและตายได้

การสะสมของโลหะหนักในดิน มักก่อให้เกิดปัญหาความเป็นพิษต่อพืช ถึงแม้ว่าพืชจะมีกลไกในการทนความเป็นพิษของโลหะหนัก โดยการเลือกและลดการนำเข้าสู่เซลล์ของไอออนของโลหะหนัก ตรึงโลหะหนักไว้ในราก ใบหรือเมล็ด เปลี่ยนรูปหรือย่อยสลายโลหะหนักให้มีความเป็นพิษลดลง หรือเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ระเหยได้โดยอาศัยแรงดึงดูดจากการคายน้ำแล้วขับออกทางใบหรือทางราก (Kabata-Penias และ Pendia, 1992) ด้วยกลไกการทนโลหะหนักดังกล่าวจึงทำให้มีการนำพืชมาใช้บำบัดความเป็นพิษของโลหะหนัก (phytoremediation) (Bradi, 2005) เพื่อฟื้นฟูสภาพแวดล้อมในบริเวณที่ปนเปื้อน ลดอันตรายจากพิษของโลหะหนักที่มีต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตอื่นให้น้อยลง ซึ่งเทคโนโลยีการบำบัดโลหะหนักด้วยพืชนี้เป็นวิธีที่มีการใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากมีประสิทธิภาพและประหยัดต้นทุนในการบำบัด โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีที่มีราคาแพง หรือเป็นสาเหตุของการทำลายธรรมชาติ เช่น การชะล้างดิน การขุดลอกหน้าดิน ซึ่งจำเป็นต้องใช้เครื่องจักรและต้นทุนในการบำบัดสูง อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดในเรื่องความเข้มข้นของโลหะหนัก ถ้าบริเวณปนเปื้อนมีความเข้มข้นของโลหะหนักมากเกินระดับที่พืชทนได้ ก็จะทำให้เกิดผลกระทบต่อพืชอันเนื่องมาจากความเป็นพิษของโลหะหนัก โดยพืชจะมีการเจริญเติบโตช้าและมีขนาดเล็กกว่าปกติ ต้นพืชอ่อนมีการตายเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ความหลากหลายทางชีวภาพในบริเวณนั้นลดลง และทำให้การปลูกพืชขึ้นมาใหม่แทนที่ต้นเดิมต้องใช้เวลาหลายปี (Ritchie และ Thingvold, 1985)

2.7 กลไกการทนโลหะหนักของราเอคโตไมคอร์ไรซา

ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอาศัย ที่ปลูกในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักและช่วยลดความเป็นพิษของโลหะหนักที่มีต่อพืชได้ (Godbold และคณะ, 1998; Schützendübel และ Polle, 2002) ราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยกลไกการลดความเป็นพิษของโลหะหนักทั้งระดับภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ต่าง ๆ แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา ชนิดและความเข้มข้นของโลหะหนัก รวมทั้งตำแหน่งสัมผัสกับโลหะหนัก (Jentschke และ Godbold, 2000; Bellion และคณะ, 2006) นอกจากนี้การศึกษาความสัมพันธ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีต่อพืชอาศัยยังพบว่า การลดความเป็นพิษของโลหะหนักต่อพืชอาศัย จะได้ผลดีที่สุดเมื่อใช้ราเอคโตไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อโลหะหนัก (Colpaert และ van Assche, 1992; Adriaensen และคณะ, 2003)

2.7.1 กลไกภายนอกเซลล์ (extracellular mechanisms)

กลไกภายนอกเซลล์เป็นกลไกเพื่อป้องกันโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา (ภาพที่ 2.4) ดังนี้

2.7.1.1 ดูดซับโลหะหนักไว้ที่ผนังเซลล์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา ผนังเซลล์เป็นตำแหน่งแรกของการปฏิสัมพันธ์โดยตรงระหว่างราเอคโตไมคอร์ไรซากับโลหะหนัก ผนังเซลล์ของราเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่มีกลูแคน ไคติน และกาแลคโตซามีนเป็นองค์ประกอบหลัก และมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบย่อย ดังนั้นบริเวณหมู่คาร์บอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ไฮดรอกซิล หมู่ฟอสเฟต และหมู่ซัลไฟไฮดริลที่เป็นอิสระจะเป็นบริเวณจับ (binding sites) กับโลหะหนัก (Strandberg และคณะ, 1981) การดูดซับโลหะหนักไว้ที่ผนังเซลล์เป็นกลไกการทนต่อโลหะหนักของราเอคโตไมคอร์ไรซา และช่วยลดการนำเข้าสู่โลหะหนักสู่ต้นพืชอาศัยได้ Marschner และคณะ (1998) ได้ตรวจวัดปริมาณตะกั่วในเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซา *Paxillus involutus* และ *Laccaria bicolor* เมื่อสัมผัสกับตะกั่วที่ความเข้มข้น 48 ไมโครโมลาร์ พบว่าเส้นใยราดูดซับตะกั่วได้สูงถึง 0.2-1.3 มิลลิโมลต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา ซึ่งปริมาณตะกั่วที่ถูกดูดซับสอดคล้องกับความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนบวกของราชนิดนี้ จึงเชื่อว่าปริมาณตะกั่วเกือบทั้งหมดถูกดูดซับไว้ที่ผนังเซลล์ของรา ทั้งนี้ประสิทธิภาพของการดูดซับโลหะหนักขึ้นอยู่กับชนิดของโลหะหนัก โดยพบว่าทองแดงมีสัมพรรคภาพ (affinity) ในการดูดซับได้ดีกว่าตะกั่ว และสัมพรรคภาพในการดูดซับโลหะหนัก ยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีที่ผนังเซลล์ของรา จึงกล่าวได้ว่าประสิทธิภาพในการดูดซับ โลหะหนักที่ผนังเซลล์ ขึ้นอยู่กับชนิดของโลหะหนักและชนิดของราเอค

โตไมคอร์ไรซาด้วยเช่นกัน (Kapoor และ Viraraghavan, 1995) อย่างไรก็ตามยังไม่อาจสรุปได้ว่าความเป็นพิษของโลหะหนักจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของผนังเซลล์ หรือการเจริญของเส้นใยราเอกโตไมคอร์ไรซาหรือไม่ แต่ผลการทดลองของราอิริคอยด์ไมคอร์ไรซาเมื่อสัมผัสกับสังกะสี พบว่าบริเวณ ปลายเส้นใยของรามีลักษณะที่บวมขึ้น เส้นใยมีการแตกแขนง และมีปริมาณไคตินเพิ่มมากขึ้น (Lanfranco และคณะ, 2002) นอกจากนี้เมลานินซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ยังช่วยเพิ่มความสามารถของราเอกโตไมคอร์ไรซาในการดูดซับโลหะหนัก (Fogarty และ Tobin, 1996)

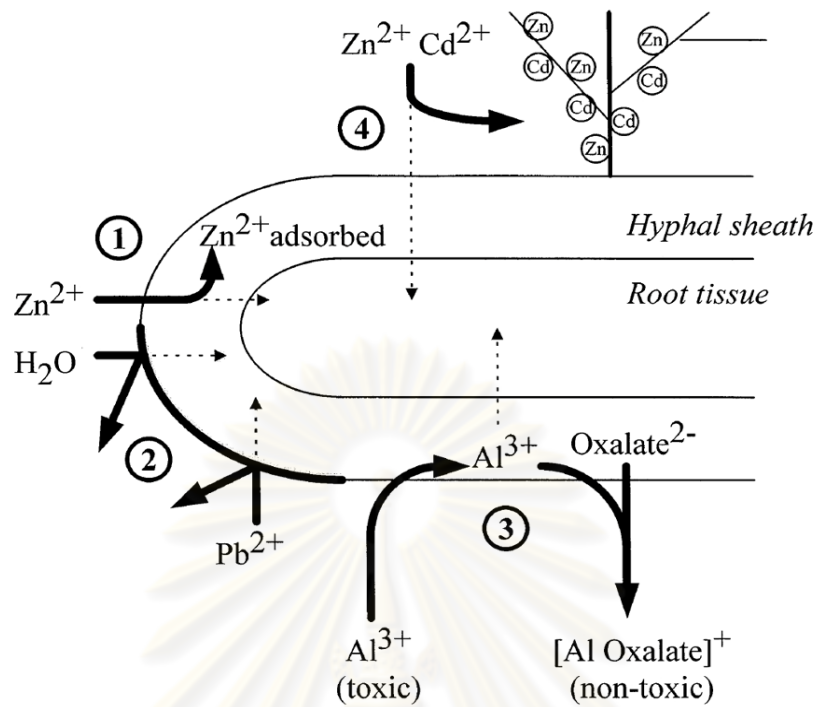
2.7.1.2 ยับยั้งการเคลื่อนที่ของโลหะหนักสู่เซลล์ โดยสมบัติของเส้นใยราเอกโตไมคอร์ไรซาซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) เส้นใยราเอกโตไมคอร์ไรซาที่รวมตัวกันเป็นแผ่นอัดแน่น (fungal sheath) อยู่รอบ ๆ รากพืชอาศัย มีสมบัติเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) (Unestam, 1991) สามารถช่วยป้องกันการลำเลียงน้ำและไอออน รวมทั้งโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ของราเอกโตไมคอร์ไรซาและรากพืชอาศัยได้ Turnau (Jentschke และ Godbold, 2000) ได้ตรวจสอบการกระจายของโลหะหนักในรากต้นสนที่มีราเอกโตไมคอร์ไรซาที่เจริญในดินที่มีสังกะสี พบว่า *Rhizopogon roseolus* และ *Suillus luteus* สามารถ ป้องกันไม่ให้ตะกั่วและสังกะสีเคลื่อนเข้ามาในเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์และชั้นเนื้อเยื่อของรากได้ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากสมบัติการเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำของราเอกโตไมคอร์ไรซา ร่วมกับการดูดซับโลหะหนักไว้ที่เส้นใยรา

2.7.1.3 เกิดสารเชิงซ้อนโดยสารหลังจากราเอกโตไมคอร์ไรซา สารประกอบอินทรีย์ที่หลังจากราเอกโตไมคอร์ไรซา โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดคาร์บอกซิลิกที่ไม่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น กรดออกซาลิก และกรดซิตริก สามารถจับกับไอออนของโลหะหนัก เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนหรือผลึกคริสตัลในรูปไม่มีพิษอยู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งช่วยลดการนำเข้าของโลหะหนักสู่เซลล์ของราเอกโตไมคอร์ไรซา และลดความเป็นพิษของโลหะหนักที่มีต่อต้นพืชอาศัยได้ (Jentschke และ Godbold, 2000; Bellion และคณะ, 2006) Ahonen-Jonnarth และคณะ (2000) พบว่าต้นสนที่มีราเอกโตไมคอร์ไรซา *Suillus variegates* หรือ *Rhizopogon roseolus* จะตอบสนองต่อภาวะที่มีอะลูมิเนียม โดยเพิ่มการผลิตกรดออกซาลิกซึ่งเป็นตัวจับอะลูมิเนียมที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าสารเมือกที่ราหลั่งออกมา สามารถช่วยลดการสัมผัสโลหะหนักทั้งของราและพืชอาศัย อีกทั้งยังช่วยเพิ่มความสามารถในการทนโลหะหนักได้ดียิ่งขึ้น (Denny และ Ridge, 1995)

2.7.1.4 **ชุดขับไละหนักรั่วที่เส้นใยราที่ขึ้นออกมาจากราก** เส้นใยของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ขึ้นออกมาจากรากช่วยลดการสัมผัสไละหนักรั่วได้ จากการศึกษาของ Colpaert และ van Assche (1992, 1993) พบว่าประสิทธิภาพของการลดการเคลื่อนย้ายสังกะสีและแคดเมียมสู่ปลายยอดพืชของราเอคโตไมคอร์ไรซา มีความสัมพันธ์กับจำนวนของเส้นใยที่ขึ้นออกมาจากราก และเส้นใยที่ขึ้นออกมาจากรากนี้สามารถดูดซับสังกะสีและตะกั่วได้ดีกว่าการดูดซับไว้ที่เส้นใยราที่สานกันเป็นแผ่น (sheath) ล้อมรอบราก หรือที่สานกันเป็นร่างแห (hartig net) รอบเซลล์ (Denny และ Wilkins, 1987; Jentschke และคณะ, 1991)

นอกจากนี้ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถผลิตฮอร์โมนพืชได้หลายชนิด เช่น ออกซิน ไซโตไคนิน เอทิลีน และจิบเบอเรลลิน เป็นต้น (Slankis, 1973; Gogala, 1991; Beyrle, 1995) เพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอาศัย การปรับเปลี่ยนกระบวนการทางสรีระวิทยาของพืชในการเพิ่มระดับฮอร์โมนพืชทางอ้อมโดยราเอคโตไมคอร์ไรซานี้ สามารถช่วยลดความเป็นพิษของไละหนักรั่วที่มีต่อพืชอาศัยได้ เนื่องจากฮอร์โมนพืช โดยเฉพาะไซโตไคนิน มีบทบาทสำคัญต่อการทนไละหนักรั่วของพืชที่มีท่อลำเลียง (Pan และคณะ, 1989) Hentschel และคณะ (1993) ได้ศึกษาผลของอะลูมิเนียมต่อการเจริญของ *Picea abies* ที่มีและไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซา *Paxillus involutus* พบว่าอะลูมิเนียมมีผลไปลดความเข้มข้นแมกนีเซียมของพืชทั้งที่มีและไม่มี ราเอคโตไมคอร์ไรซา แต่ไม่ทำให้การเจริญของพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาลดลง หรือไม่ก่อให้เกิดอาการเป็นพิษใด ๆ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาไปช่วยเพิ่มระดับแมกนีเซียมของพืชอาศัย และชะลอการเสื่อมของใบโดยเพิ่มไซโตไคนินให้แก่พืชอาศัยผ่านทางระบบราก (Jentschke และ Godbold, 2000)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.4 กลไกภายนอกเซลล์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาเพื่อลดปริมาณโลหะหนักเข้าสู่เซลล์พืช (1) ดูดซับไว้ที่ผนังเซลล์หรือ hyphal sheath (2) ยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์เนื่องจากสมบัติความไม่ชอบน้ำของเส้นใยรา (3) เกิดสารเชิงซ้อนโดยสารหลังจากรา และ (4) ดูดซับไว้ที่เส้นใยราที่ยื่นออกมาจากราก (ที่มา: Jentschke และ Godbold, 2000)

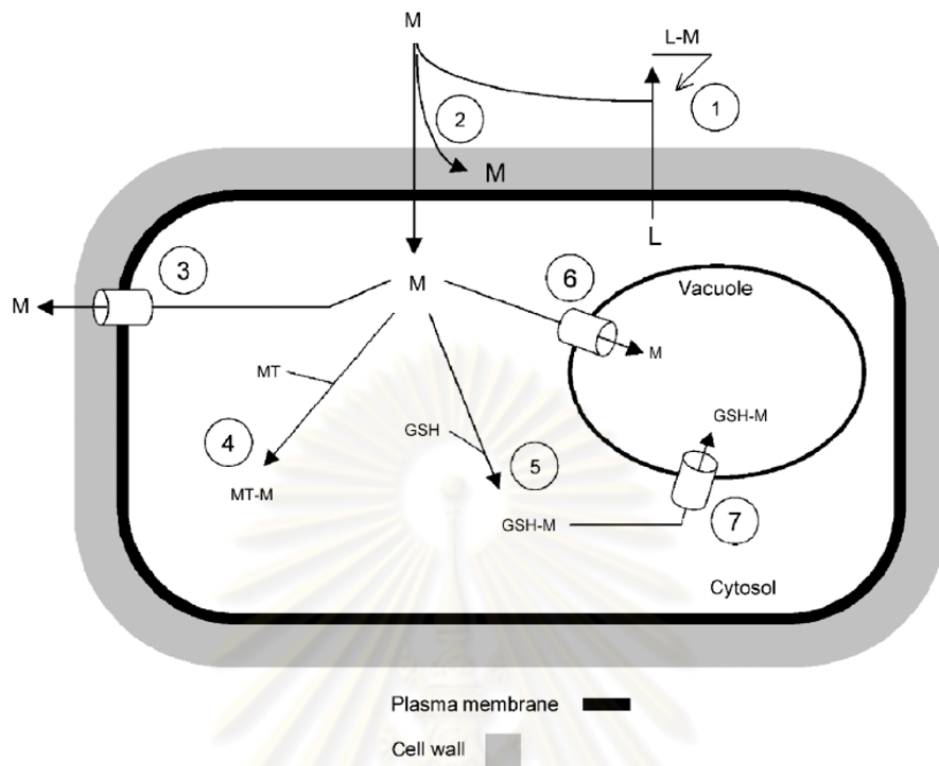
2.7.2 กลไกภายในเซลล์ (intracellular mechanisms)

ถึงแม้ว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาจะมีกลไกภายนอกเซลล์เพื่อป้องกันโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ดังที่กล่าวในข้างต้นแล้ว แต่โลหะหนักจำนวนมากยังคงสามารถเข้าสู่เซลล์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาได้ Blaudez และคณะ (2000a) ตรวจสอบปริมาณแคดเมียมในเซลล์ของ *Paxillus involutus* พบว่ามีแคดเมียมในไซโตซอลและแวคคิวโอล 20% และ 30% ตามลำดับ ราเอคโตไมคอร์ไรซาจึงมีกลไกภายในเซลล์ เพื่อลดปริมาณและความเป็นพิษของโลหะหนักที่จะทำลายเซลล์ (ภาพที่ 2.5) ดังนี้

2.7.2.1 เกิดสารเชิงซ้อนโดยสายเปปไทด์ภายในเซลล์ ราเอคโตไมคอร์ไรซามีเมทัลโลไธโอนีน (metallothionein, MT) ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีนเป็นจำนวนมาก สามารถจับกับโลหะหนักโดยเฉพาะสังกะสี ทองแดง แคดเมียม และปรอทได้ดีด้วยหมู่ไทออลหรือหมู่ซัลไฟไฮไดรล (-SH) ที่อยู่ในซิสเทอีน พบได้ทั่วไป

ในราและอาณาจักรสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ Howe และคณะ (1997) พบว่าโปรตีนเมทิลไลโอโอนีนมีความเกี่ยวข้องกับการจับกับทองแดงซึ่งพบในราเอคโตไมคอร์ไรซา *Laccaria laccata* และ *Paxillus involutus* นอกจากนี้ยังพบว่ากลูตาไธโอน (glutathione, GSH) ซึ่งเป็นไตรเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิดเรียงต่อกัน คือ กลูตามีน ซิสเทอีน และไกลซีน มีความเกี่ยวข้องกับการจับกับโลหะหนัก Courbot และคณะ (2004) พบว่า *Paxillus involutus* เมื่ออยู่ในภาวะที่มีแคดเมียม จะมีกลูตาไธโอน แกมมากกลูตามิลซิสเทอีน (γ -glutamylcysteine) และเมทิลไลโอโอนีนเพิ่มมากขึ้น

2.7.2.2 เคลื่อนย้ายโลหะหนักออกนอกเซลล์หรือเข้าสู่ออร์แกเนลล์ กลไกการเคลื่อนย้ายโลหะหนักมีความเกี่ยวข้องกับความสามารภในการทนโลหะหนักของราเอคโตไมคอร์ไรซา ทั้งการเคลื่อนย้ายโลหะหนักโดยผ่านตัวขนส่ง (transporter) จากไซโตซอลออกนอกเซลล์หรือการเคลื่อนย้ายโลหะหนักเข้าสู่ออร์แกเนลล์ภายในเซลล์ (Williams และคณะ, 2000; Hall, 2002) Adriaensen (2005) พบว่าการเคลื่อนย้ายสังกะสีออกนอกเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้นเป็นกลไกสำคัญในการทนโลหะหนักของ *Suillus bovinus* ในขณะที่ Blaudez และคณะ (2000a) ตรวจพบแคดเมียมถูกสะสมอยู่ในส่วนของแวคิลโล ซึ่งถือเป็นกลไกลดความเป็นพิษของแคดเมียมที่สำคัญของ *Paxillus involutus* โดยแวคิลโลนั้นนับว่าเป็นออร์แกเนลล์ที่ดีที่สุดที่ใช้สะสมโลหะหนักที่มีมากเกินไป (Eide, 2003) การลดความเป็นพิษของแคดเมียมโดยวิธีนี้ยังสามารถพบได้ในยีสต์และในพืชชั้นสูง โดยแคดเมียมจะถูกเชื่อมติดกับกลูตาไธโอนหรือไฟโตคีเลติน (phytochelatins, PCs เปปไทด์สายสั้นที่ใช้จับกับโลหะหนักซึ่งพบในสาหร่ายและพืชชนิดต่าง ๆ) ก่อนที่จะถูกสะสมไว้ในแวคิลโล ซึ่งควบคุมการทำงานโดยตัวขนส่ง Hmt1 ที่อยู่บริเวณโทโนพลาสต์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ของแวคิลโล (Ortiz และคณะ, 1992) นอกจากนี้การควบคุมการทำงานของ transporter genes ที่ลดลง ซึ่งช่วยลดการนำเข้าของโลหะหนักที่เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นอีกกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับความสามารภในการทนโลหะหนักของราชนิดอื่น (Eide, 2003) และของพืช (Clemens, 2001; Hall, 2002)



ภาพที่ 2.5 กลไกภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนต่อโรคของราเอคโตไมคอร์ไรซา (1) เกิดสารเชิงซ้อนโดยสารหลังจากรา (2) ดูดซับไว้ที่ผนังเซลล์ (3) เคลื่อนที่ออกนอกเซลล์ (4) จับกับเมทิลโลไฮโอนีน (5) จับกับกลูตาไรโอน (6) เคลื่อนที่เข้าสู่แวคคูลอล และ (7) จับกับกลูตาไรโอนแล้วเคลื่อนที่เข้าสู่แวคคูลอล (ที่มา: Bellion และคณะ, 2006)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับราเอคโตไมคอร์ไรซากับความเป็นพิษของโลหะหนัก

งานวิจัยของต่างประเทศจำนวนมากกล่าวถึงราเอคโตไมคอร์ไรซา ในด้านการทดสอบความทนทานต่อโลหะหนัก และศึกษาการเจริญของพืชอาศัยที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาในภาวะที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก

Colpaert และ van Assche (1987) คัดแยกราเอคโตไมคอร์ไรซาของพืชอาศัยของ *Pinus sylvestris* L. และ *Betula pendula* จากแหล่งที่ปนเปื้อนสังกะสีและแคดเมียม เพื่อทดสอบความทนทานต่อโลหะหนักบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและอาหารเหลว เปรียบเทียบกับราเอคโตไมคอร์ไรซาสายพันธุ์เดียวกันที่คัดแยกจากแหล่งที่ไม่ปนเปื้อนโลหะหนัก ผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ที่แยกจากแหล่งที่ปนเปื้อนมีความทนทานต่อโลหะหนักได้ดี ขณะที่สายพันธุ์ที่แยกจากแหล่งที่ไม่มีการปนเปื้อนจะถูกยับยั้งการเจริญ โดยรา *Suillus luteus*, *Suillus bovinus*, *Telephora terrestris*

และ *Amanita muscaria* สามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ใส่สังกะสีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อกรัม และมีเพียง *Pisolithus tinctorius* เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ที่ทองแดงความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อกรัม สำหรับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพบว่า *Suillus bovinus* และ *Amanita muscaria* สามารถเจริญได้ที่สังกะสีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อกรัม และ *Pisolithus tinctorius* เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ที่ทองแดงความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อกรัม จะเห็นว่าสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสังกะสีจะไม่ทนทานต่อทองแดง และ สายพันธุ์ที่ทนทานต่อทองแดงจะไม่ทนทานต่อสังกะสีเช่นเดียวกัน ซึ่งยืนยันได้ว่าราเอคโตไมคอร์ไรซามีกลไกในการทนทานต่อสังกะสีและทองแดงที่แตกต่างกัน

Tam (1995) ได้ทดสอบการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus tinctorius*, *Thelephora terrestris*, *Cenococcum geophilum*, *Hymenogaster* sp. และ *Scleroderma* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่โลหะหนัก 9 ชนิด ได้แก่ อะลูมิเนียม เหล็ก ทองแดง สังกะสี นิกเกิล แคดเมียม โครเมียม ตะกั่ว และปรอท พบว่า *Pisolithus tinctorius*, *Hymenogaster* sp. และ *Scleroderma* sp. มีความทนทานต่ออะลูมิเนียม เหล็ก ทองแดง และสังกะสีที่ความเข้มข้นสูงได้ดี เมื่อนำเส้นใย *Pisolithus tinctorius* ในภาวะที่มีโลหะหนักมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าที่โลหะหนักความเข้มข้นสูงจะทำให้เส้นใยมีลักษณะการเจริญที่ผิดปกติ ปลายเส้นใยบวม และมีสารเมือกเคลือบที่เส้นใย และเมื่อตรวจเส้นใยด้วยวิธี energy-dispersive X-ray spectrometry (EDS) พบว่ากลไกการลดความเป็นพิษของโลหะหนักเฉพาะทองแดงและสังกะสีของราเอคโตไมคอร์ไรซานี้มีความเกี่ยวข้องกับ polyphosphate granules

Blaudez และคณะ (2000b) ทดสอบการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา 39 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Suillus bovinus*, *Suillus luteus* และ *Suillus variegates* มี 21 สายพันธุ์ที่เก็บจากบริเวณที่ปนเปื้อน และสายพันธุ์ที่เหลือเก็บจากบริเวณที่ไม่ปนเปื้อนโลหะหนัก ทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN ที่มีผลสมโลหะหนัก ได้แก่ สังกะสี ทองแดง แคดเมียม และนิกเกิล พบว่า *Suillus luteus*, *Suillus variegates* และ *Pisolithus tinctorius* ทนทานต่อสังกะสี ทองแดง และแคดเมียมได้ดีกว่า *Paxillus involutus* แต่ *Paxillus involutus* ทนทานต่อนิกเกิลได้ดีกว่าราสายพันธุ์อื่น ๆ และพบว่าค่า EC_{50} ของราที่เก็บจากบริเวณที่มีและไม่มีกรปนเปื้อนโลหะหนักไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Moyer-Henry และคณะ (2005) ตรวจสอบระดับความทนทานและการสะสมอะลูมิเนียมในรากของกล้าสนloblolly pine) ที่ใส่อะลูมิเนียมเป็นเวลา 14 วัน รวมทั้งในรากกล้าสนที่ติดเชื้อ *Pisolithus tinctorius* เมื่อใส่อะลูมิเนียมเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากล้าสน

สามารถทนอะลูมิเนียมได้สูง โดยความเป็นพิษของอะลูมิเนียมเริ่มส่งผลกระทบต่อการเจริญของรากแก้ว ที่ระดับความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ จนกระทั่งที่ระดับความเข้มข้น 580 ไมโครโมลาร์ การเจริญของรากแก้วลดลงเพียง 30% เมื่อนำปลายรากสนที่ตัดตามยาวมาตรวจหาตำแหน่งการสะสมอะลูมิเนียมโดยวิธี lumigallion staining พบว่าอะลูมิเนียมสะสมมากที่สุดบริเวณหุ้มรากและเซลล์พาเรงไคมา (parenchyma cells) นอกชั้นเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ในขณะที่การเจริญของกล้าสนที่ติดเชื้อ *Pisolithus tinctorius* จะมีผลกระทบเมื่อใส่อะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1.18 มิลลิโมลาร์ โดยทำให้น้ำหนักแห้งของรากลดลง 10% และพบอะลูมิเนียมถูกสะสมเป็นจำนวนมากบริเวณแผ่นเส้นใยรา (sheath) ที่เจริญอยู่รอบรากแขนงและบริเวณเส้นใยสานกันเป็นร่างแห (hartig net) รอบเซลล์ของกล้าสน โดยมีอะลูมิเนียมปริมาณเล็กน้อยเท่านั้นที่ถูกตรวจพบในรากแขนง แสดงให้เห็นว่านอกจากกลไกการทนความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในรากกล้าสนแล้ว ยังมีราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ช่วยป้องกันการนำเข้าอะลูมิเนียมสู่รากพืชอาศัยด้วย

Ray และคณะ (2005) ทดสอบความทนทานของราเอคโตไมคอร์ไรซา 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Laccaria fraterna*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius* EM-1081, *Pisolithus tinctorius* EM-1293, *Scleroderma cepa*, *Scleroderma flavidum*, *Scleroderma verucosum* และ *Hysterangium incarcerationum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่อะลูมิเนียม สารหนู แคดเมียม โคโรเนียม นิกเกิล และตะกั่วที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ติดตามการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี พบว่า *Hysterangium incarcerationum* มีความทนทานต่อโลหะหนักทุกชนิดที่นำมาทดสอบมากที่สุด ขณะที่ *Laccaria fraterna* และ *Pisolithus tinctorius* EM-1293 สามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่โลหะหนักเช่นเดียวกัน ส่วนราเอคโตไมคอร์ไรซาสายพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ จะมีการเจริญลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มความเข้มข้นโลหะหนัก เมื่อตรวจสอบปริมาณโลหะหนักในเส้นใยรา โดยวิธี atomic absorption spectrophotometry พบว่า *Pisolithus tinctorius* EM-1293 ดูดซับอะลูมิเนียม (34,642.58 ppm) แคดเมียม (302.12 ppm) และตะกั่ว (3,501.96 ppm) ไว้มากที่สุด *Laccaria fraterna* ดูดซับสารหนู (130.57 ppm) และโคโรเนียม (402.38 ppm) ไว้มากที่สุด และ *Hysterangium incarcerationum* ดูดซับนิกเกิล (2,648.59) ไว้มากที่สุด

Sell และคณะ (2005) นำราเอคโตไมคอร์ไรซา *Hebeloma crustuliniforme* *Paxillus involutus* และ *Pisolithus tinctorius* ใส่ในรากของไม้ป๊อปลาร์ (poplar) และวิลโลว์ (willow) เจริญในดินที่ปนเปื้อนแคดเมียมเป็นเวลา 11 สัปดาห์ วัดปริมาณแคดเมียมที่อยู่ในราก ลำต้น และใบ และนำไปคำนวณปริมาณแคดเมียมจากรากที่ถูกส่งไปยังลำต้นและใบ พบว่าต้น

ป๊อปปลาร์ที่มี *Pisolithus involutus* มีการดูดซึมปริมาณแคดเมียมมากขึ้น และอัตราการขนส่งแคดเมียมจากรากสู่ใบสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นป๊อปปลาร์ที่ไม่มีการเติมราเอคโตไมคอร์ไรซา แต่ผลดังกล่าวไม่พบใน *Hebeloma crustuliniforme* และ *Pisolithus tinctorius* และในไม้วิลโลว์

Adriaensen และ Vangronsveld (2006) ศึกษาการเจริญของกล้าไม้สน (*Pinus sylvestris* L.) ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา *Suillus bovinus* สายพันธุ์ที่ไวและทนทานต่อสังกะสี และไม่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา เลี้ยงกล้าไม้ในวัสดุปลูกที่มีสังกะสี เป็นเวลา 9 เดือน พบว่าการเจริญ การดูดซึมแร่ธาตุ รวมทั้งความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ของกล้าไม้ที่ไม่ใส่และไม่ใส่ราสายพันธุ์ที่ไวต่อสังกะสีถูกยับยั้งอย่างมาก แต่กล้าไม้ที่ใส่ราสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสังกะสีจะถูกยับยั้งน้อยกว่า ผลการวิจัยนี้สนับสนุนว่าราเอคโตไมคอร์ไรซามีส่วนสำคัญในการต่อต้านความเป็นพิษของสังกะสีในกล้าไม้

Krznaric และคณะ (2009) ศึกษา *Suillus luteus* ในแหล่งที่ปนเปื้อนและไม่ปนเปื้อนโลหะหนัก พบว่าสายพันธุ์ที่เก็บจากแหล่งปนเปื้อนโลหะหนักเป็นสายพันธุ์ที่ทนความเป็นพิษของแคดเมียมได้ และสะสมแคดเมียมไว้ที่เส้นใยน้อยกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ทนแคดเมียม เมื่อนำมาเจริญร่วมกับกล้าไม้สน พบว่ากล้าไม้สนที่มีรา *Suillus luteus* สายพันธุ์ที่ทนโลหะหนักสามารถช่วยให้กล้าสนยังคงมีการดูดซึมแร่ธาตุอาหารฟอสเฟตและแอมโมเนียมได้ดีกว่า และจากการตรวจวัดปริมาณแคดเมียมในกล้าสน พบว่าแคดเมียมมีการสะสมอยู่ในรากมากกว่าใบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

เคมีภัณฑ์	บริษัทผู้ผลิต
• ไข่แดง	-
• 30% Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Merck, Germany
• 95% Ethanol (C_2H_5OH)	Merck, Germany
• Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	J.T. Baker, USA
• Boric acid (H_3BO_3)	Merck, Germany
• Cadmium sulphate ($3CdSO_4 \cdot 8H_2O$)	May and Baker, England
• Calcium chloride ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	May and Baker, England
• Copper sulphate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	Ajax Finechem, Australia
• Cotton blue	Sigma-Aldrich, USA
• D-glucose	Sigma-Aldrich, USA
• di-ammonium phosphate ($(NH_4)_2HPO_4$)	May and Baker, England
• di-Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Merck, Germany
• Ethylenediaminetetraacetic acid ferric-sodium salt (FeEDTA)	Sigma-Aldrich, USA
• Ferric chloride ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	Carlo Erba Reagenti, Italy
• Glycerol	Merck, Germany
• Hydrochloric acid (HCl)	Merck, Germany
• Lactic acid	Merck, Germany
• Lead nitrate ($Pb(NO_3)_2$)	May and Baker, England
• Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	May and Baker, England
• Malt extract	Difco Laboratories, USA
• Manganese chloride ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	Ajax Finechem, Australia
• Phenol crystal	Merck, Germany
• Potassium chloride (KCl)	Merck, Germany
• Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck, Germany

- | | |
|--|----------------------------|
| • Sodium chloride (NaCl) | Merck, Germany |
| • Sodium hydroxide (NaOH) | Merck, Germany |
| • Sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | May and Baker, England |
| • Thiamine HCl | May and Baker, England |
| • Zinc sulphate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | Carlo Erba Reagenti, Italy |

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- | อุปกรณ์ | บริษัทผู้ผลิต |
|---|--------------------------------|
| • กระดาษกรอง (Membrane filter) ขนาด 0.45 ไมครอนเมตร | Millipore, Ireland |
| • กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) รุ่น CH30 | Olympus, Japan |
| • กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereo microscope) รุ่น MZ6 | Leica, Germany |
| • ขวดทดลองรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร รุ่น Pyrex | Bibby, England |
| • ขวดพลาสติกโพลีโพรพิลีน ขนาด 250 มิลลิลิตร | Nalgene, USA |
| • เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) รุ่น AG 204 | Mettler Toledo, Switzerland |
| • เครื่องชั่งหยาบ (Precision balance) รุ่น PG 4002-5 | Mettler Toledo, Switzerland |
| • เครื่องปั่นผสมความเร็วสูง (Homogenizer) รุ่น AM-8 | Nissei, Japan |
| • เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S20-K | Mettler Toledo, USA |
| • จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (Plastic Petri Dish) | Greiner Bio-One, Thailand |
| • ตะแกรงร่อนดิน (Sieve) รุ่น O.S.K. 119 | Ogawa Seiki, Japan |
| • ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) รุ่น H1 | Lab Service LTD part, Thailand |
| • ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (Refrigerator) | Mitsubishi Electric, Japan |
| • ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น Modell 700 | Memmert, Germany |
| • ทิป (Tip) ขนาด 0.01, 0.2, 1 และ 5 มิลลิลิตร | Axygen Scientific, USA |
| • ปิเปตอัตโนมัติ (Micropipette) ขนาด P2, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 | Gilson, France |
| • ไมโครเวฟ รุ่น TRX-1963i | Turbora, Thailand |
| • หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น ES-315 | Tomy, Japan |

3.3 **วัสดุปลูก** ได้แก่ ทราย พีทมอส (peat moss) เพอร์ไลท์ (perlite) กระจ่างดินไม้พลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 นิ้ว ป้ายซีลปิดกระจ่าง ถุงเพาะชำ

วัสดุอุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ กระดาษอลูมิเนียม พาราฟิล์ม ก่อร่างถ้วยรูป เข็มเขี่ยเชื้อ เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร ไม้บรรทัด เวอร์เนีย (vernier)

เมล็ดพันธุ์ไม้ยางนา (*Dipterocarp alatus* Roxb.)

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 สํารวจและเก็บตัวอย่าง

สํารวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ดเห็ดโคนไม้คอร์กโรซจากแหล่งตามธรรมชาติ และสวนป่าในพื้นที่ 9 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ กาญจนบุรี ขอนแก่น ฉะเชิงเทรา ชัยภูมิ ชุมพร เชียงใหม่ ตาก นครราชสีมา และน่าน ในช่วงฤดูฝนของแต่ละปี ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม พ.ศ. 2550 ถึง 2552 และจากบริเวณเหมืองสังกะสี บริษัท ผาแดงอินดัสทรี จำกัด (มหาชน) จังหวัดตาก ช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2551

3.4.2 แยกเส้นใยราให้บริสุทธิ์

แยกเส้นใยจากเนื้อเยื่อดอกเห็ดที่เก็บได้ในข้อ 3.4.1 ให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์โดยวิธีปลอดเชื้อ เลือกดอกเห็ดที่มีสภาพสมบูรณ์ ทำความสะอาดบริเวณผิวด้านนอกที่มีดินติดอยู่ด้วยแปรงใช้เข็มเขี่ยผงไฟฆ่าเชื้อเขี่ยเนื้อเยื่อที่อยู่ภายใน นำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Modified Melin-Norkrans (MMN) (Marx, 1969) (ภาคผนวก ก) pH 5.8 ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ ทำการ subculture จนได้เส้นใยราที่บริสุทธิ์ ตรวจยืนยันความบริสุทธิ์ของเส้นใยราที่แยกได้ โดยเขี่ยเส้นใยวางบนแผ่นสไลด์ ย้อมด้วยสี Lactophenol cotton blue (ภาคผนวก ข) ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเพาะขยายเส้นใยราที่บริสุทธิ์ในจานเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.4.3 คัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ทนโลหะหนัก

3.4.3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 เพื่อหลีกเลี่ยงการตกตะกอนของโลหะหนัก (Blaudez และคณะ, 2000b) เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อในขวดทดลองรูปชมพู่แล้ว ใส่สารละลายโลหะหนัก (ภาคผนวก ข) ที่ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ได้แก่ ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$), คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$), เลดไนเตรท ($Pb(NO_3)_2$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และแคดเมียมซัลเฟต ($CdSO_4$) ความเข้มข้น 0.06 มิลลิโมลาร์ เขย่าให้เข้ากัน เทลงจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่โลหะหนักเป็นชุดควบคุม ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ

3.4.3.2 คัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่โลหะหนักชนิดต่าง ๆ

เลี้ยงเส้นใยที่แยกได้และบริสุทธิ์แล้วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 5.8 บ่มที่อุณหภูมิ เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ จากนั้นใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์กที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะลงบนขอบโคโลนีของราเอคโตไมคอร์ไรซา วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบที่เตรียมไว้จากข้อ 3.4.3.1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกสัปดาห์ เปรียบเทียบการเจริญของราแต่ละไอโซเลตโดยใช้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในสัปดาห์ที่ 4 และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความทนทานของรา คัดเลือกไอโซเลตที่มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางมากและทนทานต่อโลหะหนักแต่ละชนิดได้ดี เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

$$\text{ความทนทาน (\%)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางชุดทดลอง (ซม.)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางชุดควบคุม (ซม.)}} \times 100$$

3.4.4 ทดสอบการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ผ่านการคัดเลือก

เลี้ยงเส้นใยที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.3.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 5.8 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ จากนั้นใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์กที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะลงบนขอบโคโลนีของราเอคโตไมคอร์ไรซา วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่โลหะหนัก ได้แก่ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1, 2,

4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และ CdSO_4 ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่โลหะหนักเป็นชุดควบคุม ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ทุกสัปดาห์ และหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยราในสัปดาห์ที่ 4 โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ทดสอบไปละลายด้วยเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 2-3 นาที ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเส้นใย โดยจุ่มลงในน้ำร้อนอุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียส ชั้เส้นใยราให้แห้งด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำเส้นใยราอบที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จนได้น้ำหนักแห้งคงที่ (ดัดแปลงจาก Colpaert และคณะ, 2000) นำค่าเส้นผ่านศูนย์กลางทุกสัปดาห์มาสร้างกราฟการเจริญ และนำค่าเส้นผ่านศูนย์กลางสัปดาห์ที่ 4 และน้ำหนักแห้งของเส้นใยรามาสั่งกราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญร้อยละ 50 (EC_{50})

3.4.5 เตรียมหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

เลี้ยงเส้นใยราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.3.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 5.8 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ จากนั้นใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์กที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะลงบนขอบโคโลนีของราเอคโตไมคอร์ไรซา วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งกึ่งเหลว MMN (ภาคผนวก ก) pH 5.8 บ่มที่อุณหภูมิ เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ แยกเส้นใยราออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ล้างด้วยน้ำสะอาด นำเส้นใยราผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในอัตราส่วน รา 1 โคโลนีต่อน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมความเร็วสูง (homogenizer) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-2 นาที ขึ้นอยู่กับเส้นใยราที่นำมาทำหัวเชื้อ

3.4.6 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ผ่านการคัดเลือกในวัสดุปลูกที่ใส่โลหะหนัก

3.4.6.1 เตรียมกล้าไม้ยางนา

ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดยางนาโดยแช่ใน 70% ethanol เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นแช่ใน 30% hydrogen peroxide เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำไปเพาะในถุงเพาะชำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร โดยปลูกในดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง รดน้ำสัปดาห์ละ 2 วัน จนกล้าไม้อายุ 2 เดือน

3.4.6.2 เตรียมวัสดุปลูก

เตรียมวัสดุสำหรับปลูกกล้าไม้ยางนา โดยใช้เพอร์ไลต์ (perlite) พีทมอส (peat moss) และทราย ในอัตราส่วน 2:1:1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง

3.4.6.3 ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาและโลหะหนัก

นำกล้าไม้ยางนาที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.6.1 ที่มีความสมบูรณ์และโตสม่ำเสมอ ย้ายลงในกระถางต้นไม้พลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 นิ้ว ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้านในด้วย 70% ethanol ปลูกกล้าไม้ในวัสดุปลูกที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.6.2 โดยโลหะหนักแต่ละชนิดมี 4 ชุด การทดลอง ดังนี้

ชุด ก	กล้าไม้			
ชุด ข	กล้าไม้	+	โลหะหนัก	
ชุด ค	กล้าไม้	+	หัวเชื้อ	
ชุด ง	กล้าไม้	+	หัวเชื้อ	+ โลหะหนัก

ใส่หัวเชื้อราที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.5 ในบริเวณใกล้ ๆ รากของกล้าไม้ยางนา ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อกระถาง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อให้หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเกาะติดกับรากของกล้าไม้ยางนา จากนั้นทดสอบความทนทานต่อโลหะหนักของกล้าไม้ยางนา โดยชุด ก และ ค รดปุ๋ย (ภาคผนวก ก) ที่ไม่ใส่โลหะหนัก ส่วนชุด ข และ ง รดปุ๋ยที่ใส่โลหะหนักแต่ละชนิด ดังนี้ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ และ $CdSO_4$ ความเข้มข้น 1, 1, 1 และ 0.03 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ รดบริเวณรอบโคนกล้าไม้ ปริมาตร 200 มิลลิลิตรต่อกระถาง ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน แต่ละชุดการทดลองมีกล้าไม้ยางนา 15 ต้น วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ หรือ *Completely randomized design* (CRD) (ภาคผนวก ง)

3.4.6.4 เก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบการเจริญของกล้าไม้ยางนาในชุดการทดลองต่าง ๆ เมื่อใส่โลหะหนัก เป็นเวลา 1 เดือน ติดตามข้อมูลดังต่อไปนี้

3.4.6.4.1 ความสูงของลำต้นและเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก

3.4.6.4.2 น้ำหนักสดส่วนเหนือดิน (ลำต้นและใบ) และส่วนใต้ดิน (ราก)

3.4.6.4.3 มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน (ลำต้นและใบ) และส่วนใต้ดิน (ราก)

โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 วัน จนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งหา น้ำหนักแห้ง

3.4.6.4.4 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (percent infection) ราเอกโตไมคอร์ไรซา ที่รากของกล้าไม้ยางนา โดยตัดรากออกมาต้นละ 50 ชิ้น ความยาวประมาณชิ้นละ 1 เซนติเมตร วางบนแผ่นสไลด์ครึ่งละ 10 ชิ้น นับจำนวนรากที่มีการติดเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซา

3.4.7 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลการเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซาจากข้อ 3.4.3.2 และ 3.4.4 และข้อมูลการเจริญของกล้าไม้ยางนาจากข้อ 3.4.6.4.1 3.4.6.4.2 และ 3.4.6.4.3 มาวิเคราะห์ทางสถิติแบบ one-way ANOVA โดยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม SPSS (ภาคผนวก ง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

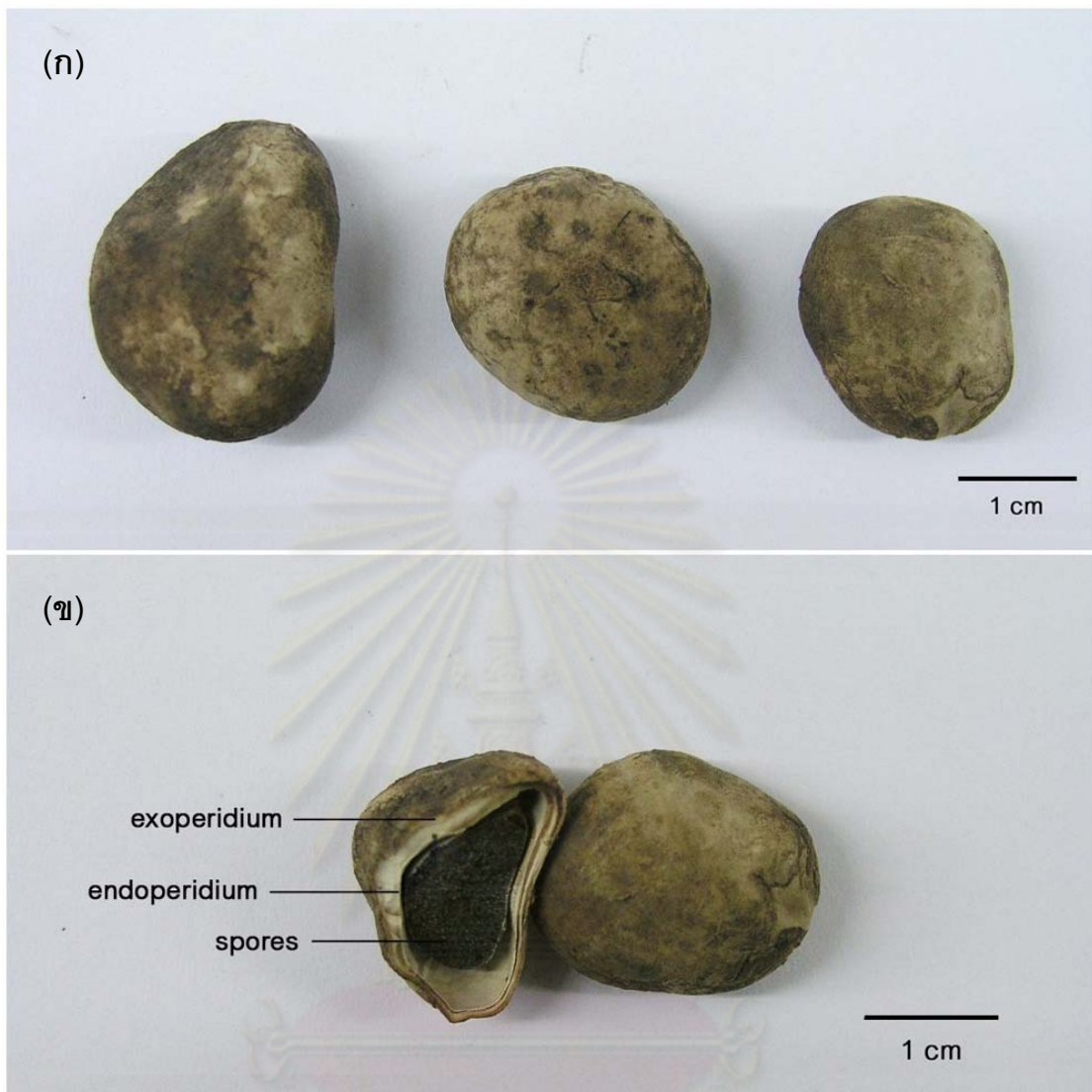
4.1 สํารวจและเก็บตัวอย่าง

สํารวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาจากแหล่งตามธรรมชาติ และสวนป่าในพื้นที่ 9 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ กาญจนบุรี ขอนแก่น ฉะเชิงเทรา ชัยภูมิ ชุมพร เชียงใหม่ ตาก นครราชสีมา และน่าน ในช่วงฤดูฝนของแต่ละปี ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม พ.ศ. 2550 ถึง 2552 และจากบริเวณเหมืองสังกะสี บริษัท ผาแดงอินดัสทรี จำกัด (มหาชน) จังหวัดตาก ช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ได้ดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาในกลุ่ม Gasteromycetes ทั้งหมด 3 สกุล คือ *Astraeus Pisolithus* และ *Scleroderma*

ดอกเห็ดสกุล *Astraeus* มีรูปร่างกลม ไม่มีก้านดอก ผิวเรียบ เมื่ออ่อนจะมีสีขาว บางสายพันธุ์แม้ว่าจะแก่แล้วก็ยังมีสีขาว บางสายพันธุ์จะเป็นสีน้ำตาลอ่อนถึงเกือบดำ ขนาดของดอกเห็ดจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดินตั้งแต่ 1-3 เซนติเมตร มีเปลือก (peridium) 2 ชั้น ชั้นนอก (exoperidium) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 2-3 ชั้น ผนังติดกัน หนาประมาณ 1-3 มิลลิเมตร เมื่อดอกเห็ดแก่จะเหนียวและแข็งขึ้น ในที่สุดจะแตกออกเป็นแฉก 4-12 แฉก ทำให้เห็นเปลือกหุ้มดอกชั้นใน (endoperidium) มีลักษณะเป็นก้อนกลม ผิวเรียบ สีน้ำตาลอ่อน หนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ตั้งอยู่กลางดอกเห็ด ภายในบรรจุสปอร์สีดำอัดแน่น (ภาพที่ 4.1)

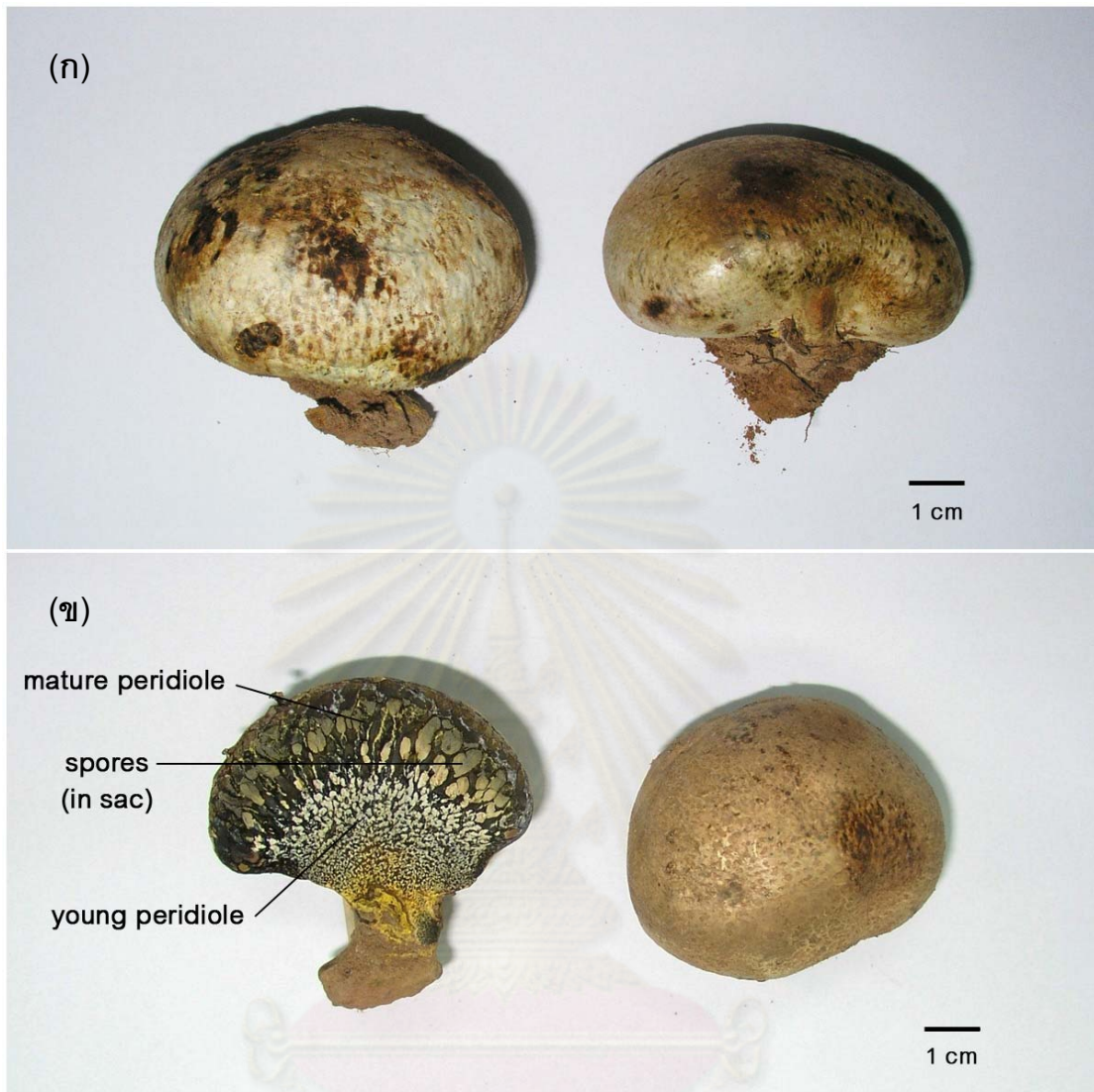
ดอกเห็ดสกุล *Pisolithus* มีรูปร่างค่อนข้างกลม หรือคล้ายลูกแพร์ (pear-shaped) หรือกระบอง (club-shaped) มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-12 เซนติเมตร สูง 5-20 เซนติเมตร ผิวด้านนอกมีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม เมื่อดูดอกเห็ดตามความยาวจะเห็นภายในแบ่งเป็น 2 ชั้น คือ ชั้น mature peridioles ประกอบด้วยถุงเล็ก (sac) เป็นจำนวนมาก ภายในบรรจุด้วยสปอร์สีเหลือง และชั้น young peridioles เป็นส่วนต้นกำเนิดการสร้างสปอร์ (ภาพที่ 4.2)

ดอกเห็ดสกุล *Scleroderma* มีลักษณะเป็นก้อนกลม สีเหลืองเข้มถึงน้ำตาลอมเหลือง เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-6 เซนติเมตร สูง 2-4 เซนติเมตร ไม่มีก้าน ผนังชั้นนอกหนาประมาณ 3 มิลลิเมตร ภายในบรรจุสปอร์ที่อัดแน่น (ภาพที่ 4.3)



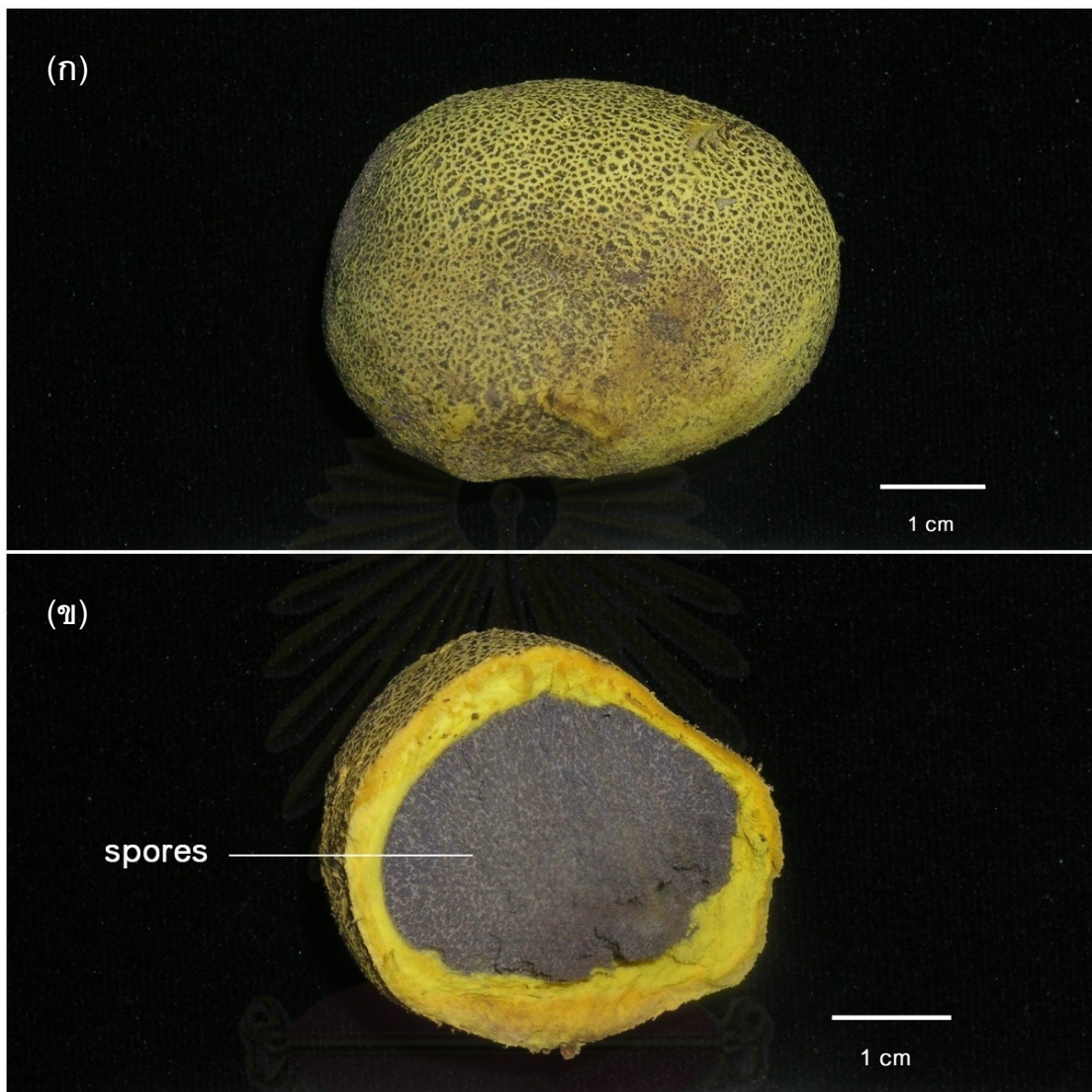
ภาพที่ 4.1 ลักษณะของดอกเห็ดสกุล *Astraeus* (ก) ภายนอก และ (ข) ภายในแสดง exoperidium, endoperidium และ spores

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.2 ลักษณะของดอกเห็ดสกุล *Pisolithus* (ก) ภายนอก และ (ข) ภายในแสดง mature peridiole, young peridiole และ spores (in sac)

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.3 ลักษณะของดอกเห็ดสกุล *Scleroderma* (ก) ภายนอก และ (ข) ภายในแสดง spores

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แยกเส้นใยจากเนื้อเยื่อดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา ได้เส้นใยบริสุทธิ์ทั้งหมด 43 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่สามารถแยกเส้นใยได้บริสุทธิ์

ไอโซเลต	ราเอคโตไมคอร์ไรซา	แหล่งที่มา	ปีที่เก็บ
Aa01	<i>Astraeus asiaticus</i>	เชียงใหม่	2550
Aa02	<i>Astraeus asiaticus</i>	เชียงใหม่	2550
Ao03	<i>Astraeus odoratus</i>	ตาก	2551
Ao04	<i>Astraeus odoratus</i>	ตาก	2551
Ao05	<i>Astraeus odoratus</i>	ตาก	2551
Ao06	<i>Astraeus odoratus</i>	ตาก	2551
Ao07	<i>Astraeus odoratus</i>	ตาก	2551
Ao08	<i>Astraeus odoratus</i>	ตาก	2551
Aa09	<i>Astraeus asiaticus</i>	ขอนแก่น	2551
Aa10	<i>Astraeus asiaticus</i>	ขอนแก่น	2551
Aa11	<i>Astraeus asiaticus</i>	ขอนแก่น	2551
Aa12	<i>Astraeus asiaticus</i>	ขอนแก่น	2551
Aa13	<i>Astraeus asiaticus</i>	ขอนแก่น	2551
Aa14	<i>Astraeus asiaticus</i>	ขอนแก่น	2551
Aa15	<i>Astraeus asiaticus</i>	ขอนแก่น	2551
Aa16	<i>Astraeus asiaticus</i>	ขอนแก่น	2551
Aa17	<i>Astraeus asiaticus</i>	ขอนแก่น	2551
Aa18	<i>Astraeus asiaticus</i>	ชัยภูมิ	2551
Aa19	<i>Astraeus asiaticus</i>	ชัยภูมิ	2551
Aa20	<i>Astraeus asiaticus</i>	ชัยภูมิ	2551
Aa21	<i>Astraeus asiaticus</i>	ชัยภูมิ	2551
Aa22	<i>Astraeus asiaticus</i>	ชัยภูมิ	2551
Ao23	<i>Astraeus odoratus</i>	น่าน	2552
Ao24	<i>Astraeus odoratus</i>	น่าน	2552
Ao25	<i>Astraeus odoratus</i>	น่าน	2552

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ไอโซเลต	ราเอกโตไมคอร์ไรซา	แหล่งที่มา	ปีที่เก็บ
Aa26	<i>Astraeus asiaticus</i>	กาญจนบุรี	2551
Aa27	<i>Astraeus asiaticus</i>	กาญจนบุรี	2551
Aa28	<i>Astraeus asiaticus</i>	กาญจนบุรี	2551
Aa29	<i>Astraeus asiaticus</i>	กาญจนบุรี	2551
Aa30	<i>Astraeus asiaticus</i>	กาญจนบุรี	2551
Aa31	<i>Astraeus asiaticus</i>	กาญจนบุรี	2551
Psp32	<i>Pisolithus</i> sp.	เชียงใหม่	2548
Pa33	<i>Pisolithus albus</i>	กาญจนบุรี	2550
Pa34	<i>Pisolithus albus</i>	ฉะเชิงเทรา	2550
Psp35	<i>Pisolithus</i> sp.	นครราชสีมา	2550
Psp36	<i>Pisolithus</i> sp.	นครราชสีมา	2550
Psp37	<i>Pisolithus</i> sp.	ชุมพร	2551
Ssp38	<i>Scleroderma</i> sp.	เชียงใหม่	2547
Ssp39	<i>Scleroderma</i> sp.	ฉะเชิงเทรา	2550
Ssp40	<i>Scleroderma</i> sp.	น่าน	2551
Ssp41	<i>Scleroderma</i> sp.	ตาก	2552
Ssp42	<i>Scleroderma</i> sp.	ตาก	2552
Ssp43	<i>Scleroderma</i> sp.	ตาก	2552

หมายเหตุ ไอโซเลตที่ 5-22 และ 26-31 ได้รับความอนุเคราะห์จาก นางสาววรณิษฐ์ กลิ่นทอง

ไอโซเลตที่ 23-25 ได้รับความอนุเคราะห์จาก นางสาวเซาวณีย์ อ้นลำพูน

ไอโซเลตที่ 32 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.สุนัดดา โยมญาติ

ไอโซเลตที่ 38 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี

4.2 คัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ทนโลหะหนัก

คัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาไอโซเลตที่สร้างเส้นใยมาก เจริญเร็ว ทนโลหะหนักแต่ละชนิดได้ดี และเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อมากที่สุด โดยเปรียบเทียบจากเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในสัปดาห์ที่ 4 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ไม่ใส่และใส่โลหะหนัก ได้แก่ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ และ $CdSO_4$ ความเข้มข้น 2, 2, 2 และ 0.06 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า

บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เจริญได้ดีที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ ไอโซเลต Ssp40 Ssp38 Ssp42⁽¹⁾ Aa22 และ Ssp41 วัดค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $ZnSO_4$ ได้ 3.45, 1.37, 4.75, 2.98 และ 3.18 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ ค.1 และตารางที่ 4.2) และคำนวณความทนทานได้ 149.28, 114.63, 97.89, 83.24 และ 82.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) ไอโซเลตที่คัดเลือกสำหรับการทดลองขั้นต่อไป คือ *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42

บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม $CuSO_4$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เจริญได้ดีที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ ไอโซเลต Psp32⁽²⁾ Ssp40 Pa33 Pa34 และ Ssp41 วัดค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $CuSO_4$ ได้ 4.43, 3.45, 3.53, 5.43 และ 3.18 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ ค.1 และตารางที่ 4.2) และคำนวณความทนทานได้ 86.84, 50.72, 46.70, 28.88 และ 21.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) ไอโซเลตที่คัดเลือกสำหรับการทดลองขั้นต่อไป คือ *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32

บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เจริญได้ดีที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ ไอโซเลต Aa10 Ssp40 Pa33⁽³⁾ Ssp38 และ Psp36 วัดค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ ได้ 2.03, 3.45, 3.53, 1.37 และ 5.92 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ ค.1 และตารางที่ 4.2) และคำนวณความทนทานได้ 135.80, 121.74, 120.75, 100.00 และ 95.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) ไอโซเลตที่คัดเลือกสำหรับการทดลองขั้นต่อไป คือ *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33

บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม CdSO_4 ความเข้มข้น 0.06 มิลลิโมลาร์ ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เจริญได้ดีที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ ไโซเลต Aa10 Aa11⁽⁴⁾ Aa15 Aa16 และ Psp36 วัดค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CdSO_4 ได้ 2.03, 4.02, 4.17, 3.05 และ 5.92 เซนติเมตรตามลำดับ (ภาพที่ ค.1 และตารางที่ 4.2) และคำนวณความหนาแน่นได้ 80.66, 47.72, 42.00, 41.53 และ 40.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) ไโซเลตที่คัดเลือกสำหรับการทดลองขั้นต่อไป คือ *Astraeus asiaticus* ไโซเลต Aa11

- (1) ราเอคโตไมคอร์ไรซาสำหรับทดสอบ ZnSO_4 คือ *Scleroderma* sp. ไโซเลต Ssp42
- (2) ราเอคโตไมคอร์ไรซาสำหรับทดสอบ CuSO_4 คือ *Pisolithus* sp. ไโซเลต Psp32
- (3) ราเอคโตไมคอร์ไรซาสำหรับทดสอบ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ คือ *Pisolithus albus* ไโซเลต Pa33
- (4) ราเอคโตไมคอร์ไรซาสำหรับทดสอบ CdSO_4 คือ *Astraeus asiaticus* ไโซเลต Aa11



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 การเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซาแต่ละไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ไม่ใส่และใส่โลหะหนัก ได้แก่ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ และ $CdSO_4$ ความเข้มข้น 2, 2, 2 และ 0.06 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร)				
	ชุดควบคุม	$ZnSO_4$ 2 mM	$CuSO_4$ 2 mM	$Pb(NO_3)_2$ 2 mM	$CdSO_4$ 0.06 mM
Aa01	5.77a	0.00d	0.02d	4.15b	1.48c
Aa02	5.20a	0.00d	0.00d	3.20b	1.35c
Ao03	4.15a	0.00d	0.00d	2.28b	0.70c
Ao04	4.55a	0.00d	0.00d	3.83b	0.98c
Ao05	4.37a	0.00d	0.00d	2.95b	1.65c
Ao06	5.25a	0.00d	0.00d	3.40b	1.53c
Ao07	5.45a	0.00d	0.00d	3.50b	0.92c
Ao08	5.78a	0.00d	0.00d	4.13b	1.18c
Aa09	3.95a	0.48d	0.00e	3.05b	1.13c
Aa10	2.03b	0.00e	0.40d	2.75a	1.63c
Aa11	4.02a	2.33c	0.00e	2.52b	1.92d
Aa12	5.37a	0.72c	0.00d	4.67b	0.92c
Aa13	5.15a	0.77c	0.00d	4.25b	0.85c
Aa14	3.60a	1.37c	0.00d	2.18b	1.40c
Aa15	4.17a	2.30b	0.00d	2.45b	1.75c
Aa16	3.05a	0.93d	0.00e	2.00b	1.27c
Aa17	3.23a	0.78d	0.00e	1.93b	1.27c
Aa18	3.92a	1.07c	0.00e	3.25b	0.65d
Aa19	3.52a	0.58c	0.00d	2.25b	0.03d
Aa20	3.53a	0.57c	0.00d	2.63b	0.13d
Aa21	4.03a	0.37c	0.00d	2.25b	0.04d
Aa22	2.98a	2.48b	0.00d	2.53b	0.82c
Ao23	5.60a	0.00d	0.00d	2.02b	1.43c
Ao24	5.95a	0.00d	0.00d	3.75b	1.60c

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร)				
	ชุดควบคุม	ZnSO ₄ 2 mM	CuSO ₄ 2 mM	Pb(NO ₃) ₂ 2 mM	CdSO ₄ 0.06 mM
Ao25	6.62a	0.00d	0.00d	4.18b	1.62c
Aa26	4.08a	1.10d	0.00e	2.77b	1.45c
Aa27	4.65a	0.28d	0.00d	3.95b	1.18c
Aa28	4.08a	0.65d	0.00e	2.15b	1.22c
Aa29	5.00a	0.90c	0.00d	3.35b	1.17c
Aa30	4.25a	1.53c	0.00d	3.18b	1.35c
Aa31	3.82a	0.58c	0.00d	2.28b	0.58c
Psp32	4.43a	2.20d	3.85b	3.38c	0.28e
Pa33	3.53b	0.00e	1.65c	4.27a	0.30d
Pa34	5.43a	0.18e	1.57c	4.47b	1.18d
Psp35	6.88a	0.00d	0.00d	5.95b	1.78c
Psp36	5.92a	0.22d	0.00d	5.65b	2.40c
Psp37	4.53a	0.02d	0.03d	3.40b	0.93c
Ssp38	1.37b	1.57a	0.00c	1.37b	0.05c
Ssp39	4.87a	3.48b	0.00e	0.97d	1.78c
Ssp40	3.45c	5.15a	1.75d	4.20b	0.14e
Ssp41	3.18a	2.62b	0.68d	2.43c	0.05e
Ssp42	4.75a	4.65b	0.45d	3.13c	0.10e
Ssp43	4.32a	3.22b	0.65d	2.55c	0.00e

* เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

** ค่าเส้นผ่านศูนย์กลาง คือ ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางที่วัดได้จริง - 0.8 (ขนาดเครื่องเจาะรูไม้คอร์ก)

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ความทนทานของราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่โลหะหนัก ได้แก่ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ และ $CdSO_4$ ความเข้มข้น 2, 2, 2 และ 0.06 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อป้อนที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ไอโซเลต	ความทนทาน (เปอร์เซ็นต์)			
	$ZnSO_4$ 2 mM	$CuSO_4$ 2 mM	$Pb(NO_3)_2$ 2 mM	$CdSO_4$ 0.06 mM
Aa01	0.00	0.29	71.97	25.72
Aa02	0.00	0.00	61.54	25.96
Ao03	0.00	0.00	54.82	16.87
Ao04	0.00	0.00	84.25	21.61
Ao05	0.00	0.00	67.56	37.79
Ao06	0.00	0.00	64.76	29.21
Ao07	0.00	0.00	64.22	16.82
Ao08	0.00	0.00	71.57	20.49
Aa09	12.24	0.00	77.22	28.69
Aa10	0.00	19.75	135.80	80.66
Aa11	58.09	0.00	62.66	47.72
Aa12	13.35	0.00	86.96	17.08
Aa13	14.89	0.00	82.52	16.50
Aa14	37.96	0.00	60.65	38.89
Aa15	55.20	0.00	58.80	42.00
Aa16	30.60	0.00	65.57	41.53
Aa17	24.23	0.00	59.79	39.18
Aa18	27.23	0.00	82.98	16.60
Aa19	16.59	0.00	63.98	0.95
Aa20	16.04	0.00	74.53	3.77
Aa21	9.09	0.00	55.79	1.03
Aa22	83.24	0.00	84.92	27.37
Ao23	0.00	0.00	36.01	25.60
Ao24	0.00	0.00	63.03	26.89

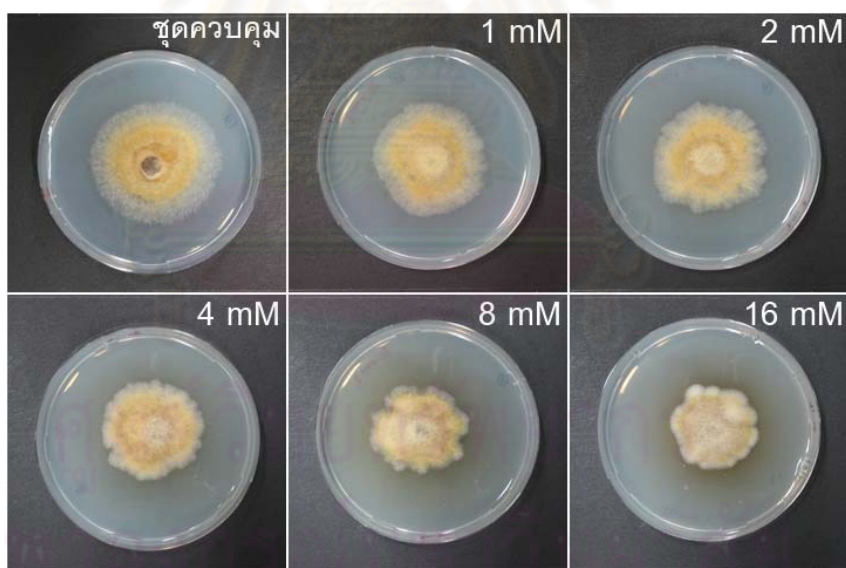
ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ไอโซเลต	ความหนาทาน (เปอร์เซ็นต์)			
	ZnSO ₄ 2 mM	CuSO ₄ 2 mM	Pb(NO ₃) ₂ 2 mM	CdSO ₄ 0.06 mM
Ao25	0.00	0.00	63.10	24.43
Aa26	26.94	0.00	67.76	35.51
Aa27	6.09	0.00	84.95	25.45
Aa28	15.95	0.00	52.76	29.86
Aa29	18.00	0.00	67.00	23.33
Aa30	36.08	0.00	74.71	31.76
Aa31	15.28	0.00	59.83	15.28
Psp32	49.62	86.84	76.32	6.39
Pa33	0.00	46.70	120.75	8.49
Pa34	3.38	28.88	82.33	21.81
Psp35	0.00	0.00	86.44	25.91
Psp36	3.66	0.00	95.49	40.56
Psp37	0.37	0.74	75.00	20.59
Ssp38	114.63	0.00	100.00	3.66
Ssp39	71.58	0.00	19.86	36.64
Ssp40	149.28	50.72	121.74	4.11
Ssp41	82.20	21.47	76.44	1.57
Ssp42	97.89	9.47	65.96	2.11
Ssp43	74.52	15.06	59.07	0.00

4.3 ทดสอบการเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซาที่ผ่านการคัดเลือก

4.3.1 ทดสอบการเจริญบนอาหารที่ใส่ $ZnSO_4$

จากข้อ 4.2 คัดเลือกราเอกโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42 เพื่อทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ไม่ใส่และใส่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ $ZnSO_4$ ทุกความเข้มข้น เส้นผ่านศูนย์กลางลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $ZnSO_4$ ส่วนน้ำหนักแห้งบนอาหารที่ใส่ $ZnSO_4$ มีเพียงความเข้มข้น 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์เท่านั้นที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าอาหารที่ใส่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลยับยั้งการเจริญด้านน้ำหนักแห้งของราไอโซเลตนี้ (ภาพที่ 4.4 และตารางที่ 4.4) ขณะที่เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกชุดการทดลองเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1-4 (ภาพที่ 4.5) สร้างกราฟหาค่า EC_{50} จากเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของเส้นใยราได้เท่ากับ >16 และ 7.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6 และ 4.7)



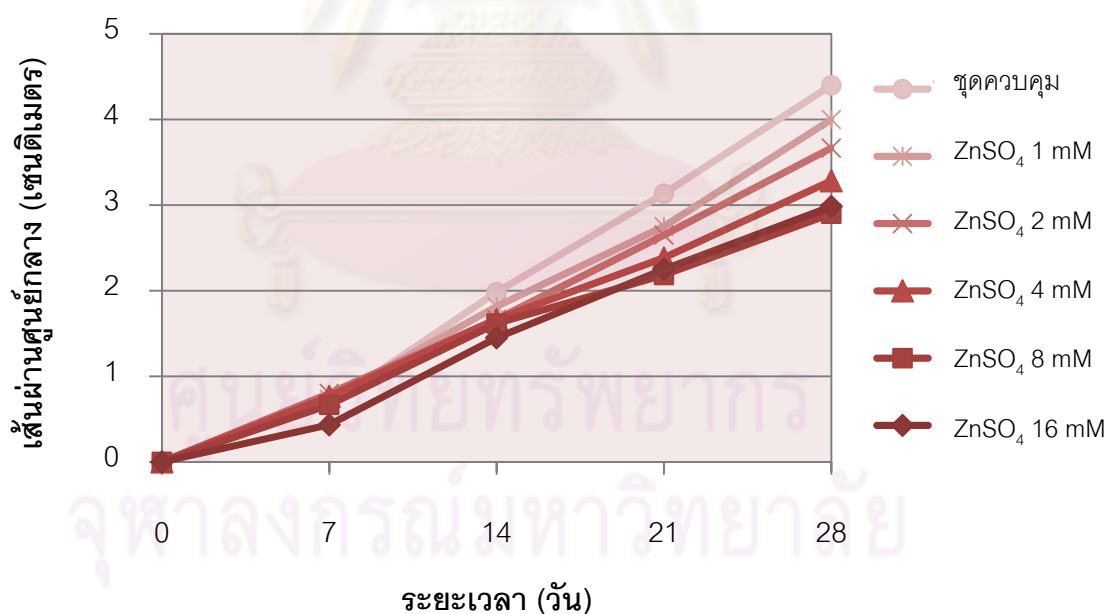
ภาพที่ 4.4 ลักษณะการเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $ZnSO_4$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4.4 เส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของราเอกโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่โลหะหนัก เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

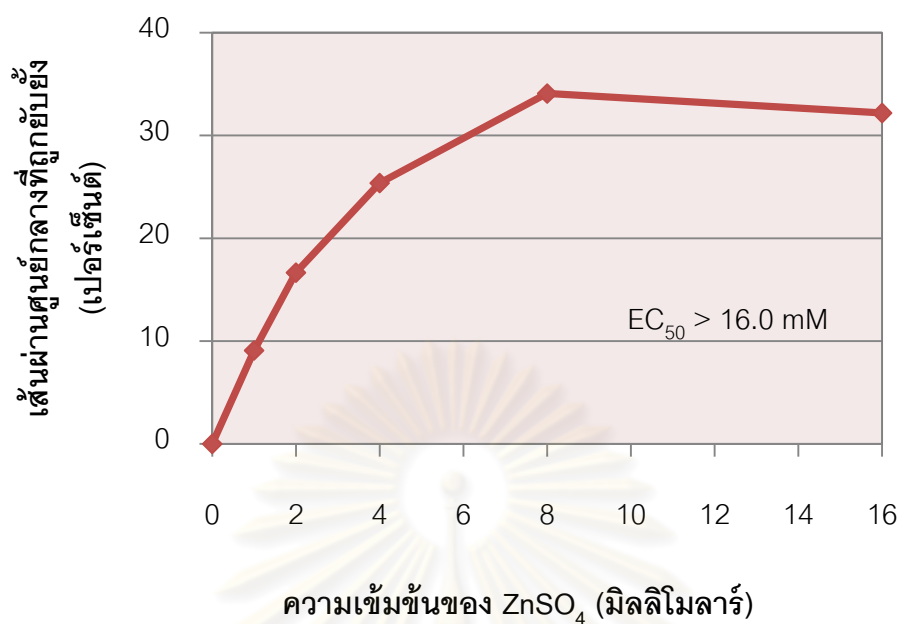
<i>Scleroderma</i> sp. ไอโซเลต Ssp42						
	$ZnSO_4$ (มิลลิโมลาร์)					
	0	1	2	4	8	16
เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	4.40a	4.00b	3.67c	3.28d	2.90e	2.98de
น้ำหนักแห้ง (มก.)	69.17a	65.63a	60.80a	45.23b	33.23c	26.43c

* เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

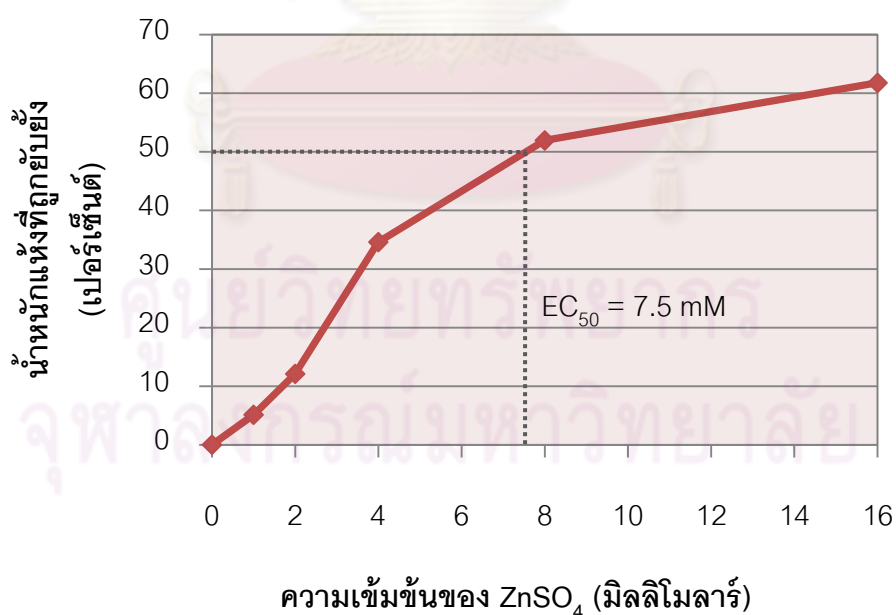
** ค่าเส้นผ่านศูนย์กลาง คือ ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางที่วัดได้จริง - 0.8 (ขนาดเครื่องเจาะรูไมคอร์ริก)



ภาพที่ 4.5 การเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $ZnSO_4$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



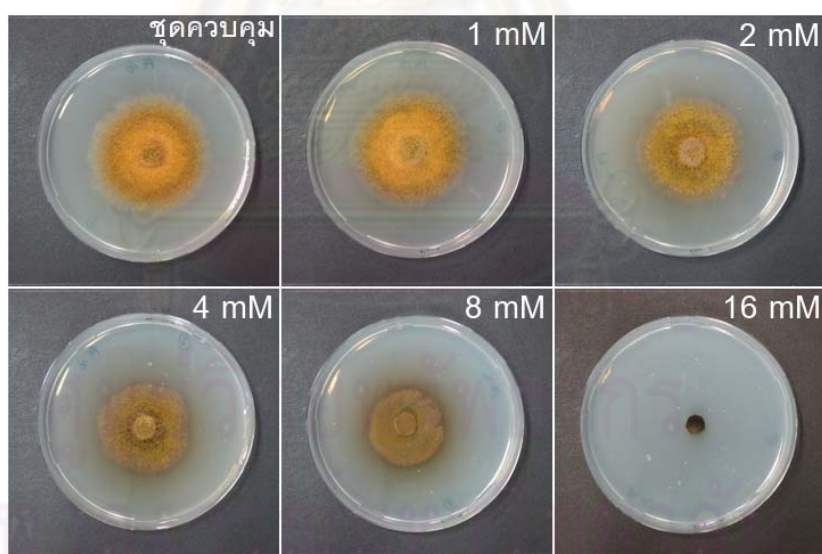
ภาพที่ 4.6 เส้นผ่านศูนย์กลางที่ถูกยับยั้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ ZnSO₄ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ ZnSO₄ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4.7 น้ำหนักแห้งที่ถูกยับยั้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ ZnSO₄ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ ZnSO₄ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.3.2 ทดสอบการเจริญบนอาหารที่ใส่ CuSO_4

จากข้อ 4.2 คัดเลือกราเอกโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32 เพื่อทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ไม่ใส่และใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ CuSO_4 ทุกความเข้มข้น เส้นผ่านศูนย์กลางลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CuSO_4 ส่วนน้ำหนักแห้งบนอาหารที่ใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์เท่ากันที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าอาหารที่ใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลยับยั้งการเจริญ ด้านน้ำหนักแห้งของราไอโซเลตนี้ (ภาพที่ 4.8 และตารางที่ 4.5) ขณะที่เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีบนอาหารที่ไม่ใส่และใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 1, 2, 4 และ 8 มิลลิโมลาร์ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1-4 ยกเว้นความเข้มข้น 16 มิลลิโมลาร์ที่ไม่มีการเจริญด้านเส้นผ่านศูนย์กลางจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 4.9) สร้างกราฟหาค่า EC_{50} จากเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของเส้นใยราได้เท่ากับ 9.0 และ 7.1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.10 และ 4.11)



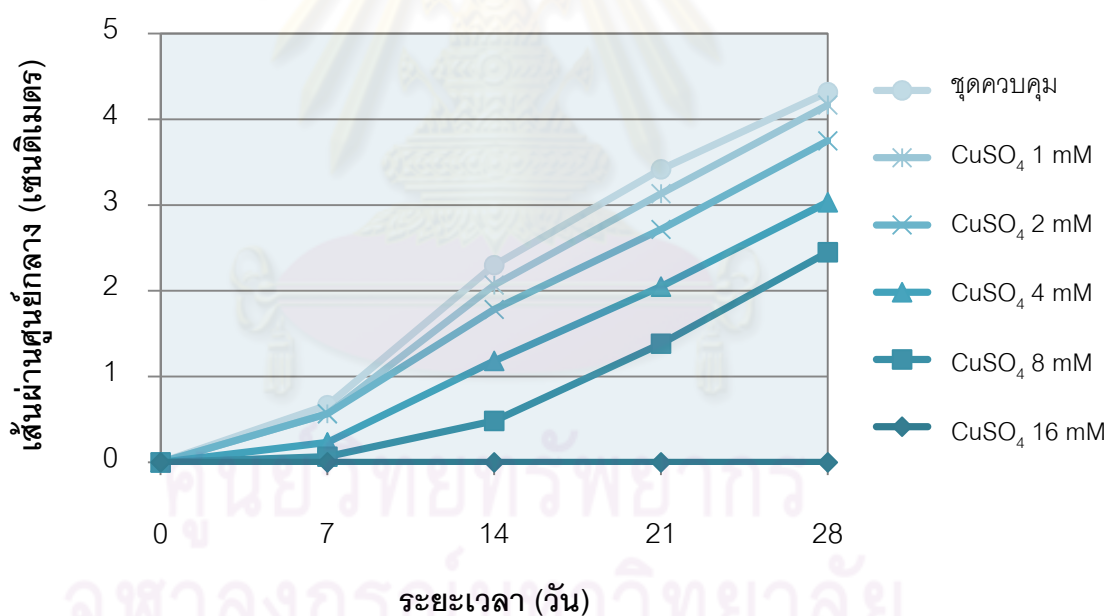
ภาพที่ 4.8 ลักษณะการเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CuSO_4 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4.5 เส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของราเอกโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่มี CuSO_4 ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CuSO_4 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

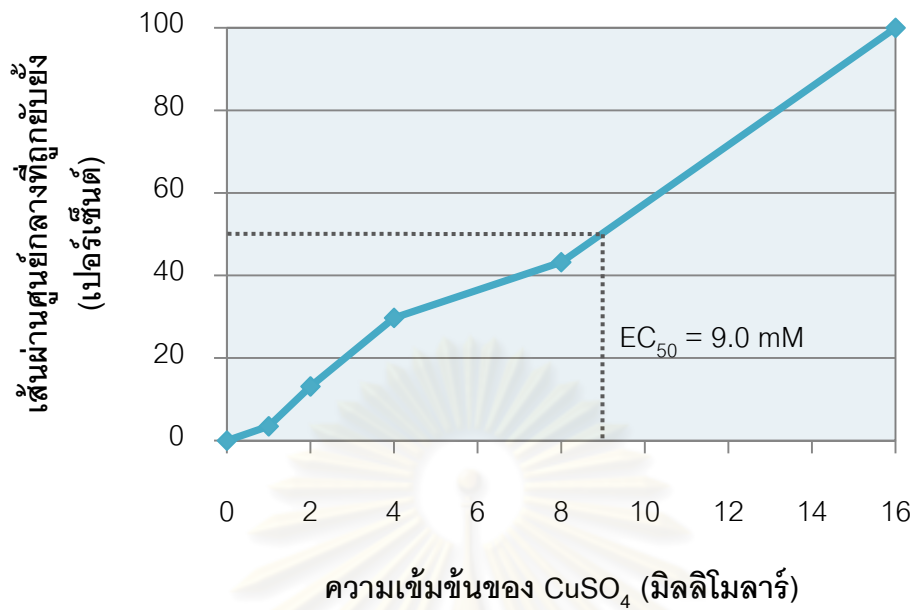
<i>Pisolithus</i> sp. ไอโซเลต Psp32						
	CuSO_4 (มิลลิโมลาร์)					
	0	1	2	4	8	16
เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	4.32a	4.17b	3.75c	3.03d	2.45e	0.00f
น้ำหนักแห้ง (มก.)	97.20a	99.57a	77.13b	67.60b	43.30c	2.87d

* เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

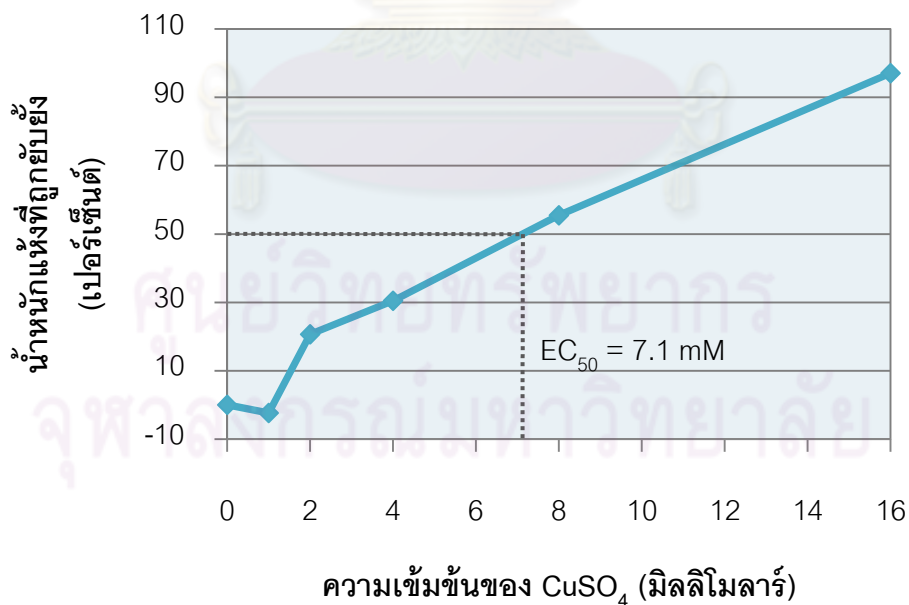
** ค่าเส้นผ่านศูนย์กลาง คือ ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางที่วัดได้จริง - 0.8 (ขนาดเครื่องเจาะรูไม้คอร์ก)



ภาพที่ 4.9 การเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CuSO_4 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



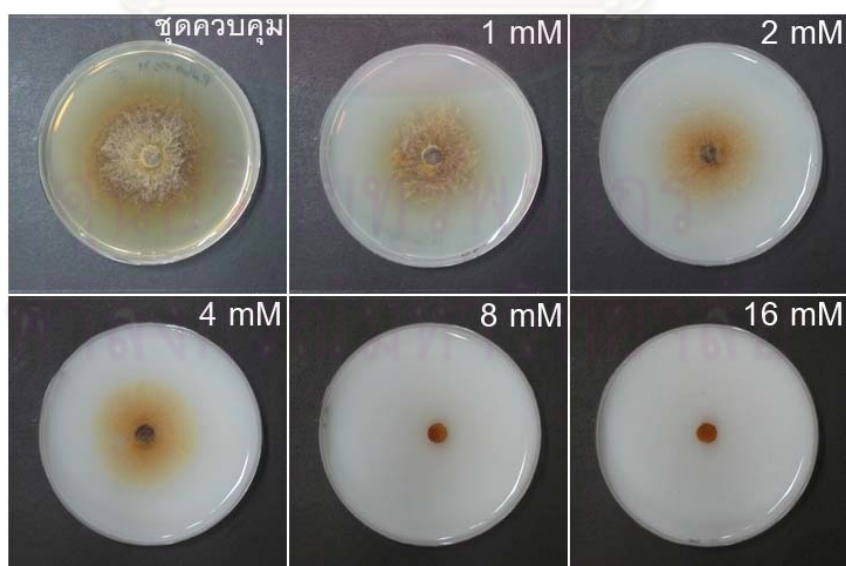
ภาพที่ 4.10 เส้นผ่านศูนย์กลางที่ถูกลบยั้งของราเอดโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CuSO_4 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4.11 น้ำหนักแห้งที่ถูกลบยั้งของราเอดโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CuSO_4 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.3.3 ทดสอบการเจริญบนอาหารที่ใส่ $Pb(NO_3)_2$

จากข้อ 4.2 คัดเลือกราเอกโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 เพื่อทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ไม่ใส่และใส่ $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิโมลาร์ ไม่มีความแตกต่าง แต่ความเข้มข้น 1, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จะเห็นว่า $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์เส้นผ่านศูนย์กลางลดลง ขณะที่ความเข้มข้นสูงขึ้น คือ 2 และ 4 มิลลิโมลาร์กลับไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ อาจเป็นเพราะว่าเส้นใยราไม่ได้เจริญออกด้านข้างแต่หนาแน่นมากขึ้นและเจริญฟูขึ้นด้านบน เห็นได้จากค่าน้ำหนักแห้งของทั้ง 3 ความเข้มข้นดังกล่าว ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนน้ำหนักแห้งบนอาหารที่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 8 และ 16 มิลลิโมลาร์เท่านั้นที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ แสดงว่าความเข้มข้น 1, 2 และ 4 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลยับยั้งการเจริญด้านน้ำหนักแห้งของราไอโซเลตนี้ (ภาพที่ 4.12 และตารางที่ 4.6) ขณะที่เส้นผ่านศูนย์กลางของอาหารที่ไม่ใส่และใส่ $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 มิลลิโมลาร์เจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1-4 มีเพียงความเข้มข้น 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ที่ไม่มีการเจริญตั้งแต่สัปดาห์แรกจนกระทั่งสัปดาห์สุดท้าย (ภาพที่ 4.13) สร้างกราฟหาค่า EC_{50} จากเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของเส้นใยราได้เท่ากับ 6.0 และ 5.8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.14 และ 4.15)



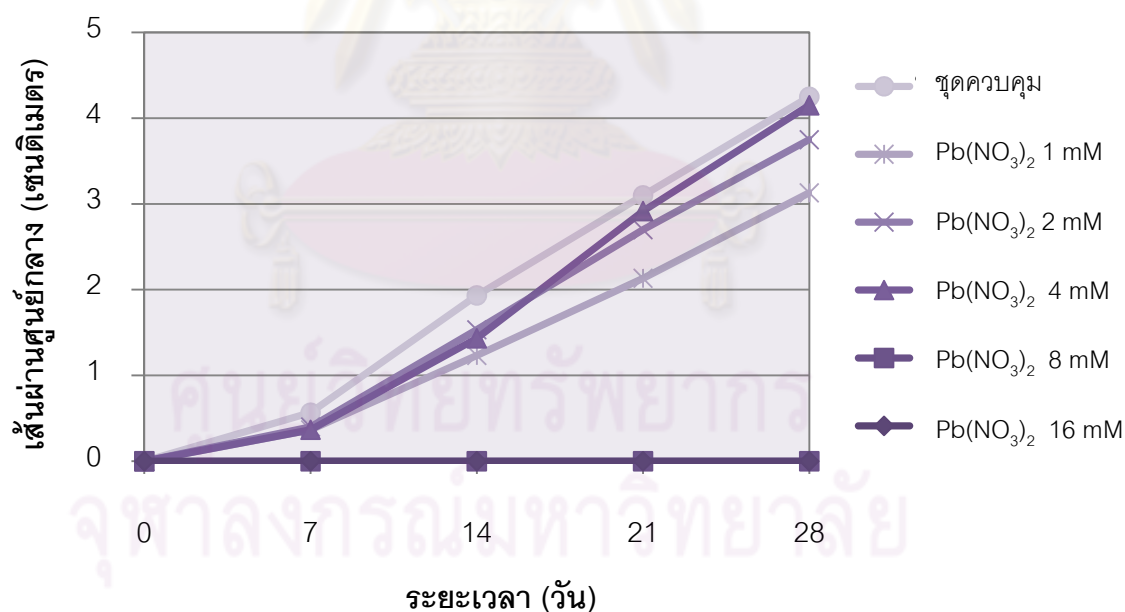
ภาพที่ 4.12 ลักษณะการเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4.6 เส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

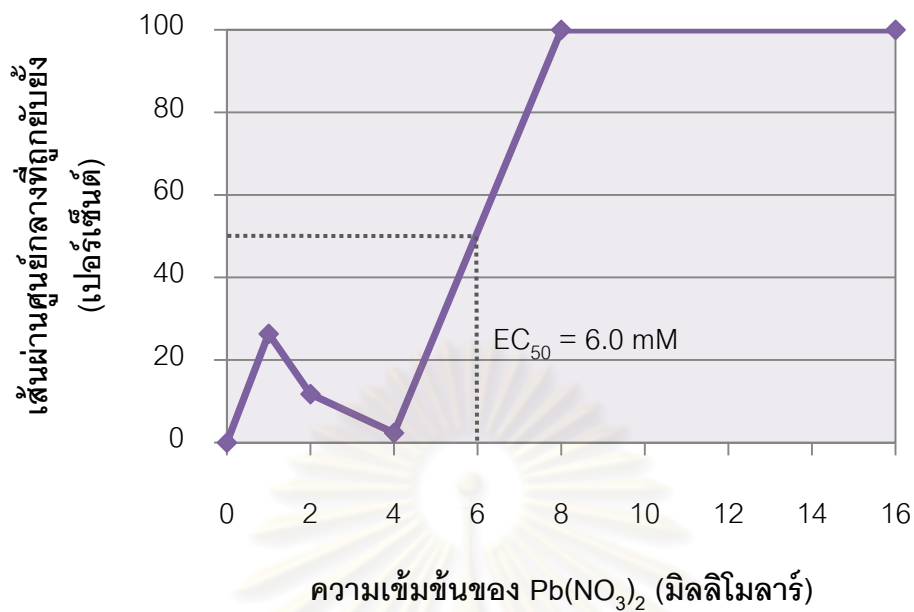
<i>Pisolithus albus</i> ไอโซเลต Pa33						
	$Pb(NO_3)_2$ (มิลลิโมลาร์)					
	0	1	2	4	8	16
เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	4.25a	3.13b	3.75a	4.15a	0.00c	0.00c
น้ำหนักแห้ง (มก.)	30.90a	26.82a	35.63a	27.70a	0.63b	1.47b

* เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

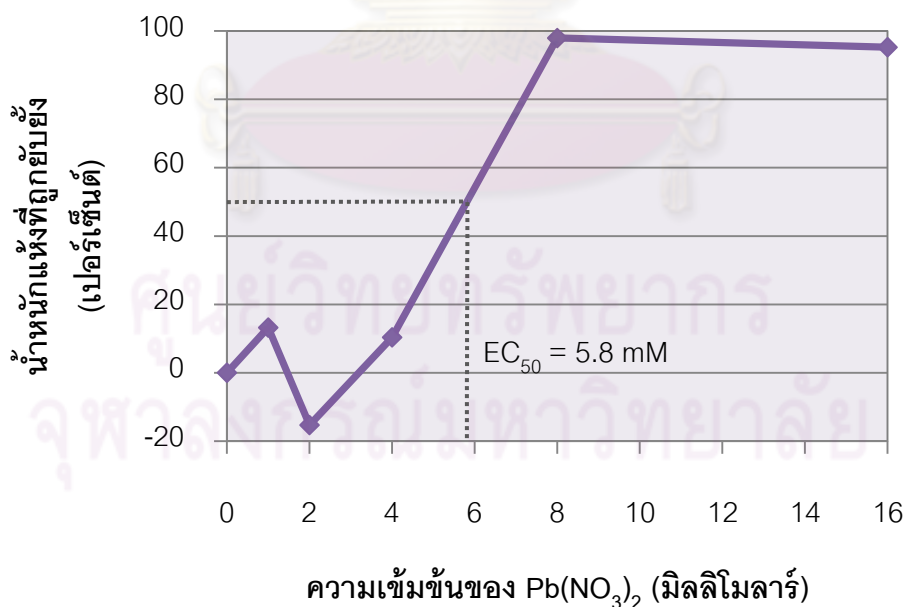
** ค่าเส้นผ่านศูนย์กลาง คือ ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางที่วัดได้จริง - 0.8 (ขนาดเครื่องเจาะรูไม้คอร์ก)



ภาพที่ 4.13 การเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์



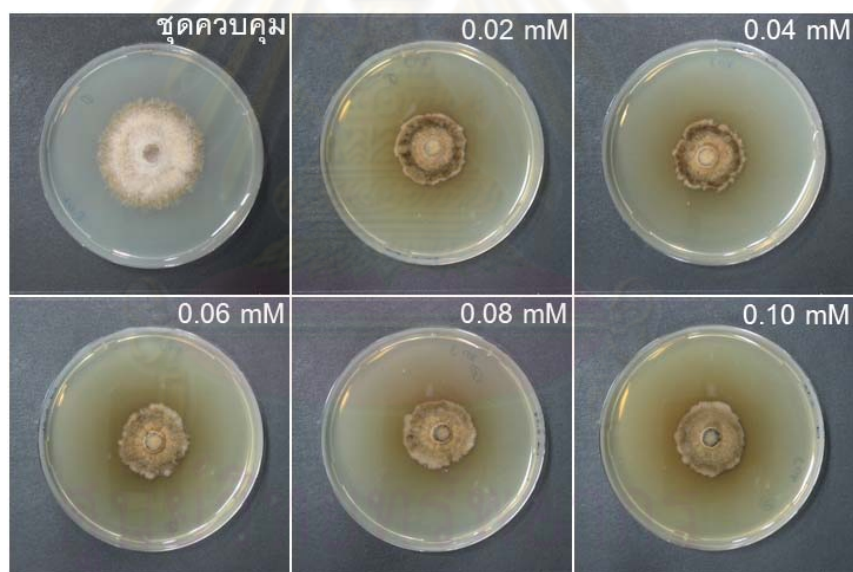
ภาพที่ 4.14 เส้นผ่านศูนย์กลางที่ถูกลบยั้งของราเอดโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4.15 น้ำหนักแห้งที่ถูกลบยั้งของราเอดโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $Pb(NO_3)_2$ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.3.4 ทดสอบการเจริญบนอาหารที่ใส่ CdSO_4

จากข้อ 4.2 คัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซา *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11 เพื่อทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ไม่ใส่และใส่ CdSO_4 ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ CdSO_4 ทุกความเข้มข้น ทั้งเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CdSO_4 (ภาพที่ 4.16 และตารางที่ 4.7) ขณะที่เส้นผ่านศูนย์กลางของชุดควบคุมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกสัปดาห์ แต่อาหารที่มีใส่ CdSO_4 ทุกความเข้มข้น มีการเจริญเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยตั้งแต่สัปดาห์ 1-4 และสัปดาห์ที่ 4 ทุกความเข้มข้นมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณครึ่งหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CdSO_4 (ภาพที่ 4.17) สร้างกราฟหาค่า EC_{50} จากเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของเส้นใยราได้เท่ากับ >0.100 และ 0.047 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.18 และ 4.19)



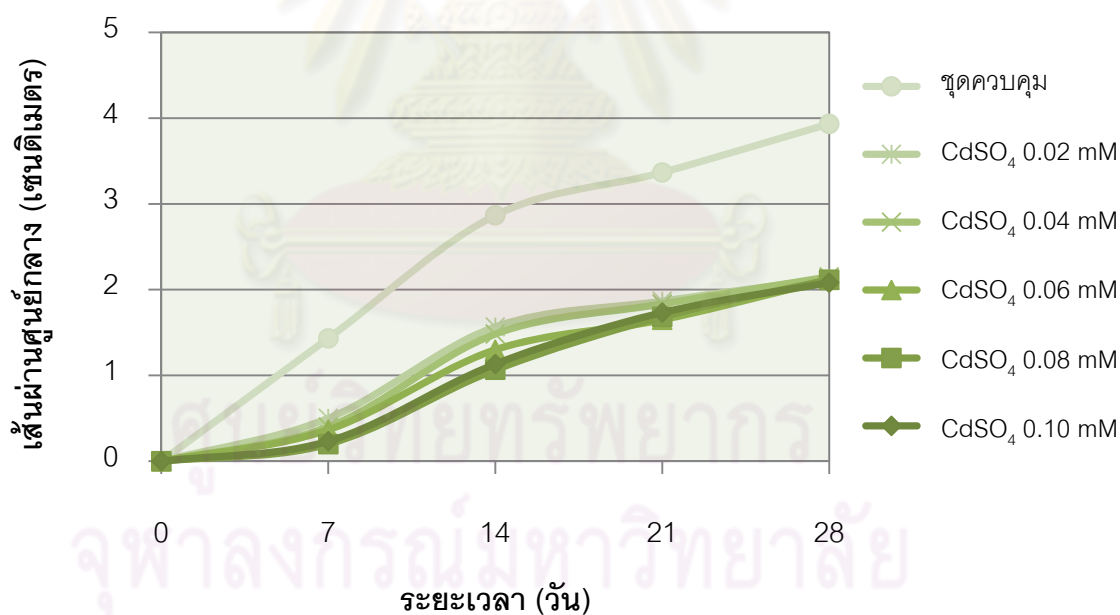
ภาพที่ 4.16 ลักษณะการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CdSO_4 ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่โลหะหนัก เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4.7 เส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CdSO_4 ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่โลหะหนัก เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

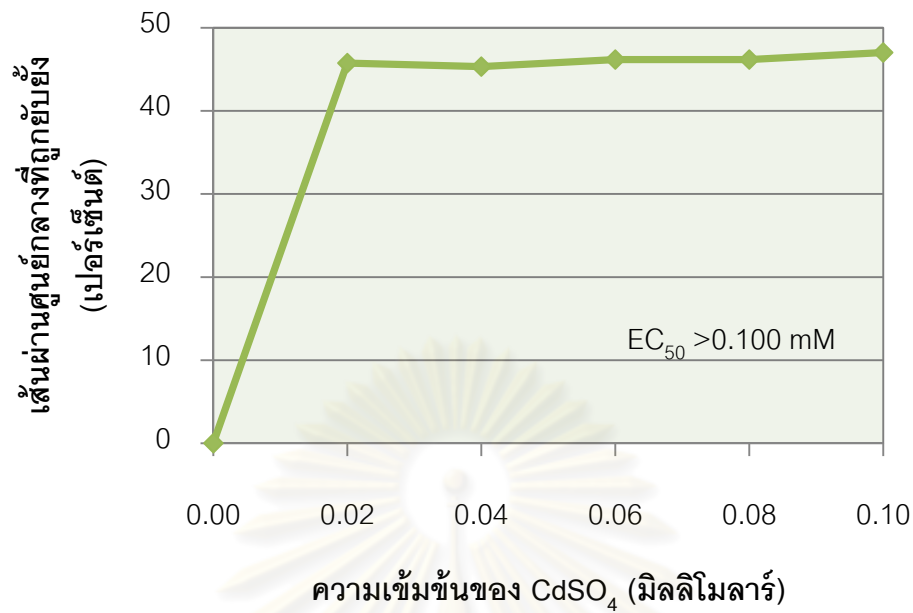
<i>Astraeus asiaticus</i> ไอโซเลต Aa11						
	CdSO_4 (มิลลิโมลาร์)					
	0.00	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	3.93a	2.13b	2.15b	2.12b	2.12b	2.08b
น้ำหนักแห้ง (มก.)	72.57a	42.40b	40.00bc	28.80d	31.37cd	27.10d

* เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

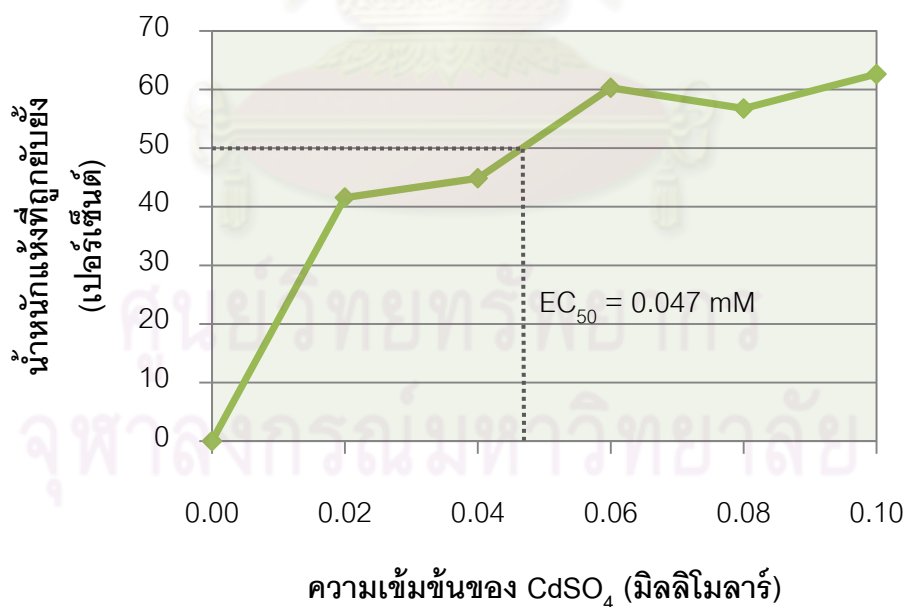
** ค่าเส้นผ่านศูนย์กลาง คือ ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางที่วัดได้จริง - 0.8 (ขนาดเครื่องเจาะรูไม้คอร์ก)



ภาพที่ 4.17 การเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CdSO_4 ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CdSO_4 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีด วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4.18 เส้นผ่านศูนย์กลางที่ตายร้อยละของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CdSO₄ ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CdSO₄ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีด เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4.19 น้ำหนักแห้งที่ตายร้อยละของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CdSO₄ ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CdSO₄ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.4 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีหัวเชื้อราเคโตไมคอร์ไรซาที่ผ่านการคัดเลือกในวัสดุปลูกที่ใส่โลหะหนัก

4.4.1 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาในวัสดุปลูกที่ใส่ $ZnSO_4$

ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb.) ที่มีและไม่มีหัวเชื้อราเคโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42 ในวัสดุปลูกที่ไม่ใส่และใส่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการเจริญทุกด้านของกล้าไม้ยางนา ทั้งความสูงของลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน (ลำต้นและใบ) และส่วนใต้ดิน (ราก) และไม่พบการติดเชื้อราเคโตไมคอร์ไรซาที่รากของกล้าไม้ยางนาทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 4.8)

4.4.2 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาในวัสดุปลูกที่ใส่ $CuSO_4$

ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีและไม่มีหัวเชื้อราเคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32 ในวัสดุปลูกที่ไม่ใส่และใส่ $CuSO_4$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการเจริญทุกด้านของกล้าไม้ยางนา ทั้งความสูงของลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน และไม่พบการติดเชื้อราเคโตไมคอร์ไรซาที่รากของกล้าไม้ยางนาทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 4.9)

4.4.3 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาในวัสดุปลูกที่ใส่ $Pb(NO_3)_2$

ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีและไม่มีหัวเชื้อราเคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 ในวัสดุปลูกที่ไม่ใส่และใส่ $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการเจริญทุกด้าน ทั้งความสูงของลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือและส่วนใต้ดิน และไม่พบการติดเชื้อราเคโตไมคอร์ไรซาที่รากของกล้าไม้ยางนาทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 4.10)

4.4.4 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาในวัสดุปลูกที่ใส่ CdSO₄

ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีและไม่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11 ในวัสดุปลูกที่ไม่ใส่และใส่ CdSO₄ ความเข้มข้น 0.03 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการเจริญทุกด้าน ทั้งความสูงของลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน และไม่พบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากของกล้าไม้ยางนาทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.8 การเจริญด้านต่าง ๆ ของกล้าไม้ยางนาที่มีและไม่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42 ในวัสดุปลูกที่ไม่ใส่และใส่ ZnSO₄ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

	<i>Scleroderma</i> sp. ไอโซเลต Ssp42			
	ชุด ก	ชุด ข	ชุด ค	ชุด ง
ความสูงของลำต้น (ซม.)	27.55a	30.26a	27.75a	28.12a
เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก (ซม.)	0.47a	0.53a	0.48a	0.49a
น้ำหนักสดส่วนเหนือดิน (กรัม)	5.74a	6.44a	4.91a	5.25a
น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน (กรัม)	2.32a	2.44a	2.27a	2.01a
น้ำหนักสดส่วนใต้ดิน (กรัม)	1.53a	1.86a	1.78a	1.23a
น้ำหนักแห้งส่วนใต้ดิน (กรัม)	1.10a	0.79a	1.07a	0.82a
เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	-	-	0	0

* เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

- หมายถึง ไม่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

ชุดการทดลอง คือ

ชุด ก	กล้าไม้
ชุด ข	กล้าไม้ + ZnSO ₄
ชุด ค	กล้าไม้ + <i>Scleroderma</i> sp. ไอโซเลต Ssp42
ชุด ง	กล้าไม้ + <i>Scleroderma</i> sp. ไอโซเลต Ssp42 + ZnSO ₄

ตารางที่ 4.9 การเจริญด้านต่าง ๆ ของกล้าไม้ยางนาที่มีและไม่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32 ในวัสดุปลูกที่ไม่ใส่และใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

	<i>Pisolithus</i> sp. ไอโซเลต Psp32			
	ชุด ก	ชุด ข	ชุด ค	ชุด ง
ความสูงของลำต้น (ซม.)	27.55a	26.80a	29.09a	29.75a
เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก (ซม.)	0.47a	0.45a	0.50a	0.52a
น้ำหนักสดส่วนเหนือดิน (กรัม)	5.74a	5.18a	5.61a	6.54a
น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน (กรัม)	2.32a	1.91a	1.81a	2.39a
น้ำหนักสดส่วนใต้ดิน (กรัม)	1.53a	1.28a	1.41a	2.16a
น้ำหนักแห้งส่วนใต้ดิน (กรัม)	1.10a	0.79a	0.92a	1.17a
เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	-	-	0	0

* เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

- หมายถึง ไม่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

ชุดการทดลอง คือ

ชุด ก กล้าไม้

ชุด ข กล้าไม้ + CuSO_4

ชุด ค กล้าไม้ + *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32

ชุด ง กล้าไม้ + *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32 + CuSO_4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.10 การเจริญด้านต่าง ๆ ของกล้าไม้ยางนาที่มีและไม่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 ในวัสดุปลูกที่ไม่ใส่และใส่ $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

	<i>Pisolithus albus</i> ไอโซเลต Pa33			
	ชุด ก	ชุด ข	ชุด ค	ชุด ง
ความสูงของลำต้น (ซม.)	27.55a	30.17a	29.48a	28.01a
เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก (ซม.)	0.47a	0.46a	0.48a	0.42a
น้ำหนักสดส่วนเหนือดิน (กรัม)	5.74a	7.01a	6.62a	5.21a
น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน (กรัม)	2.32a	2.15a	2.28a	2.07a
น้ำหนักสดส่วนใต้ดิน (กรัม)	1.53a	2.14a	1.38a	1.39a
น้ำหนักแห้งส่วนใต้ดิน (กรัม)	1.10a	1.03a	1.05a	0.74a
เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	-	-	0	0

* เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

- หมายถึง ไม่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

ชุดการทดลอง คือ

ชุด ก กล้าไม้

ชุด ข กล้าไม้ + $Pb(NO_3)_2$

ชุด ค กล้าไม้ + *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33

ชุด ง กล้าไม้ + *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 + $Pb(NO_3)_2$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.11 การเจริญด้านต่าง ๆ ของกล้าไม้ยางนาที่มีและไม่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Astraeus asiaticus* สายพันธุ์ที่ Aa11 ในวัสดุปลูกที่ไม่ใส่และใส่ CdSO₄ ความเข้มข้น 0.03 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

	<i>Astraeus asiaticus</i> สายพันธุ์ที่ Aa11			
	ชุด ก	ชุด ข	ชุด ค	ชุด ง
ความสูงของลำต้น (ซม.)	27.55a	29.31a	29.42a	32.40a
เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก (ซม.)	0.47a	0.52a	0.52a	0.48a
น้ำหนักสดส่วนเหนือดิน (กรัม)	5.74a	7.02a	6.79a	7.22a
น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน (กรัม)	2.32a	2.46a	2.52a	2.67a
น้ำหนักสดส่วนใต้ดิน (กรัม)	1.53a	1.58a	1.79a	1.96a
น้ำหนักแห้งส่วนใต้ดิน (กรัม)	1.10a	0.73a	0.89a	0.95a
เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	-	-	0	0

* เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

- หมายถึง ไม่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

ชุดการทดลอง คือ

ชุด ก กล้าไม้

ชุด ข กล้าไม้ + CdSO₄

ชุด ค กล้าไม้ + *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11

ชุด ง กล้าไม้ + *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11 + CdSO₄

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาในพื้นที่ 9 จังหวัดของประเทศไทย ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม พ.ศ. 2550 ถึง 2552 พบว่าดอกเห็ดสกุลเดียวกันจากแหล่งที่เก็บต่างกัน จะมีลักษณะรูปร่าง ขนาด และสีของดอกเห็ดแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และความอุดมสมบูรณ์ของดิน เป็นต้น เชิดชัย โพธิ์ศรี (2541) รายงานว่าดอกเห็ด *Pisolithus tinctorius* ที่พบในป่าสนจะมีสีค่อนข้างเข้มกว่าดอกเห็ด *Pisolithus tinctorius* ที่พบในสวนป่ายูคาลิปตัส เมื่อนำดอกเห็ดในกลุ่ม Gasteromycetes ที่เก็บได้มาแยกเส้นใยรา พบว่าได้เส้นใยราบริสุทธิ์ทั้งหมด 43 ไอโซเลต ประกอบด้วย 3 สกุล คือ *Astraeus* 31 ไอโซเลต *Pisolithus* 6 ไอโซเลต และ *Scleroderma* 6 ไอโซเลต นำไปคัดเลือกหาไอโซเลตที่เหมาะสมต่อการผลิตเป็นหัวเชื้อมากที่สุด โดยคัดเลือกจากไอโซเลตที่สร้างเส้นใยมาก เจริญเร็ว และทนโลหะหนักแต่ละชนิดได้ดี

Scleroderma sp. ไอโซเลต Ssp42 สามารถสร้างเส้นใยมากและทนทานต่อ $ZnSO_4$ ได้ดี และเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อสำหรับทดสอบกับ $ZnSO_4$ มากที่สุด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีบนอาหารที่ไม่ใส่และใส่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ได้เท่ากับ 4.75 และ 4.65 เซนติเมตร ตามลำดับ คำนวณความทนทานได้เท่ากับ 97.89% (ตารางที่ 4.2 และ 4.3) คำนวณค่า EC_{50} ของเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของเส้นใยราได้เท่ากับ >16.0 และ 7.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6 และ 4.7)

Pisolithus sp. ไอโซเลต Psp32 สามารถสร้างเส้นใยมากและทนทานต่อ $CuSO_4$ ได้ดี และเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อสำหรับทดสอบกับ $CuSO_4$ มากที่สุด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีบนอาหารที่ไม่ใส่และใส่ $CuSO_4$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ได้เท่ากับ 4.43 และ 3.85 เซนติเมตร ตามลำดับ คำนวณความทนทานได้เท่ากับ 86.84% (ตารางที่ 4.2 และ 4.3) คำนวณค่า EC_{50} ของเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของเส้นใยราได้เท่ากับ 9.0 และ 7.1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.10 และ 4.11)

Pisolithus albus ไอโซเลต Pa33 สามารถสร้างเส้นใยมากและทนทานต่อ $Pb(NO_3)_2$ ได้ดี และเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อสำหรับทดสอบกับ $Pb(NO_3)_2$ มากที่สุด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบนของโคโลนีอาหารที่ไม่ใส่และใส่ $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ได้เท่ากับ 3.53

และ 4.27 เซนติเมตร ตามลำดับ คำนวณความทนทานได้เท่ากับ 120.75% (ตารางที่ 4.2 และ 4.3) คำนวณค่า EC_{50} ของเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของเส้นใยราได้เท่ากับ 6.0 และ 5.8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.14 และ 4.15)

Astraeus asiaticus ไอโซเลต Aa11 สามารถสร้างเส้นใยมากและทนทานต่อ $CdSO_4$ ได้ดี และเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อสำหรับทดสอบกับ $CdSO_4$ มากที่สุด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีบนอาหารที่ไม่ใส่และใส่ $CdSO_4$ ความเข้มข้น 0.06 มิลลิโมลาร์ได้เท่ากับ 4.02 และ 2.52 เซนติเมตร ตามลำดับ คำนวณความทนทานได้เท่ากับ 47.72% (ตารางที่ 4.2 และ 4.3) คำนวณค่า EC_{50} ของเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของเส้นใยราได้เท่ากับ >0.100 และ 0.047 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.18 และ 4.19)

การทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่ไม่มีและมีราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละไอโซเลตที่ผ่านการคัดเลือก ได้แก่ *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42, *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32, *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 และ *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11 ในวัสดุปลูกที่ไม่ใส่และใส่ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ $CdSO_4$ ความเข้มข้น 0.03 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการเจริญทุกด้าน ทั้งความสูงของลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน (ลำต้นและใบ) และส่วนใต้ดิน (ราก) และไม่พบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากของกล้าไม้ยางนาทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 4.8, 4.9, 4.10 และ 4.11)

การทดสอบความทนทานของราเอคโตไมคอร์ไรซาต่อโลหะหนักชนิดต่าง ๆ ได้แก่ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ และ $CdSO_4$ พบว่าไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาไอโซเลตใดที่สามารถทนต่อความเป็นพิษของโลหะหนักทั้ง 4 ชนิดได้ดีพร้อมกัน (ตารางที่ 4.2 และ 4.3) ทั้งนี้เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยกลไกทั้งภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ในการทนทานต่อโลหะหนัก (Jentschke และ Godbold, 2000; Bellion และคณะ, 2006) โดยแต่ละกลไกนั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดและความเข้มข้นของโลหะหนัก รวมทั้งสายพันธุ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ใช้ทดสอบ (Hartley และคณะ, 1997; Hüttermann และคณะ, 1999) Colpaert และ van Assche (1992) รายงานว่าราเอคโตไมคอร์ไรซา *Paxillus involutus* สามารถทนต่อสังกะสีได้ดี และช่วยลดปริมาณการนำเข้าสังกะสีใน *Pinus sylvestris* ได้ ซึ่งตรงกันข้ามกับราเอคโตไมคอร์ไรซา *Thelephora terrestris* ที่สามารถทนต่อสังกะสีได้น้อย และเพิ่มการนำเข้าสังกะสีปริมาณมากสู่พืชอาศัย Van Tichelen และคณะ (2001) รายงานว่าราเอคโตไมคอร์ไรซา *Suillus bovinus*

และ *Thelephora terrestris* สามารถป้องกัน *Pinus sylvestris* ต่อความเป็นพิษของทองแดงได้ แต่ *Thelephora terrestris* สามารถทนทานต่อทองแดงในความเข้มข้นที่มากกว่าได้ หรือ รายงานวิจัยของ Tam (1995) พบว่า *Pisolithus tinctorius* สามารถทนทานต่อทองแดงและสังกะสี โดยใช้กลไกในการจับโลหะหนักไว้ที่สารเมือกที่ราเอคโตไมคอร์ไรซาหลังออกมาออกมา นอกเซลล์ ในขณะที่รายงานวิจัยของ Blaudes และคณะ (2000a) พบว่า *Paxillus involutus* สามารถทนทานต่อแคดเมียมโดยอาศัยกลไกในการจับแคดเมียมไว้ที่ผนังเซลล์และการสะสมแคดเมียมไว้ภายในแควิวโอล

เมื่อพิจารณาผลการคัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 4 ไโซเลตที่ทนทานต่อโลหะหนักแต่ละชนิดเพื่อนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ยางนา จะเห็นว่ามีราเอคโตไมคอร์ไรซาเพียงไโซเลตเดียว คือ *Pisolithus* sp. Psp32 ที่ทนต่อ CuSO_4 ได้ดีที่สุด อีกทั้งยังสามารถสร้างเส้นใยได้มาก ในขณะที่ราเอคโตไมคอร์ไรซา 3 ไโซเลต คือ *Scleroderma* sp. Ssp42, *Pisolithus albus* Pa33 และ *Astraeus asiaticus* Aa11 ไม่ได้เป็นไโซเลตที่ทนต่อ ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ และ CdSO_4 ตามลำดับได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.3) แต่เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา จะพบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ไโซเลตนี้มีการเจริญที่รวดเร็วและสร้างเส้นใยได้มากกว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาไโซเลตที่ทนต่อโลหะหนักชนิดดังกล่าวได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.2) Marx และคณะ (1992) ได้กล่าวถึงหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อ ว่าควรเป็นสายพันธุ์ที่สามารถเกิดราเอคโตไมคอร์ไรซาจำนวนมากกับพืชที่ต้องการหรือกับพืชหลายชนิด สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ สามารถมีชีวิตรอดอยู่รอดได้นานในสภาพหัวเชื้อ และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ได้ ดังนั้นราเอคโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma* sp. ไโซเลต Ssp42, *Pisolithus* sp. ไโซเลต Psp32, *Pisolithus albus* ไโซเลต Pa33 และ *Astraeus asiaticus* ไโซเลต Aa11 จึงเหมาะต่อการนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อเพื่อทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาในภาวะที่ปนเปื้อน ZnSO_4 , CuSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ และ CdSO_4 ตามลำดับ

การสร้างกราฟการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 4 ไโซเลตที่ผ่านการคัดเลือกเพื่อหาค่า EC_{50} จากเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของเส้นใยรายน่าจะได้ค่าความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกัน แต่จากผลการทดลองพบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาบางไโซเลตมีค่า EC_{50} จากเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งแตกต่างกันมาก กล่าวคือ *Scleroderma* sp. ไโซเลต Ssp42 มีค่า EC_{50} จากเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งเท่ากับ >16.0 และ 7.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ

ที่ 4.6 และ 4.7) และ *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11 มีค่า EC_{50} จากเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งเท่ากับ >0.100 และ 0.047 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.18 และ 4.19) ค่า EC_{50} ที่แตกต่างกันนี้ น่าจะมีสาเหตุมาจากลักษณะการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่โลหะหนัก โดยความเป็นพิษของโลหะหนักจะมีผลต่อการเจริญของราในช่วงของการเจริญระยะ lag phase ที่อาจจะนานขึ้นเพื่อให้รามีการปรับตัวกับสภาพแวดล้อม อีกทั้งยังมีผลต่อความหนาแน่นและการผลิตชีวมวลของเส้นใยรา (Jones และ Hutchinson, 1988) ถึงแม้ว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเอคโตไมคอร์ไรซา 2 ไอโซเลตนี้เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ $ZnSO_4$ และ $CdSO_4$ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จะถูกยับยั้งไม่ถึงร้อยละ 50 แต่จะเห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ความหนาแน่นของเส้นใยราจะลดลงอย่างมาก จนกระทั่งน้ำหนักแห้งถูกยับยั้งเกินร้อยละ 50 (ตารางที่ 4.4 และ 4.7) ทำให้ค่า EC_{50} อยู่ในระดับความเข้มข้นที่ทำการทดลอง ดังนั้นการหาค่า EC_{50} จึงควรพิจารณาจากทั้งเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา แต่ค่า EC_{50} จากน้ำหนักแห้งน่าจะให้ผลการทดลองที่แม่นยำมากกว่า เนื่องจากการวัดการเจริญทั้งหมดของเส้นใยรา

การทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนา พบว่าทุกการทดลองของทุกโลหะหนักไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และไม่พบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ราก ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจาก

(1) ระยะเวลาที่ให้รากเกาะติดกับรากเพียง 1 เดือนก่อนการทดสอบโลหะหนักอาจน้อยเกินไป จึงทำให้ไม่พบการเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซา Reddy และ Natarajan (1996) ได้ศึกษาการเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาในพืชจำพวกสน 4 ชนิด เมื่อใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ *Amanita muscaria*, *Laccaria fraterna*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon luteolus*, *Scleroderma citrinum* และ *Thelephora terrestris* เป็นเวลา 2-12 สัปดาห์ พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาที่นำมาทดสอบส่วนใหญ่ จะเริ่มเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซากับกล้าสนภายใน 2 สัปดาห์หลังการใส่รา ส่วน *Laccaria fraterna* และ *Scleroderma citrinum* จะเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซากับกล้าสนหลังใส่รา 6 สัปดาห์ ในขณะที่ *Amanita muscaria* ไม่ปรากฏลักษณะของรากเอคโตไมคอร์ไรซาเลย โดยปริมาณของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เจริญเพิ่มขึ้นจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของกล้าสนที่นำมาทดสอบ

(2) ปริมาณหัวเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซา อัตราส่วนของปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ต่อวัสดุปลูกอาจจะน้อยเกินไป ซึ่งไม่พอเหมาะที่จะทำให้เกิดการติดเชื้อและส่งเสริมการเจริญของกล้าไม้

ยางนา Khemnark (1982) พบว่า ถ้าปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ต่ำเกินไป จะทำให้การติดเชื้อหรือการพัฒนามของรากเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นไปอย่างช้า ๆ

(3) ความเข้มข้น ปริมาตร หรือระยะเวลาที่ใช้ทดสอบของโลหะหนัก ถึงแม้ว่าในงานวิจัยนี้จะไม่พบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากของกล้าไม้ยางนา โลหะหนักที่ใส่ลงในวัสดุปลูกนั้นจึงน่าจะก่อให้เกิดความเป็นพิษและมีผลต่อการเจริญต่อพืชอาศัยโดยตรง อย่างไรก็ตามพืชอาศัยเองก็มีกลไกในการทนทานต่อความเป็นพิษของโลหะหนักเช่นเดียวกัน (Hall, 2002) ดังนั้นความเข้มข้นและปริมาตรของโลหะหนักที่ใช้ทดสอบอาจน้อยเกินไป รวมทั้งช่วงระยะเวลาที่ใช้ทดสอบโลหะหนักในงานวิจัยนี้เพียง 1 เดือน จึงทำให้ไม่พบความแตกต่างในด้านการเจริญของกล้าไม้ยางนาระหว่างชุดการทดลองแต่ละชุด

(4) อายุของกล้าไม้ที่นำมาทดสอบมากเกินไป กล้าไม้อายุน้อย ๆ จะมีการเจริญและการเปลี่ยนแปลงรวดเร็วกว่า ซึ่งอาจทำให้สังเกตเห็นความแตกต่างของการเจริญระหว่างชุดทดลองได้

(5) ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมในการทดลอง เช่น อุณหภูมิ หรือความชื้นภายในเรือนเพาะชำที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของรากเอคโตไมคอร์ไรซา อาจมีผลต่อการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ราก Bougher และ Malajczuk (1990) พบว่าปริมาณความชื้นในดินที่เพิ่มขึ้น จะทำให้เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus tinctorius* ในกล้าไม้ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) ลดลง ทำให้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการเจริญทางความสูง และมวลชีวภาพของกล้าไม้ยูคาลิปตัสในชุดทดลองที่มีรากเอคโตไมคอร์ไรซากับชุดควบคุมที่ไม่มีรากเอคโตไมคอร์ไรซา

(6) กล้าไม้ยางนาอาจไม่ใช่พืชอาศัยที่เหมาะสมของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่ผ่านการคัดเลือก Denny และ Wilkins (1987) รายงานว่าความเข้ากันได้ (compatible) ของรากและพืชอาศัย เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้การเจริญร่วมกันในบริเวณที่ปนเปื้อนโลหะหนักประสบความสำเร็จมากกว่าการปรับตัวของราให้ทนทานต่อโลหะหนัก

ข้อเสนอแนะในการวิจัย

1. ควรสำรวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ดเหอคโตไมคอร์ไรซา ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักที่ระดับความเข้มข้นสูง เช่น เหมืองแร่ชนิดต่าง ๆ เพื่อเปรียบเทียบการเจริญ และความทนทานต่อโลหะหนักกับราเหอคโตไมคอร์ไรซาในงานวิจัยนี้ที่แยกได้จากแหล่งตามธรรมชาติ และสวนป่า ซึ่งไม่มีการปนเปื้อนหรืออาจจะมีการปนเปื้อนโลหะหนักในระดับต่ำ เพื่อนำมาคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่ทนทานต่อโลหะหนักได้ดีมากยิ่งขึ้น
2. การทดสอบการเจริญของราเหอคโตไมคอร์ไรซาในงานวิจัยนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียว คืออาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN ควรเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น หรือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญของราเหอคโตไมคอร์ไรซา และจะเห็นว่าค่า EC_{50} ของราเหอคโตไมคอร์ไรซาบางไอโซเลตไม่อยู่ในช่วงที่ทำการทดลอง ดังนั้นควรเพิ่มความเข้มข้นของโลหะหนักจนกระทั่งอยู่ในช่วงที่สามารถคำนวณค่า EC_{50} ได้ถูกต้อง นอกจากนี้ยังพบว่าผลการเจริญของราไอโซเลตเดียวกัน ถึงแม้จะเป็นการเจริญบนอาหารชนิดเดียวกัน แต่ให้ค่าการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมาก ดังนั้นควรเพิ่มจำนวนซ้ำของการทดลองจาก 3 เป็น 5 ซ้ำ เพื่อความแม่นยำที่มากขึ้น
3. จากงานวิจัยนี้จะเห็นว่า ผลการเจริญทุกด้านของกล้าไม้ยางนาในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่พบการติดเชื้อราเหอคโตไมคอร์ไรซาที่รากเลย ดังนั้นควรมีการวิจัยเพิ่มเติม ดังนี้
 - (1) เพิ่มระยะเวลาที่ให้รากเกาะติดกับรากก่อนทดสอบโลหะหนัก
 - (2) ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของปริมาณหัวเชื้อต่อวัสดุปลูกสำหรับทดสอบกล้าไม้
 - (3) เพิ่มความเข้มข้น ปริมาตร และระยะเวลาในการทดสอบโลหะหนัก
 - (4) ทดสอบกับกล้าไม้ยางนาจากหลาย ๆ แหล่ง หรือใช้กล้าไม้ยางนาที่อายุน้อยกว่านี้
 - (5) ศึกษาความเข้ากันได้ (compatible) และความเข้ากันไม่ได้ (incompatible) ของราเหอคโตไมคอร์ไรซากับกล้าไม้ชนิดต่าง ๆ เพื่อหาชนิดของพืชอาศัยที่เหมาะสมของราเหอคโตไมคอร์ไรซาที่นำมาทดสอบ
4. ศึกษาการนำราเหอคโตไมคอร์ไรซาไปใช้ในพื้นที่จริงที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการอาจแสดงผลที่แตกต่างกับพื้นที่จริง เนื่องจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ทั้งความชื้น อุณหภูมิ ความอุดมสมบูรณ์ของดิน รวมถึงปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ท้องถิ่น ดังนั้นการทดลองในพื้นที่จริงจึงมีความสำคัญ เพื่อแสดงให้เห็นว่ากล้าไม้ที่ติดเชื้อมีการเจริญและมีอัตราการอยู่รอดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกล้าไม้ที่ไม่ติดเชื้อราเหอคโตไมคอร์ไรซา

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- พัฒนาที่ดิน, กรม. 2553. การจัดการดินเหมืองแร่ร้าง[online]. แหล่งที่มา: http://www.sisaket.go.th/WEB_Idd/Soil/Page06.htm[15 มกราคม 2553]
- กิตติมา ดั่งแคว. 2552. เห็ดกินได้และเห็ดสมุนไพร[online]. แหล่งที่มา: http://www.thaiagro.com/index_library_detail.php?show=744[24 มีนาคม 2552]
- เชิดชัย โพธิ์ศรี. 2541. การคัดเลือก *Pisolithus tinctorius* ราเอคโตไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในโครงการปลูกป่าในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธัญญาภรณ์ สุรภักดี. 2553. ผลกระทบกรณีเหมืองแร่กับมาตรา 67: โอกาสทองของการเรียนรู้ [online]. แหล่งที่มา: <http://www.publicconsultation.opm.go.th/rubfung67/doc37.pdf>[11 เมษายน 2553]
- ประกิตติ์สิน สีหนนทร์. 2523. ความสำคัญของเชื้อราไมคอร์ไรซาในการช่วยการเจริญเติบโตของต้นไม้ที่ใช้ในโครงการป่า. วารสารวิทยาศาสตร์ฉบับพิเศษชีววิทยา 34(3): 245-251.
- วิโรจน์ อิงคากุล. 2552. การปนเปื้อนของธาตุโลหะหนักในดินของอำเภอทับคล้อ จังหวัดพิจิตร [online]. แหล่งที่มา: <http://soil1.wordpress.com/author/soil1/>[26 กุมภาพันธ์ 2553]
- อนิวรรณ เฉลิมพงษ์. 2539. เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่ช่วยในการปลูกป่าภาคอีสาน. กรุงเทพมหานคร: สำนักวิชาการกรมป่าไม้.
- ออมทรัพย์ นพอมรบดี. 2523. การเพาะผลผลิตและการเจริญเติบโตของพืชโดยใช้ไมคอร์ไรซา. วารสารกสิกรรม 53(5): 345-353.

ภาษาอังกฤษ

- Adriaensen, K. 2005. Adaptive heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal fungi *Suillus bovinus* and *Suillus luteus*. Ph.D. thesis. Limburgs Universitair Centrum.
- Adriaensen, K. and Vangronsveld, J. 2006. Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedling. Mycorrhiza 16: 553-558.
- Adriaensen, K., Van der Lelie, D., Van Laere, A., Vangronsveld, J. and Colpaert, J. V. 2003. A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. New Phytol. 161: 549-555.

- Aggangan, N. S., Dell, B., Malajczuk, N. and dela Cruz, R. E. 1996. Soil fumigation and phosphorus supply affect the formation of *Pisolithus – Eucalyptus urophylla* ectomycorrhizas in two acid Philippine soils. Plant Soil 180(2): 259-266.
- Agrios, G. N. 1988. Plant pathology. San Diego, CA: Academic Press, Inc.
- Ahonen-Jonnarth, U., van Hees, P. A. W., Lundström, U. S. and Finlay, R. D. 2000. Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. New Phytol. 146: 557-567.
- Alexander, I. J. 1989. Systematics and ecology of ectomycorrhizal legumes. In Stirton, C.H. and Zanuchi, J. L. (eds.), Advances in legume biology. Monographs in Systematic Botany, Vol 29, pp. 617-624. St. Louis: Missouri Botanical Garden.
- Alloway, B. J. and Ayres, D. C. 1997. Inorganic pollutions. In Chemical principles of environmental pollution, pp. 157-246. London: Blackie Academic and Professional.
- Arnolds, E. 1991. Decline of ecto-mycorrhizal fungi in Europe. Agric. Ecosyst. Environ. 35: 209-244.
- Ashford, A. E., Ryde, S. and Barrow, K. D. 1994. Demonstration of a short-chain polyphosphate in *Pisolithus tinctorius* and the implications for phosphorus transport. New Phytol. 126(2): 239-247.
- Ashford, A. E., Vesk, P. A., Orlovich, D. A., Markovina, A. L. and Allaway, W. G. 1999. Dispersed polyphosphate in fungal vacuoles in *Eucalyptus pilularis/Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizas. Fungal Genet. Biol. 28(1): 21-33.
- Atkinson, M. A. 1975. The fine structure of mycorrhizas. Ph.D. dissertation. Oxford.
- Bellion, Marc., Courbot, M., Jacob, C., Blaudez, D. and Chalot, M. 2006. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. FEMS Microbiol. Lett. 254: 173-181.
- Bending, G. D. and Read, D. J. 1997. Lignin and soluble phenolic degradation by ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal fungi. Mycol. Res. 101: 1348-1354.
- Beyrle, H. 1995. The role of phytohormones in the function and biology of mycorrhizas. In Varma, A. and Hock, B. (eds.), Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology, pp. 365–390. Berlin: Springer.

- Blaudez, D., Botton, B. and Chalot, M. 2000a. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Microbiology 146: 1109–1117.
- Blaudez, D., Jacob, C., Turnau, K., Colpaert, J. V., Ahonen-Jonnarth, U., Finlay, R., Botton, B. and Chalot, M. 2000b. Differential response of ectomycorrhizal fungi to heavy metals *in vitro*. Mycol. Res. 104(11): 1366-1371.
- Bougher, N. L. and Malajczuk, N. 1990. Effects of high soil moisture on formation of ectomycorrhizas and growth of Karri (*Eucalyptus diversicolor*) seedlings inoculated with *Descolea maculate*, *Pisolithus tinctorius* and *Laccaria laccata*. New Phytol. 114: 87-91.
- Bradi, H. B. 2005. Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Bradley, R., Burt, A. J. and Read, D. J. 1981. Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. Nature 292: 335-337.
- Brundrett, M. C. 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. In Macfayden, A., Begon, M. and Fitter, A. H. (eds.), Advances in ecological research, Vol. 21, pp. 171-313. London: Academic Press.
- Brundrett, M. C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. Plant Soil 320: 37–77.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. and Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph 32. Canberra: Pirie.
- Chalermpongse, A. 1993. The Importance of ectomycorrhizae in planting stock production. In Nicoll, A. M. (ed.), ACFTSC Proceedings symposium on application of soil microorganism in planting stock production, pp. 11-37. Thailand.
- Claridge, A. W. 2002. Ecological role of hypogeous ectomycorrhizal fungi in Australian forests and woodlands. Plant Soil 244: 291-305.

- Clemens, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212: 475–486.
- Clement, A., Garbaye, J. and Letacon, F. 1977. Importance des ectomycorrhizes. Dans la resistance all calcaire du Pin noir *Pinus nigora* An. ssp. *Nigricans* host. Oecol. Plant 2: 111-131.
- Colpaert, J. and van Assche, J. A. 1987. Heavy metal tolerance in some ectomycorrhizal fungi. Funct. Ecol. 1: 415-421.
- Colpaert, J. and van Assche, J. A. 1992. Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. Plant Soil 143: 201–211.
- Colpaert, J. and van Assche, J. A. 1993. The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. New Phytol. 123: 325–333.
- Colpaert, J. V., Vandenkoornhuysse, P., Adriaensen, K. and Vangronsveld, J. 2000. Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. New Phytol. 147: 367-379.
- Courbot, M., Diez, L., Ruotolo, R., Chalot, M. and Leroy, P. 2004. Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 7413–7417.
- Denny, H. J. and Ridge, I. 1995. Fungal slime and its role in the mycorrhizal amelioration of zinc toxicity to higher plants. New Phytol. 130: 251–257.
- Denny, H. J. and Wilkins, D. A. 1987. Zinc tolerance in *Betula* spp. IV. The mechanism of ectomycorrhizal amelioration of zinc toxicity. New Phytol. 106: 545–553.
- Duddridge, J. A. 1980. A comparative ultrastructural analysis of a range of mycorrhizal associations. D. Phil. thesis, University of Sheffield.
- Durall, D. M., Harniman, S. M. K., Berch, S. M. and Goodman, D. M. 1996. Morphology of ectomycorrhizal system (Dissection Microscope). In Goodman, D. M., Durall, D. M., Trofymow, J. A. and Berch, S. M. (eds.), Concise descriptions of north american ectomycorrhizal, pp. CDE1.1- CDE1.4. Mycologue Publications and Canada – B.C. Forest Resource Development Agreement, Canadian forest service.

- Eason, W. R., Newman, E. I. and Chuba, P. N. 1991. Specificity of interplant cycling of phosphorus: the role of mycorrhizas. Plant Soil 137: 267-274.
- Eide, D. J. 2003. Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Nutr. 133: 1532S–1535S.
- Fellner, R. 1989. Mycorrhiza-forming fungi as bioindicator of air pollution. Agric. Ecosyst. Environ. 28: 115-120.
- Fogarty, R. V. and Tobin, J. M. 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. Enzyme Microb. Technol. 19: 311–317.
- Fogel, R. and Peck, S. B. 1975. Ecological studies of hypogeous fungi. I. *Coleoptera* associated with sporocarps. Mycologia 67: 741-747.
- Glanze, W.D. 1996. Mosby Medical Encyclopedia, Revised Edition. St. Louis, MO: C.V. Mosby.
- Godbold, D. L., Jentschke, G., Winter, S. and Marschner, P. 1998. Ectomycorrhizas and amelioration of metal stress in forest trees. Chemosphere 36: 757–762.
- Gogala, N. 1991. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. Experientia 47: 331–340.
- Griffiths, P. R., Baham, J. E. and Caldwell, B. A. 1994. Soil solution chemistry of ectomycorrhizal mats in forest soil. Soil Bio. Biochem. 26(3): 331-337.
- Hacskeylo, E. 1973. Carbohydrate Physiology of Ectomycorrhizae. In Marks, G. C. and Kozlowski, T. T. (eds.), Ectomycorrhizae, pp. 207-230. New York: Academic Press.
- Hall, J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J. Exp. Bot. 53: 1–11.
- Harley, J. L. 1972. The biology of mycorrhiza. London: Leonard Hill.
- Harley, J. L. 1991. Introduction: the state of the art. In Norris, J. R., Read, D. J. and Varma, A. K. (eds.), Methods in Microbiology, pp. 1-24. London: Academic Press.
- Hartley, J., Cairney, J. W. G. and Meharg, A. A. 1997. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? Plant Soil 189, 303-319.

- Harley, J. L. and Loughman, B. C. 1963. The uptake of phosphate by excised mycorrhizal roots of beech IX. The nature of phosphate compounds passing to the host. New Phytol. 62: 350-359.
- Harley, J. L. and Smith, S. E. 1983. Mycorrhizal symbiosis. London: Academic Press.
- Hatch, A. B. 1937. The physical basis of mycotrophy of the genus *Pinus* Black Rock. For. Bull. 6: 168.
- Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C. and Pegler, D. N. 1995. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 8th ed. Oxon: CAB International.
- Hentschel, E., Godbold, D. L., Marschner, P., Schlegel, H. and Jentschke, G. 1993. The effect of *Paxillus involutus* Fr. on aluminium sensitivity of Norway spruce seedlings. Tree Physiol. 12: 379-390.
- Honston, H. W. 1956. Chelation between calcium and organic anions. N. Z. J. Sci. Technol. 37: 522-537.
- Howe, R., Evans, R. L. and Ketteridge, S. W. 1997. Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. New Phytol. 135: 123-131.
- Hüttermann, A., Arduini, I. and Godbold, D. L. 1999. Metal pollution and forest decline. In Prasad, N. M. V. and Hagemeyer, J. (eds.), Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems, pp. 253-272. Berlin: Springer-Verlag.
- Ingham, E. R. and Massicotte, H. B. 1994. Protozoan communities around conifer roots colonized by ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 5: 53-61.
- Jackson, R. M. and Mason, P. A. 1984. Mycorrhiza. Studies in Biology No. 159. London: Edward Arnold.
- Jentschke, G., Fritz, E. and Godbold, D. L. 1991. Distribution of lead in mycorrhizal and non-mycorrhizal Norway spruce seedlings. Physiol. Plant. 81: 417-422.
- Jentschke, G. and Godbold, D. L. 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. Physiol. Plant. 109: 107-116.
- Jones, M. D. and Hutchinson, T. C. 1988. Nickel toxicity in mycorrhizal Birch seedling infected with *Lactarius rufus* or *Scleroderma flavidum* I. Effects on growth, photosynthesis, respiration and transpiration. New Phytol. 108: 451-459.

- Kabata-Penias, A. and Pendaris, H. 1992. Trace elements in soils and plants. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Kapoor, A. and Viraraghavan, T. 1995. Fungal biosorption – an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: A review. Bioresour. Technol. 53: 195-206.
- Kaul, T. N. 2002. Mycorrhiza. In Biology and Conversation of Mushrooms, pp. 46-91. Enfield, NH: Science Publishers, Inc.
- Kendrick, B. and Berch, S. 1985. Mycorrhizae: application in agriculture and forestry. In Robinson, C. W. and Howell, J. A. (eds.), Comprehensive biotechnology, Vol. 4, pp. 109-152. Oxford: Pergamon Press.
- Khemnark, C. 1982. Ectomycorrhizal fungi culture and inoculation on *Pinus kesiya*. In Training course on mycorrhiza research and techniques, Serdang, Malaysia.
- Krzmaric E., Verbruggen, N., Wevers, J. H. L., Carleer, R., Vangronsveld, J. and Colpaert, J. V. 2009. Cd-tolerant *Suillus luteus*: a fungal insurance for pines exposed to Cd. Environ. Pollut. 157: 1581-1588.
- Kvesitadze, G., Khatishvili, G., Sadunishvili, T. and Ramsden, J. J. 2006. Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants: basis of phytoremediation. New York: Springer Berlin Heidelberg.
- Lanfranco, L., Balsamo, R., Martino, E., Perotto, S. and Bonfante, P. 2002. Zinc ions alter morphology and chitin deposition in an ericoid fungus. Eur. J. Histochem. 46: 341–350.
- Lawrence, J. F. and Milner, R. 1996. Associations between arthropods and fungi. In Orchard, A. E. (ed.), Fungi of Australia Vol. 1V Introduction-Fungi in the Environment, pp. 137-202. Canberra: ABRS/CSIRO.
- Levisohn, I. 1960. Physiological and ecological factors influencing the effect of mycorrhizal inoculation. New Phytol. 59: 42.
- Manninen, A. M., Laatikainen, T. and Holopainen, T. 1998. Condition of Scots pine fine roots and mycorrhiza after fungicide application and low-level ozone exposure in a 2-year field experiment. Trees-Struct. Funct. 12: 347-355.

- Mardisubroto, S. and Warnada, N. M. K. 1982. The Development of ectomycorrhizae on seedlings of *Pinus merkusii* after fungicides – application. In IFS Provision report no.12, Malaysia: Training Serdang.
- Marks, G. C. and Foster, R. C. 1973. Structure, Morphogenesis, and Ultrastructure of Ectomycorrhizae, In Marks, G. C. and Kozlowski, T. T. (eds.), Ectomycorrhizae, pp. 1-44. New York: Academic Press.
- Marschner, P., Jentschke, G. and Godbold, D. L. 1998. Cation exchange and lead sorption in ectomycorrhizal fungi. Plant Soil 205: 93–98.
- Marx, D. H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59: 153-163.
- Marx, D. H. 1973. Growth of ectomycorrhizal and nonmycorrhizal shortleaf pine seedlings in soil with *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 63: 18-23.
- Marx, D. H. and Barnett, J. P. 1974. Mycorrhizae and containerized forest tree seedling. Proceedings of the North American containerized forest tree seedlings symposium, pp. 85-92. Denver, CO: Great Plains Agric. Counc. Publ. 68.
- Marx, D. H. and Davey, C. B. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. III. Resistance of aseptically mycorrhizae to infection *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathol. 59: 549-558.
- Marx, D. H., Maul, S. B. and Cordell, C. E. 1992. Application of specific ectomycorrhizal fungi in world forestry. In Leafham, G. F. (ed.), Fronties in industrial mycology, pp. 79-98. New York: Chapman and Hall.
- Marx, D. H. and Ruehle, J. L. 1988. Ectomycorrhizae as biological tools in reclamation and revegetation of waste lands. In Mahadevan, A., Raman, N. and Natarajan, K. (eds.), Mycorrhizae for green Asia 1st Asian conference on mycorrhizae, Jan. 29-31, pp. 339-344. India: Maadras.
- Mason, P. A., Ingleby, K., Munro, R. C., Wilson, J. and Ibrahim, K. 1999. Interactions of nitrogen and phosphorus on mycorrhizal development and shoot growth of *Eucalyptus globules* (Labill.) seedlings inoculated with two different ectomycorrhizal fungi. For. Ecol. Manage. 128(3): 259-268.

- McElhinney, C. and Mitchell, D. T. 1995. Influence of ectomycorrhizal fungi on the response of Sitka spruce and Japanese larch to forms of phosphorus. Mycorrhiza 5: 409-415.
- McIlwee, A. P. and Johnson, C. N. 1998. The contribution of fungi to the diets of three mycophagous marsupials in Eucalyptus forests revealed by stable isotope analysis. Funct. Ecol. 12: 223-231.
- Meyer, F. H. 1973. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In Marks, G. C., Kozłowski, T. T. (eds.) Ectomycorrhizae, their ecology and physiology, pp.79-105. New York: Academic Press.
- Mikola, P. 1948. On the physiology and ecology of *Cenococcum graniforme* Communs. Inst. For. Fenn. 36: 1-104.
- Mikola, P. 1965. Studies on the ectendotrophic mycorrhiza of pine. Acta For. Fenn. 79: 1-56.
- Mikola, P. 1970. Mycorrhizal Inoculation in Afforestation. Int. Rev. Forest Res. 3: 123-185.
- Mikola, P. 1973. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practice. In Marks, C.G. and Kozłowski, T.T. (eds.), Ectomycorrhizae, pp. 383-411. New York: Academic Press.
- Miller, O. K. 1982. Taxonomy of ecto – and ectendomycorrhizal fungi. In Schenck, N. C. (ed.), Method and principles of mycorrhizal research, pp.91-101. St. Paul Minnesota: American Phytopathological Society Publication.
- Molina, R., Massicotte, H., Trappe, J. M. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In Allen, M. F. (ed.), Mycorrhizal functioning, pp. 357-423. London: Chapman and Hall.
- Momoh, Z. O. and Gbadegesin, R. A. 1980. Field performance of *Pisolithus tinctorius* as a mycorrhizal fungus of pine in Nigeria. In Mikola, P. (ed.), Tropical mycorrhiza research, pp. 73-79. New York; Oxford University Press.

- Moyer-Henry, K., Silva, I., Macfall, J., Johannes, E., Allen, N., Goldfarb, B. and Rufty, T. 2005. Accumulation and localization of aluminium in root tips of loblolly pine seedlings and the associated ectomycorrhiza *Pisolithus tinctorius*. Plant Cell Environ. 28: 111-120.
- Ortiz, D. F., Kreppel, L., Speiser, D. M., Scheel, G., McDonald, G. and Ow, D. W. 1992. Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. Embo J. 11: 3491-3499.
- Pan, W. L., Hopkins, A. G. and Jackson, W. A. 1989. Aluminium inhibition of shoot lateral branches of *Glycine max* and reversal by exogenous cytokinin. Plant Soil 120: 1-9.
- Peterson, R. L., Massicotte, H. B., Melville, L. H. 2004. Ectomycorrhizas. In Mycorrhizas: anatomy and cell biology, pp. 5-42. Canada: NRC Research Press.
- Ray, P., Tiwari, R., Reddy, U. G. and Adholeya, A. 2005. Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi *in vitro*. World J. Microbiol. Biotechnol. 21: 309-315.
- Read, D. J. 1978. The biology of mycorrhiza in heathland ecosystems, with special reference to the nitrogen nutrition of the Ericaceae. In Lontit, M. W. and Miles, J. A. (eds.), Microbial ecology, pp. 324-328. New York: Springer, Berlin Heidelberg.
- Read, D. J., Leake, J. R. and Langdale, A. R. 1989. The nitrogen nutrition of mycorrhizal fungi and their host plants. In Boddy, L., Marchant, R. and Read, D. J. (eds.), Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi, pp. 182-204. Cambridge: Cambridge University Press.
- Reddell, P., Spain, A. V. and Hopkins, M. 1997. Dispersal of spores of mycorrhizal fungi in scats of native mammals in tropical forests of Northeastern Australia. Biotropica 29: 184-192.
- Reddy, M. S. and Nararajan, K. 1994. Effect of a synthetic pyrethroid on the growth of ectomycorrhizal fungi and mycorrhiza formation in *Pinus patula*. Mycorrhiza 5: 115-117.

- Reddy, M. S. and Natarajan, K. 1996. *In vitro* ectomycorrhizal formation of *Pinus patula*, *P. pseudostrobus*, *P. oocarpa* and *P. elliotii* grown in southern India. New For. 11: 149-153.
- Rice, M. and Beebee, D. 1980. Mushrooms for color. California: Eureka Printing Company, Inc.
- Ritchie, I. M. and Thingvold, D. A. 1985. Assessment of atmospheric impacts of large-scale copper-nickel development in northern Minnesota. Waste Air Soil Pollut. 25: 145-160.
- Schenck, N. C. and Perez, N. 1987. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. Gainesville, FL: University of Florida.
- Schübler, A., Schwarzott, D. and Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol. Res. 105:1413-1421.
- Schützendübel, A. and Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. J. Exp. Bot. 53: 1351–1365.
- Sell, J., Kayser, A., Schulin, R. and Brunner, I. 2005. Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. Plant Soil 277: 245-253.
- Selosse, M. M. and Le Tacon, F. 1998. The land flora: a phototroph-fungus partnership? Trends Ecol. Evol. 13: 15-20.
- Setälä, H. 1995. Growth of birch and pine seedlings in relation to grazing by soil fauna on ectomycorrhizal fungi. Ecology 76: 1844-1851.
- Sharples, J. M. and Cairney, J. W. G. 1997. Organic nitrogen utilization by an unidentified mycobiont isolated from mycorrhizas of *Pisonia grandis*. Mycol. Res. 101(3): 315-318.
- Simard, S. W., Jones, M. D., Durall, D. M., Perry, D. A., Myrold, D. D. and Molina, R. 1997. Reciprocal transfer of carbon isotopes between ectomycorrhizal *Betula papyrifera* and *Pseudotsuga menziesii*. New Phytol. 137: 529-542.

- Slankis, V. 1973. Hormonal Relationships in Mycorrhizal Development. In Marks, G. C. and Kozlowski, T. T. (eds.), Ectomycorrhizae, p. 232-297. New York: Academic Press.
- Smith, S. E. and Read, D. J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. London: Academic Press.
- Strandberg, G. W., Shumate II, S. E. and Parrott, J. R., Jr. 1981. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 41: 237–245.
- Tam, P. C. F. 1995. Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. Mycorrhiza 5: 181-187.
- Taylor A. F. S. and Alexander, I. J. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. Mycologist 19:102–112.
- Theodorou, C. and Bowen, G. D. 1971. Influence of temperature on the mycorrhizal association of *Pinus radiata* D. Don. Aust. J. Bot. 19: 13-20.
- Torstensson, L. and Wessen, B. 1984. Interaction between the fungicide benomyl and soil microorganisms. Soil Biol. Biochem. 16(5): 445-452.
- Trappe, J. M. 1987. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In Safir, G. R. (ed.), Ecophysiology of VA mycorrhizal plants, pp. 5-25. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Trappe, J. M. and Berch, S. M. 1985. The prehistory of mycorrhizae: A. B. Frank's predecessors. In Molina, R. (ed.), Proceedings of the 6th North American Conference on Mycorrhizae, pp. 2-11. Corvallis, OR: Forest Research Laboratory.
- Trevors, J. T., Stratton, G. W. and Gadd, G. M. 1986. Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. Can. J. Microbiol. 32: 447–464.
- Turnau, K. Cited in Jentschke, G. and Godbold, D. L. 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. Physio. Plant. 109: 107-116. (Unpublished data)
- Unestam, T. 1991. Water repellency, mat formation, and leaf-simulated growth of some ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 1: 13–20.

- Van Tichelen, K. K., Colpaert, J. V. and Vangronsveld, J. 2001. Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. New Phytol. 150: 203-213.
- Wang, B. and Qiu, Y. L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. Mycorrhiza 16: 299–363.
- Warcup, J. H. 1975. Factors affecting symbiotic germination of orchid seed. In Sanders, F. E., Mosse, B. and Tinker, P. B. (eds.), Endomycorrhizas, p. 87. London: Academic Press.
- Warcup, J. H. 1980. Ectomycorrhizal associations of Australian indigenous plants. New Phytol. 85: 531–535.
- Williams, L. E., Pittman, J. K. and Hall, J. L. 2000. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. Biochim. Biophys. Acta-Biomembr. 1465: 104–126.
- Zak, B. 1973. Classification of ectomycorrhizae. In Marks, G. C. and Kozlowski, T. T. (eds.), Ectomycorrhizal: their ecology and physiology, pp. 43-78. New York: Academic press.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสูตรปุ๋ย

1. 1% FeCl₃

FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.67	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร

2. Stock Thiamine HCl

Thiamine HCl	10	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วยหัวกรองปราศจากเชื้อ ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Modified Melin-Norkrans (MMN agar)* (Marx, 1969)

Malt extract	3	กรัม
D-glucose	10	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.5	กรัม
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.25	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.15	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.066	กรัม
NaCl	0.025	กรัม
1% FeCl ₃	1.2	มิลลิลิตร
วุ้นผง	15	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	1	ลิตร

ปรับ pH เป็น 5.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุ่น เติม Stock Thiamine HCl 100 ไมโครลิตร

* หมายเหตุ อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ใช้วุ้นผง 5 กรัม

4. สูตรปุ๋ย

NH_4NO_3	7.5 กรัมต่อน้ำ 250 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ N 10.5 ppm
Na_2HPO_4	11.5 กรัมต่อน้ำ 250 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ P 10.0 ppm
KCl	4.5 กรัมต่อน้ำ 250 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ K 9.4 ppm
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	9.27 กรัมต่อน้ำ 250 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Ca 10.1 ppm
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30.69 กรัมต่อน้ำ 250 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Mg 10.5 ppm
H_3BO_3	0.16 กรัมต่อน้ำ 250 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.11 กรัมต่อน้ำ 250 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Zn 0.1 ppm
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.625 กรัมต่อน้ำ 250 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Mn 0.7 ppm
FeEDTA	9.05 กรัมต่อน้ำ 250 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Fe 5.5 ppm
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	15 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ทำละลายเจือจางที่ 10^{-1} ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Cu 0.006 ppm
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ทำละลายเจือจางที่ 10^{-2} ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Mo 0.001 ppm

ปรับ pH เป็น 4.3 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. HCl ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

HCl (37%)	8.28	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร

2. NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

NaOH	4	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร

3. Lactophenol cotton blue

Lactic acid	20	มิลลิลิตร
Phenol (Melt crystal)	20	มิลลิลิตร
Glycerol	40	มิลลิลิตร
Cotton blue	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

หลอม Phenol แล้วดูมา 20 มิลลิลิตร ลงใน lactic acid, glycerol และน้ำกลั่นโดยผ่านความร้อนอ่อนๆ และเติม cotton blue ลงไป เก็บสารละลายใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

ศูนย์วิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. Stock สารละลายโลหะหนัก

4.1 ZnSO₄ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7.19	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	250	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวดโพลีโพรพิลีน (PP) ที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2 CuSO₄ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

CuSO ₄ ·5H ₂ O	6.24	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	250	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวดโพลีโพรพิลีน (PP) ที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3 Pb(NO₃)₂ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

Pb(NO ₃) ₂	8.28	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	250	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวดโพลีโพรพิลีน (PP) ที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

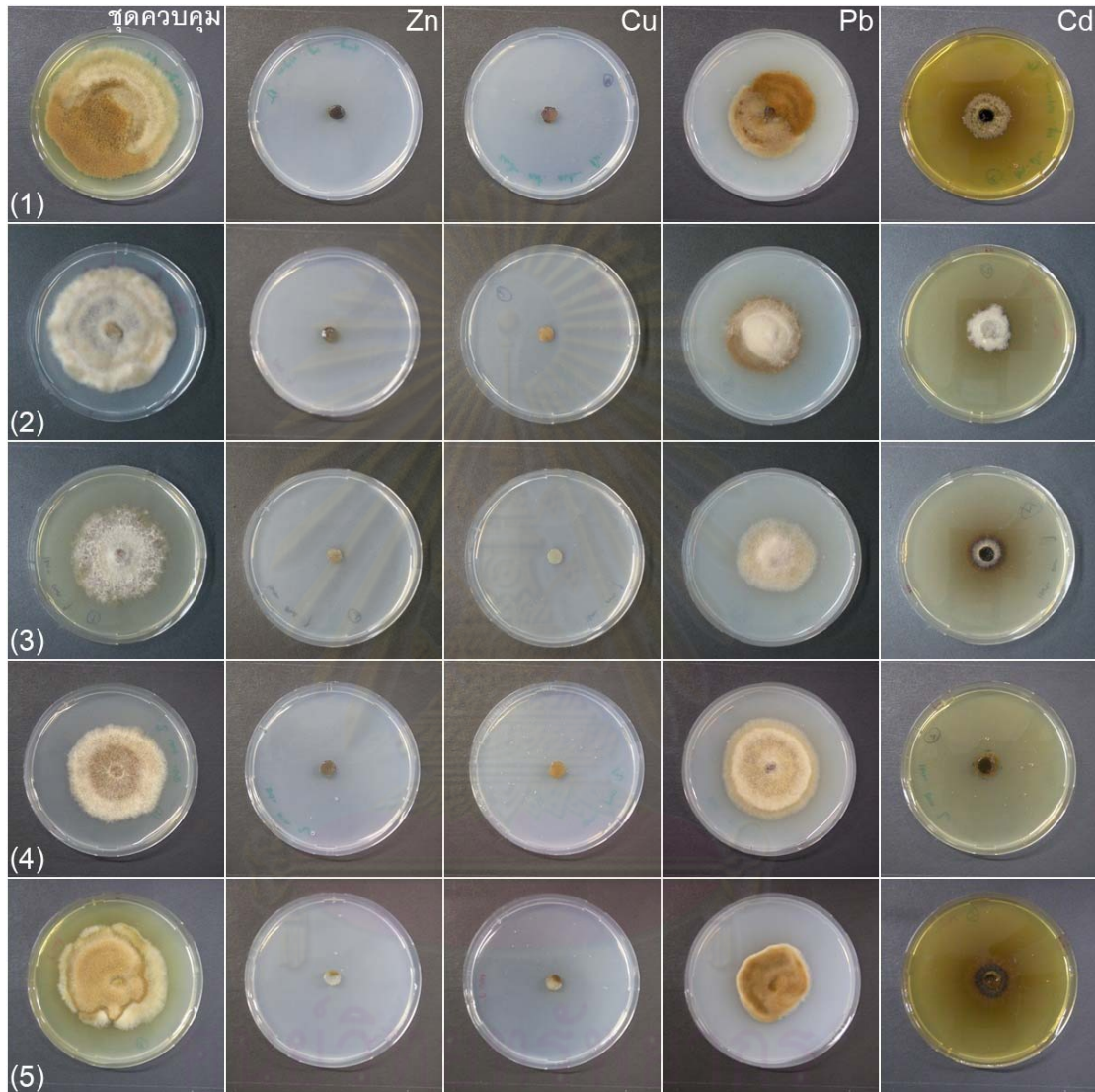
4.4 CdSO₄ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์

3CdSO ₄ ·8H ₂ O	128.26	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	250	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวดโพลีโพรพิลีน (PP) ที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

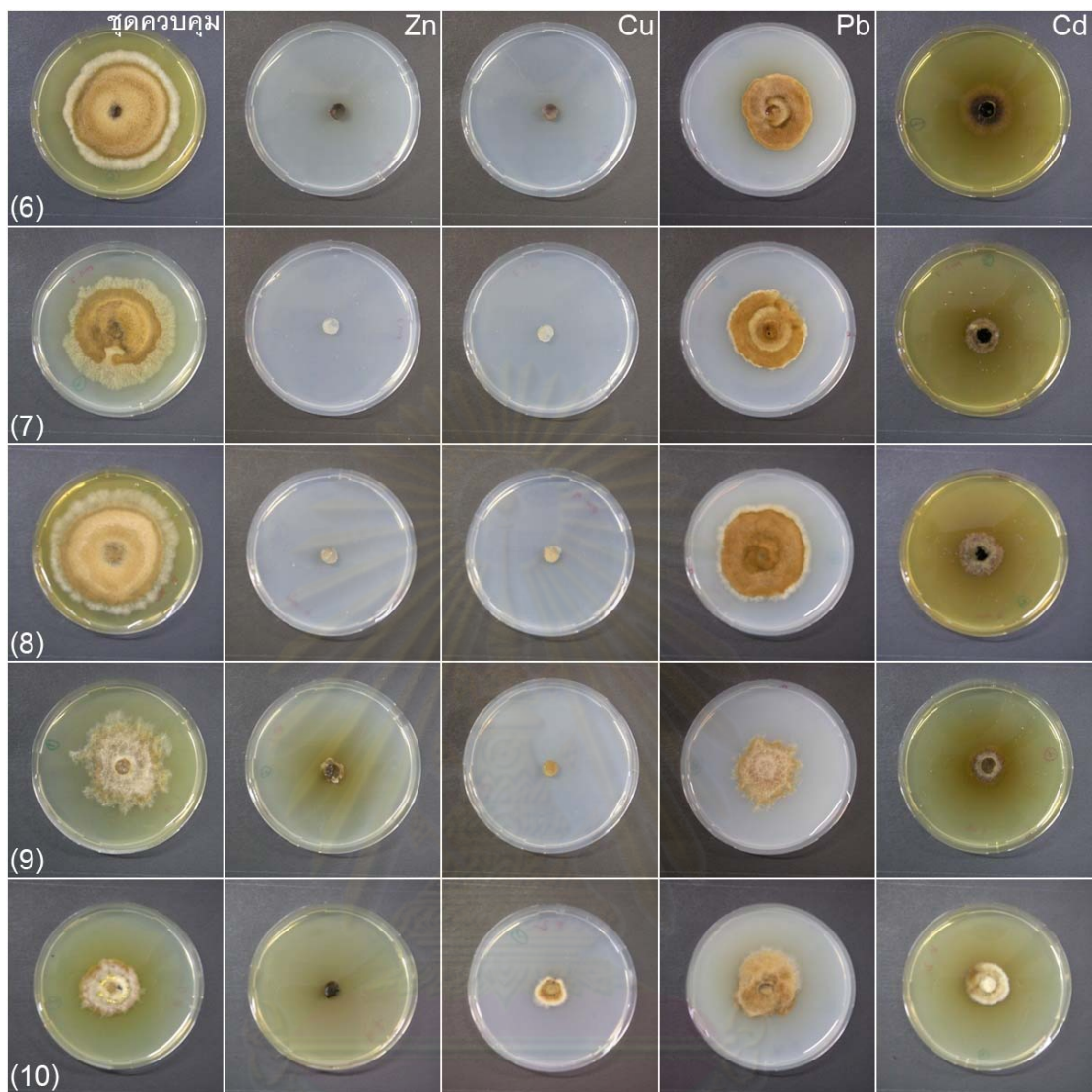
ภาคผนวก ค

ลักษณะการเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซา 43 ไอโซเลต



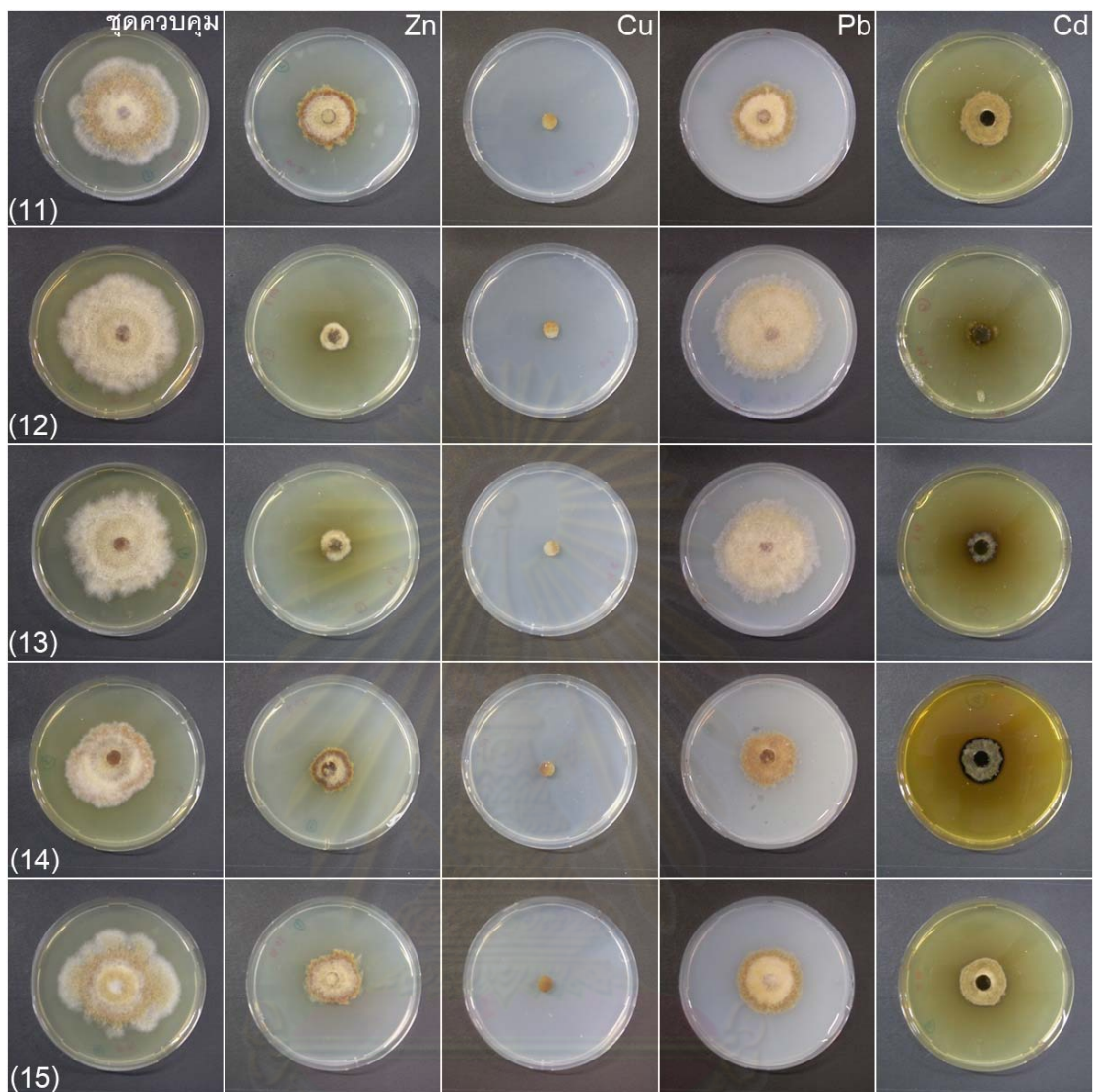
ภาพที่ ค.1 ลักษณะการเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซา 43 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่โลหะหนัก ได้แก่ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ และ $CdSO_4$ ความเข้มข้น 2, 2, 2 และ 0.06 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่โลหะหนัก เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

- (1) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa01
- (2) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa02
- (3) *Astraeus odoratus* ไอโซเลต Ao03
- (4) *Astraeus odoratus* ไอโซเลต Ao04
- (5) *Astraeus odoratus* ไอโซเลต Ao05



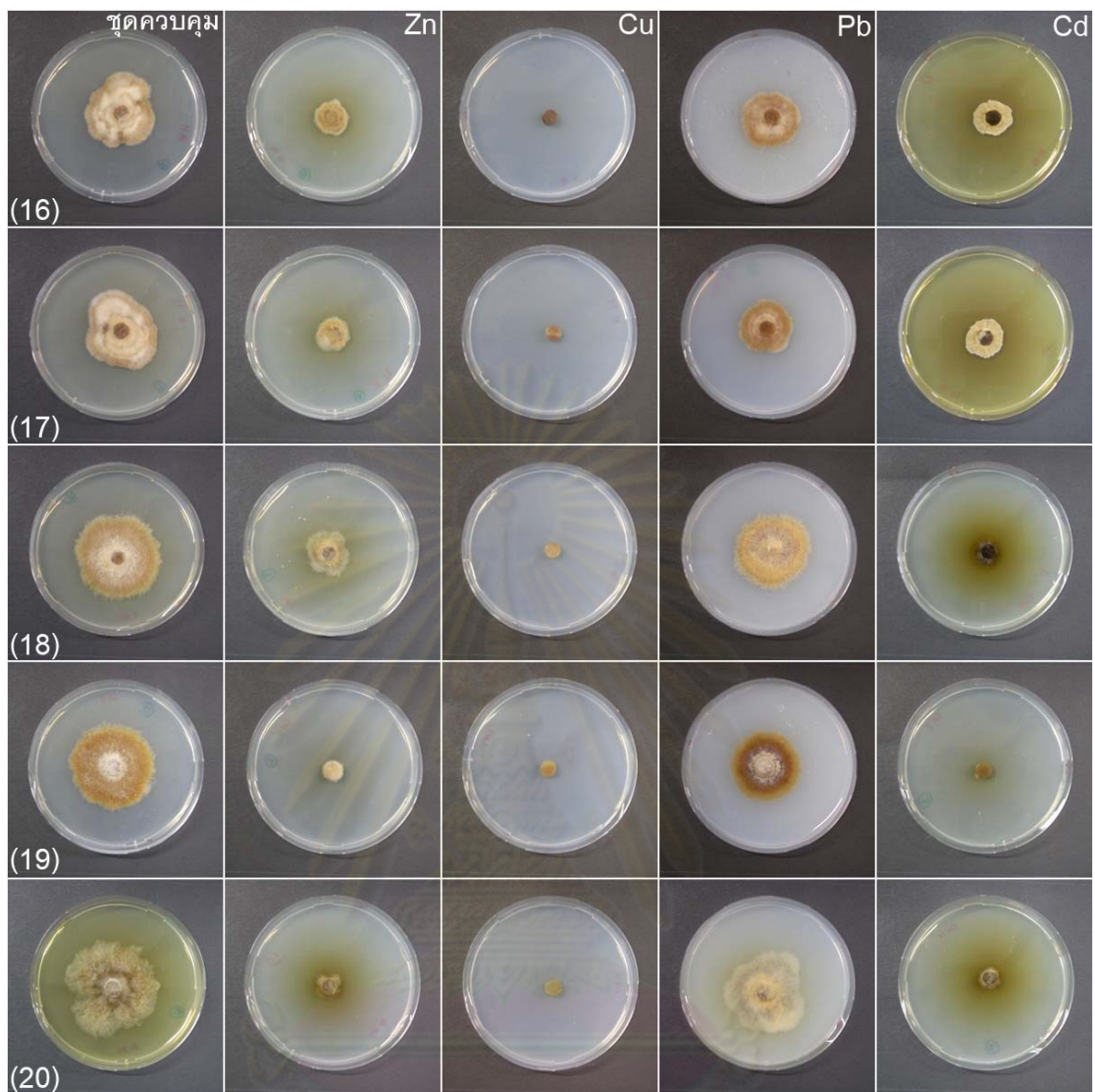
ภาพที่ ค.1 (ต่อ)

- (6) *Astraeus odoratus* ไอโซเลต Ao06
 (7) *Astraeus odoratus* ไอโซเลต Ao07
 (8) *Astraeus odoratus* ไอโซเลต Ao08
 (9) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa09
 (10) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa10



ภาพที่ ค.1 (ต่อ)

- (11) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11 (คัดเลือกสำหรับทดสอบ CdSO_4)
- (12) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa12
- (13) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa13
- (14) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa14
- (15) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa15



ภาพที่ ค.1 (ต่อ)

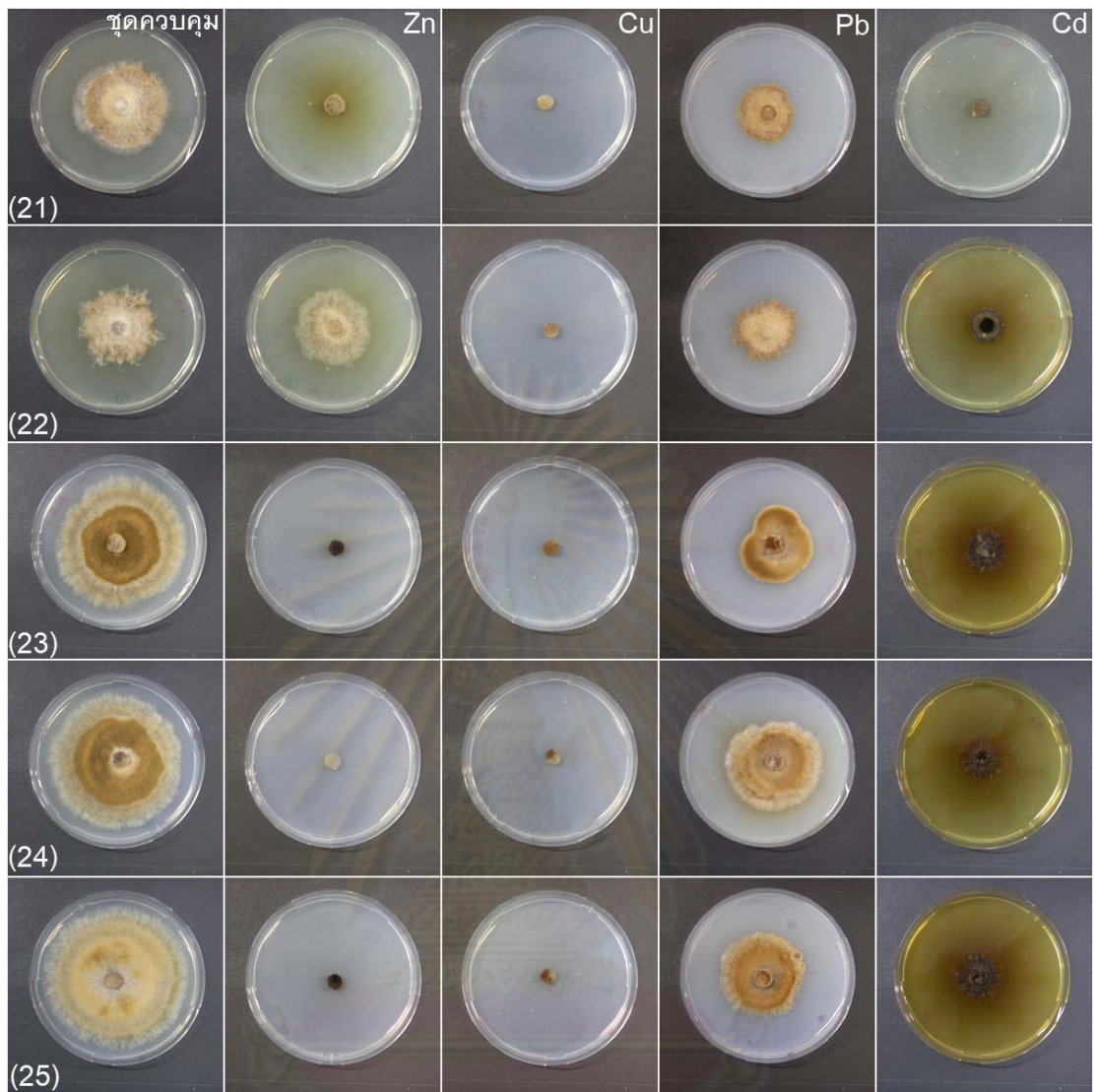
(16) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa16

(17) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa17

(18) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa18

(19) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa19

(20) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa20



ภาพที่ ค.1 (ต่อ)

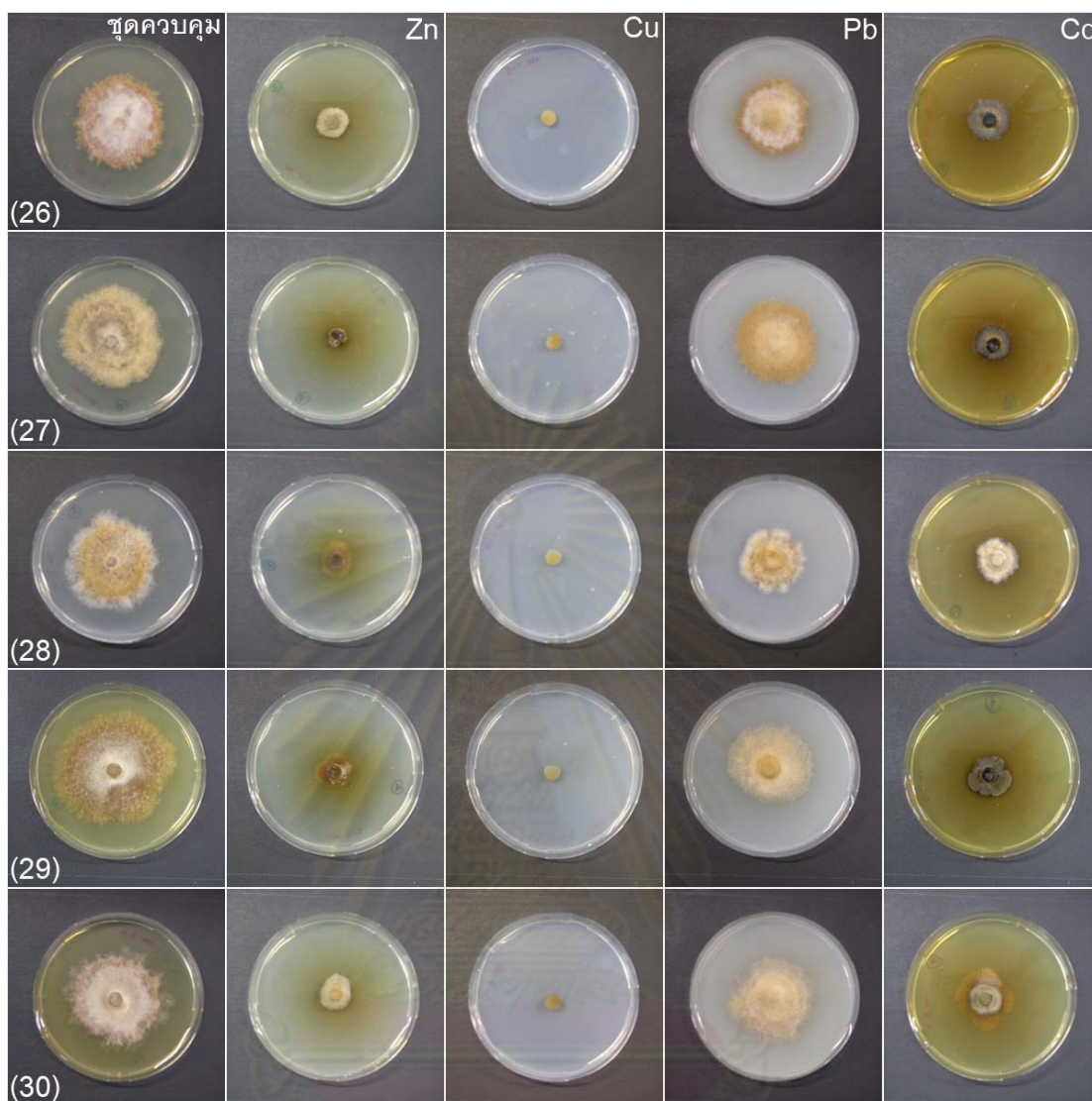
(21) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa21

(22) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa22

(23) *Astraeus odoratus* ไอโซเลต Ao23

(24) *Astraeus odoratus* ไอโซเลต Ao24

(25) *Astraeus odoratus* ไอโซเลต Ao25



ภาพที่ ค.1 (ต่อ)

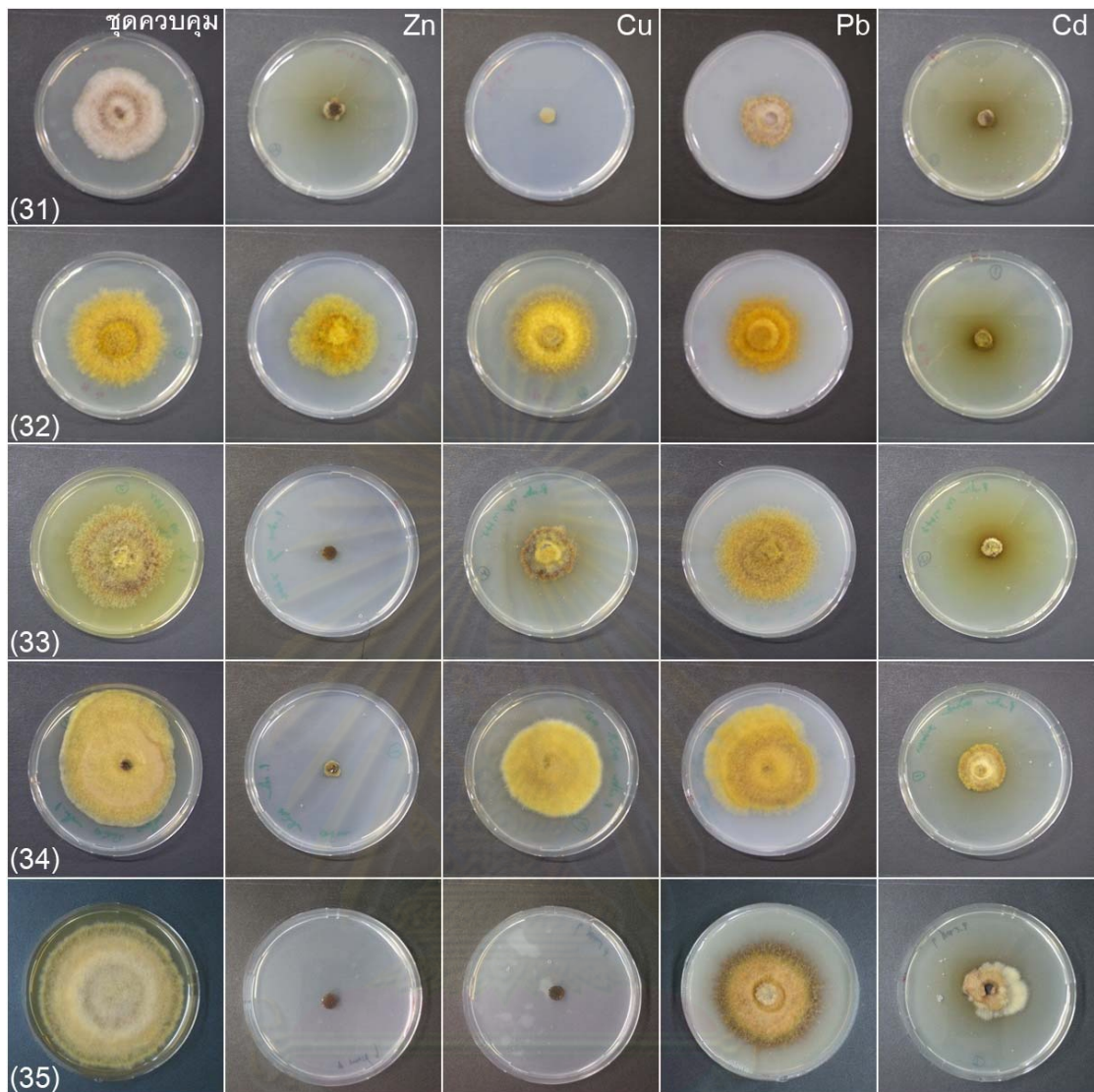
(26) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa26

(27) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa27

(28) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa28

(29) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa29

(30) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa30



ภาพที่ ค.1 (ต่อ)

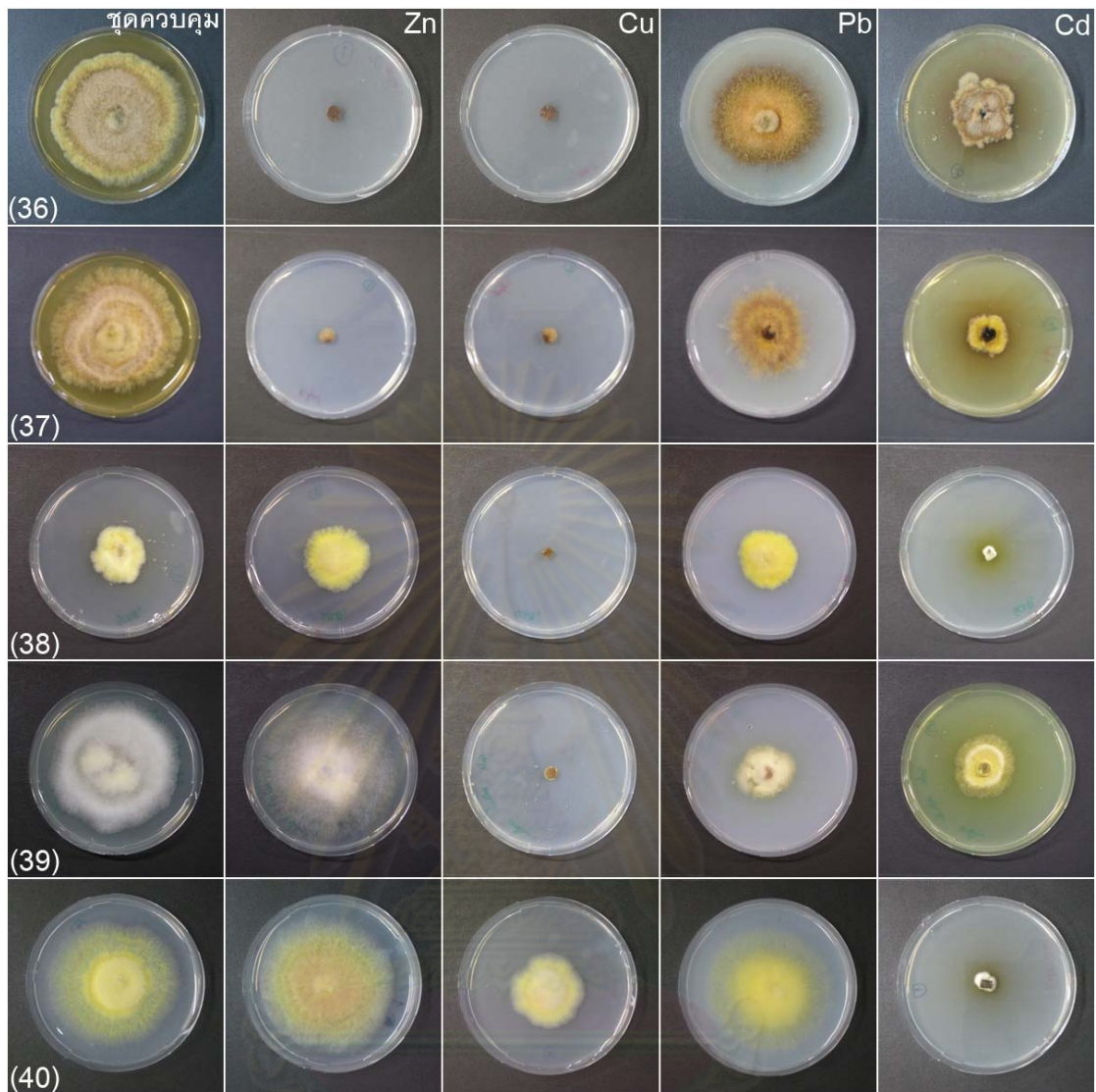
(31) *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa31

(32) *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp32 (คัดเลือกสำหรับทดสอบ CuSO_4)

(33) *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 (คัดเลือกสำหรับทดสอบ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)

(34) *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa34

(35) *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp35



ภาพที่ ค.1 (ต่อ)

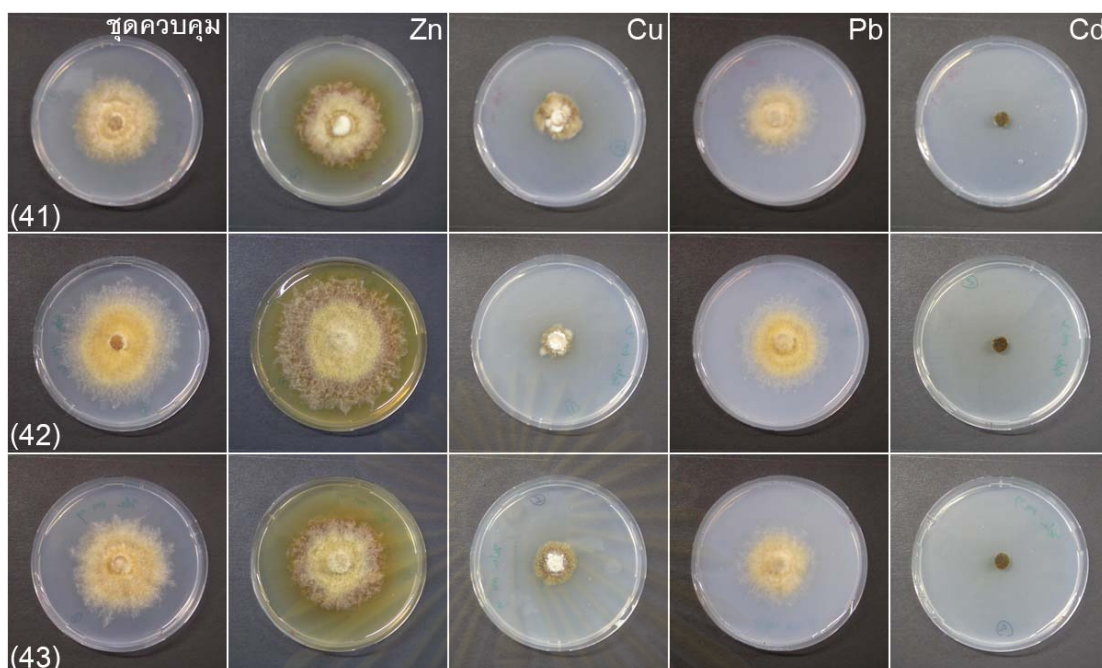
(36) *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp36

(37) *Pisolithus* sp. ไอโซเลต Psp37

(38) *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp38

(39) *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp39

(40) *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp40



ภาพที่ ค.1 (ต่อ)

- (41) *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp41
 (42) *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42 (คัดเลือกสำหรับทดสอบ $ZnSO_4$)
 (43) *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp43

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

สถิติ

1. การทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ หรือ Completely randomized design (CRD)

ตัวอย่าง การวางแผนการทดลองแบบ CRD ที่ใช้ในข้อ 3.4.6.3

สมมติ การทดสอบกับ $ZnSO_4$ จะได้ชุดการทดลอง (treatment) ดังนี้

ชุด ก	กล้าไม้		
ชุด ข	กล้าไม้	+	$ZnSO_4$
ชุด ค	กล้าไม้	+	หัวเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว
ชุด ง	กล้าไม้	+	หัวเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว + $ZnSO_4$

การทดลองครั้งนี้ ผู้ทดลองกำหนดให้มีจำนวนซ้ำเท่ากันในแต่ละชุดการทดลอง คือ 15 ซ้ำ ต่อ 1 ชุดการทดลอง ภายหลังจากสุ่ม (random) ด้วยการจับฉลาก หรือใช้ตารางเลขสุ่ม (table of random digits) อาจได้ผังการทดลอง ดังนี้

ก	ข	ง	ค	ก	ค	ข	ก	ข	ง
ง	ค	ค	ง	ง	ข	ก	ค	ข	ค
ง	ข	ก	ข	ค	ค	ง	ก	ก	ง
ก	ง	ข	ก	ข	ก	ค	ง	ค	ง
ค	ข	ค	ก	ง	ง	ก	ค	ง	ข
ก	ข	ข	ง	ค	ข	ค	ก	ข	ก

2. ผล Post Hoc Tests โดยวิธี Duncan นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

2.1 ทดสอบการเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซาที่ผ่านการคัดเลือก

2.1.1 ทดสอบการเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $ZnSO_4$

เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)

ZnSO ₄ (mM)	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
8	3	2.9000				
16	3	2.9833	2.9833			
4	3		3.2833			
2	3			3.6667		
1	3				4.0000	
0	3					4.4000
Sig.		.585	.056	1.000	1.000	1.000

น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)

ZnSO ₄ (mM)	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
16	3	26.4333		
8	3	33.2333		
4	3		45.2333	
2	3			60.8000
1	3			65.6333
0	3			69.1667
Sig.		.126	1.000	.078

2.1.2 ทดสอบการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. ไฮโซเลต Psp32 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CuSO_4 ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CuSO_4

เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)

CuSO_4 (mM)	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
16	3	.0000					
8	3		2.4500				
4	3			3.0333			
2	3				3.7500		
1	3					4.1667	
0	3						4.3167
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)

CuSO_4 (mM)	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
16	3	2.8667			
8	3		43.3000		
4	3			67.6000	
2	3			77.1333	
0	3				97.2000
1	3				99.5667
Sig.		1.000	1.000	.131	.694

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.3 ทดสอบการเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ mM	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
8	3	.0000		
16	3	.0000		
1	3		3.1333	
2	3			3.7500
4	3			4.1500
0	3			4.2500
Sig.		1.000	1.000	.052

น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ mM	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
8	3	.6333	
16	3	1.4667	
1	3		26.8333
4	3		27.7000
0	3		30.9000
2	3		35.6333
Sig.		.928	.383

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.4 ทดสอบการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN pH 4.3 ที่ใส่ CdSO_4 ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ CdSO_4

เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)

CdSO_4 (mM)	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
0.10	3	2.0833	
0.06	3	2.1167	
0.08	3	2.1167	
0.02	3	2.1333	
0.04	3	2.1500	
0.00	3		3.9333
Sig.		.461	1.000

น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)

CdSO_4 (mM)	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
0.10	3	27.1000			
0.06	3	28.8000			
0.08	3	31.3667	31.3667		
0.04	3		40.0000	40.0000	
0.02	3			42.4000	
0.00	3				72.5667
Sig.		.334	.054	.563	1.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ผ่านการคัดเลือกในวัสดุปลูกที่ใส่โลหะหนัก

2.2.1 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma* sp. ไอโซเลต Ssp42 ในวัสดุปลูกที่ใส่ $ZnSO_4$

ความสูงของลำต้น (เซนติเมตร)

ZnSO ₄	N	Subset for alpha = .05
		1
ก	15	27.5533
ค	15	27.7533
ง	15	28.1200
ข	15	30.2600
Sig.		.558

เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก (เซนติเมตร)

ZnSO ₄	N	Subset for alpha = .05
		1
ก	15	.4743
ค	15	.4813
ง	15	.4930
ข	15	.5277
Sig.		.210

น้ำหนักสดส่วนเหนือดิน (กรัม)

ZnSO ₄	N	Subset for alpha = .05
		1
ค	15	4.9073
ง	15	5.2453
ก	15	5.7373
ข	15	6.4400
Sig.		.250

น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน (กรัม)

ZnSO ₄	N	Subset for alpha = .05	
		1	
ง	15		2.0070
ค	15		2.2700
ก	15		2.3200
ข	15		2.4420
Sig.			.637

น้ำหนักสดส่วนใต้ดิน (กรัม)

ZnSO ₄	N	Subset for alpha = .05	
		1	
ง	15		1.2340
ก	15		1.5280
ค	15		1.7820
ข	15		1.8560
Sig.			.511

น้ำหนักแห้งส่วนใต้ดิน (กรัม)

ZnSO ₄	N	Subset for alpha = .05	
		1	
ข	15		.7925
ง	15		.8160
ค	15		1.0660
ก	15		1.1045
Sig.			.505

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.2 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. ไบโชนิเลต Psp32 ในวัสดุปลูกที่ใส่ CuSO_4

ความสูงของลำต้น (เซนติเมตร)

CuSO_4	N	Subset for alpha = .05
		1
ข	15	26.8000
ก	15	27.5533
ค	15	29.0933
ง	15	29.7467
Sig.		.484

เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก (เซนติเมตร)

CuSO_4	N	Subset for alpha = .05
		1
ข	15	.4473
ก	15	.4743
ค	15	.4970
ง	15	.5203
Sig.		.068

น้ำหนักสดส่วนเหนือดิน (กรัม)

CuSO_4	N	Subset for alpha = .05
		1
ข	15	5.1807
ค	15	5.6060
ก	15	5.7373
ง	15	6.5380
Sig.		.294

น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน (กรัม)

CuSO_4	N	Subset for alpha = .05
		1
ค	15	1.8140
ข	15	1.9140
ก	15	2.3200
ง	15	2.3910
Sig.		.491

น้ำหนักสลดส่วนไต้ดิน (กรัม)

CuSO ₄	N	Subset for alpha = .05	
		1	
ข	15		1.2840
ค	15		1.4140
ก	15		1.5280
ง	15		2.1560
Sig.			.239

น้ำหนักแห้งส่วนไต้ดิน (กรัม)

CuSO ₄	N	Subset for alpha = .05	
		1	
ข	15		.7920
ค	15		.9240
ก	15		1.1045
ง	15		1.1700
Sig.			.374

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.3 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus albus* ไอโซเลต Pa33 ในวัสดุปลูกที่ใส่ $Pb(NO_3)_2$

ความสูงของลำต้น (เซนติเมตร)

$Pb(NO_3)_2$	N	Subset for alpha = .05
		1
ก	15	27.5533
ง	15	28.0133
ค	15	29.4800
ข	15	30.1733
Sig.		.552

เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก (เซนติเมตร)

$Pb(NO_3)_2$	N	Subset for alpha = .05
		1
ง	15	.4213
ข	15	.4567
ก	15	.4743
ค	15	.4753
Sig.		.147

น้ำหนักสดส่วนเหนือดิน (กรัม)

$Pb(NO_3)_2$	N	Subset for alpha = .05
		1
ง	15	5.2120
ก	15	5.7373
ค	15	6.6240
ข	15	7.0093
Sig.		.204

น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน (กรัม)

$Pb(NO_3)_2$	N	Subset for alpha = .05
		1
ง	15	2.0660
ข	15	2.1500
ค	15	2.2800
ก	15	2.3200
Sig.		.789

น้ำหนักสตรอนไทด์ดิน (กรัม)

Pb(NO ₃) ₂	N	Subset for alpha = .05	
		1	
ค	15		1.3767
ง	15		1.3920
ก	15		1.5280
ข	15		2.1400
Sig.			.359

น้ำหนักแ่งส่วนไต้ดิน (กรัม)

Pb(NO ₃) ₂	N	Subset for alpha = .05	
		1	
ง	15		.7360
ข	15		1.0262
ค	15		1.0525
ก	15		1.1045
Sig.			.417

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.4 ทดสอบการเจริญของกล้าไม้ยางนาที่มีหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Astraeus asiaticus* ไอโซเลต Aa11 ในวัสดุปลูกที่ใส่ CdSO_4

ความสูงของลำต้น (เซนติเมตร)

CdSO_4	N	Subset for alpha = .05
		1
ก	15	27.5533
ข	15	29.3067
ค	15	29.4200
ง	15	32.4000
Sig.		.227

เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก (เซนติเมตร)

CdSO_4	N	Subset for alpha = .05
		1
ก	15	.4743
ง	15	.4760
ข	15	.5183
ค	15	.5187
Sig.		.214

น้ำหนักสดส่วนเหนือดิน (กรัม)

CdSO_4	N	Subset for alpha = .05
		1
ก	15	5.7373
ค	15	6.7860
ข	15	7.0193
ง	15	7.2240
Sig.		.262

น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน (กรัม)

CdSO_4	N	Subset for alpha = .05
		1
ก	15	2.3200
ข	15	2.4580
ค	15	2.5160
ง	15	2.6670
Sig.		.673

น้ำหนักสลดส่วนใต้ดิน (กรัม)

CdSO ₄	N	Subset for alpha = .05	
		1	
ก	15		1.5280
ข	15		1.5760
ค	15		1.7920
ง	15		1.9580
Sig.			.544

น้ำหนักแห้งส่วนใต้ดิน (กรัม)

CdSO ₄	N	Subset for alpha = .05	
		1	
ข	15		.7300
ค	15		.8920
ง	15		.9480
ก	15		1.1045
Sig.			.333

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายจตุรงค์ พูลทวี เกิดวันที่ 14 สิงหาคม 2526 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จ การศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2549

ผลงานทางวิชาการ

Pooltavee, J., Piapukiew, J. and Sihanonth, P. 2009. Selection for heavy metal-tolerant ectomycorrhizal fungi. Proceedings of the 21st annual meeting and international conference of the Thai society for biotechnology, p. 100. Queen Sirikit National Convention Center. September 24-25, 2009. (Poster presentation) (Full text in CD-ROM)

ทุนการวิจัย

ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2552

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย