การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับรากพืชทดสอบโดยราเห็ดตับเต่าดำ

นายสุรเชษฐ์ พัฒนพานิชสวัสดิ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ECTOMYCORRHIZAL FORMATION OF PLANT ROOTS BY *Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) Boedijn

Mr. Surachet Pattanapanitswat

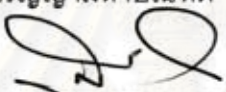
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับรากพืชทดสอบโดยราเห็ดตับเต่าดำ
โดย	นายสุรเชษฐ์ พัฒนพานิชสวัสดิ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว

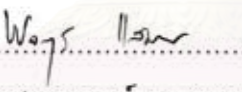
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต



..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

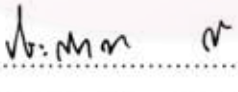
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



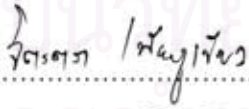
..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)



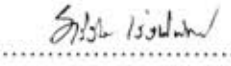
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)



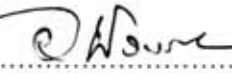
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว)



..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)



..... กรรมการ

(อาจารย์ อนิวรรต เฉลิมพงษ์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุรเชษฐ์ พัฒนพานิชสวัสดิ์ : การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับรากพืชทดสอบโดยราเห็ดตับเต่าดำ (ECTOMYCORRHIZAL FORMATION OF PLANT ROOTS BY *Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) Boedijn) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ.ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว, 121 หน้า.

การสำรวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ด *Phaeogyroporus portentosus* (Berk. & Broome) McNabb จากหลายท้องที่ในประเทศไทย สามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้ 22 สายพันธุ์ ทำการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ของรา *P. portentosus* ทั้ง 22 สายพันธุ์ เมื่อพิจารณาจากแผนภูมิต้นไม้ พบว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง ITS ต่ำมากและรา *P. portentosus* ทุกสายพันธุ์มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ส่วนอัตราการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN พบว่ามีอัตราการเจริญที่ต่างกันไปทุกสายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญที่ดีที่สุดคือ XK2 และ MM ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 8 และ 7.9 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาของรา *P. portentosus* บนรากของกล้าไม้ทดสอบซึ่ง ได้แก่ กระถิน แค โสน มะขามเทศ และสะแก พบว่ารากของพืชทดสอบทุกชนิดไม่มีการสร้างแมนเทิล และ hartig net พบแต่เพียงเส้นใยราพันอยู่รอบๆ รากของพืชทดสอบเท่านั้น การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ารา *P. portentosus* ไม่สามารถสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชทดสอบ และทำการทดสอบเพื่อยืนยันความเป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาของรา *P. portentosus* โดยคัดเลือกรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 และ MM มาผลิตหัวเชื้อสำหรับเพาะร่วมกับกล้าไม้ เพื่อศึกษาการกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแก หลังเพาะหัวเชื้อกับกล้าไม้ได้ 6 เดือน วัดความสูงของลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก และน้ำหนักแห้งของรากและลำต้น พบว่าการเจริญของกล้าไม้ที่มีการใส่หัวเชื้อไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกล้าไม้ที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อและไม่พบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากพืชทดสอบ ซึ่งจากผลการทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซา และการทดสอบการกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้ทำให้สรุปได้ว่ารา *P. portentosus* ไม่ใช่ราเอคโตไมคอร์ไรซา

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต สุรเชษฐ์ พัฒนพานิชสวัสดิ์

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ประกิตติ์สิน

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม จิตรตรา เพียภูเขียว

4872526523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : ECTOMYCORRHIZA / ECTOMYCORRHIZAL FORMATION / *Phlebopus portentosus*

SURACHET PATTANAPANITSWAT: ECTOMYCORRHIZAL FORMATION OF PLANT ROOTS BY *Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) Boedijn. ADVISOR: ASSOC. PROF. PRAKITSIN SIHANONTH, Ph.D., CO-ADVISER: ASST. PROF. JITTRA PIAPUKIEW, Ph.D., 121 pp.

The sporocarps of *Phaeogyroporus portentosus* (Berk. & Broome) McNabb were collected from various localities in Thailand. Twenty-two strains of *P. portentosus* were isolated and cultured on MMN medium. The genetic variation and phylogenetic relationships based on internal transcribed spacer (ITS) among 22 strains were investigated. The phylogenetic tree suggested that genetic variation in ITS regions of this fungus was low and all strains had closed relationship. The strains of *P. portentosus* showed different growth rate on MMN medium. *P. portentosus* strain XK2 and MM gave high growth rate with colony diameter of 8 and 7.9 cm, respectively. The ectomycorrhizal formation on seedling roots of *Lecucaena leucocephala*, *Sesbania geandiflora*, *Sesbania javanica*, *Pithecellobium dulce* and *Combretum quadrangulare* were tested. The results showed no mantle and hartig net formation and only mycelium attachment on roots of tested plants. This indicated that *P. portentosus* could not form ectomycorrhiza with the tested plants. To confirm being ectomycorrhizal fungus of *P. portentosus*, *P. portentosus* strain XK2 and MM were selected to test on growth stimulation of *Leucaena leucocephala* and *Combretum quadrangulare* seedlings. The seedlings were inoculated with a peat-vermiculite inoculum of the both selected strains. No significant difference ($P<0.05$) in shoot height, stem diameter, shoot and root dry weight on inoculated seedlings compared with non inoculated seedlings was observed after 6 months. No ectomycorrhizal formation was also observed. The results of ectomycorrhizal formation and growth stimulation in this study revealed that *P. portentosus* should not be ectomycorrhizal fungus.

Field of Study : BIOTECHNOLOGY Student's Signature Surachet Pattanapanitswat

Academic Year : 2008 Advisor's Signature Prakitsin Sihanonth

Co-Advisor's Signature Jittra Piapukiew

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยความช่วยเหลือของหลายฝ่าย ดังต่อไปนี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตรจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็นตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็นตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆ และความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่กรุณามาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ อาจารย์อนิวรรต เฉลิมพงษ์ ที่กรุณามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ คณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาพฤกษศาสตร์ ทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกต่างๆ

กราบขอบพระคุณบิดามารดา ตลอดจนครอบครัวของข้าพเจ้าที่ช่วยสนับสนุน ช่วยเก็บตัวอย่าง และให้กำลังใจตลอดมา

และท้ายที่สุด ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง และทุกท่านที่ให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

2.1 วิวัฒนาการและความหมายของความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา..... 3

2.2 ชนิดของราไมคอร์ไรซา..... 5

2.3 ชนิดและพืชอาศัยของราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 11

2.4 ลักษณะของรากพืชที่ติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 14

2.5 ประโยชน์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 15

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการติดเชื้อในรากพืชของไมคอร์ไรซา..... 17

2.7 หลักการคัดเลือกราไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อ..... 19

2.8 ลักษณะทั่วไปของเห็ด *Phaeogyroporus portentosus*..... 23

2.9 เอกสารที่เกี่ยวข้อง..... 24

3 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย..... 27

3.1 อุปกรณ์..... 27

3.2 สารเคมี..... 29

3.3 สำรวจและเก็บตัวอย่าง..... 31

3.4 แยกและเพาะเลี้ยงเส้นใยให้บริสุทธิ์..... 31

3.5 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ..... 31

3.6 คัดเลือกสายพันธุ์ราที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อทดสอบเอคโตไมคอร์ไรซา.. 35

หน้า

3.7 ทดสอบความสามารถในการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชทดสอบ..... 35
3.8 ทดสอบการกระตุ้นการเจริญกับกล้าไม้ทดสอบ..... 36
4 ผลการทดลอง..... 41
4.1 การสำรวจและการเก็บตัวอย่าง..... 41
4.2 การแยกและเพาะเลี้ยงเส้นใยให้บริสุทธิ์..... 43
4.3 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ..... 45
4.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ราที่เหมาะสม..... 48
4.5 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซา..... 53
4.6 การผลิตหัวเชื้อ..... 60
4.7 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาต่อการเจริญของกล้าไม้..... 60
5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 70
6 สรุปผลการทดลอง..... 76
รายการอ้างอิง..... 79
ภาคผนวก ก..... 88
ภาคผนวก ข..... 90
ภาคผนวก ค..... 92
ภาคผนวก ง..... 93
ภาคผนวก จ..... 110
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 121

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 9

2.2 พืชที่มีความสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 12

3.1 สาร ความเข้มข้นของสาร และปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 33

4.1 รา *P. portentosus* ที่สามารถแยกได้เส้นใยบริสุทธิ์..... 43

4.2 การเจริญของเส้นใยรา *P.portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN อายุ 4 สัปดาห์..... 49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ลำดับการวิวัฒนาการของพืชและหลักฐานฟอสซิลของความสัมพันธ์แบบต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ชนิดต่าง..... 4

2.2 รูปแบบการแตกแขนงของรากเอคโตไมคอร์ไรซา..... 14

2.3 ภาพตัดขวางของรากสนและพืชแองจิโอสเปิร์ม แสดงโครงสร้างต่างๆ ของเอคโตไมคอร์ไรซา..... 14

2.4 ลักษณะดอกเห็ดของ *Phaeogyroporus portentosus*..... 23

3.1 ลักษณะของเส้นใยรา *P. portentosus* ที่เจริญในวัสดุหัวเชื้อเวอร์มิคิวไลท์ ผสม peat moss บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน..... 37

4.1 ดอกเห็ด *Phaeogyroporus portentosus* ที่ขึ้นในสวนมะม่วง..... 40

4.2 ลักษณะเนื้อเยื่อของ *P. portentosus* ที่ฉีกขาดและไม่มีการเปลี่ยนสี..... 41

4.3 ลักษณะรูสร้างสปอร์ของ *P. portentosus* หลังจากปล่อยสปอร์..... 41

4.4 ลักษณะสปอร์ของ *P. portentosus* เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์..... 42

4.5 ลักษณะเส้นใยของ *P. portentosus* เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามี clamp connection เกิดขึ้น..... 42

4.6 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ตำแหน่ง ITS..... 46

4.7 แผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์ระหว่างรา *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ..... 47

4.8 ลักษณะการเจริญของ *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้เส้นใยบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN ระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 50

4.9 ลักษณะการเจริญของ *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้เส้นใยบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN ระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 51

4.10 ลักษณะการเจริญของ *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้เส้นใยบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN ระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 52

4.11 การเจริญของต้นกล้ากระถินร่วมกับเส้นใย *P. portentosus*..... 54

4.12 การเจริญของต้นกล้าแคร่วมกับเส้นใย *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2..... 55

4.13 การเจริญของต้นกล้าโสนร่วมกับเส้นใย *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2..... 57

4.14 การเจริญของต้นกล้ามะขามเทศร่วมกับเส้นใย *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2..... 58

ภาพที่ หน้า

4.15 การเจริญของต้นกล้าสะแกร่วมกับเส้นใย *P. portentosus*..... 59

4.16 อัตราการเจริญทางความสูงของลำต้นกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแก อายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อราสายพันธุ์ XK2 และ MM โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (เมื่อ CXK2 คือชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ XK2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ XK2 คือหัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 CMM คือชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ MM ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และ MM คือหัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ MM).. 61

4.17 การเจริญของกล้าไม้กระถิน อายุ 6 เดือน ในชุดการทดลองต่างๆ..... 62

4.18 การเจริญของกล้าไม้สะแก อายุ 6 เดือน ในชุดการทดลองต่างๆ..... 63

4.19 อัตราการเจริญทางเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้นกล้าไม้กระถิน และกล้าไม้สะแก อายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 และ MM โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (เมื่อ CXK2 คือชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ XK2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ XK2 คือหัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 CMM คือชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ MM ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และ MM คือหัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ MM)..... 64

4.20 อัตราการเจริญทางมวลชีวภาพส่วนเหนือดินของลำต้นกล้าไม้กระถิน และกล้าไม้สะแก อายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 และ MM โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (เมื่อ CXK2 คือชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ XK2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ XK2 คือหัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 CMM คือชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ MM ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และ MM คือหัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ MM)..... 65

4.21 อัตราการเจริญทางมวลชีวภาพส่วนใต้ดินของลำต้นกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแก อายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 และ MM โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (เมื่อ CXK2 คือชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ XK2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ XK2 คือหัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 CMM คือชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ MM ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และ MM คือหัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ MM)..... 66

ภาพที่ หน้า

4.22 อัตราการเจริญทางมวลชีวภาพรวมของลำต้นกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแก อายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 และ MM โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (เมื่อ CXK2 คือชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ XK2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ XK2 คือหัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 CMM คือชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ MM ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และ MM คือหัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ MM)..... 67

4.23 ภาพตัดขวางของรากกระถิน พบว่าไม่มีการสร้าง hartig net แต่มีเส้นใยราเจริญอยู่รอบๆ..... 69

4.24 ภาพตัดขวางของรากสะแก พบว่าไม่มีการสร้าง hartig net มีเพียงเส้นใยราเจริญอยู่รอบราก..... 69

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เนื่องจากจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เกิดความต้องการอาหาร ที่พักอาศัย น้ำ และพลังงานจำนวนมหาศาลจากทั่วโลก ทำให้ทรัพยากรธรรมชาติและป่าไม้ถูกทำลายอย่างมาก เพื่อนำมาแปรรูปและใช้เป็นที่เพาะปลูกอาหารให้กับมนุษย์ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาวะอากาศของโลกขึ้นและเกิดขึ้นทุกบริเวณทั่วโลกอย่างรวดเร็ว ไม่ว่าจะเป็นความแห้งแล้ง น้ำท่วม ภาวะอากาศแปรปรวนผิดปกติ การละลายของน้ำแข็งขั้วโลก คลื่นยักษ์สึนามิ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้มีผลกระทบกับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดแต่ปัญหาเหล่านี้อาจบรรเทาความรุนแรงให้ลดลงได้ วิธีการหนึ่งคือช่วยกันอนุรักษ์ทรัพยากรป่าไม้ ฟื้นฟูป่าที่เสื่อมโทรม (reforestation) และส่งเสริมให้มีการปลูกป่าทดแทน (afforestation) ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยความสัมพันธ์ของพืชและราในดินที่มีความสัมพันธ์กันแบบพึ่งพาอาศัยกันโดยต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง โดยเรียกความสัมพันธ์ระหว่างพืชและรานี้ว่า ไมคอร์ไรซา

ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) คือความสัมพันธ์ระหว่างรากับระบบรากของพืช ซึ่งเป็นการอาศัยอยู่ร่วมกันแบบต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ (symbiotic relationship) พืชจะได้รับน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตได้มากกว่าปกติ ส่วนราได้รับสารอาหาร เช่น แป้ง น้ำตาล โปรตีน และวิตามิน จากกระบวนการสังเคราะห์แสงและจากทางระบบรากของพืช โดยเส้นใยราจะทำหน้าที่เหมือนรากฝอยให้แก่พืช นอกจากนี้เส้นใยรายังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมแร่ธาตุของพืช ส่วนใหญ่ราเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นราชั้นสูงที่อยู่ในไฟลัม Basidiomycota และ Ascomycota ส่วนไมคอร์ไรซารูปแบบอื่นๆ มีทั้ง อาบัสคูลาเอนโดไมคอร์ไรซา ออร์คิดไมคอร์ไรซา เออริคอยด์ไมคอร์-ไรซา อาร์บูตอยด์ไมคอร์ไรซา โมโนโทรพอยด์ไมคอร์ไรซา และเอคเทนโดไมคอร์ไรซา (Brundrett และคณะ, 1996)

ปัจจุบันการทำเกษตรกรรมนิยมปลูกพืชแบบผสมผสาน โดยปลูกร่วมกันหลายๆ ชนิด และหากมีการส่งเสริมให้มีการใส่เชื้อไมคอร์ไรซาลงปลูกร่วมกับกล้าพืช จะเป็นการช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของพืชให้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ไมคอร์ไรซาบางชนิดยังสามารถสร้างดอกเห็ดที่กินได้และขายได้ราคาดีทำให้เกษตรกรมีรายได้เสริม โดยเฉพาะเห็ดตับเต่าดำเป็นเห็ดที่คนทั่วไปนิยมบริโภคอีกชนิดหนึ่ง พบกระจายทั่วประเทศ มีราคาสูง มีรายงานว่าพบใต้ต้นไม้ในสวนไม้ผลยืนต้นหลายชนิด ซึ่งเป็นเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีประโยชน์ต่อพืชอาศัย (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ, 2542) แต่ในบางงานทดลองได้รายงานว่าอาจเป็นราที่ก่อโรคพืช เนื่องจากทำให้พืชอาศัยแสดงอาการทรุดโทรม

และเกิดโรค (Visitpanich และคณะ, 2001) และยังไม่มีรายงานการศึกษาที่ยืนยันว่าเห็ดชนิดนี้เป็นเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีประโยชน์ต่อพืชอาศัยจริงหรือไม่ จึงควรทำการศึกษาวิจัยคัดเลือกสายพันธุ์ราไมคอร์ไรซาของเห็ดตับเต่าดำที่เหมาะสม และทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาของเห็ดตับเต่าดำร่วมกับศึกษาการกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้ เพื่อที่จะส่งเสริมให้แก่เกษตรกรนำเอคโต-ไมคอร์ไรซาชนิดนี้ไปใช้ปลูกร่วมกับพืชอื่นๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

คัดเลือกสายพันธุ์รา *Phaeogyroporus portentosus* (Berk & Broome) McNabb ที่มีประสิทธิภาพเหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อเพื่อสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาให้แก่พืชทดสอบ

ขั้นตอนการวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมเอกสารสำหรับการวิจัย
2. สำรวจและเก็บตัวอย่างของเห็ดตับเต่าดำ
3. แยกและเพาะเลี้ยงเส้นใยให้บริสุทธิ์
4. ตรวจสอบชนิดของเห็ดตับเต่าดำจากแหล่งต่างๆ
5. ทดสอบความสามารถในการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชทดสอบ
6. ทดสอบการกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้
7. วิเคราะห์ สรุปผล และเขียนวิทยานิพนธ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *P. portentosus* ที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อเพื่อสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาและกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้ให้แก่พืชทดสอบ

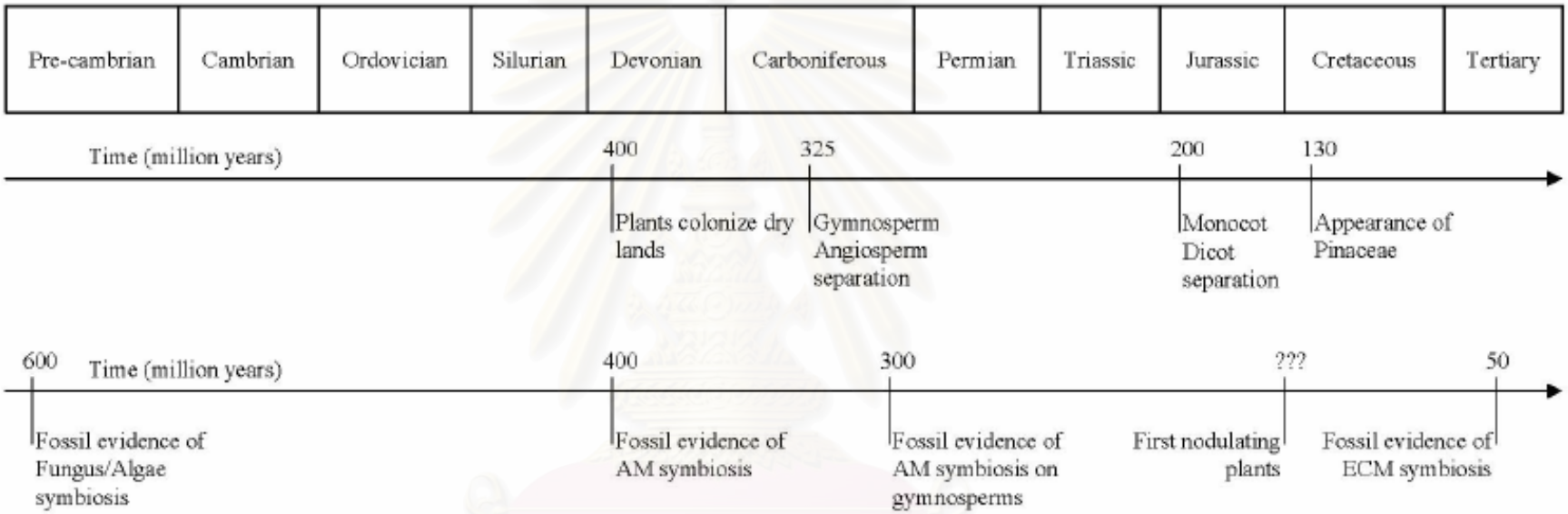
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไมคอร์ไรซา (mycorrhizal) มาจากภาษากรีกว่า mykes แปลว่า รา รวมกับ คำว่า rhiza แปลว่ารากา (Frank, 1885 อ้างถึงใน Bonfante-Fasolo, 1982) ผู้เชี่ยวชาญโรคป่าไม้วิทยาชาวเยอรมัน พบการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อราและรากของพืชชั้นสูง โดยรานั้นต้องไม่ใช่ราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ส่วนรากพืชต้องเป็นรากที่มีอายุน้อย (Jackson และ Masom, 1984) การอยู่ร่วมกันนี้เป็นความสัมพันธ์แบบต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ (symbiosis) พืชได้รับน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตจากรา ส่วนราได้รับสารอาหารจากพืชผ่านมาทางระบบราก เช่น แป้ง น้ำตาล โปรตีน กรดอะมิโนและวิตามิน โดยเชื้อราจะทำหน้าที่เหมือนเป็นรากฝอยให้แก่พืช เส้นใยของราส่วนที่แพร่กระจายอยู่ภายนอกรากและภายในรากจะเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมธาตุอาหารให้แก่พืช ทำให้พืชที่มีราไมคอร์ไรซาอยู่ที่รากจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าพืชที่ไม่มีราชนิดนี้ (Chilvers และคณะ, 1987) และยังพบว่าราไมคอร์ไรซาจะยับยั้งการเจริญของราที่เป็นก่อให้เกิดโรคพืช นอกจากนี้ยังป้องกันการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย และเพิ่มอัตราการอยู่รอดของกล้าไม้เมื่อปลูกลงแปลง

2.1 วิวัฒนาการและความหมายของความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา

หลักฐานฟอสซิลแสดงให้เห็นว่า ความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา ระหว่างรากพืชและเชื้อราในดินมีมานานกว่า 400 ล้านปีก่อน (Redecker, Kodner และ Graham, 2000; Taylor และคณะ, 1995) โดยความสัมพันธ์นี้เชื่อว่ามีความเก่าแก่ที่สุดในพืชบก และน่าจะเริ่มต้นในช่วงแรกของการเกิดพืชบนบกสปีชีส์แรก (ภาพที่ 2.1) เนื่องจากพืชและราจะวิวัฒนาการร่วมกันเพื่อปรับตัวให้เหมาะสมกับสิ่งแวดล้อมใหม่ ในช่วงยุค Carboniferous (ประมาณ 300 ล้านปีก่อน) หลักฐานฟอสซิลแสดงถึงการแยกกันระหว่างพืช gymnosperm และพืช angiosperm ออกจากบรรพบุรุษดั้งเดิม (Crane, Friis และ Pederson, 1995) ซึ่งเป็นยุคที่มีการพบหลักฐานที่เก่าแก่ที่สุดของเอนโดไมคอร์ไรซาที่เจริญร่วมกับพืช gymnosperm ส่วนฟอสซิลความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซาที่เก่าแก่ที่สุดที่มีการค้นพบมีอายุ 50 ล้านปี พบกับพืชในกลุ่ม Pinaceae (LePage และคณะ, 1997) แต่เมื่อพิจารณาจากหลักฐานฟอสซิลของพืชและลำดับของช่วงเวลาการเกิดพืชชนิดแรกในกลุ่ม Pinaceae (Axelrod, 1986) แล้วคาดว่าความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซาน่าจะมีมานานกว่า 100 ล้านปีแล้ว (Pirozynski และ Malloch, 1975; Taylor และ Osborn, 1996)



ภาพที่ 2.1 ภาพลำดับการวิวัฒนาการของพืชและหลักฐานฟอสซิลของความสัมพันธ์แบบต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ชนิดต่างๆ (Gregory, 2008)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 ชนิดของราไมคอร์ไรซา

เมื่ออาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของรา Harley และ Smith (1983) จำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซาได้เป็น 7 กลุ่มได้แก่ Ectomycorrhiza, Endomycorrhiza (Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza), Ectendomycorrhiza, Ericoid mycorrhiza, Arbutoid mycorrhiza, Monotropoid mycorrhiza และ orchid mycorrhiza

1. Ectomycorrhiza เป็นราที่สามารถสร้างใยรอบๆ รากพืชอัดกันแน่นเป็นแผ่นครอบคลุมผิวรากคล้ายกับเปลือกของรากอีกชั้นหนึ่งส่วนมากจะพบเป็น 2 ชั้น ซึ่งเรียกโครงสร้างนี้ว่า แผ่นแมนเทิล (mantle sheath) สีของเส้นใยอาจจะมีสีดำ ส้ม เหลือง น้ำตาล และไม่มีสีขึ้นอยู่กับชนิดของรา ในขณะเดียวกันเส้นใยของราบางส่วนจะเจริญเข้าไปภายในรากระหว่างเซลล์ (intercellular hyphae) เข้าสู่ชั้นคอร์เท็กซ์ เกิดลักษณะที่เป็นร่างแหเรียกว่า ฮาร์ติกเน็ท (Hartig net) พบในพืชประมาณ 2,000 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นไม้ป่า พืชอาศัยของเชื้อรามีประมาณ 10-20% ของพืชชั้นสูง ที่สำคัญได้แก่ไม้ในวงศ์สนเขา (Pinaceae) วงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae) วงศ์ไม้ยูคาลิปตัส (Myrtaceae) วงศ์ไม้มะค่าโมง (Caesalpinaceae) วงศ์ไม้ก่อ (Fagaceae) วงศ์ไม้กำลังเสือโคร่ง (Betulaceae) เป็นต้น (Newman และ Reddell, 1987; Sanmee และคณะ, 2003) พืชพวกจิมโนสเปิร์ม (gymnosperm) ได้แก่ พืชใน Cypressaceae ส่วนพืชพวกแองจิโอสเปิร์ม (angiosperm; มีเมล็ด) ที่เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้แก่ *Kobresia* sp. (วงศ์ Cyperaceae) *Festuca* sp. (วงศ์ Gramineae) และ *Euerpe* sp. (วงศ์ Palmae) ส่วนพืชใบเลี้ยงคู่ได้แก่วงศ์ Betulaceae และ Salicaceae (Kendrik, 1985) การอยู่ร่วมกันของเชื้อราพวกนี้ในรากพืชมีประโยชน์อย่างชัดเจนในแง่ที่ สามารถทำให้ต้นไม้นั้นได้รับธาตุอาหารพอเพียงที่จะทนทานต่อความแห้งแล้งได้ พันธุ์ไม้ชนิดหนึ่งอาจมีเชื้อราอาศัยอยู่หลายชนิด เช่น ในไม้สน (pine) ส่วนใหญ่จะมีราเอคโตไมคอร์ไรซาอยู่รวมกันตั้งแต่ 3 ชนิดขึ้นไป พบเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาประมาณ 5,000 ชนิด ส่วนใหญ่เจริญเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ในอาหารสังเคราะห์ มักพบการสร้างส่วนขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual fruitification) ในสภาพธรรมชาติ ส่วนใหญ่ราเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นราชั้นสูง (ตารางที่ 2.1) จัดจำแนกอยู่ในไฟลัม Basidiomycota Ascomycota และ Zygomycota (Harley และ Smith, 1983) ราชนิดนี้มักจะสร้างดอกเห็ดเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น *Lactarius* spp. *Pisolithus* spp. และ *Scleroderma* spp. เป็นต้น บางชนิดนิยมนำมารับประทาน เช่น *Amanita* spp. *Boletus* spp. และ *Russula* spp.

2. Endomycorrhiza หรือ Arbuscular Mycorrhiza (AM) หรือ Vesicular–Arbuscular Mycorrhiza (VAM) เป็นราไมคอร์ไรซาที่มีเส้นใยเจริญสานกันอยู่หลวมๆ รอบรากพืชและบางส่วนของเส้นใยเจริญเข้าไปในเซลล์ของรากพืช (intracellular) และอาจเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์

(intercellular) ของรากพืชในชั้นคอร์เท็กซ์ นอกจากเส้นใยในรากแล้วราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซานี้ยังสร้างโครงสร้างที่ไม่เหมือนราไมคอร์ไรซาแบบอื่นในเนื้อเยื่อราก 2 โครงสร้าง คือ เวสสิเคิล (vesicle) และอาบัสคูล (arbuscule) เส้นใยอาจขดเป็นวงในเซลล์รากหรืออาจจะมีการแตกแขนงแบบ dichotomous จนเกือบเต็มเซลล์ ทำให้มีลักษณะคล้ายกะหล่ำดอก หรือคล้ายต้นไม้อยู่ในเซลล์พืช เราเรียกโครงสร้างนั้นว่า อาบัสคูล โดยจะใช้เวลาในการเจริญประมาณ 4-5 วัน (Brundrett และคณะ. 1985) โครงสร้างอาบัสคูล นั้นเป็นโครงสร้างซึ่งราใช้สะสมแร่ธาตุอาหารโดยเฉพาะฟอสฟอรัส ซึ่งเมื่อพืชย่อยสลายโครงสร้างนี้ สารอาหารสามารถถ่ายเทไปให้กับพืชได้ การถ่ายเทสารอาหารนั้นอาจเกิดจากการแลกเปลี่ยนสารอาหารที่บริเวณผิวหน้าของราที่อาบัสคูลสัมผัสกับเซลล์ ราจะได้รับสารคาร์โบไฮเดรตจากพืช โครงสร้างอาบัสคูลนี้จะมีอายุประมาณ 4-15 วันก็จะสลายไป (Carling และ Brown, 1982) ในบางครั้งจะมีโครงสร้างซึ่งมีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ลักษณะคล้ายถุง ผนังหนา เกิดที่ปลายของเส้นใย (terminal) หรือตรงกลางเส้นใย (intercalary) ซึ่งโป่งบวมออกมา ภายในมีหยดไขมันสีเหลืองบรรจุอยู่ เป็นโครงสร้างที่ใช้ในการเก็บสะสมอาหารของรา เป็นโครงสร้างที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี เรียกโครงสร้างนี้ว่า เวสสิเคิล ในบางครั้งไม่พบเวสสิเคิลในราก จึงนิยมเรียกว่าราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา ราวีเอไมคอร์ไรซาจะไม่สร้างใยราที่อัดกันแน่นเป็นแผ่นรอบรากพืช แต่จะสร้างใยรานอกรากพืชเจริญต่อกันเป็นร่างแหแผ่ไปได้ในรัศมีหลายเมตรในดิน (Smith, 1980) พบว่าราวีเอไมคอร์ไรซาสามารถสร้างใยที่มีความยาวมากกว่า 1 เมตรได้ในขณะที่เจริญเข้าไปในรากได้เพียง 1 เซนติเมตรเท่านั้น เนื่องจากโครงสร้างทั้งสองนี้เป็นโครงสร้างที่ไม่พบในราชนิดใดๆ จึงทำให้ใช้โครงสร้างนี้ในการบ่งชี้ว่ามีราชนิดนี้เข้าไปอาศัยในพืชอาศัยหรือไม่ และรานี้สามารถเจริญร่วมกับพืชประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของพืชทั้งหมด มีทั้งพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ในทางป่าไม้แล้วราพวกนี้มีความสำคัญต่อพืชหลายชนิด ได้แก่ maples gums sycamore cotton-wood locust potars และ elms เป็นต้น รากของพืชที่มีราอาศัยร่วมอยู่ด้วยจะสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติและไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ

3. Ectendomycorrhiza เป็นราไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะอยู่ระหว่างราเอคโตไมคอร์ไรซาและราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา อาจพบเส้นใยของราเจริญเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ รอบๆ รากพืช หรือไม่พบเลย มีเส้นใยบางส่วนเจริญเข้าสู่เซลล์พืช แล้วขดเป็นวงอยู่ภายในเซลล์ เส้นใยราจะทำให้เซลล์พืชในชั้นคอร์เท็กซ์มีขนาดยาวขึ้น บางครั้งพบเส้นใยเจริญเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ในชั้นคอร์เท็กซ์และสร้าง Hartig net ราที่มีการดำรงชีวิตแบบนี้เส้นใยจะมีผนังกั้น มีสีเข้ม จัดอยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes และ Ascomycetes บางครั้งพบการสร้าง chlamydospore เกิดขึ้นบนเส้นใย มีผนังหนา โป่งบวมออก ไม่พบ conidia และโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นๆ ตัวอย่างราเอคเทน-

โดไมคอร์ไรซา ได้แก่ *Rhizoctonia sylvestris* และ *Phiolocephala dimorphospora* พืชอาศัยของเอคเทนโดไมคอร์ไรซา จะมีความคล้ายคลึงกับพืชอาศัยของราเอคโตไมคอร์ไรซา ซึ่งเป็นพืชในกลุ่ม Gymnospermae และ Angiospermae (Harley และ Smith, 1983) พบมากในรากของไม้สน (conifer) สปรูส (spruce) และ บีช (beech) ในแถบยุโรป โดยที่ราเอคเทนโดไมคอร์ไรซามักจะพบราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญขึ้นแทน

4. Ericoid mycorrhiza เป็นราไมคอร์ไรซาของพืชใน order Ericales ลักษณะสำคัญของ ericoid mycorrhiza คือ เส้นใยของราชนิดนี้จะมีผนังกั้น เป็นราในกลุ่ม Ascomycetes เช่น *Hymenoscyphus ericae* และ *Pezizella ericae* บางชนิดเป็นราในกลุ่ม Basidiomycetes เช่น Clavaria argillacea (Stoyke และ Currah, 1991) ราจะเจริญเข้าสู่เซลล์พืชแล้วม้วนขดเป็นวงอยู่ในเซลล์ของคอร์เท็กซ์ (Bonfante-Fasolo และ Gianinazzi-Pearson, 1982) ไม่สร้างแผ่นเส้นใยหรือ Hartig net พืชอาศัยเป็นไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้นขนาดเล็กใน order Ericales family Ericaceae family Epacridaceae และ family Empetraceae (Harley และ Smith, 1983) เป็นราไมคอร์ไรซาที่มีความสำคัญต่อพืชและระบบนิเวศน์เช่นเดียวกับราไมคอร์ไรซาชนิดอื่น แต่ที่สำคัญ คือ ericoid mycorrhiza มีบทบาทสำคัญมากสำหรับพืชที่ปลูกในดินที่มีความเป็นกรดสูง

5. Arbutoid mycorrhiza เป็นไมคอร์ไรซาของพืชใน order Ericales อีกชนิดหนึ่ง และเป็นพืชในสกุล *Arbutus Pyrola* และ *Arctostaphylos* โดยราที่อยู่ร่วมกับรากจะสร้างเส้นใยสานกันเป็นแผ่น ล้อมรอบราก ความหนาของแผ่นราขึ้นอยู่กับชนิดของราและพืชอาศัย บางครั้งอาจไม่พบแผ่นรารอบราก (Robertson และ Robertson, 1985) หลังจากนั้นเส้นใยบางส่วนเจริญเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ในชั้นคอร์เท็กซ์สร้าง Hartig net และมีเส้นใยเล็กๆ งอกแทงเข้าสู่เซลล์แล้วเจริญขดม้วนเป็นวงอยู่ภายในเซลล์ มักพบในไม้ยืนต้นและไม้พุ่ม (shrub) ที่โตเต็มที่แล้ว ซึ่งบางครั้งอาจจะมีความสัมพันธ์แบบ ectomycorrhiza หรือ ectendomycorrhiza กับพืชอาศัยชนิดอื่น (Molina และ Trappe, 1982) เช่น *Cortinarius zakii* ซึ่งเป็น arbutoid mycorrhiza กับ *Arbutus menziesii* และเป็น ectomycorrhiza กับ *Pseudotsuga douglasii* และกับ *Abies grandis* เป็นต้น (Zak, 1973)

6. Monotropoid mycorrhiza เป็นราไมคอร์ไรซาที่พบในพืช family Monotropaceae sub family Monotropoidae ซึ่งเป็นพืชที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ มีระบบรากเป็นรากแก้ว รากแขนงและรากฝอย บริเวณรากแขนงจะพบเส้นใยของราสานกันเป็นแผ่น หนา 2-3 ชั้น และมีเส้นใยสานกันเป็นตาข่ายล้อมรอบเซลล์ชั้นนอกสุดและชั้นคอร์เท็กซ์ของพืช (Robertson และ Robertson, 1982) เส้นใยนี้จะเชื่อมระหว่างรากของพืชใน subfamily Monotropoidae กับไม้ยืนต้น ได้แก่ สน เนื่องจากพืชอาศัยของ Monotropoid mycorrhiza ไม่สามารถสังเคราะห์แสงเองได้ Monotropoid

mycorrhiza จึงเป็นตัวถ่ายทอดสารอาหารจากไม้ยืนต้นไปยังพืชที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ พืชอาศัยที่มีการศึกษากันมาก คือ *Monotropa hypopytis*

7. Orchid mycorrhiza เป็นราไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่กับพืช family Orchidaceae พบในรากกล้วยไม้ชนิดต่างๆ รวมทั้งในเมล็ดกล้วยไม้ช่วงพัฒนาจากต้นอ่อนไปเป็นต้นกล้า (protocorm) ราไมคอร์ไรซาชนิดนี้แตกต่างจากราไมคอร์ไรซาชนิดอื่นๆ คือ แทนที่ราจะได้อาหารจากพืช รากลับเป็นฝ่ายให้อาหารกับกล้วยไม้เสียเอง เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก จึงมีอาหารสะสมไว้ภายในเมล็ดน้อย เมล็ดกล้วยไม้จะถูกกระตุ้นให้งอกก็ต่อเมื่อมีราไมคอร์ไรซาที่จำเพาะมาอยู่ด้วย ราไมคอร์ไรซาพวกนี้จะเจริญอยู่ในดินที่มีสารอินทรีย์ โดยสามารถย่อยสลายเซลลูโลสและลิกนินได้ ราไมคอร์ไรซาชนิดนี้มีความสำคัญในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ และให้สารอาหารที่ต้นกล้ากล้วยไม้ต้องการในการเจริญเติบโต เมื่อราไมคอร์ไรซาไปจับอยู่บนเมล็ดจะมีการงอกของเส้นใย เมล็ดกล้วยไม้จะดูดอาหารจากราไมคอร์ไรซาซึ่งเป็นน้ำตาลชนิดหนึ่ง คือ น้ำตาล Trehalose ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้งอก ราไมคอร์ไรซาจะให้สารอาหารกับ protocorm ซึ่งยังไม่มีคลอโรฟิลล์ (Hadley, 1982) ดังนั้นกล้วยไม้จึงต้องอาศัยอาหารจากราในช่วงแรกของการเจริญเติบโตจนกว่ากล้วยไม้จะสร้างคลอโรฟิลล์ได้เอง ข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างเส้นใยราและ protocorm ยังคงมีอยู่น้อยมากและไม่มีหลักฐานที่บ่งชี้ว่า protocorm สร้างสารที่ชักนำให้เส้นใยรายืดยาวออกมาหาเมล็ดกล้วยไม้ เมื่อราเข้าไปในเซลล์ parenchyma ของรากแล้ว เส้นใยจะม้วนเป็นวงเรียกว่า peloton หลังจากนั้นจะเกิดการแลกเปลี่ยนแร่ธาตุและอาหารกัน ระหว่าง peloton และโปรโตพลาสซึมของเซลล์พืช เชื้อรากลุ่มนี้ได้แก่ Rhizoctonia – like fungi ในระยะ perfect stage ที่เป็นพวก Tremellaceae และ Tulasnellaceae ซึ่งพึ่งพาอาศัยกับกล้วยไม้สีเขียว (green orchids) ส่วนเชื้อราพวก Basidiomycetes อาศัยอยู่รวมกับพืชพวก achlorophyllous orchids เช่น *Armillaria mellea* (Vahl) Kummer พบอยู่กับ Japanese orchid (*Gastrodia elata*) และ *Galeola septrionalis* ในบางครั้งราในกลุ่มนี้อาจมีความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซา เช่น *Rhizoctonia gardneri* กับพืช *Melaleuca uncinata* และ *Eucalyptus* sp. ในขณะที่ *Rhizoctonia* spp. และ *Armillaria mallea* เป็นราสาเหตุของโรคพืช แต่ไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชในวงศ์ Orchidaceae

ตารางที่ 2.1 ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา (Miller, 1982 และ Brundrette และคณะ, 1996)

Class	Order	Family	Genera
Hymenomycota	Agaricales	Amanitaceae	*Amanita, Limacella*
		Boletaceae	*Austroboletus, Boletellus, Boletochaete, Boletus, Buchwaldoboletus, Chalciporus, Fistulinella, Gyrodon, Gyroporus, Heimiella, Leccinum, Phlebopus, Phylloporus, Pulveroboletus, Suillus, Rubinoboletus, Tylopilus, Xanthoconium*
		Cortinariaceae	*Astrosporina, Cortinarius, Cuphocybe, Dermocybe, Descolea, Hebeloma, Inocybe, Leucocortinarius, Rozites, Stephanopus*, etc.
		Entolomataceae	*Clitopilus, Entoloma, Leptonia, Rhodocybe*
		Gomphidiaceae	*Chroogomphus, Cystogomphus, Gomphidius*
		Hygrophoraceae	*Bertrandia, Gliophorus, Camarophyllus, Hygrocybe, Humidicutis, Hygrophorus,* etc.
		Paxillaceae	*Paxillus*
		Strobilomycetaceae	*Strobilomyces*
		Tricholomataceae	*Clitocybe, Cystoderma, Cantharellula, Laccaria*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Class	Order	Family	Genera
	Aphyllophorales	Cantharellaceae	*Cantharellus,Craterellus*
		Clavariaceae	*Aphelaria, Clavaria, Clavariadelphus, Clavicorona, Clavulina, Clavulinopsis, Ramaria, Ramariopsis*
		Corticiaceae	*Amphinema, Byssocorticium, Byssosporia, Piloderma*
		Thelephoraceae	*Boletopsis, Thelephora*
	Guatieriales	Guatieriaceae	
	Hymenogastrales	Hydnangiaceae	
		Hymenogastraceae	
		Octavianinaceae	
		Rhizopogonaceae	
	Lycoperdales	Mesophelliaceae	*Lycoperdon*
	Melanogastrales	Leucogastraceae	*Leucogaster, Leucophleps*
		Melanogastraceae	*Melanogaster*
	Phallales	Hysterangiaceae	*Hysterangium, Pseudohysterangium, Trappea*
	Russulales	Elasmomycetaceae	*Elasmomyces,Gymnomyces, Martellia, Zelleromyces*
		Russulaceae	*Lactarius, Russula*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Class	Order	Family	Genera
	Sclerodermatales	Astraceae	*Astraeus*
		Sclorodermataceae	*Scleroderma, Horakiella*
Ascomycota	Eurotiales	Elaphomycetaceae	*Elaphomyces*
	Pezizales	Humariaceae	*Peziza*
	Tuberales	Eutuberaceae	
		Geneaceae	*Genea*
		Hydnotryaceae	
		Pseudotuberaceae	
		Terfeziaceae	*Pachyphoeus, Terferzia, Choiromyces*
Zygomycota	Mucorales	Endogonaceae	*Endogone, Sclerogone*

2.3 ชนิดและพืชอาศัยของราเอคโตไมคอร์ไรซา

มีการคำนวณว่าพืชประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ อาศัยอยู่ร่วมกับราไมคอร์ไรซา แม้จะจำแนกราไมคอร์ไรซาออกเป็น 7 กลุ่ม แต่กลุ่มที่มีความสำคัญและมีการแพร่กระจายมากที่สุดมี 2 กลุ่มด้วยกัน คือ ราเอคโตไมคอร์ไรซาและราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา โดยมีราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เจริญร่วมกับพืชประมาณ 2,000 ชนิด ในเขตภูมิอากาศต่างๆ ทั่วโลกทั้งในไม้ยืนต้นขนาดเล็กและขนาดใหญ่ เช่น ไม้วงศ์สนเขา (Pinaceae) ไม้วงศ์ก่อ (Fagaceae) ไม้วงศ์กำลังเสือโคร่ง (Betulaceae) ไม้วงศ์ยูคาลิปตัส (Myrtaceae) ไม้วงศ์วอลนัท (Jungrandaceae) และไม้วงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) ราเอคโตไมคอร์ไรซาจึงมีความสำคัญสามารถนำไปใช้เป็นหัวเชื้อให้กับพืชในโครงการปลูกป่าต่างๆ ส่วนราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาสามารถพบได้ทุกภูมิภาคของโลก ทั้งในเขตร้อน เขตอบอุ่นและเขตหนาว พบได้ในธรรมชาติและพื้นที่เกษตรกรรม อาศัยอยู่ร่วมกับพืชได้เกือบทุกชนิด ในระบบนิเวศน์ที่หลากหลาย เช่น ในป่าเขตร้อน ป่าโกงกาง ทุ่งหญ้า ทะเลทราย เป็นต้น พืชในกลุ่มที่มีท่อลำเลียงน้ำและอาหารประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ หรือประมาณ 3 แสนชนิด รวมทั้งพืชที่ไม่มีท่อลำเลียงน้ำและอาหาร พวก Bryophyte และ Pteridophyte พืชที่ไม่เคยมีการรายงานว่าพบราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา ได้แก่ พืชในตระกูล Pinaceae, Betulaceae, Orchidaceae, Fumanaceae, Commelinaceae, Urticaceae และ Ericaceae

โดยทั่วไปมักใช้รูปร่างลักษณะของดอกเห็ดในการจำแนกราเอคโตไมคอร์ไรซา ดอกเห็ดของราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดมีลักษณะเฉพาะทำให้สามารถจำแนกชนิดได้ง่าย แต่ดอกเห็ดจะขึ้นเฉพาะหน้าฝนเท่านั้น ในขณะที่ช่วงเวลาอื่นไม่สามารถศึกษาได้ นอกจากนี้ราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดก็ไม่สร้างดอกเห็ดหรือสร้างดอกเห็ดอยู่ใต้ดิน ซึ่งสามารถพบเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาได้ทั่วไปในเขตต่างๆ ของโลก เช่น เชื้อราในวงศ์ Gomphidiaceae และ Rhizopogonaceae เป็นที่ทราบกันดีว่าพบอยู่เขตเหนือเส้นศูนย์สูตรขึ้นมา ซึ่งอาศัยอยู่รวมกับพืชพวก conifers แต่เมื่อมีการขยายพื้นที่การปลูกสนกันมากขึ้น ก็เริ่มพบราพวกนี้ในซีกโลกใต้ด้วย เช่น พบรา *Rhizopogon roseolus* ในการปลูกสนของออสเตรเลีย เป็นต้น ต้นไม้ที่มีความสัมพันธ์กับราแบบเอคโตไมคอร์-ไรซาส่วนใหญ่มักเป็นไม้ยืนต้นและไม้พุ่ม (ตารางที่ 2.2) แต่ก็มีรายงานว่าเกิดกับไม้ล้มลุกพวกสมุนไพรอีกด้วย เช่น Kobresia (Cyperaceae) Polygonum (Polygonaceae) และ Cassiope (Ericaceae) ซึ่งพบในเขตเทือกเขาและเขตอาร์กติก (Kohn และ Stasovski, 1990; Massicotte และคณะ,1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพืชออสเตรเลียในวงศ์ Goodeniaceae Asteraceae และ Stylidiaceae ก็สามารถเกิดเอคโตไมคอร์ไรซาได้เช่นเดียวกัน (Kope และ Warcup, 1986)

ตารางที่ 2.2 พืชที่มีความสัมพันธ์กับราแบบเอคโตไมคอร์ไรซา (Alexander และ Hogberg, 1986 และ Harley และ Harley, 1987 และ Brundrett และคณะ,1996)

Family	Genera
Betulaceae	*Alnus, Betula, Carpinus, Ostrya, Ostryopsis*
Caesalpiniaceae	*Anthonotha, Afzelia, Berlinia, Brachystegia, Eperua, Gilbertiodendron, Instia, Isoberlinia, Julbernadia, Microberlinia, Monopetalanthus, tetraberlinia*
Casuarinaceae	*Allocasuarina (Cassuarina)*
	Helianthemum, Cistus, Tuberaria
Corylaceae	*Corylus*
Cyperaceae	*Kobresia* (herb)
Dipteracarpaceae	*Anisoptera, Dipterocarpus, Hopea, Marquesia, Monotes, Shorea, Vateria*
Ericaceae	*Cassiope*
Euphorbiaceae	*Marquesia, Uapaca, Ampera, Poranthera*

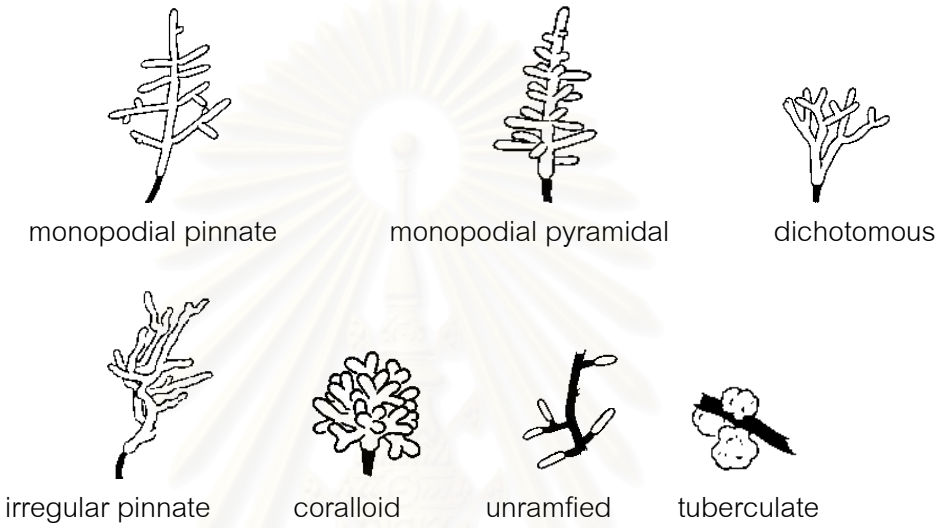
ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Family	Genera
Papilionaceae (Fabaceae)	*Gastrolobium, Gompholobium, Jacksonia, Mirbelia, Oxylobium, Pericopsis*
Fagaceae	*Castanea, Castanopsis, Fagus, Nothofagus, Quercus*
Gnetaceae	*Gnetum*
Meliaceae	*Owenia*
Mimosaceae	*Acacia*
Myrtaceae	*Allosyncarpia, Agonis, Angophora, Baeckea, Eucalyptus, Leptospermum, Melaleuca, Tristania*
Nyctaginaceae	*Neea, Pisonia*
Pinaceae	*Abies, Cathaya, Cedrus, Keteleeria, Larix, Picea, Pinus, Pseudolarix, Pseudotsuga, Tsuga*
Polygonaceae	*Polygonum*
Rhamnaceae	*Pomaderris, Trymalium*
Rosaceae	*Dryas*
Salicaceae	*Populus, Salix*
Tiliaceae	*Tilia*

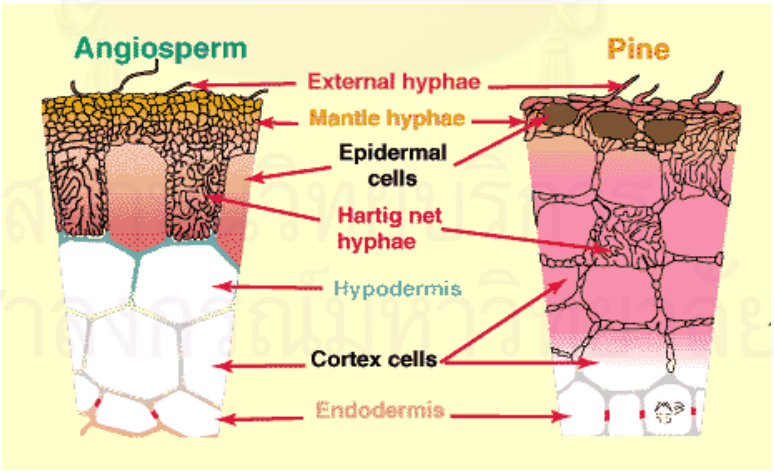
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 ลักษณะของรากพืชที่ติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

ลักษณะของรากพืชที่มีเอคโตไมคอร์ไรซา จะแตกต่างไปจากรากพืชปกติอย่างชัดเจน เช่น รูปร่าง สี ลักษณะของผิวราก รากพืชมีการแตกแขนงมากขึ้น รูปแบบการแตกแขนงและชื่อเรียกแสดงไว้ในภาพที่ 2.2 เส้นใยราจะพันแน่นรอบๆ รากเป็นแผ่นหนา บางส่วนจะเจริญเข้าไปภายในรากระหว่างเซลล์ กลายเป็นฮาร์ติกเน็ท (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.2 รูปแบบการแตกแขนงของรากเอคโตไมคอร์ไรซา (Durall และคณะ, 1996)



ภาพที่ 2.3 แสดงโครงสร้างต่างๆ ของเอคโตไมคอร์ไรซาในรากสนและพืชแองจิโอสเปิร์ม

2.5 ประโยชน์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา

ไมคอร์ไรซามีความสำคัญในแง่ของการเพิ่มผลผลิตให้แก่พืชเศรษฐกิจหลายชนิด รวมทั้งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตไม้ป่าและไม้ยืนต้นต่างๆ เช่น สน โอ๊ก และ ยูคาลิปตัส เป็นต้น มีการทดลองกันมากในหลายประเทศ เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์ของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในการปลูกป่า รวมทั้งการใช้เอนโดไมคอร์ไรซาในการเพิ่มผลผลิตของพืชหลายชนิด ในประเทศไทยมีการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้พอสมควร ทั้งเอคโตไมคอร์ไรซาและเอนโดไมคอร์ไรซา ส่วนใหญ่ได้ผลสรุปว่าพืชที่มีเชื้อราไมคอร์ไรซาจะมีการเจริญเติบโตดีกว่าพืชปกติ จึงอาจจะกล่าวได้ว่าสามารถนำเชื้อราไมคอร์ไรซามาใช้ร่วมกับพืชเพื่อเพิ่มผลผลิตของพืชให้สูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินที่มีปัญหาเกี่ยวกับการตรึงฟอสฟอรัส ดินที่ขาดฟอสฟอรัสหรือดินที่มีฟอสฟอรัสในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้ ไมคอร์ไรซาจะช่วยดูดฟอสฟอรัสมาให้นำไปใช้ได้ โดยการซึมผ่านจากเซลล์ของเชื้อราเข้าสู่เซลล์ของรากพืช และพืชนำเอาไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโตต่อไป ราเอคโตไมคอร์ไรซามีประโยชน์ต่อการดำรงชีพและการเจริญเติบโตของพืชได้หลายทางด้วยกันซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

เพิ่มอัตราการเจริญของพืช พืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอยู่ด้วย จะมีอัตราการเจริญสูงกว่าพืชที่ไม่มี รากพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและเส้นใยของราจะทำหน้าที่เหมือนรากฝอย โดยเส้นใยราสามารถแผ่ไปได้ไกลจึงสามารถดูดน้ำและอาหารจากแหล่งที่รากพืชไม่สามารถเจริญไปถึง ต้นยูคาลิปตัสที่ใส่หัวเชื้อ *Pisolithus* sp. และ *Scleroderma* sp. จะมีการเจริญดีกว่าต้นที่ไม่ใส่หัวเชื้อ (Dell และคณะ, 1994) ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถผลิตเอนไซม์ phosphatase ทำให้สามารถใช้ฟอสฟอรัสจากแหล่งฟอสฟอรัสที่ละลายได้ยาก เช่น KH_2PO_4, $Ca_3(PO_4)_2$ และ Fe-phytate ได้ (Mcheininney และ Mitchell, 1995) รวมถึงสร้างกรดอินทรีย์ออกมาย่อยสลาย iron และ aluminium phosphate และ rock phosphates (Griffths และคณะ, 1994) ฟอสฟอรัสที่พืชดูดซึมเข้าไปจะถูกสะสมอยู่ใน vacuole ของแผ่นแมนเทิล และใยฮาร์ติกเน็ทในรูปของ soluble orthophosphate (Harley และ Loughman, 1963) polyphosphate dispersed (Ashford และคณะ, 1999) หรือ polyphosphate granule (Ashford และคณะ, 1994) ขึ้นอยู่กับชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถสร้างฮอร์โมนหรือสารที่กระตุ้นการเจริญของพืชได้ *P. tinctorius* สามารถผลิต jasmonic acid (Miersch และคณะ, 1999) *T. terrestris* และ *L. bicolor* สร้าง cytokinin ได้ (Kraigher และคณะ, 1991) และสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลซึ่งไปขัดขวางการดูดซึมไนโตรเจนของพืช (Bending และ Read 1997)

ป้องกันราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชกับรากพืชที่อาศัยอยู่ได้ โดยที่แผ่นแมนเทิลรอบราก ทำหน้าที่ป้องกันการเจาะเข้ารากและยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค โดยสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งราและแบคทีเรียชนิดอื่นได้ Tsantrizos และคณะ (1991) พบว่า p-hydroxybenzoylformic acid [2-(4'-hydroxyphenyl)-2-oxoethanoic acid, pisolithin A] และ (R)-(-)-p-hydroxymandelic acid [(R)-(-)-2-(4'-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethanoic acid, pisolithin B] ที่สกัดได้จาก *P. tinctorius* สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืชและทำให้เส้นใยราโรคพืชสลายตัว Mortier และคณะ (1988) พบว่าต้นกล้า Douglas fir (spruce) ที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซา *L. laccata* สามารถป้องกันการเข้าทำลายของราโรคพืช *Fusarium oxysporum* ได้ดีกว่าต้นที่ไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซา

เพิ่มความทนทานของต้นไม้ต่อความเป็นพิษของดิน เช่น ความเป็นกรดและด่างที่ไม่เหมาะสมของดิน และโลหะหนัก ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถลดความเป็นพิษของดินและทำให้พืชมีความทนทานมากขึ้น *Pisolithus* spp. *S. cepa* และ *L. laccata* สามารถกระตุ้นการเจริญของยูคาลิปตัสเมื่อปลูกในดินที่มีความเป็นกรดสูงได้ Jones และ Hutchinson (1988) รายงานว่า *S. flavidum* สามารถกระตุ้นการเจริญของต้น Birch ได้ในดินที่มีการปนเปื้อนของนิเกิลปริมาณสูง

เกื้อหนุนแหล่งรับสารระหว่างรากพืชในระบบนิเวศน์ ราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดหนึ่งสามารถมีพืชอาศัยได้หลายชนิด เส้นใยราที่เชื่อมระหว่างพืช 2 ชนิด สามารถถ่ายทอดคาร์บอนจากต้นหนึ่งไปยังพืชต้นอื่นที่ขาดแคลนอาหาร ทำให้ต้นไม้ยังคงมีชีวิตรอดต่อไปได้ ช่วยให้ระบบนิเวศน์นั้นเกิดความเสถียรและมีความหลากหลายของพันธุ์พืช (Simard และคณะ, 1997)

ใช้เป็นสีย้อม ดอกเห็ดของราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถนำมาสกัดเป็นสีย้อมผ้าขนสัตว์ ผ้าไหมและผ้าฝ้ายได้ *Cortinarius semisanguineus* ให้สารสกัดสีแดงและชมพู *C. sanguineus* ให้สารสกัดสีแดงสด *C. alboviolaceus* ให้สารสกัดสีม่วง *C. zakii* ให้สารสกัดสีเหลือง *B. edulis* ให้สารสกัดสีส้ม นอกจากนี้ *Russula* sp. และ *Amanita muscaria* สามารถให้สีแดงและชมพู *Amanita caesarea* ให้สีเหลืองส้ม แต่ไม่ติดทนนานเหมือนสีที่ได้จาก *Cortinarius* spp. (Miriam, 1980)

เป็นอาหารของมนุษย์ ราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิดสามารถสร้างดอกเห็ดที่สามารถนำมารับประทานได้ เช่น *Morchella esculenta Tuber aestivum B. edulis* และ *Cortinellis*

shiitake ในประเทศไทยที่นิยมนำมารับประทานเช่น เห็ดเผาะ *(Astraeus hygrometricus*) เห็ดตับเต่าหรือเห็ดเสม็ด (*Boletus griseipurpureus*) เห็ดระโงกหรือเห็ดไข่ (*Amanita* sp.) และเห็ดตะไคลหรือเห็ดหล่มขาว (*Russula delica*) เป็นต้น *Agaricus blazei* Murill เป็นราเอคโตไมคอร์-ไรซาที่พบในประเทศบราซิล แต่ชาวญี่ปุ่น เกาหลีและจีน นิยมรับประทานเป็นอาหารเสริม เพราะเชื่อว่าสามารถป้องกันมะเร็งได้ ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดคอเรสเตอรอลและเพิ่มความยืดหยุ่นของผนังเส้นเลือดแดง

เป็นอาหารของสัตว์ ดอกเห็ดของราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิดเป็นอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็ก (Claridge และ May, 1994) เป็นที่อยู่และเป็นอาหารของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด (Fogel และ Peck, 1975; Rabatin และ Stinne, 1989) เส้นใยในดินเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของแมลงที่อาศัยอยู่ในดิน Ingham และ Massicotte (1994) ศึกษากลุ่มของสิ่งมีชีวิตในดินรอบๆ รากของ *Pinus ponderosa Pseudotsuga menziesii Picea sitchensis Tsuga heterophylla* และ *Abies grandis* ที่มีดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาขึ้น พบว่า โปรโตซัวอาศัยอยู่กับราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างจำเพาะเจาะจง

เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพสิ่งแวดล้อม (Bioindicator) ถ้าในป่ามีจำนวนราเอคโตไมคอร์ไรซาหลากหลายชนิดแสดงว่าเป็นป่าที่สมบูรณ์ แต่ถ้ามีไม่กี่ชนิดแสดงว่าเป็นป่าที่เสื่อมโทรมมีความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อมสูง Asbjornsen (1996) รายงานว่าป่าที่มีการบุกรุกมากจะพบส่วนขยายพันธุ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาจำนวน 200 ต่อดิน 1 กรัม ป่าที่ไม่มีการบุกรุกจะพบส่วนขยายพันธุ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาจำนวน 1000 ต่อดิน 1 กรัม และพบว่าจำนวนรากสนที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาในป่าที่ถูกบุกรุกมีจำนวนน้อยกว่าในป่าที่ไม่มีการบุกรุกมาก โดย Garcia และคณะ (1998) รายงานว่าถ้าในดินมีปริมาณตะกั่วมากกว่า 1 ppm จะพบดอกเห็ดที่เป็น Saprophite มากกว่าราเอคโตไมคอร์ไรซา

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการติดเชื้อในรากพืชของไมคอร์ไรซา

การเจริญและการติดเชื้อในรากพืชของราไมคอร์ไรซามีความเกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อมภายนอก หลายประการ

ปัจจัยที่มีผลต่อราเอคโตไมคอร์ไรซา

อุณหภูมิ อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการเจริญ การผลิตและกิจกรรมของเอนไซม์และการอยู่รอดของราเอคโตไมคอร์ไรซา (Tibbett และคณะ, 1998) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่อยู่ที่ 18-27 องศาเซลเซียส (Harley และ Smith,

1983) ต้นสนที่มี *P. tinctorius* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ขณะที่ถ้าไม่มีหรือมีราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่นก็จะเจริญช้าหรือตาย และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ต้นสนที่มี *P. tinctorius* ยังสามารถมีชีวิตรอดได้ (Marx, 2001) Domisch และคณะ (2002) ได้ทดลองหาผลของอุณหภูมิที่มีต่อราเอคโตไมคอร์ไรซาใน *Pinus sylvestris* L. พบว่า *Cenococcum geophilum* เจริญได้ดีในอุณหภูมิต่ำ คือที่ 5 และ 9 องศาเซลเซียส แต่จะมีจำนวนลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 13 และ 17 องศาเซลเซียส ในเขตที่ราบ tundra taiga และ alpine ส่วนมากอุณหภูมิจะต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส แต่ยังพบ *Hebeloma* spp. เนื่องจากสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ โดยการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเส้นใย เพื่อป้องกันการเป็นน้ำแข็งและผลิตเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิต่ำมากๆ (Tibbett และ Caieney, 1996)

ความชื้น จะพบราเอคโตไมคอร์ไรซาในดินที่มีความชื้นสูงจำนวนมากกว่าในดินที่มีความชื้นต่ำ (Lodge, 1989) *Scleroderma aurantium* จะทำให้เกิดการติดเชื้อใน *Pinus kesiya* ดีที่ความชื้น 30 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *Boletus edulis* จะทำให้เกิดการติดเชื้อใน *P. kesiya* ดีที่ความชื้น 55 เปอร์เซ็นต์ (Rajkumar และคณะ, 1990)

ความเป็นกรด-ด่าง ราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดหรือต่างสายพันธุ์กัน จะมีความสามารถในการเจริญและปรับตัวได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน พบว่าเมื่อปลูก *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake ร่วมกับราเอคโตไมคอร์ไรซา 3 ชนิด พบว่า *Pisolithus* spp. *Laccaria laccata* และ *Scleroderma cepa* สามารถกระตุ้นการเจริญได้เมื่อดินมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.6 แต่ที่ 4.6 เฉพาะ *Pisolithus* spp. เท่านั้นที่กระตุ้นการเจริญได้ (Aggangan และคณะ, 1996) Gerliz และ Gerliz (1997) ทดลองหาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการดูดซึมฟอสฟอรัสของ *Suillus bovines* ใน *Pinus sylvestris* ที่ความเป็นกรด-ด่าง 3.5-8.5 พบว่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ 5.5 ถ้าต่ำกว่าหรือสูงกว่านี้การดูดซึมฟอสฟอรัสจะลดลง

แหล่งคาร์บอน โดยทั่วไปราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด เช่น กลูโคส แมนโนส ฟรุคโตสและซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Rieger และคณะ, 1992) แต่อาจเจริญได้น้อยหรือไม่เจริญเมื่อใส่น้ำตาลชนิดอื่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *L. laccata Lactarius rufus Paxillus involutus* และ *Thelephora terrestris* ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า ราไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Sbrana และคณะ, 1995) Hutchison และ Piche (1995) พบว่า เมื่อเลี้ยงราเอคโตไมคอร์ไรซาร่วมกับต้นไม้ในภาวะปลอดเชื้อ ถ้ามีปริมาณกลูโคสต่ำกว่า 2 กรัมต่อลิตร ราเอคโตไมคอร์ไรซาจะเจริญช้าแต่ต้นไม้เจริญได้ดี แต่ถ้าเพิ่มกลูโคสเป็น 10 กรัมต่อ

ลิตร ราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญดีแต่ต้นไม้ไม่เจริญ เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซาผลิตสารที่ยับยั้งการเจริญของต้นไม้

ธาตุฟอสฟอรัส ถ้าในดินมีปริมาณฟอสฟอรัสสูง จะไปยับยั้งการเข้าสู่รากของราและทำให้เกิดการติดเชื้อในรากลดลง เนื่องจากผนังเซลล์รากมีความหนาเพิ่มขึ้น Mason และคณะ (1999) ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นฟอสฟอรัสต่อราไมคอร์ไรซาและการเจริญของ *Eucalyptus globulus* Labill เมื่อใส่หัวเชื้อเป็นราเอคโตไมคอร์ไรซา 10 ชนิด เมื่อให้ฟอสฟอรัสเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากจะลดลง

ธาตุไนโตรเจน ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถใช้ไนโตรเจนที่อยู่ในรูป NO_3^- NH_4^+ และกรดอะมิโนได้ เมื่อเลี้ยง *Hebeloma* sp. ในอาหารที่มี NH_4^+ และ/หรือ glutamic acid พบว่าถ้ามีแหล่งไนโตรเจน 2 แบบ *Hebeloma* sp. จะเจริญได้ดีที่สุด (Tibbett และคณะ, 1998) การใส่ปุ๋ยเป็นสารละลาย NH_4NO_3 ในระดับต่ำ กลางและสูง ใน Scots pine พบว่าการให้ปุ๋ยในระดับกลางทำให้เกิดการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาสูงสุด (Kainulainen และคณะ, 1996)

สารเคมีทางการเกษตร ยาฆ่ารามีผลต่อราเอคโตไมคอร์ไรซามากกว่ายาฆ่าหญ้า (Laatikainen และ Heinonen-Tanski, 2002) ยาฆ่ารามีผลต่อราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ copper oxychloride และ propiconazole ยับยั้งการเกิดเอคโตไมคอร์ไรซาใน Scots pine และราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เกิดขึ้นก็มีลักษณะต่างไปจากเดิม (Manninen และคณะ, 1998) *Hebeloma* spp. *Paxillus involutus* และ *Suillus bovinus* สามารถย่อย Chlorothalonil ให้เป็น ergosterol แต่ *Amanita muscaria* ไม่สามารถย่อยได้ นอกจากนี้ยังพบว่า maneb glyphosate และ terbuthylazine สามารถกระตุ้นการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดได้ (Laatikainen และ Heinonen-Tanski, 2002) ยาฆ่าแมลง fenvalerate ที่ความเข้มข้นต่ำจะกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *T. terrestris* ได้ แต่ที่ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเจริญ (Reddy และ Natarajan, 1994)

2.7 หลักการคัดเลือกราไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อ

ในธรรมชาติราเอคโตไมคอรไรซาที่มีความสัมพันธ์กับรากพืชมีหลายชนิด ราแต่ละชนิดจะมีผลต่อพืชอาศัยแตกต่างกัน การคัดเลือกชนิดของราหรือสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อให้กับพืชจึงเป็นเรื่องที่จำเป็น Trappe (1977) กล่าวว่า เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกชนิดของราเอค-โตไมคอร์ไรซา หรือสายพันธุ์ที่เหมาะสม จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับความต้องการ ซึ่งอาจจะ

พิจารณาได้จาก อัตราการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความสามารถในการดูดซึมธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ความทนทานต่อความเป็นพิษของดิน ความจำเพาะกับพืชอาศัย ความชื้น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง หรือความสามารถในการผลิตดอกเห็ดเพื่อใช้เป็นอาหาร

Marx และคณะ (1992) กล่าวว่า ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ได้รับคัดเลือกว่าเหมาะสมนั้นควรพิจารณาคุณสมบัติดังนี้ คือ

1. สามารถเกิดราเอคโตไมคอร์ไรซาจำนวนมากกับพืชที่ต้องการหรือกับพืชหลายชนิด
2. สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ
3. สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานในสภาพหัวเชื้อ
4. สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ได้

หัวเชื้อเส้นใยรา

ราส่วนใหญ่เจริญเติบโตช้าในห้องปฏิบัติการ ราบางชนิดไม่สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ บางชนิดเจริญอย่างช้าๆ บางชนิดอาจตายไปหลังจากการเลี้ยงเชื้อไปได้ไม่นาน ส่วนใหญ่แล้วการเจริญเติบโตต้องการสารบางชนิดกระตุ้นการเจริญเติบโตเช่น ไทอามีน (thiamine) และไบโอติน (biotin) รวมทั้งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ส่วนมากแล้วราจะไวต่อสารยับยั้งการเจริญเติบโต ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อราจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดที่ต้องพิจารณา ราพวกนี้มีความแตกต่างกันมาก จึงใช้ความแตกต่างเหล่านี้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกได้แก่

1. ความเฉพาะเจาะจงต่อพืช (host specificity) ราจำนวนมากอาศัยอยู่กับพืชชนิดต่างกันได้เป็นจำนวนมาก ราที่แข่งขันได้ดีกว่าก็สามารถสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชที่ต้องการได้ ถ้าสามารถอาศัยอยู่กับพืชได้มากชนิดกว่า ก็จะเป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพมากกว่า

2. ความแปรปรวนของเชื้อเนื่องมาจากการแข่งขันกันในธรรมชาติ ราจากพืชต่างชนิดและสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันอาจมีความแปรปรวนของเชื้อเกิดขึ้นได้ โดยมีการทดสอบโดยใช้รา *Rhizopogon luteolus*, *Pisolithus* sp. และ *Paxillus involutus* พบว่าเชื้อ *Pisolithus tinctorius* จากสนต่างชนิดและต่างพื้นที่กัน จะสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชได้หลายชนิด ได้แก่ *Pinus taeda* และ *Quercus rubra* แต่ราจากต้นโอ๊กต่างชนิดกันจะเกิดเอคโตไมคอร์ไรซาได้เล็กน้อยกับรากสน และโอ๊ค ราบางชนิดจากรากโอ๊คอาจไม่เกิดเอคโตไมคอร์ไรซากับทั้งสนและโอ๊คที่ต้องการก็เป็นได้

3. ความสามารถของราในการเจริญจากการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์และความทนทานในการย้ายเชื้อ วิธีการเลี้ยงเชื้อและชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงสามารถใช้แยกเชื้อที่ต้องการได้ ราที่ต้องการ

ควรมีการเจริญเติบโตได้รวดเร็ว มีขนาดของโคโลนีบนอาหารวุ้น 6 ถึง 8 เซนติเมตรภายใน 15 ถึง 20 วัน

4. การปรับตัวของราให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ปัญหาของดิน ภูมิอากาศ สิ่งมีชีวิตในดิน การใช้สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืช ความแตกต่างของกระจุกใยรา รวมทั้งการปรับเปลี่ยนอย่างฉับพลันจากดินในเรือนเพาะชำที่อุดมสมบูรณ์มีความชื้นเหมาะสม ไปสู่ดินในแปลงที่มีสภาพตรงกันข้ามเป็นความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นและเชื้อราต้องปรับตัวเข้าให้ได้

5. ความสามารถในการสร้างเส้นใยราและสเคอโรเตีย (sclerotia) ของรา การดูดกินอาหารต่างๆ และการส่งถ่ายสารประกอบคาร์บอนอินทรีย์ (organic carbon) ในราจะเกิดขึ้นโดยผ่านทางเส้นใยรา รวมทั้งการสร้างสเคอโรเตียของราบางชนิด เช่น *Pisolithus tinctorius* และ *Cenococcum geophilum* ในดินก็ใช้ความสามารถของราในการส่งเสริมความอยู่รอดในดินที่มีปัญหาได้

มีการผลิตหัวเชื้อที่เป็นเส้นใยราของราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดต่างๆ เพื่องานวิจัย ซึ่งต้องใช้ปริมาณของเส้นใยราเป็นจำนวนมาก การผลิตเฉพาะเพียงแต่ใช้ในงานวิจัยในภาชนะเล็กๆ ในกระถางหรือในเรือนทดลองอาจต้องผลิตเชื้อรามากถึง 30-40 ลิตร ในทางปฏิบัติอาจเป็นการยากที่จะผลิตหัวเชื้อที่เป็นเส้นใยราให้ได้ปริมาณมากและพอเพียงได้ ในหลายประเทศจึงมีการศึกษาวิจัยถึงการผลิตหัวเชื้อโดยใช้เส้นใยรานี้และได้รับความสำเร็จพอสมควร เช่น ออสเตรีย อาร์เจนตินา แคนาดา ออสเตรเลีย รวมทั้งสหรัฐอเมริกา วิธีการผลิตอาจแตกต่างกันไปบ้าง แต่หลักการส่วนใหญ่คล้ายกัน ในออสเตรเลียใช้ส่วนผสมของเวอร์มิคูไลต์ แกลบ และกากข้าวโพด ในสัดส่วน 10:2:1 แล้วทำให้ชื้นด้วยอาหารเหลว บรรจุลงขวดๆ ละ 80 กรัม สำหรับเลี้ยงเชื้อราที่ต้องการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส นาน 3 ถึง 4 สัปดาห์ กรณีนี้ใช้เลี้ยงเชื้อ *Rhizopogon lutelous Suillus granulatus S. luteus* และ *Cenococcum geophilum* โดย M. Moser นักวิทยาศาสตร์ชาวออสเตรียเป็นบุคคลแรกที่ได้พยายามหาวิธีการผลิตเส้นใยราของเอคโตไมคอร์ไรซา (Moser, 1963) โดยมีขั้นตอนการผลิตดังนี้

1. เลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ Moser's nutrient solution ในขวดรูปชมพู่ ไว้ระยะเวลาหนึ่ง

2. ถ่ายกลุ่มเส้นใยราลงในถังขนาด 10 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดเดิมบรรจุอยู่ ให้อากาศ 2 ถึง 3 ชั่วโมงต่อวัน เลี้ยงเชื้อในถังนี้เป็นเวลา 3 ถึง 4 เดือน

3. ถ่ายเส้นใยราลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 5 ลิตร ที่บรรจุพีทมอส (peat moss) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มเชื้อไว้ 2 ถึง 4 เดือน ในอุณหภูมิห้อง

4. บรรจุลงถุงพลาสติก แล้วควรใช้ภายใน 3 วัน

วิธีการนี้ M. Moser ใช้ผลิตเชื้อราได้หลายชนิดได้แก่ *Suillus placides* *S. gravillei* *S. aeruginasoens* *Paxillus involutus* *Phelegmacium glaucopus* *Amanita muscaria* และ *Lactarius porninsis* ต่อมาวิธีการของ Moser ก็ได้ถูกปรับปรุงให้เหมาะสมขึ้นอีก เช่น ใช้เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวสาลี และมิลเล็ตขาว (white millet) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติม $CaSO_4$ จำนวน 0.4 ถึง 0.5 กรัม ต่อเมล็ดธัญพืช 100 กรัม แล้วเลี้ยงเชื้อราในขวดขนาด 1 ลิตร ที่บรรจุอาหารดังกล่าว บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 ถึง 22 องศาเซลเซียส เขย่าเป็นระยะๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมล็ดธัญพืชจะมีเชื้อราเจริญเติบโตเต็มและสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ถึง 6 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 9 เดือน หลังจากนั้น ถ่ายเชื้อลงในพีทมอส ซึ่งเติมอาหารต่างๆ ที่มีไนโตรเจนและคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ ammonium tartrate, asparagines, soybean meal, blood meal, malt extract และกลูโคส โดยปกติใช้กลูโคส 7 ถึง 10 กรัมต่อลิตร ของพีทมอส บรรจุพีทมอส 10 ถึง 15 ลิตร ลงในถุงพลาสติก ปิดฝาด้วยจุกสำลี ใส่เชื้อจากเมล็ดธัญพืช 1 ถึง 3 ขวด เขย่าเป็นบางโอกาส ใช้เวลา 3 ถึง 6 สัปดาห์ก็สามารถนำไปใช้ได้

ในแคนาดา ใช้เมล็ดข้าวสาลี 5 กรัม แคลเซียมคาร์บอเนต 100 มิลลิกรัม น้ำ 8 มิลลิลิตร ผสมกันแล้วบรรจุลงในหลอดทดลองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใส่เชื้อราลงไป บ่มเชื้อไว้นาน 2 ถึง 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Park, 1971) การผลิตเชื้อให้ได้ปริมาณมากๆ นั้น ทำได้โดยแช่เมล็ดข้าวสาลีในน้ำ ต้มนาน 30 นาทีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ที่เหมาะสม เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 4 ถึง 5 กรัม ต่อ 100 กรัมของเมล็ด บ่มเชื้อไว้หลายสัปดาห์ จนกระทั่งสามารถนำไปใช้ได้

ปัจจุบันถือว่าส่วนผสมของ เวอร์มิคูไลต์ พีทมอส และอาหารเหลว MMN เหมาะที่จะใช้ผลิตใยราเอคโตไมคอร์ไรซามาก โดยใช้สัดส่วน เวอร์มิคูไลต์ต่อพีทมอส เท่ากับ 6 ต่อ 1 และอาหารเหลว MMN ประมาณ 1/2 ของน้ำหนักแห้งของเวอร์มิคูไลต์ และพีทมอสรวมกัน

การผลิตหัวเชื้อเส้นใยราเชื้อ *Pisolithus tinc*torius โดย USDA ใช้ชื่อการค้าว่า MycoRhiz (Marx และ Kenny, 1982) มีกรรมวิธีการผลิตโดยเลี้ยงเส้นใยราในอาหารเหลว MMN ที่บรรจุในถังหมักขนาด 14 ลิตร ก่อนที่จะถ่ายลงในถังหมักขนาดใหญ่ที่บรรจุอาหารเหลวกับเวอร์มิคูไลต์ ซึ่งใช้ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง มีการให้อากาศในอัตราสูงตลอดเวลา เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ถึง 32 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน ในถังหมักแรก ส่วนในถังหมักใหญ่ที่บรรจุสารผสมซึ่งประกอบด้วยเวอร์มิคูไลต์ พีท และ MMN นั้นฆ่าเชื้อโดยการฉีดไอน้ำร้อนแรงดันสูงเข้าไปจากใต้ถังและรอบๆ หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อจากถังหมักแรกประมาณ 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ลงในถังหมักขนาดใหญ่ ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้นาน 1 ถึง 4 สัปดาห์ การเก็บเกี่ยวเส้นใยราทำได้โดยการนำไปลอยในน้ำและการกรอง ซึ่งจะเป็นการล้างไปด้วยแล้วทำให้แห้งโดยเครื่องมือ aeromatic fluid bed

dryer ให้มีความชื้นอยู่ที่ระดับ 20 ถึง 25 เปอร์เซ็นต์ โดยปกติแล้ว MycoRhiz จะมีความหนาแน่นรวม 240 ถึง 310 กรัม ต่อลิตร pH 5.1 ถึง 5.6 ขนาดบรรจุ 50 กิโลกรัม เก็บที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 5 ถึง 6 สัปดาห์โดยไม่เสื่อมสภาพ การผลิตโดยวิธีนี้จะได้ MycoRhiz ในปริมาณที่มากพอต่อการใช้กับกล้าไม้ในเรือนทดลอง และแปลงปลูกพืชทดลองแปลงใหญ่ๆ ได้

2.8 ลักษณะทั่วไปของเห็ด *Phaeogyroporus portentosus*

kingdom: **Fungi**

phylum: **Basidiomycota**

class: **Agaricomycotina**

order: **Boletales**

family: **Boletinellaceae**

genus: ***Phaeogyroporus***

species: ***Phaeogyroporus portentosus***

ภาพที่ 2.4 ลักษณะดอกเห็ดของ *Phaeogyroporus portentosus*

เห็ดตับเต่าดำ หรือเห็ดห้า (ภาคเหนือ) หรือเห็ดผึ้ง (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) เป็นที่นิยมบริโภคกันมากแทบทุกภาคของไทย เห็ดตับเต่าดำตามธรรมชาติพบช่วงฤดูฝนบริเวณป่าธรรมชาติ โดยเฉพาะในบริเวณป่าเต็งรังหรือป่าแดง ป่าแพะ ป่าสะแก และในสวนไม้ผลยืนต้น เช่น สวน

มะม่วง มะไฟ ลำไย สวนไม้ผลที่มีต้นทองหลาง กระถินยักษ์ กระถินเทพา ฯลฯ โดยเห็ดตับเต่าจะขึ้นอยู่ใต้ร่มของต้นไม้ และเชื่อว่าสามารถสร้างไมคอร์ไรซาในพืชเหล่านี้ (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ, 2546)

เห็ดตับเต่าดำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phaeogyroporus portentosus* (Berk & Broome) McNabb จัดจำแนกอยู่ในไฟลัม Basidiomycota ลำดับ Boletales และวงศ์ Boletinellaceae เป็นเห็ดที่มีผิวดอกสีดำ มีขนละเอียดคล้ายเขม่าสีเทาดำ ขอบบางและอ่อนนุ่มคล้ายฟองน้ำ เนื้อหนา ด้านล่างมีรูเป็นเหลี่ยมเกือบกลม สีเหลืองแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 2.4) รูยึดติดกับก้านหรือเรียงลงไปติดกับก้าน ก้านยาว 8-15 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-6 เซนติเมตร โคนใหญ่เป็นรูปใบพายสีดำ ดำอมน้ำตาล สปอร์รูปกลมถึงรี สีน้ำตาลอ่อนอมชมพูขนาด 4-4.5 x 8-10 ไมโครเมตร ปัจจุบันถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) Boedijn

2.9 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

วสันต์ และคณะ (2542) ได้สำรวจ เก็บตัวอย่างและรวบรวม เห็ดในพื้นที่บริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา และพื้นที่ใกล้เคียง เก็บตัวอย่างเห็ดทั้งหมดจำนวน 980 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้ 354 ชนิด เมื่อทำการจัดหมวดหมู่โดยใช้หลักเกณฑ์ของ Hawksworth และคณะ (1995) พบว่าอยู่ใน 3 ชั้น 30 อันดับ 67 วงศ์ และ 140 สกุล ที่พบมากคือ *Agaricus* (14 ชนิด) และ *Lepiota* (12 ชนิด) เป็นต้น มีเห็ดหลายชนิดที่พบเพียงครั้งเดียวตลอดระยะเวลาที่ศึกษาและไม่เคยมีรายงานการพบในประเทศไทยมาก่อน ได้แก่ *Boedijnopeziza insitiata Gyrodon merulioides Gomphus* sp. *Calostoma* sp. *Simblum* sp. *Mutinus ravenelii* และ *Tylostoma* sp. เป็นต้น จากการสอบถามชาวบ้านในบริเวณใกล้เคียงในการนำเห็ดมาใช้ประโยชน์ พบว่ามีเพียงบางชนิดที่นำมารับประทาน ที่นิยมและรู้จักกันแพร่หลายในภาคใต้ ได้แก่ เห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) เห็ดโคน (*Termitomyces heimil*) เห็ดจู (*T. clypeatus*) เห็ดนมหมู (*T. globulus*) เห็ดตับเต่า (*Phlebopus colossus*) เห็ดเสม็ด (*Tylopilus subrobrunneus*) และเห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus*) เป็นต้น

ยุพา (2544) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาของเห็ดหนามและเห็ดมะม่วง *Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) Boedijn กับต้นไมยราพยักษ์ มะขาม และลำไย โดยใส่เชื้อเห็ดหนามและเห็ดมะม่วงให้กับพืชที่เพาะไว้อายุ 2 สัปดาห์ เมื่อใส่เชื้อได้ 1 เดือน พบว่าต้นไมยราพยักษ์ ต้นมะขาม และต้นลำไยเจริญได้ดีและเมื่อนำรากพืชไปตัดขวางตรวจสอบ พบว่าเส้นใยเห็ดหนามและเห็ดมะม่วงเจริญเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชชั้น cortex

ออมทรัพย์ นพอมรบดี (2542) ได้ทำการสำรวจ และรวบรวมเห็ดราเอคโตไมคอร์ไรซาตามจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย สามารถรวบรวมเห็ดที่เป็นเอคโตไมคอร์ไรซาของไม้โตเร็วและไม้ผลได้ 200 ชนิด นำมาแยกเชื้อและเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ 36 สายพันธุ์ นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาทดสอบการเกิดเอคโตไมคอร์ไรซากับกล้าพืชจำนวน 12 ชนิด เป็นไม้โตเร็ว 6 ชนิด และไม้ผล 6 ชนิด พบว่ามีเชื้อเห็ด 21 สายพันธุ์ ที่เกิดลักษณะเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชทดสอบ ซึ่งเป็นเห็ดจำพวกตับเต่า (*Boletus*) 6 สายพันธุ์ เห็ดปะการัง (*Ramaria*) 1 สายพันธุ์ เห็ดไข่ขาว (*Amanita*) 1 สายพันธุ์ เห็ดถ่าน (*Russula*) 1 สายพันธุ์ เห็ดไข่หงส์ (*Scleroderma*) 3 สายพันธุ์ และที่ยังไม่ทราบชื่ออีก 9 สายพันธุ์ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตด้านความสูงของต้นกล้าที่ปลูกเชื้อมากกว่าต้นกล้าที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ

Giovannetti และคณะ (1989) ได้ทำการศึกษาสถานะความเป็นพืชอาศัยไมคอร์ไรซาของ *Arbutus unedo* L. และติดตามการพัฒนาของไมคอร์ไรซาในระยะต้นของการเจริญของพืช พบว่ามีราเอคเทนโดไมคอร์ไรซา 2 ชนิด มาอาศัยอยู่ เมื่อใส่เชื้อ *Hymenoscypus ericae* ให้กับ *A. unedo* พบว่ารากของ *A. unedo* แสดงอาการแคระแกร็นและเปลี่ยนเป็นสีดำเหมือนกับที่ Malajczuk และคณะ (1982) รายงานเกี่ยวกับความเข้ากันไม่ได้ของราก *Eucalyptus* sp. ที่ใส่เชื้อเอคโตไมคอร์ไรซาที่ไม่เหมาะสม และเมื่อใส่เชื้อเอนโดไมคอร์ไรซาให้แก่ *A. unedo* พบว่ามีเพียงรากที่ใส่เชื้อ *Glomulus microcarpum* ที่แสดงอาการติดเชื้อ แต่รากจะแคระแกร็นและตายภายใน 2 เดือน

Thoen และ Ducousso (1989) ได้ทำการศึกษาการเกิดไมคอร์ไรซาและสเคอโรเตียของเห็ด *Phlebopus sudanicus* พบว่าเป็นเห็ดกลุ่มโบลีทส์ในเขตร้อนชนิดแรกที่มีการสร้างสเคอโรเตียในการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งสเคอโรเตียจะผลิตของเหลวหยดเล็กๆ จำนวนมากเหมือนกับที่พบใน *Sclerotium rolfsii* Sacc. โดยสเคอโรเตียของ *P. sudanicus* มีลักษณะเป็นชั้นๆ ชั้นนอกแข็งแรงและหนา ภายในเป็นแหล่งสะสมพลังงาน ซึ่งสเคอโรเตียนี้สามารถอยู่รอดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมได้นานถึง 4 เดือน นอกจากนี้ยังพบว่าไม่เกิดไมคอร์ไรซากับพืชท้องถิ่นพวก *Acacia* sp. แต่เกิดเอคโตไมคอร์ไรซากับ *Acacia* sp. บางชนิดของประเทศออสเตรเลีย

Visitpanich และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาสาเหตุการเกิดโรคหงอย อาการพุ่มแจ้ และอาการตายเฉียบพลันของลำไย พบว่าการมีเห็ดห้าขึ้นบริเวณทรงพุ่มอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ต้นลำไยแสดงอาการยืนต้นตายเฉียบพลัน เมื่อทำการจำแนกชนิดของเห็ดที่พบขึ้นกับต้นลำไยแล้วมี 2 ชนิด คือเห็ดห้า *Phlebopus portentosus* และเห็ดลำไย *Boletus dimocarpicola*

Walting (2001) ได้ศึกษาความสัมพันธ์และความเป็นไปได้ของรูปแบบในการกระจายตัวของแหล่งอาศัยของเห็ดในกลุ่มโบลีทส์ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่าเห็ด *Phlebopus*

portentosus ที่บางครั้งเรียกว่า *Phaeogyroporus* ซึ่งเคยถูกเข้าใจผิดว่าเกี่ยวข้องกับ *Gyroporus* นั้นมีการพบกระจายอยู่เป็นบริเวณกว้างทั้งใน ศรีลังกา อินโดนีเซีย รวมถึง ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ ซึ่งยังมีข้อถกเถียงในความเป็นไปได้ของการกระจายตัวในพื้นที่ที่กว้างขนาดนั้น

Seehanan และคณะ (2007) ได้ทำการเก็บรวบรวมและจำแนกชนิดเห็ดโบลีทส์บางชนิดในภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ และใต้ของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2538-2548 สามารถเก็บรวบรวมและจำแนกชนิดเห็ดโบลีทส์ได้ 20 ชนิด โดย 11 ชนิด พบในตลาดท้องถิ่น และบริโภคโดยประชนในพื้นที่ ได้แก่ เห็ดผึ้งชาติ (*Boletus ananus* และ *B. emodensis*) เห็ดผึ้งคราม (*Boletus* sp.) เห็ดผึ้งจองงอง (*Boleintus* sp.) เห็ดเสม็ด (*Boletus griseipurpureus*) เห็ดผึ้งไข่ (*Boletus* sp.1) เห็ดผึ้งฝ้าย (*Boletus* sp.2) เห็ดผึ้งขาแดง (*Heimiella retispora*) เห็ดตับเต่าดำ (*Phlebopus colossus*) เห็ดผึ้งผ้าอ้อม (*Pulveroboletus ravenelii*) และเห็ดผึ้งหวาน (*Pulveroboletus* sp.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) บริษัท Barnstead, U.S.A.
- เครื่องชั่งแบบละเอียด (digital scale) บริษัท Sartorius, Germany
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave) บริษัท Ta Chang Medical Instrument, Taiwan
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) บริษัท Lab service Ltd., Part.
- ตู้อบ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Jebsen and Jessen, Germany
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา (compound microscope) รุ่น BX51 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- กล้องสเตอริโอ (stereoscope) รุ่น SZ60 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (micro refrigerated centrifuge) รุ่น 3700 บริษัท Kubota Corporation, Tokyo Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น CM-610T บริษัท Hslangtai
- เครื่องกำเนิดรังสีอัลตราไวโอเลต (UV – transilluminator) รุ่น TM-10E
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (authorized thermal cycler) รุ่น TP 600 บริษัท TaKaRa
- เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า (electrophoresis chamber set) รุ่น Mupid-ex บริษัท Avance
- เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) รุ่น VX-100 บริษัท Labnet International, Inc.
- เครื่อง Digital dry bath บริษัท Labnet International, Inc.

- ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) -20 องศาเซลเซียส บริษัท Sharp
- ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส บริษัท Sanyo
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ บริษัท Phillips
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Twin pH meter B-212 บริษัท Horiba, Japan
- โถดูดความชื้น (desicator)
- หลอดทดลอง (test tube) บริษัท Pyrex, USA
- หลอดฝาเกลียว (screw cap) บริษัท Pyrex, USA
- กระบอกตวง (cylinder) บริษัท Pyrex, USA
- ขวดรูปชมพู่ (flask) บริษัท Scott Duran, Germany
- ขวดฝาเกลียว (vial) บริษัท Pyrex, USA
- ไมโครปิเปตต์ (automatic adjustable micropipette) P2 (0.1-2 ไมโครลิตร) P20 (5-20 ไมโครลิตร) P200 (20-200 ไมโครลิตร) P1000 (0.1-1 มิลลิลิตร) บริษัท Gilson, France
- ปิเปตต์ทิป (pipette tip) บริษัท Axygen Scientific Inc., USA
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific Inc., USA
- หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร บริษัท Axygen Scientific Inc., USA
- จานอาหารเลี้ยงเชื้อแก้ว (petridish) บริษัท Pyrex, USA
- จานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก (plastic petridish) บริษัท Greiner bio-one Gmbh, Austria
- เครื่องเจาะชิ้นวุ้น (cork borer) เบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- พาราฟิล์ม บริษัท Whatman, England
- วัสดุปลูก กระถางต้นไม้พลาสติก ถาดเพาะเมล็ดพลาสติก ดินพรุ ทราย เวอร์มิคิวไลท์
- วัสดุอื่นๆ ได้แก่ กระดาษฟอยล์ เข็มเขี่ยเชื้อ ผ้าขาวบาง สำลี กระดาษกรอง

3.2 สารเคมี

- 2-Mercaptoethanol บริษัท Sigma, USA
- 2-Propanol (CH_3CHOH) บริษัท Lab scan, Ireland
- Agar
- Agarose บริษัท Sigma, USA
- Ammonium nitrate (NH_4NO_3) บริษัท Merck, Germany
- Ammonium phosphate ($(NH_4)_2HPO_4$) บริษัท Merck, Germany
- Boric acid (H_3BO_3) บริษัท Merck, Germany
- Calcium chloride ($CaCl_2$) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- Chloroform บริษัท Labscan, Thailand
- Copper (II) sulphate ($CuSO_4.5H_2O$) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromide) บริษัท Merck, Germany
- EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) บริษัท Merck, Germany
- Ethanol บริษัท Lab scan, Ireland
- Feric chloride ($FeCl_3$) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- Glucose

- Glutaraldehyde
- Hydrogen peroxide (H_2O_2) บริษัท Merck, Germany
- Lactophenol cotton blue บริษัท Sigma, USA
- Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
- Malt extract บริษัท Difco, USA
- Manganese chloride ($MnCl_2.4H_2O$) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- Methylene blue บริษัท Fluka, Switzerland
- PEG (Polyethylene glycol) บริษัท Fluka, Switzerland
- Potassium chloride (KCl) บริษัท Merck, Germany
- Potassium hydroxide (KOH) บริษัท Merck, Germany
- Potassium phosphate (KH_2PO_4) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- Sodium chloride (NaCl) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- Sodium hydroxide (NaOH) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- Sulfuric acid (conc. H_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
- SYBR Safe DNA gel stain บริษัท Invitrogen, USA
- Thiamine-HCl บริษัท May and Baker, England
- tris-HCl บริษัท Scharlau, Spain
- Zinc sulphate ($ZnSO_4.7H_2O$) บริษัท May and Baker, England

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 สำรวจและเก็บตัวอย่าง

สำรวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ด *Phaeogyroporus portentosus* จากแหล่งต่างๆ ตามธรรมชาติ ระหว่างช่วงฤดูฝนของแต่ละปี ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม พ.ศ. 2549 ถึง พ.ศ. 2551 เลือกดอกเห็ดอ่อนที่สมบูรณ์มาตัดชิ้นเนื้อเยื่อเห็ดบริเวณก้านดอก แล้วเก็บในซิลิกาเจลเพื่อทำให้แห้ง โดยเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.4 แยกและเพาะเลี้ยงเส้นใยให้บริสุทธิ์

แยกเส้นใยจากเนื้อเยื่อดอกเห็ด *P. portentosus* ที่เก็บจากข้อ 3.3 ให้ได้เส้นใยที่บริสุทธิ์โดยวิธีปลอดเชื้อ ทำโดยเลือกดอกเห็ดที่มีสภาพสมบูรณ์ ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเนื้อเยื่อที่อยู่ภายในดอกเห็ด นำไปวางเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Modified Melin-Norkrans (MMN) (Molina และ Palmer, 1982) (ภาคผนวก ก) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 สัปดาห์ จากนั้นทำการ subculture จนกระทั่งได้เส้นใยราที่บริสุทธิ์ ตรวจยืนยันความบริสุทธิ์ของเส้นใยที่แยกได้ โดยเขี่ยเส้นใยราวางลงบนแผ่นสไลด์ ย้อมด้วย Lactophenol cotton blue ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ต่าง ๆ

3.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ใส่ตัวอย่างแห้ง *P. portentosus* ประมาณ 20 มิลลิกรัม และเม็ดบีดส์ 3-4 เม็ด ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บดด้วยเครื่องบดตัวอย่างจนละเอียด เติมสารละลาย washing buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ถ่ายส่วนผสมลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อล้างตัวอย่าง ทำซ้ำจนกว่าของเหลวส่วนบนจะใส นำหลอดที่มีตะกอนอยู่มาเติมสารละลาย 2X CTAB (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เติมสารละลาย chloroform / isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1

(ภาคผนวก ข) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมสารละลาย chloroform / isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร อีกครั้งแล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย polyethylene glycol ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนของดีเอ็นเอ เติมเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.5.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของรา *Phaeogyroporus portentosus* ที่ประมวลรหัสของยีนที่ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ ดังนี้

ITS1 (5’ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3’) (White และคณะ, 1990)

ITS4 (5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3’) (White และคณะ, 1990)

นำดีเอ็นเอของ *P. portentosus* ที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สาร ความเข้มข้นของสาร และปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X PCR buffer without $MgCl_2$	1x	1.0
2 mM dNTP mix	0.2 mM	1.0
25 mM $MgCl_2$	2.5mM	0.6
20 µM primer ITS1	2.0 µM	0.5
20 µM primer ITS4	2.0 µM	0.5
5 units/µl *Taq* DNA polymerase	0.05 units/µl	0.1
DNA template	-	2.0
Sterilized distilled water	-	4.3
ปริมาตรรวม		10

ทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยทำในเครื่อง thermocycler ซึ่งมีสภาวะในการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

Initial denaturation	94	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Amplification				
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	1 นาที	38 รอบ
Annealing	55	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72	องศาเซลเซียส	5 นาที	
Holding	4	องศาเซลเซียส		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส (electrophoresis) บน 1.5 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล (ภาคผนวก ข) ที่เติม SYBR gel stain ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ต่ออะกาโรสเจล 50 มิลลิลิตร ใน 0.5X TBE buffer (ภาคผนวก ข) โดยผสม PCR product กับ tracking dye ในอัตราส่วน 5:2 หยอดตัวอย่างลงในหลุมอะกาโรสเจลที่แข็งตัวดีแล้ว จากนั้นนำไปทำอิเลคโตรโฟริซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที และมีดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder เป็นแถวเปรียบเทียบกับขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มจำนวนแล้ว นำแผ่นอะกาโรสเจลที่ทำอิเลคโตร-โฟริซิสแล้วไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น

3.5.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ของรา *P. portentosus* ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่องตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencer) ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี จากนั้นนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับเบสของ ITS ที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST version 2.2.18 ที่จัดทำโดย DDBJ (www.ddbj.nig.ac.jp)

3.5.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ข้อมูลของลำดับเบสที่ได้จากข้อ 3.5.3 จะถูกนำไปสร้างเป็นชุดข้อมูล และใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Nei และ Li (1979) เพื่อการคำนวณความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ ใช้โปรแกรม PAUP* 4.0b10 จัดเป็นกลุ่มของสายพันธุ์ต่างๆ ในรูปของแผนภูมิ โดยใช้วิธี Neighbour-joining (NJ) ทำการวิเคราะห์ค่า bootstrap ซ้ำ 1,000 ครั้ง เพื่อยืนยันความแม่นยำของแต่ละกิ่งบนแผนภูมิต้นไม้ และเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นที่ถือว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แผนภูมิที่สร้างขึ้นแสดงถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ของรา *P. portentosus*

3.6 คัดเลือกสายพันธุ์ราที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อทดสอบเอคโตไมคอร์ไรซา

เลือกสายพันธุ์รา *P. portentosus* ที่มีคุณสมบัติที่ดีเหมาะสมต่อการทำหัวเชื้อ เพื่อสร้างราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยเลือกสายพันธุ์ที่สร้างเส้นใยมากและเจริญเร็วที่สุด โดยเปรียบเทียบจากเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่อายุ 4 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN ที่อุณหภูมิห้อง

3.7 ทดสอบความสามารถในการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชทดสอบ

ศึกษาการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชทดสอบด้วยเทคนิค petri-plate system ตามวิธีของ Gregory (2008) ดัดแปลงจาก Chilvers และคณะ (1987) โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.7.1 เตรียมกล้าไม้ทดสอบ

นำเมล็ดของพืชที่ต้องการทดสอบได้แก่ แค โสน กระถิน สะแก และมะขามเทศ มาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด โดยแช่ใน 70 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นแช่ใน 30 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง นำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ water agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รอจนงอกในสภาวะควบคุมระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง

3.7.2 การเตรียมชิ้นวุ้นหัวเชื้อ

เลี้ยงเส้นใยรา *P. portentosus* ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบด้านนอกของโคโลนีด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กขนาด 4 มิลลิเมตร นำชิ้นวุ้นไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN จานใหม่ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน

3.7.3 ใส่หัวเชื้อราทดสอบ

นำเมล็ดพืชทดสอบที่งอกแล้วเป็นเวลา 1 สัปดาห์ วางลงบนแผ่นกระดาษกรองเปียกที่วางอยู่บนจานอาหารพลาสติกของ 1 เปอร์เซ็นต์ water agar ที่เจาะรูเพื่อให้ส่วนยอดของกล้าพืชอยู่นอกจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทำในสภาวะปลอดเชื้อ จากนั้นเขี่ยชิ้นวุ้นจากข้อ 3.7.2 วางลงที่ใกล้ๆ กับรากของพืช ปิดทับด้วยกระดาษกรองเปียกที่ฆ่าเชื้อแล้วอีกชิ้นหนึ่ง ใช้พาราฟิล์มพันรอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อและหุ้มรอบจานอาหารด้วยกระดาษฟอยล์ เพื่อไม่ให้รากพืชโดนแสง เก็บจานอาหารที่มีกล้าไม้ทดสอบไว้ 2 สัปดาห์ ในสภาวะควบคุมระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง

3.7.4 ตรวจสอบการติดเชื้อ

ตรวจหาการติดเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซาของรา *P. portentosus* ในรากของกล้าไม้ทดสอบ โดยดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอและสัณฐานวิทยาภายในโดยตัดขวางรากของพืชทดสอบออกเป็นชิ้นบางๆ นำไปวางลงบนสไลด์แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจหาลักษณะของ mantle sheath และ hartig net ที่บริเวณรากพืชทดสอบ

3.8 ทดสอบการกระตุ้นการเจริญกับกล้าไม้ทดสอบ

เปรียบเทียบการเจริญของกล้าไม้ทดสอบที่ใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* และชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อ

3.8.1 การผลิตหัวเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อมาตรฐานสำหรับนำมาเพิ่มปริมาณเส้นใย เพื่อใส่ให้กับพืชทดสอบ เตรียมวัสดุหัวเชื้อเวอร์มิคิวไลท์ (vermiculite) ผสม peat moss โดยใช้เวอร์มิคิวไลท์ 6 ส่วน และ peat moss 1 ส่วน บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN ในอัตราส่วนวัสดุที่ใช้ทำหัวเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2:1 โดยปริมาตร นึ่งฆ่าเชื้อที่

อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง เลี้ยงเส้นใยรา *P. portentosus* ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบด้านนอกของโคโลนีด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กขนาด 4 มิลลิเมตร ใส่ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยราลงในขวดวัสดุหัวเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขวดละ 1 ชิ้น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องจนเส้นใยราเจริญเต็มขวด ใช้เวลาประมาณ 1 เดือน (ภาพที่ 3.1) เมื่อจะนำมาใช้ให้เทหัวเชื้อออกจากขวด ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากหัวเชื้อด้วยน้ำประปาหลายๆ ครั้ง กรองด้วยผ้าขาวบางที่ซ้อนกัน 3 ชั้น บีบเอาน้ำออกให้หมด นำไปผึ่งในถาดให้เหลือความชื้นเล็กน้อย แล้วนำไปผสมกับวัสดุปลูกต่อไป

ภาพที่ 3.1 ลักษณะของเส้นใยรา *Phaeogyroporus portentosus* ที่เจริญในวัสดุหัวเชื้อเวอร์มิคิวไลท์ ผสม peat moss บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน

3.8.2 เตรียมกล้าไม้ทดสอบ

ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดพืชทดสอบ โดยแช่ใน 70 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นแช่ใน 30 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำไปเพาะในถาดหลุมเพาะเมล็ดพลาสติกขนาด 40×55 เซนติเมตร โดยปลูกในทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รดน้ำทุกวันจนต้นกล้ามีอายุ 1 เดือน

3.8.3 เตรียมวัสดุสำหรับปลูก

นำทรายที่ผ่านการล้างสะอาดแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง ส่วนกระถางพลาสติกสำหรับปลูกขนาด 8×8×12 เซนติเมตร เช็ดภายในกระถางด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์

3.8.4 ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

ใช้กล้าไม้ทดสอบอายุ 1 เดือน ใส่หัวเชื้อโดยผสมหัวเชื้อรา *P. portentosus* ที่เตรียมได้ในข้อ 3.3.6.1 กับทรายปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1:8 นำวัสดุปลูกที่เตรียมได้ไปบรรจุในกระถางพลาสติกขนาด 8×8×12 เซนติเมตร นำกล้าไม้จากข้อ 3.8.2 จำนวน 1 ต้น ลงปลูก นำไปดูแลในเรือนเพาะชำ รดน้ำให้ชุ่มวันเว้นวัน ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในระดับปานกลางทุกๆ 2 สัปดาห์ (ภาคผนวก ก) จนกล้าไม้อายุ 6 เดือน

3.8.5 เก็บข้อมูล

เปรียบเทียบอัตราการเจริญของกล้าไม้ทดสอบในชุดการทดลองต่างๆ เมื่อกล้าไม้อายุครบ 6 เดือน โดยทำการวัด

3.8.5.1 ความสูงของลำต้นและเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นที่ระดับคอราก

3.8.5.2 มวลชีวภาพของส่วนลำต้นและราก โดยนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วชั่งหาน้ำหนักแห้ง

3.8.5.3 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (infection percentage) ของราเอคโตไมคอร์ไรซาในรากของกล้าไม้ทดสอบ โดยตัดรากออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีความยาวชิ้นละ 1 เซนติเมตร ย้อมสีราก (Kormaik และ McGraw, 1982 ดัดแปลงจาก Phillips และ Hayman, 1970) สุ่มชิ้นส่วนของรากที่ย้อมสีแล้วมา 50 ชิ้น วางบนแผ่นสไลด์ สไลด์ละ 5 ชิ้น นับจำนวนรากที่พบว่ามีการติดเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซาของแต่ละชุดการทดลองภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราไมคอร์ไรซา (Giovanneti และ Mosse, 1980)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

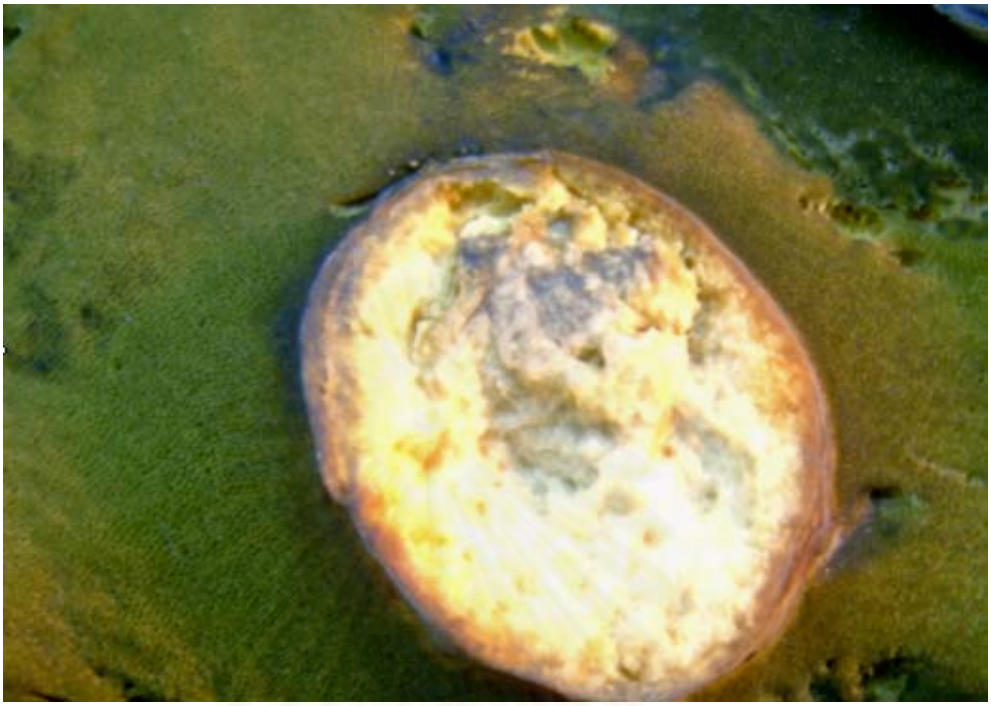
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 สำรวจและการเก็บตัวอย่าง

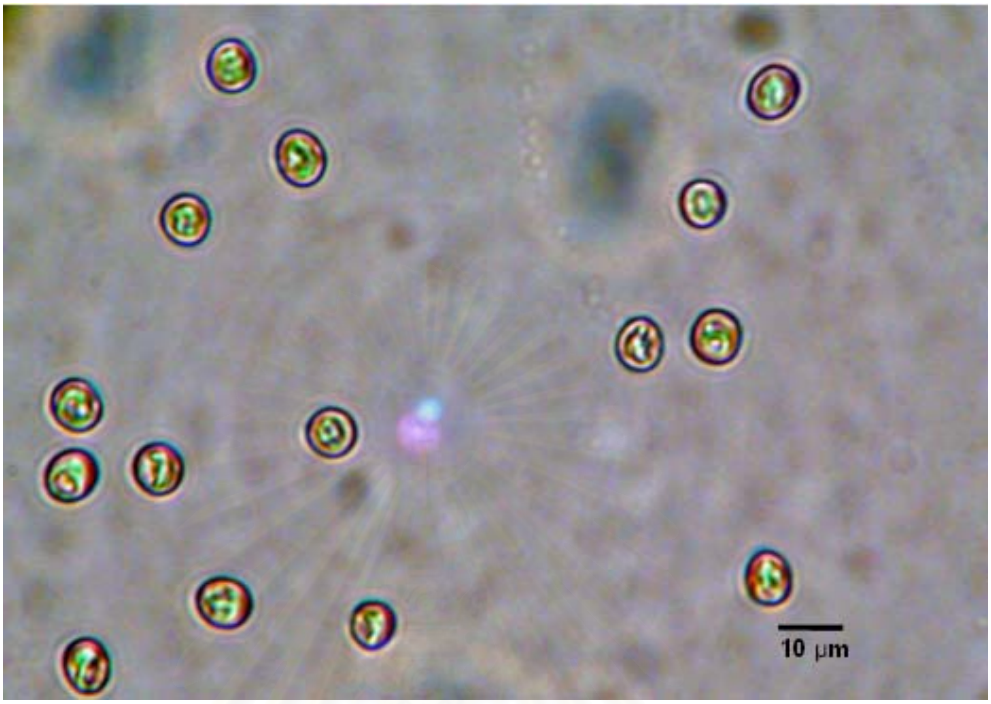
สำรวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ด *Phaeogyroporus portentosus* จากสวนไม้ผลต่างๆ และตามตลาดท้องถิ่นในพื้นที่ 8 จังหวัด ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก ได้แก่ กรุงเทพฯ กาฬสินธุ์ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา นนทบุรี ปทุมธานี ยโสธร และสมุทรปราการ ระหว่างช่วงฤดูฝนของแต่ละปี ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม พ.ศ. 2549 ถึง 2550 ดอกเห็ดเมื่อโตเต็มที่มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4.1) หมวกเห็ดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-20 เซนติเมตร สีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีดำ หมวกเห็ดมีขนละเอียดปกคลุมคล้ายกำมะหยี่ เมื่อได้รับความชื้นสูงผิวจะมีลักษณะเรียบ ลื่นเป็นมัน เนื้อเยื่อมีสีเหลืองอ่อน เมื่อช้ำหรือเกิดการฉีกขาดจะไม่เปลี่ยนสี (ภาพที่ 4.2) รูสร้างสปอร์มีขนาดเล็กและติดกันแน่น เนื้อเยื่อมีสีเหลือง เมื่อแก่และปล่อยสปอร์แล้วจะมีสีเหลืองอมน้ำตาล (ภาพที่ 4.3) ก้านดอกติดกับดอกตรงกลาง ยาว 8-15 เซนติเมตร ผิวก้านไม่เรียบเป็นร่องบุ๋ม เนื้อค่อนข้างหนามีสีเหลือง สปอร์มีรูปร่างรีจนถึงค่อนข้างกลม สีน้ำตาลอ่อน ผิวเรียบ ผนังบาง ขนาดของสปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.4) เมื่อนำเส้นใยไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์พบ clamp connection (ภาพที่ 4.5)

ภาพที่ 4.1 ลักษณะดอกเห็ด *P. portentosus* ที่ขึ้นในสวนมะม่วง

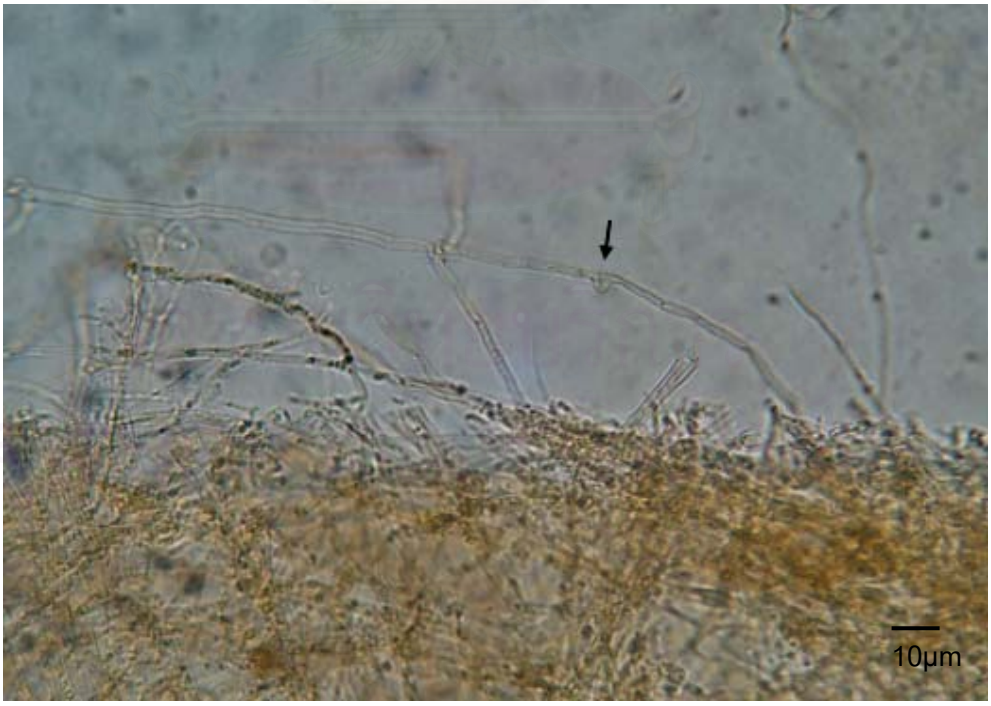


ภาพที่ 4.2 ลักษณะเนื้อเยื่อของ *P. portentosus* ที่ฉีกขาดและไม่มีการเปลี่ยนสี

ภาพที่ 4.3 ลักษณะรูสร้างสปอร์ของ *P. portentosus* หลังจากปล่อยสปอร์



ภาพที่ 4.4 ลักษณะสปอร์ของ *P. portentosus* เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 4.5 ลักษณะเส้นใยของ *P. portentosus* เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามี clamp connection เกิดขึ้น (ลูกศรชี้)

4.2 แยกและเพาะเลี้ยงเส้นใยให้บริสุทธิ์

เมื่อนำเนื้อเยื่อจากดอกเห็ด *Phaeogyroporus portentosus* มาแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์ สามารถแยกได้ 22 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 รา *P. portentosus* ที่สามารถแยกได้เส้นใยบริสุทธิ์

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งที่มา
KA2	แค *Sesbania grandiflora* (L.) Desv.	มีนบุรี กทม.
SN2	โสน *Sesbania javanica* Miq.	หนองจอก กทม.
SN3	โสน *Sesbania javanica* Miq.	หนองจอก กทม.
XK2	-	กาฬสินธุ์
XK3	-	กาฬสินธุ์
MM	มะม่วง *Mangifera indica* L.	จันทบุรี
NJ2	ทองหลาง *Erythrina fusca* Lour.	อำเภอเมือง ฉะเชิงเทรา
SP1	สะแก *Combretum quadrangulare* Kurz	อำเภอเมือง ฉะเชิงเทรา
SP2	สะแก *Combretum quadrangulare* Kurz	อำเภอเมือง ฉะเชิงเทรา
AJ1	-	นนทบุรี
TN	ทองหลาง *Erythrina fusca* Lour.	อำเภอบางบัวทอง นนทบุรี
MA2	ทองหลาง *Erythrina fusca* Lour.	อำเภอบางบัวทองนนทบุรี
TC1	มะกอกน้ำ *Elaeocarpus hygrophilus* Kurz	อำเภอลาดหลุมแก้ว ปทุมธานี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) รา *P. portentosus* ที่สามารถแยกได้เส้นใยบริสุทธิ์

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งที่มา
TC2	มะกอกน้ำ *Elaeocarpus hygrophilus* Kurz	อำเภอลาดหลุมแก้ว ปทุมธานี
HF	มะกอกน้ำ *Elaeocarpus hygrophilus* Kurz	อำเภอลาดหลุมแก้ว ปทุมธานี
XY1	-	ยโสธร
XY2	-	ยโสธร
XY3	-	ยโสธร
ML1	กระถิน *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit	อำเภอบางพลี สมุทรปราการ
ML3	กระถิน *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit	อำเภอบางพลี สมุทรปราการ
KL1	แค *Sesbania grandiflora* (L.) Desv.	อำเภอบางพลี สมุทรปราการ
XS	-	อำเภอบางบ่อ สมุทรปราการ

- ไม่ทราบพืชอาศัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ต่าง ๆ

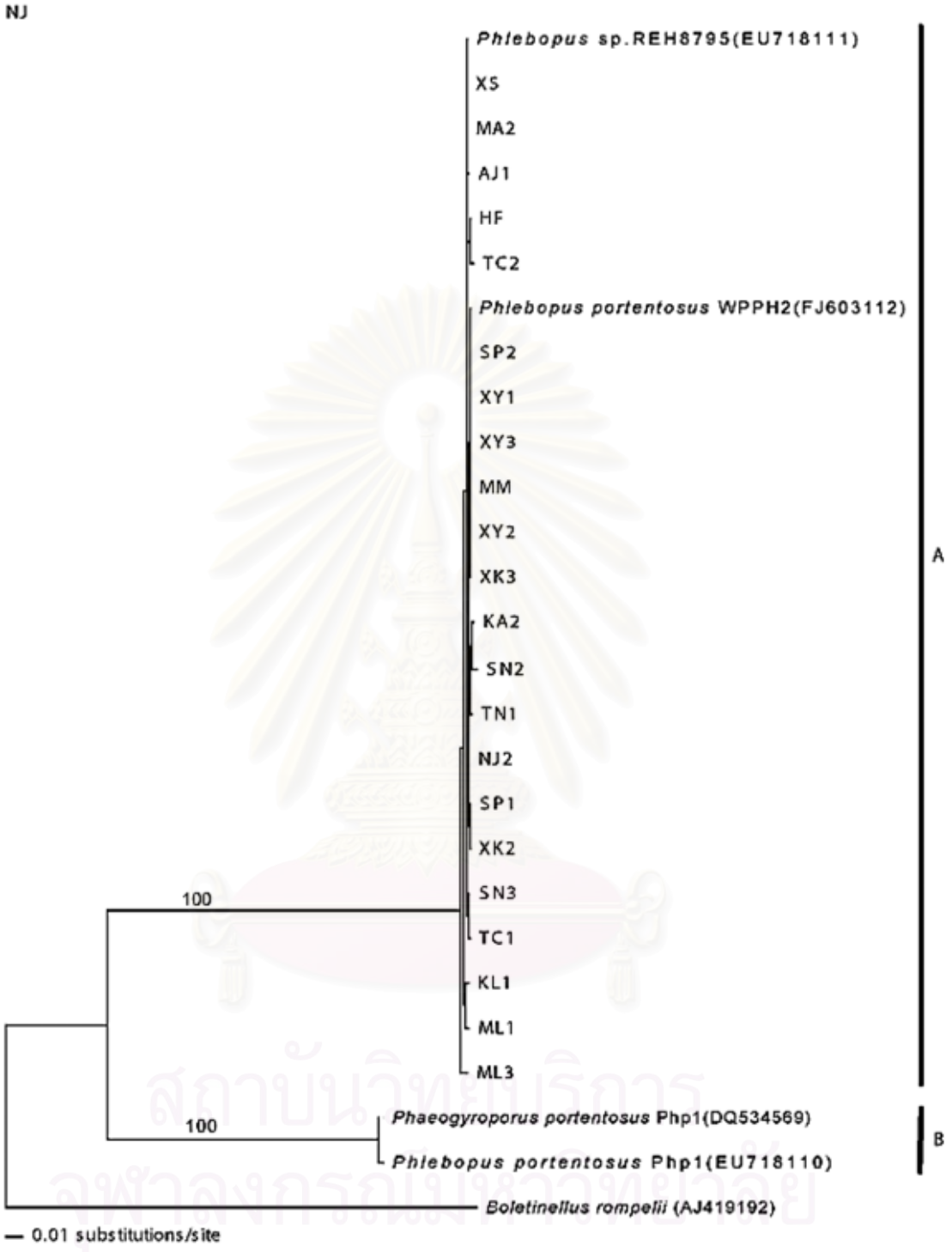
ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ตำแหน่ง ITS พบว่าขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS มีขนาดประมาณ 800 bp (ภาพที่ 4.6) เมื่อนำข้อมูลของลำดับเบสที่ตำแหน่งดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับข้อมูลเบสของรา *P. portentosus* ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี Neighbour-joining (NJ) ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ค่า bootstrap ซ้ำ 1,000 ครั้ง เพื่อยืนยันความแม่นยำของแต่ละกิ่งบนแผนภูมิต้นไม้

จากแผนภูมิต้นไม้ (ภาพที่ 4.7) สามารถแบ่งรา *P. portentosus* ได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ คือกลุ่ม A และกลุ่ม B โดยกลุ่ม A ประกอบด้วยรา *P. portentosus* สายพันธุ์ KA2 SN2 SN3 XK2 XK3 MM NJ2 SP1 SP2 AJ1 TN MA2 TC1 TC2 HF XY1 XY2 XY3 ML1 ML3 KL1 และ XS รวมถึง *Phlebopus* sp.REH8795 (EU718111) (Wilson และคณะ,2008) และ *Phlebopus portentosus* WPPH2 (FJ603112) (Lumyong และคณะ, 2008) ซึ่งพบว่ารา *P. portentosus* ทั้ง 22 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดโดยมีค่า bootstrap 100% จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันคือกลุ่ม A ซึ่งไม่สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก ส่วนกลุ่ม B ประกอบด้วย *Phaeogyroporus portentosus* Php1 (DQ534569) (Binder และ Hibbett, 2006) ที่เป็นตัวอย่างดอกเห็ดแห้งที่เก็บจากทวีปแอฟริกา และ *Phlebopus portentosus* Php1 (EU718110) (Wilson และคณะ, 2008)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.6 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ตำแหน่ง ITS ซึ่งมีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 800 bp (M = 1.5 kb + 100 bp DNA marker หมายเลข 1 = KA2 2 = SN2 3 = SN3 4 = XK2 5 = XK3 6 = MM 7 = NJ2 8 = SP1 9 = SP2 10 = AJ1 และ 11 = TN)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.7 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *Phaeogyroporus portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เก็บได้จากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย โดยพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง ITS โดยมี *Boletinellus rompelii* เป็นตัวอย่าง outgroup (ค่า bootstrap แสดงเป็นตัวเลขบนกิ่งของแผนภูมิ)

—— แสดงระยะห่างทางพันธุกรรม 0.01 ระหว่างตัวอย่างบนแผนภูมิ

4.4 คัดเลือกสายพันธุ์ราที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อทดสอบเอคโตไมคอร์-ไรซา

คัดเลือกรา *Phaeogyroporus portentosus* ที่มีคุณสมบัติที่ดีเหมาะสมต่อการทำหัวเชื้อเพื่อสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในพืชอาศัย โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการสร้างเส้นใยมากและมีอัตราการเจริญเร็วที่สุด โดยเปรียบเทียบจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่อายุ 4 สัปดาห์ของราที่แยกให้บริสุทธิ์จากดอกเห็ด *P. portentosus* ที่เก็บรวบรวมได้ เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN พบว่ารา *P. portentosus* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.6 ถึง 8.0 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.2) โดยสายพันธุ์ XK2 และ MM มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่มากที่สุด คือ 8.0 และ 7.9 เซนติเมตร ตามลำดับ จึงคัดเลือกสายพันธุ์ดังกล่าวเพื่อนำไปผลิตหัวเชื้อต่อไป และพบว่าโคโลนีของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ มีเส้นใยฟูหนาสีน้ำตาล เมื่อแก่จะสร้างของเหลวสีน้ำตาลดำ (ภาพที่ 4.8, 4.9 และ 4.10)

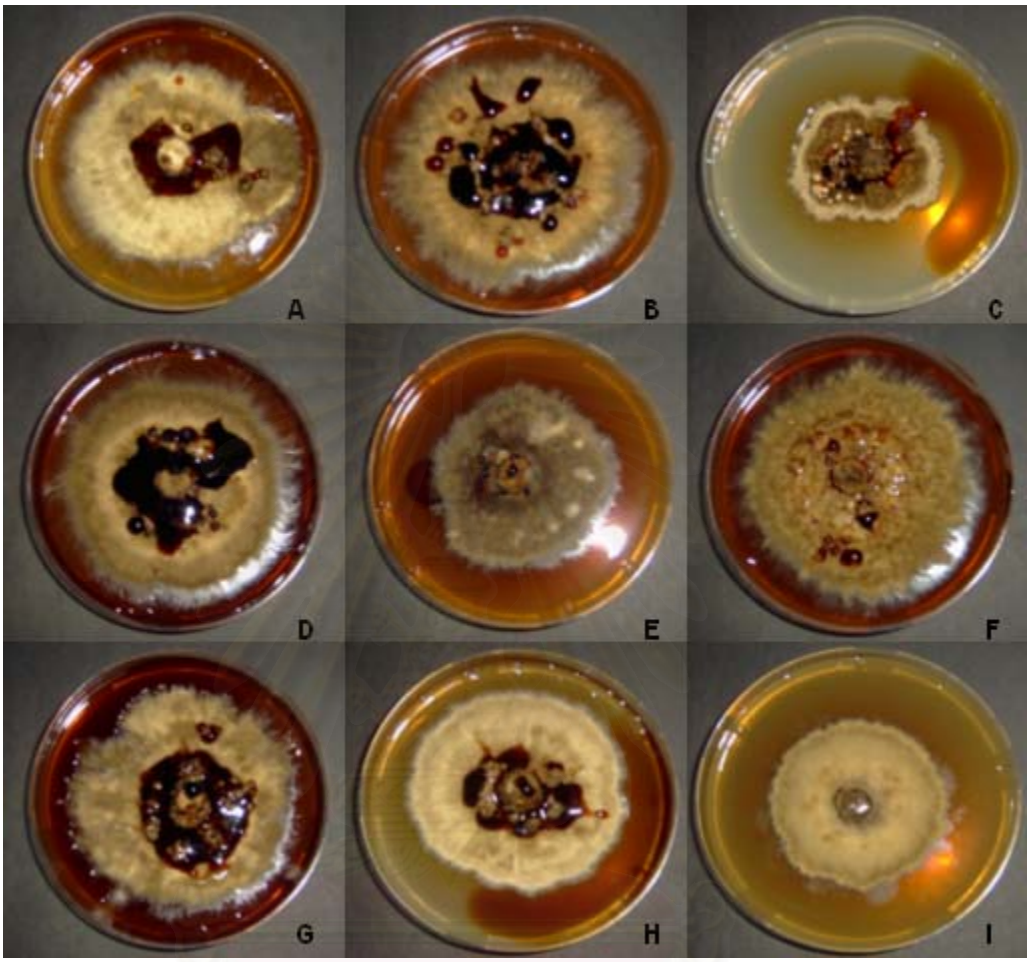
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 การเจริญของเส้นใยรา *P.portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN อายุ 4 สัปดาห์

สายพันธุ์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (ซม.)*
KA2	7.5 ± 0.22
SN2	7.6 ± 0.15
SN3	4.2 ± 0.19
XK2	8.0 ± 0.15
XK3	6.5 ± 0.13
MM	7.9 ± 0.19
NJ2	7.1 ± 0.24
SP1	6.6 ± 0.20
SP2	5.2 ± 0.16
AJ1	7.4 ± 0.28
TN	1.6 ± 0.15
MA2	6.4 ± 0.14
TC1	2.8 ± 0.20
TC2	3.7 ± 0.11
HF	7.7 ± 0.19
XY1	7.2 ± 0.23
XY2	6.9 ± 0.13
XY3	6.3 ± 0.12
ML1	4.5 ± 0.21
ML3	5.7 ± 0.17
KL1	3.5 ± 0.20
XS	6.8 ± 0.13

* ค่าเฉลี่ยจำนวน 3 ซ้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

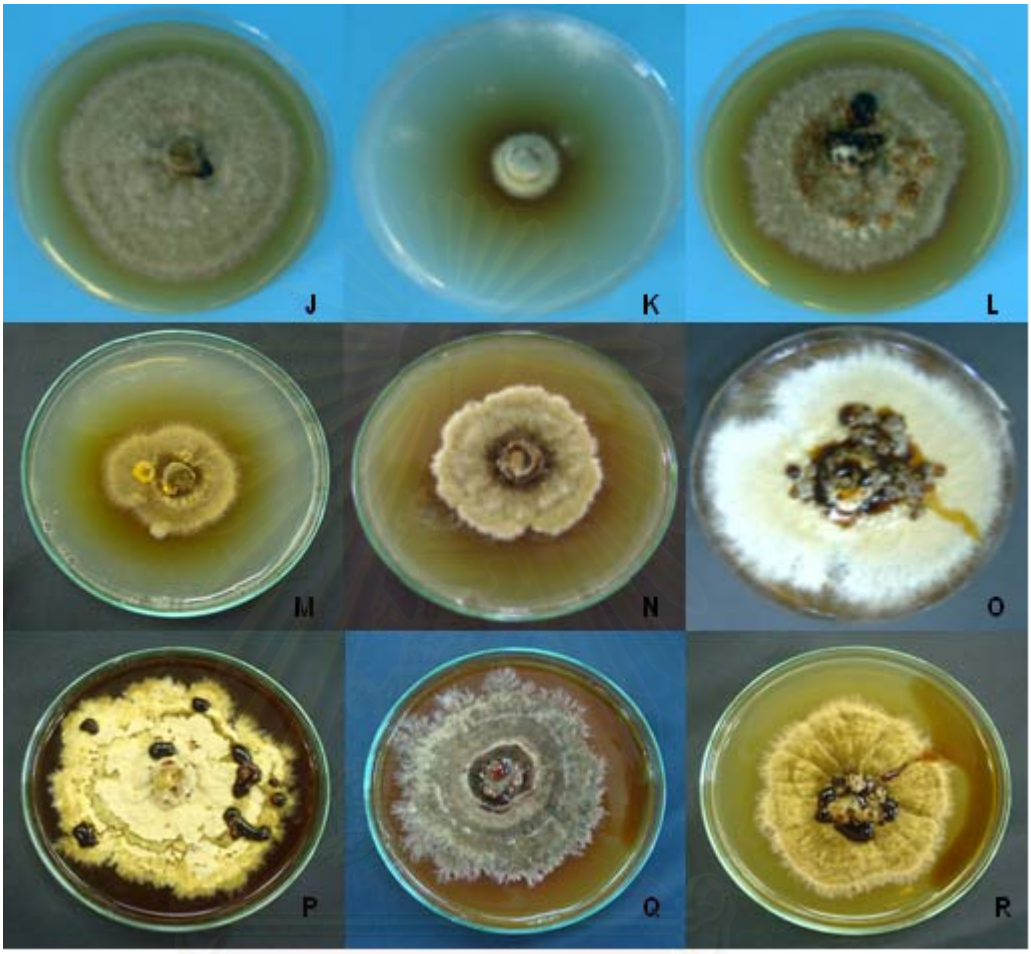


ภาพที่ 4.8 ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์ที่แยกจากดอกเห็ด *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN ระยะเวลา 4 สัปดาห์

(A) สายพันธุ์ KA2 (B) สายพันธุ์ SN2 (C) สายพันธุ์ SN3

(D) สายพันธุ์ XK2 (E) สายพันธุ์ XK3 (F) สายพันธุ์ MM

(G) สายพันธุ์ NJ2 (H) สายพันธุ์ SP1 (I) สายพันธุ์ SP2

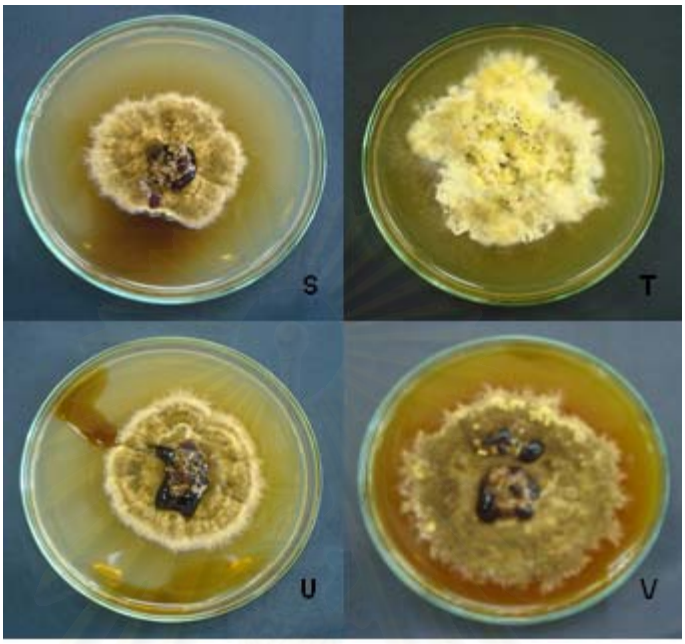


ภาพที่ 4.9 ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์ที่แยกจากดอกเห็ด *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN ระยะเวลา 4 สัปดาห์

(J) สายพันธุ์ AJ1 (K) สายพันธุ์ TN (L) สายพันธุ์ MA2

(M) สายพันธุ์ TC1 (N) สายพันธุ์ TC2 (O) สายพันธุ์ HF

(P) สายพันธุ์ XY1 (Q) สายพันธุ์ XY2 (R) สายพันธุ์ XY3



ภาพที่ 4.10 ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์ที่แยกจากดอกเห็ด *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN ระยะเวลา 4 สัปดาห์

(S) สายพันธุ์ ML1 (T) สายพันธุ์ ML3 (U) สายพันธุ์ KL1

(V) สายพันธุ์ XS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชทดสอบ

ศึกษาการเกิดเอคโตไมคอร์ไรซาในรากพืชทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ กระถิน แค โสน มะขาม-เทศ และสะแก หลังจากใส่เชื้อ 2 สัปดาห์

การทดสอบในกล้าไม้กระถิน (ภาพที่ 4.11A) พบว่าเส้นใยราจะเจริญอยู่รอบรากอย่างหลวมๆ (ภาพที่ 4.11B) รากกระถินบริเวณที่มีเส้นใยราพันอยู่จะไม่มีขนราก ต่างจากบริเวณที่ไม่มีเส้นใยราพันอยู่จะเห็นขนรากชัดเจน (ภาพที่ 4.11C) เมื่อนำรากที่มีราพันอยู่ไปทำการตัดตามขวางบนกระจกสไลด์ แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากของกระถินไม่มีใยฮาร์ติก (Hartig net) เกิดขึ้น (ภาพที่ 4.11D) เมื่อนำรากไปฟอกแล้วย้อมสี จากนั้นนำไปตัดตามขวางแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากของกระถินมีเส้นใยราที่ติดสีย้อมพันอยู่บางๆ (ภาพที่ 4.11E)

การทดสอบในกล้าไม้แค (ภาพที่ 4.12A) พบว่าเส้นใยราจะเจริญอยู่รอบรากบางๆ (ภาพที่ 4.12B) รากที่มีราพันอยู่ไม่มีขนรากต่างจากบริเวณที่ไม่มีราเจริญอยู่ เมื่อนำรากที่มีเส้นใยราพันอยู่ไปทำการตัดตามขวางบนกระจกสไลด์ แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากของแคไม่มีใยฮาร์ติก (Hartig net) เกิดขึ้น (ภาพที่ 4.12C)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.11 การเจริญของต้นกล้าไม้กระถินอายุ 2 สัปดาห์ ร่วมกับเส้นใย *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2

(A) ต้นกล้ากระถินที่ใส่ชิ้นวุ้นเชื้อ (B) เส้นใยราพันรอบรากบางๆ (ลูกศรชี้) (กำลังขยาย 24 เท่า)

(C) เส้นใยพันรอบรากทำให้รากกระถินไม่มีขนราก ต่างกับบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ (ลูกศรชี้)

(D) ภาพถ่ายตัดตามขวางของรากกระถิน พบว่าเส้นใยเจริญอยู่รอบๆรากเท่านั้น (ลูกศรชี้)

(E) รากกระถินที่มีเส้นใยเจริญพันอยู่รอบๆ ราก (ลูกศรชี้)

ภาพที่ 4.12 การเจริญของต้นกล้าไม้แคอายุ 2 สัปดาห์ ร่วมกับเส้นใย *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2

(A) ต้นแคที่ใส่ชิ้นวุ้นเชื้อ

(B) รากแคที่มีเส้นใยราสานตัวรอบราก (ลูกศรชี้) (กำลังขยาย 12 เท่า)

(C) ภาพตัดขวางรากแค ไม่พบว่ามีการสร้างใยฮาร์ติก (Hartig net)

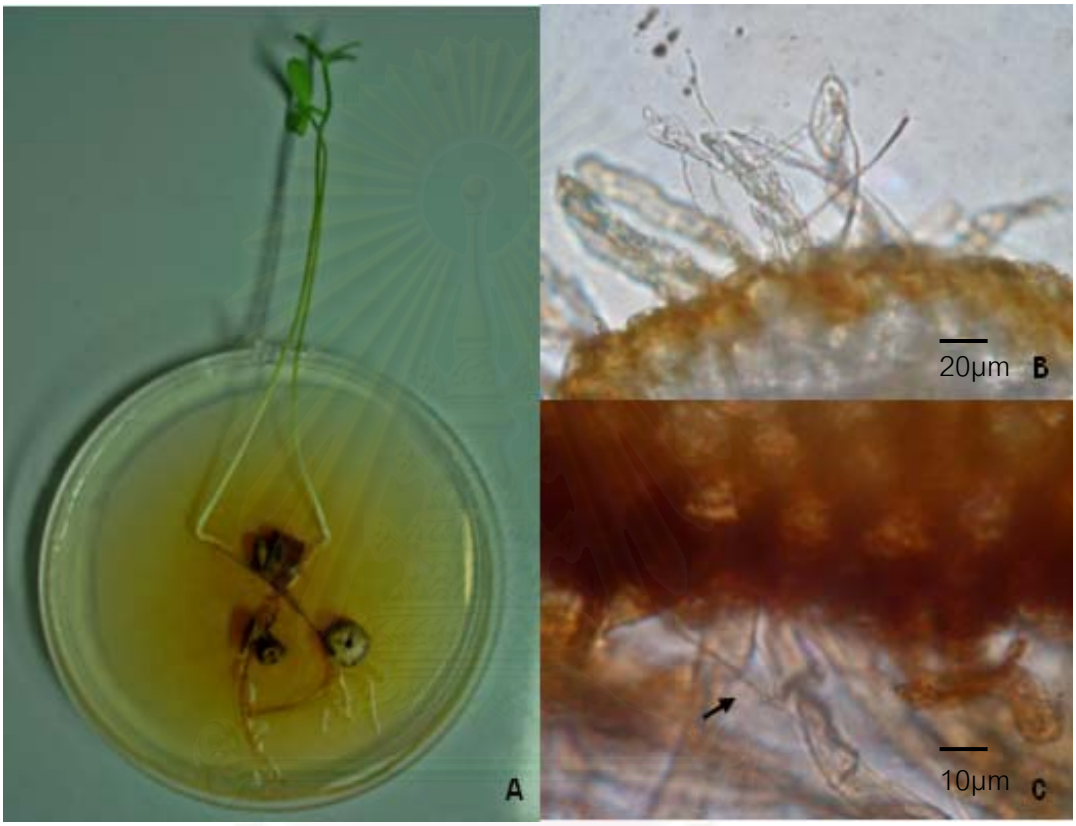
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบในกล้าไม้โสน (ภาพที่ 4.13A) พบว่าเส้นใยราจะเจริญอยู่รอบๆ ราก รากบริเวณที่มีรามาพันอยู่ไม่มีขนรากต่างจากบริเวณที่ไม่มีราพันอยู่รอบๆ ที่เห็นขนรากอย่างชัดเจน เมื่อนำรากที่มีเส้นใยราพันอยู่ ไปทำการตัดตามขวางบนกระจกสไลด์ แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 4.13B) พบว่ารากของโสนไม่มีการสร้างใยฮาร์ติก (Hartig net) แต่พบว่ามีเส้นใยเจริญอยู่รอบๆ รากบางๆ และเส้นใยมีการสร้าง clamp connection (ภาพที่ 4.13C)

การทดสอบในกล้าไม้มะขามเทศ (ภาพที่ 4.14A) พบว่าเส้นใยราจะเจริญอยู่รอบรากบางๆ และที่บริเวณเปลือกของเมล็ดที่งอกแล้วจะมีเส้นใยราเจริญอยู่หนาแน่น (ภาพที่ 4.14B) เมื่อนำรากที่มีเส้นใยราพันอยู่ไปทำการตัดตามขวางบนกระจกสไลด์แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากของมะขามเทศไม่มีใยฮาร์ติก (Hartig net) เกิดขึ้น (ภาพที่ 4.14C) มีเพียงเส้นใยราพันรอบรากบางๆ เท่านั้น

การทดสอบในกล้าไม้สะแก (ภาพที่ 4.15A) พบว่าเส้นใยราเจริญอยู่รอบๆ รากเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 4.15D) และเมื่อนำรากที่มีเส้นใยราพันอยู่ไปตัดตามขวางบนกระจกสไลด์ แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากของสะแกไม่มีใยฮาร์ติก (Hartig net) เกิดขึ้น (ภาพที่ 4.15B) เห็นเพียงราที่พันอยู่รอบรากสะแก เมื่อนำรากที่มีราพันอยู่ไปฟอกและย้อมสี แล้วตัดตามขวางจากนั้นนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบ hartig net สังเกตเห็นเพียงเส้นใยราอยู่รอบรากเท่านั้น (ภาพที่ 4.15C)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.13 การเจริญของต้นกล้าโสนอายุ 2 สัปดาห์ ร่วมกับเส้นใย *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2

(A) ต้นโสนที่ใส่ชิ้นวุ้นเชื้อ

(B) ภาพตัดขวางรากโสน สังเกตพบเส้นใยราที่สานตัวรอบๆ ราก

(C) ภาพตัดขวางรากโสน สังเกตพบว่าไม่มีการสร้างใยฮาร์ติก (Hartig net) พบแต่เส้นใยราเจริญอยู่รอบๆ (ลูกศรชี้)

ภาพที่ 4.14 การเจริญของต้นกล้ามะขามเทศอายุ 2 สัปดาห์ ร่วมกับเส้นใย *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2

(A) ต้นมะขามเทศที่ใส่ชิ้นวุ้นเชื้อ

(B) เส้นใยราที่เจริญรอบๆ เปลือกเมล็ดมะขามเทศ (กำลังขยาย 12 เท่า)

(C) ภาพตัดขวางรากมะขามเทศ พบว่าไม่มีการสร้างใยฮาร์ติก (Hartig net) แต่มีเส้นใยราเจริญอยู่รอบๆ

ภาพที่ 4.15 การเจริญของต้นกล้าสะแกอายุ 2 สัปดาห์ ร่วมกับเส้นใย *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2

(A) ต้นกล้าสะแกที่ใส่ชิ้นวุ้นเชื้อ

(B) ภาพตัดขวางรากสะแก มีเส้นใยราเจริญรอบๆ ราก (ลูกศรชี้)

(C) รากสะแกที่ผ่านการฟอกสีราก ศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไม่มีการสร้างใยฮาร์ติก (Hartig net) ขึ้นแต่มีเส้นใยราเจริญอยู่รอบๆ

(D) รากสะแกที่มีกลุ่มเส้นใยราเจริญอยู่รอบๆ ราก (ลูกศรชี้) (กำลังขยาย 12 เท่า)

4.6 การผลิตหัวเชื้อ

จากข้อ 4.3 เลือก *Phaeogyroporus portentosus* สายพันธุ์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN ได้ดีที่สุดจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 และ *P. portentosus* สายพันธุ์ MM ไปผลิตเป็นหัวเชื้อ เส้นใยรา สามารถเจริญได้ดีทั้ง 2 สายพันธุ์

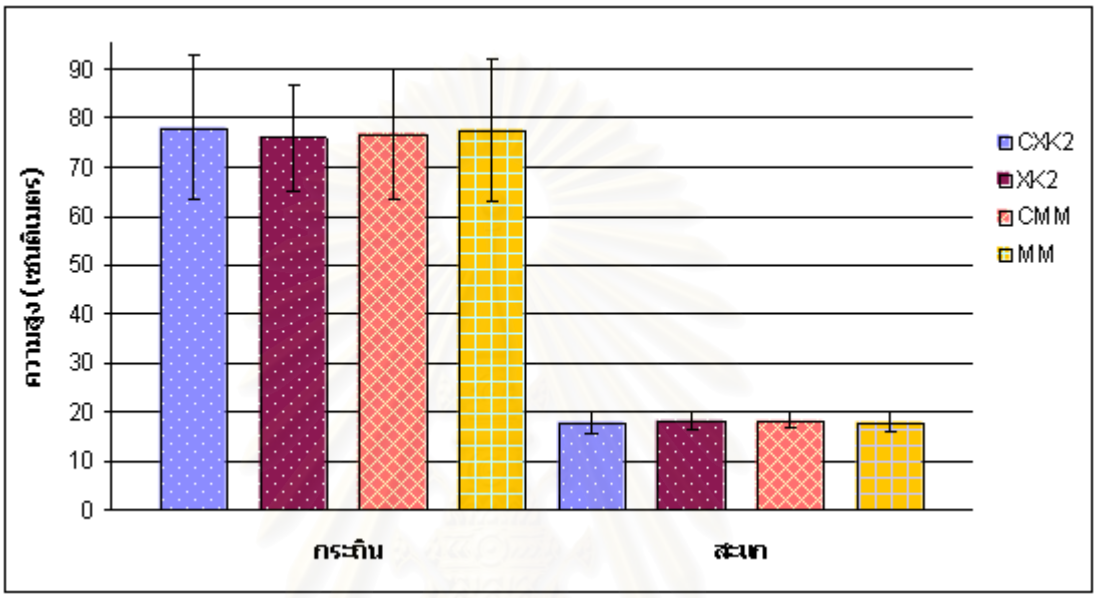
4.7 ทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ที่คัดเลือกต่อการเจริญของกล้าไม้กระถินและสะแก

เมื่อนำหัวเชื้อของรา *P. portentosus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ คือสายพันธุ์ XK2 และ MM ใส่ให้กับกล้าไม้กระถินและสะแก เปรียบเทียบผลของเอคโตไมคอร์ไรซา *P. portentosus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ต่อการเจริญของของกล้าไม้ทั้งสองชนิด กับชุดควบคุมที่ใช้หัวเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อก่อนที่จะนำมาใส่เพาะกับกล้าไม้ (CXK2 และ CMM) โดยวัดเปรียบเทียบการเจริญของกล้าไม้อายุ 6 เดือน

4.7.1 ความสูงของลำต้นกล้าไม้

เปรียบเทียบการเจริญของลำต้นกล้าไม้กระถินและสะแก (ภาพที่ 4.16) ในชุดควบคุม CXK2 และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 กับชุดควบคุม CMM และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ MM พบว่าความสูงของลำต้นกล้าไม้กระถิน (ภาพที่ 4.17) มีค่าเท่ากับ 77.70 75.68 76.51 และ 77.14 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และความสูงของลำต้นกล้าไม้สะแก (ภาพที่ 4.18) มีค่าเท่ากับ 17.88 18.27 17.88 และ 18.28 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.16 เปรียบเทียบความสูงของต้นกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแก อายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อราสายพันธุ์ XK2 และ MM และชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

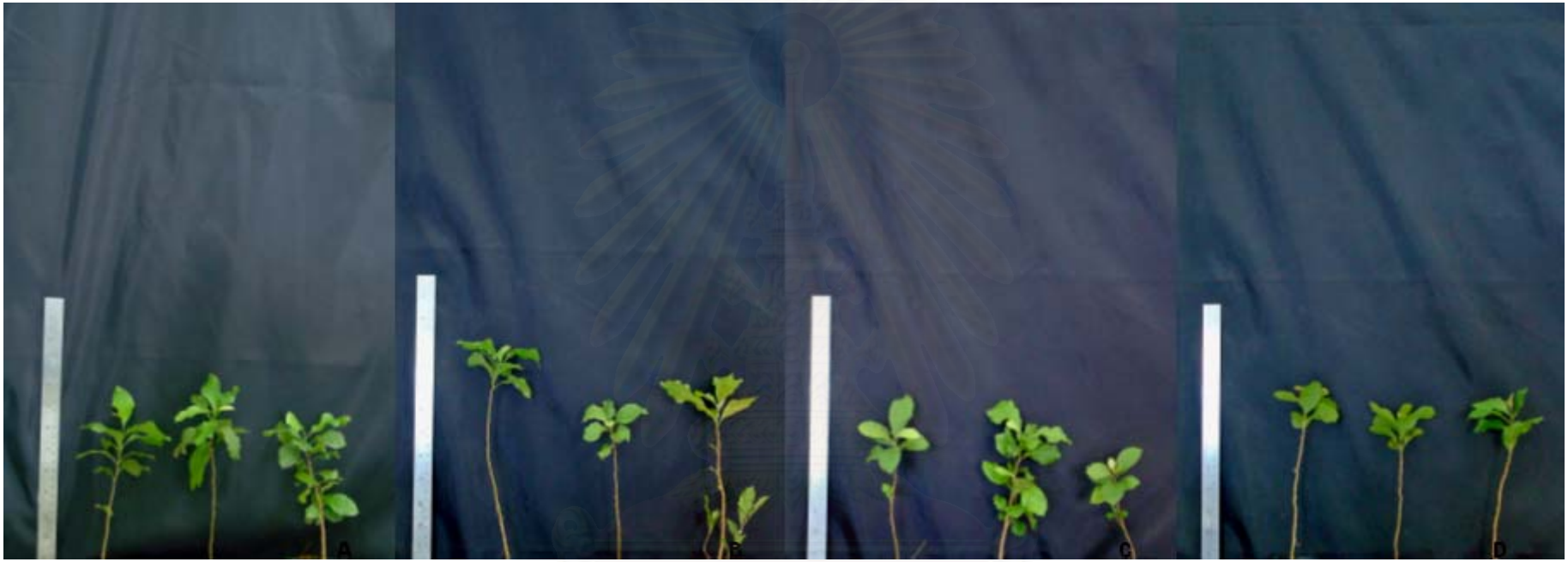
CXK2	ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ XK2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
XK2	ใส่หัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2
CMM	ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ MM ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
MM	ใส่หัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ MM

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.17 การเจริญของกล้าไม้กระถิน อายุ 6 เดือน ในชุดการทดลองต่างๆ

A. ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ XK2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
B. การเจริญของกล้าไม้กระถิน เมื่อใส่หัวเชื้อเป็น *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2
C. กล้าไม้กระถิน ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ MM ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
D. กล้าไม้กระถิน เมื่อใส่หัวเชื้อเป็น *P. portentosus* สายพันธุ์ MM

Scale = 30 เซนติเมตร



ภาพที่ 4.18 การเจริญของกล้าไม้สะแก อายุ 6 เดือน ในชุดการทดลองต่างๆ

A. ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ XK2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

B. การเจริญของกล้าไม้สะแก เมื่อใส่หัวเชื้อเป็น *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2

C. กล้าไม้สะแก ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ MM ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

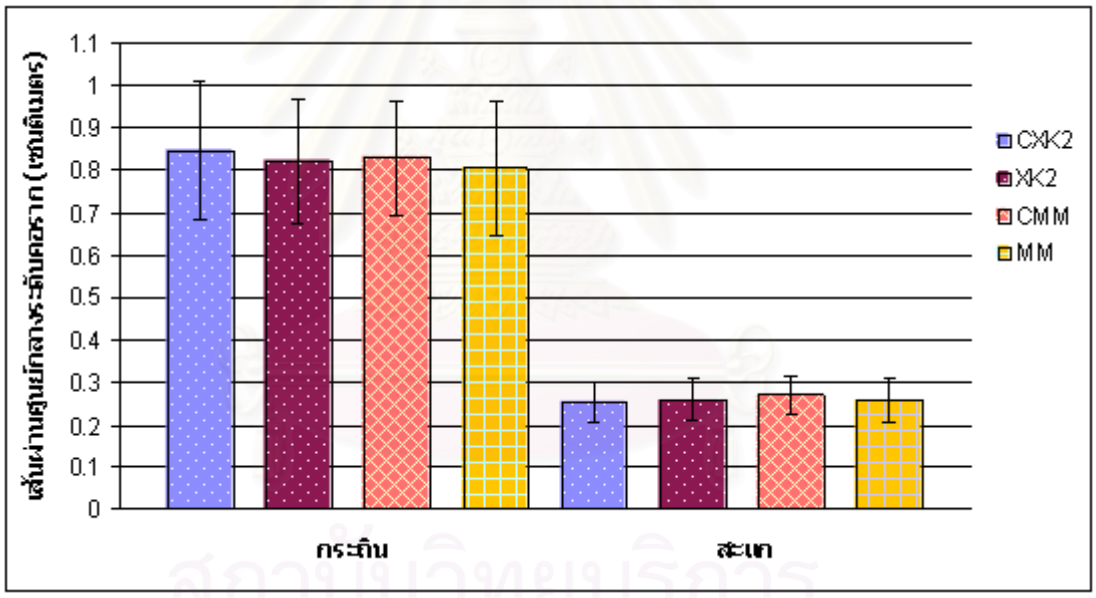
D. กล้าไม้สะแก เมื่อใส่หัวเชื้อเป็น *P. portentosus* สายพันธุ์ MM

Scale = 30 เซนติเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7.2 การเติบโตโดยการขยายขนาดโดยรอบของคอรากลำต้นกล้าไม้

เปรียบเทียบการเจริญของลำต้นกล้าไม้กระถินและสะแก (ภาพที่ 4.19) ในชุดควบคุม CXK2 และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 กับชุดควบคุม CMM และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ MM พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้นกล้าไม้กระถินมีค่าเท่ากับ 0.85 0.82 0.83 และ 0.80 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ในกล้าไม้สะแกพบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้นกล้าไม้สะแกมีค่าเท่ากับ 0.85 0.82 0.83 และ 0.80 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

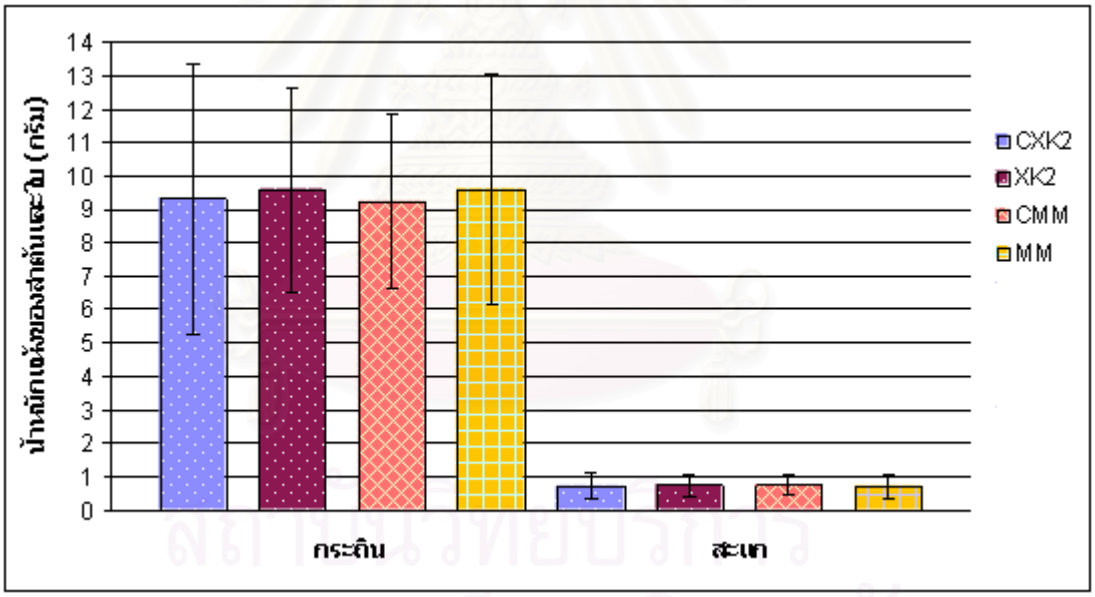


ภาพที่ 4.19 เปรียบเทียบการเติบโตโดยวัดการขยายขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางคอรากของลำต้นกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแก อายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 และ MM และชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

CXK2	ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ XK2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
XK2	ใส่หัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2
CMM	ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ MM ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
MM	ใส่หัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ MM

4.7.3 การเพิ่มของมวลชีวภาพส่วนเหนือดิน (น้ำหนักแห้งของลำต้นและใบ) ของกล้าไม้

เปรียบเทียบการเจริญของกล้าไม้กระถินและสะแก (ภาพที่ 4.20) ในชุดควบคุม CXK2 และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 กับชุดควบคุม CMM และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ MM พบว่ามวลชีวภาพส่วนเหนือดิน (น้ำหนักแห้งของลำต้นและใบ) ของกล้าไม้กระถินมีค่าเท่ากับ 9.31 9.56 9.22 และ 9.58 กรัม ตามลำดับ โดยชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ส่วนในกล้าไม้สะแกพบว่ามวลชีวภาพส่วนเหนือดิน (น้ำหนักแห้งของลำต้นและใบ) ของกล้าไม้สะแกมีค่าเท่ากับ 9.31 9.56 9.22 และ 9.58 กรัม ตามลำดับ โดยชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

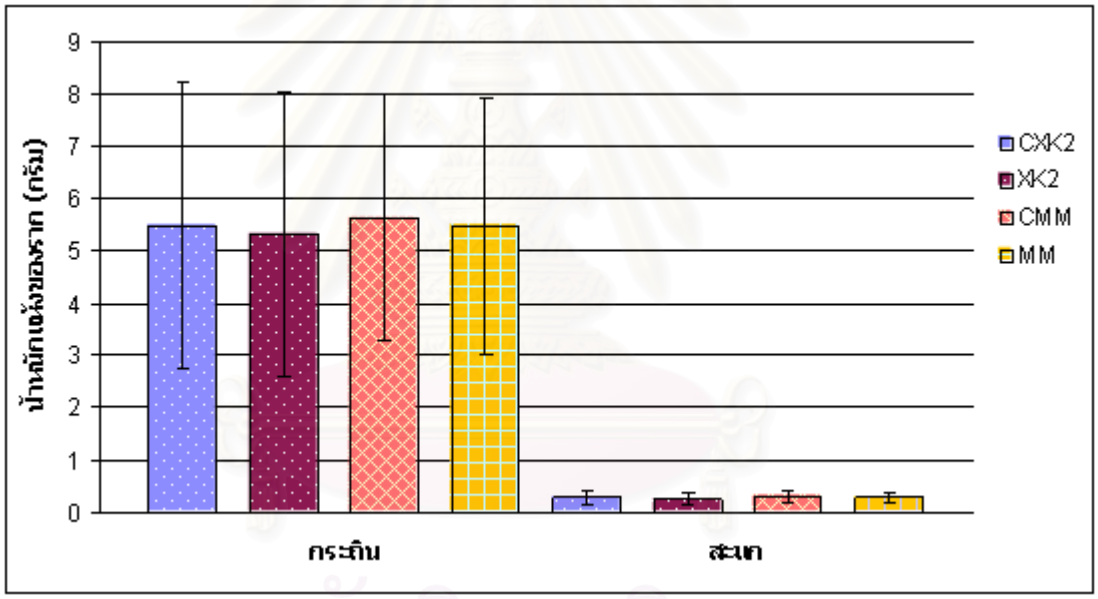


ภาพที่ 4.20 เปรียบเทียบการเพิ่มของมวลชีวภาพส่วนเหนือดินของต้นกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแก อายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 และ MM และชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

CXK2	ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ XK2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
XK2	ใส่หัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2
CMM	ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ MM ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
MM	ใส่หัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ MM

4.7.4 การเพิ่มของมวลชีวภาพส่วนใต้ดิน (น้ำหนักแห้งของราก) ของกล้าไม้

เปรียบเทียบการเจริญของกล้าไม้กระถินและสะแก (ภาพที่ 4.21) ในชุดควบคุม CXK2 และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 กับชุดควบคุม CMM และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ MM พบว่ามวลชีวภาพส่วนใต้ดิน (น้ำหนักแห้งของราก) ของกล้าไม้กระถินมีค่าเท่ากับ 5.49 5.32 5.64 และ 5.48 กรัม ตามลำดับ โดยชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ในสะแกพบว่ามวลชีวภาพส่วนใต้ดิน (น้ำหนักแห้งของราก) มีค่าเท่ากับ 0.27 0.25 0.29 และ 0.28 กรัม ตามลำดับ โดยชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 4.21 เปรียบเทียบการเพิ่มของมวลชีวภาพส่วนใต้ดินของต้นกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแก อายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 และ MM และชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

CXK2 ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ XK2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

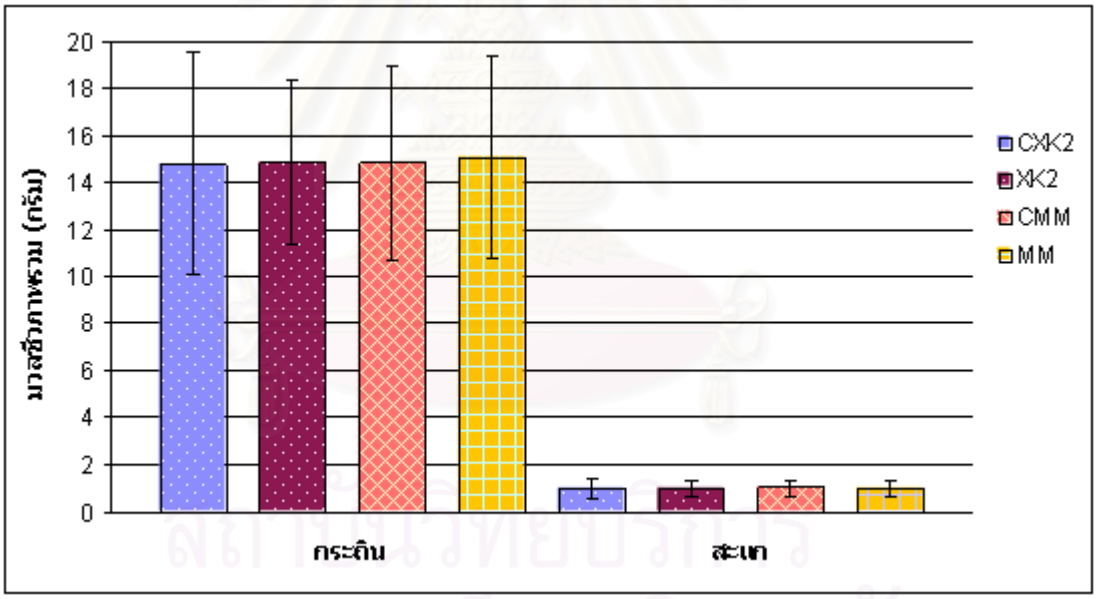
XK2 ใส่หัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2

CMM ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ MM ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

MM ใส่หัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ MM

4.7.5 การเพิ่มของมวลชีวภาพรวม (น้ำหนักแห้งของใบ ลำต้นและราก) ของกล้าไม้

เปรียบเทียบการเจริญของกล้าไม้กระถินและสะแก (ภาพที่ 4.22) ในชุดควบคุม CXK2 และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 กับชุดควบคุม CMM และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ MM พบว่ามวลชีวภาพรวม (น้ำหนักแห้งของใบ ลำต้นและราก) ของกล้าไม้กระถินมีค่าเท่ากับ 14.80 14.88 14.86 และ 15.06 กรัม ตามลำดับ โดยชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และพบว่ามวลชีวภาพรวม (น้ำหนักแห้งของใบ ลำต้นและราก) ของกล้าไม้สะแกมีค่าเท่ากับ 0.98 0.98 1.04 และ 0.97 กรัม ตามลำดับ โดยชุดการทดลองทั้ง 4 ชุด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



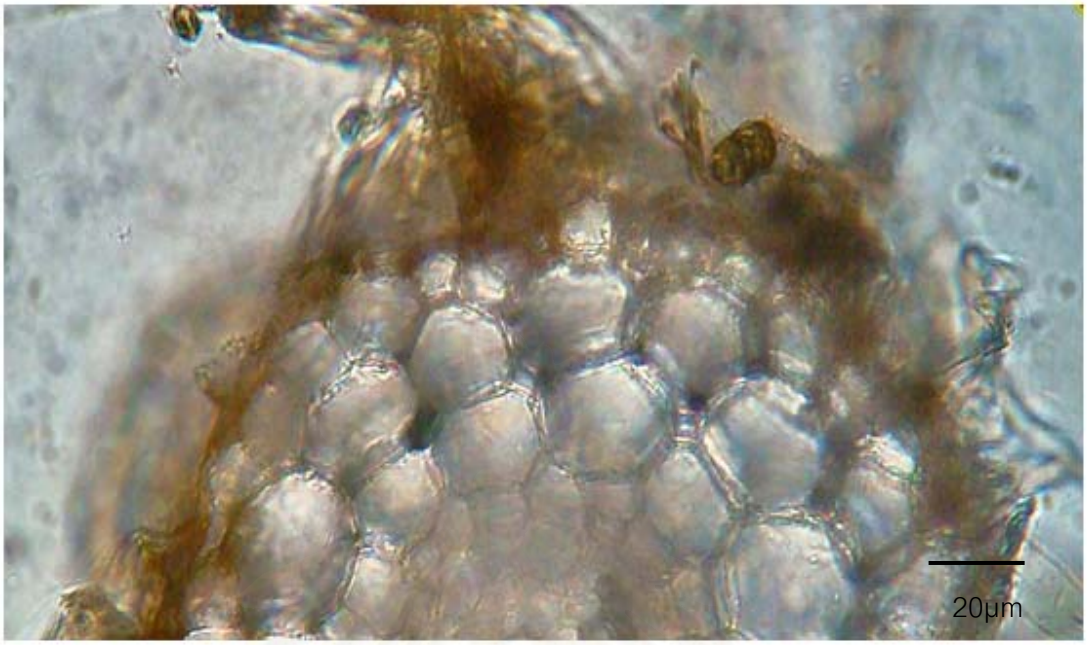
ภาพที่ 4.22 เปรียบเทียบการเพิ่มของมวลชีวภาพรวมของต้นกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแก อายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 และ MM และชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

CXK2	ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ XK2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
XK2	ใส่หัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2
CMM	ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ MM ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
MM	ใส่หัวเชื้อ *P. portentosus* สายพันธุ์ MM

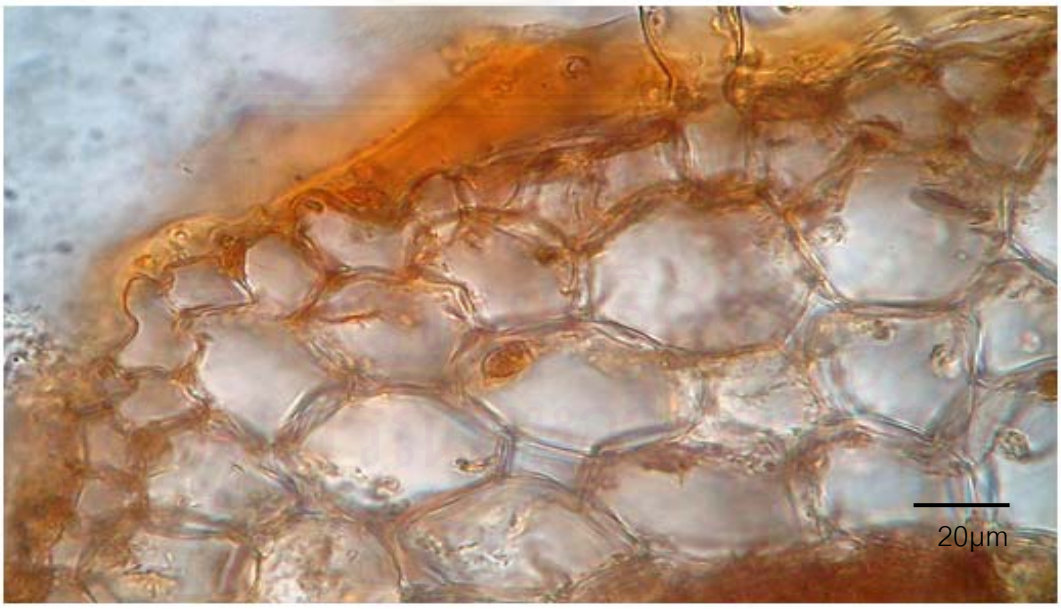
4.7.6 การติดเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ที่คัดเลือกในกล้าไม้

เปรียบเทียบการติดเชื้อรา *P. portentosus* ของกล้าไม้กระถินในชุดควบคุม CXK2 และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 กับชุดควบคุม CMM และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ MM พบว่า เส้นใยของรา *P.portentosus* เจริญอยู่รอบๆ รากเท่านั้น เมื่อนำรากกระถินอายุ 6 เดือน ไปย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue แล้วไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไม่มีรากที่ติดสีน้ำเงินของสี lactophenol cotton blue ดังนั้นเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในรากของทั้งสี่ชุดการทดลองจึงเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบการติดเชื้อรา *P. portentosus* ของกล้าไม้สะแกในชุดควบคุม CXK2 และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2 กับชุดควบคุม CMM และเมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus* สายพันธุ์ MM พบว่า เส้นใยของรา *P. portentosus* เจริญอยู่รอบๆ รากเท่านั้น เมื่อนำรากสะแกอายุ 6 เดือน ไปย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue แล้วไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไม่มีรากที่ติดสีน้ำเงินของสี lactophenol cotton blue แสดงถึงการไม่ติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาของ *P. portentosus* หรือ 0 เปอร์เซ็นต์ ของการติดเชื้อรา *P. portentosus* และเมื่อนำรากพืชทั้งสองชนิดไปทำการตัดตามขวางบนกระจกสไลด์ แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากของกระถิน (ภาพที่ 4.23) ไม่มีการสร้าง hartig net แต่พบว่ามีเส้นใยเจริญอยู่รอบๆ ราก ส่วนรากของสะแก (ภาพที่ 4.24) ไม่พบว่ามีการสร้าง hartig net มีเพียงเส้นใยราเจริญอยู่รอบรากเท่านั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.23 ภาพตัดขวางของรากกระถินอายุ 6 เดือน ที่ใส่เชื้อ XK2 พบว่าไม่มีการสร้าง ใยฮาร์ติก (Hartig net) แต่มีเส้นใยราเจริญอยู่รอบๆ



ภาพที่ 4.24 ภาพตัดขวางของรากสะแกอายุ 6 เดือน ที่ใส่เชื้อ XK2 พบว่าไม่มีการสร้าง ใยฮาร์ติก (Hartig net) มีเพียงเส้นใยราเจริญอยู่รอบราก

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ด *Phaeogyroporus portentosus* จากสวนไม้ผลต่างๆ และตามตลาดท้องถิ่นในพื้นที่ 8 จังหวัด ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก ได้แก่ กรุงเทพฯ กาฬสินธุ์ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา นนทบุรี ปทุมธานี ยโสธร และสมุทรปราการ ระหว่างช่วงฤดูฝนของแต่ละปี ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม พ.ศ. 2549 ถึง 2550 พบว่า เห็ดชนิดนี้มีชื่อเรียกที่ต่างกันไปในแต่ละภาคและท้องถิ่นหรือตามพืชอาศัยที่พบเห็ดชนิดนี้ เช่น เห็ดตับเต่าดำ (ภาคกลาง) เห็ดห้าหรือเห็ดหว้า (ภาคเหนือ) เห็ดผึ้งหรือเห็ดน้ำผึ้ง(ภาคอีสาน) และเห็ดมะม่วง โดยดอกเห็ดมีขนาดใหญ่ สีน้ำตาลอ่อนจนถึงดำ ผิวหมวกเห็ดเรียบลื่นเป็นมันเมื่อได้รับความชื้นสูง เนื้อเยื่อมีสีขาวจนถึงสีเหลืองอ่อน เมื่อฉีกขาดหรือช้ำจะไม่เปลี่ยนสี สปอร์มีผิวเรียบ รูปร่างค่อนข้างกลม และพบ clamp connection ซึ่งตรงกับ *Phlebopus portentosus* ที่รายงานไว้ใน Halling (2008) และตรงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดตับเต่าดำที่รายงานโดย สิริลักษณ์ และคณะ (2550) แต่ใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phlebopus colossus* (R. Heim) Singer ซึ่งอาจเนื่องมาจากความผิดพลาดในการจำแนกชนิด และการจำแนกชนิดโดยอ้างอิงหลักฐานที่เก่าเกินไป โดยที่ลักษณะภายนอกต่างๆ ของดอกเห็ด จะมีลักษณะที่แตกต่างกันไป ถึงแม้ว่าจะเป็นเห็ดสายพันธุ์เดียวกัน ทำให้เกิดความเข้าใจผิดในการจำแนกชนิดที่ถูกต้อง รวมไปถึงการที่เห็ดมีชื่อท้องถิ่นเหมือนกันแต่เมื่อทำการจำแนกชนิดแล้วพบว่าต่างกัน เช่น เห็ดผึ้งชาติที่พบใน อ.ภูพาน จ.สกลนคร เป็นเห็ด *Boletellus emodensis* (Berk.) Singer ส่วนเห็ดผึ้งชาติที่พบที่ กิ่งอำเภอเวียงเชียงรุ้ง จ.เชียงราย เป็นเห็ด *B. ananas* (M.A. Curtis) Murrill. โดยเห็ดทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะแตกต่างกันคือ *B. emodensis* ดอกเห็ดมีสีแดงเข้มกว่า เนื้อเยื่อเห็ดมีสีเหลือง เมื่อช้ำหรือเกิดการฉีกขาดเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ส่วนใน *B. ananas* เนื้อเยื่อเห็ดมีสีขาว เมื่อช้ำหรือเกิดการฉีกขาดไม่เปลี่ยนสี และในเห็ดตาเฒ่าก็พบว่ามี 2 ชนิด คือ *Strobilomyces confusus* Singer และ *S. floccopus* (Vahl.) P. Karst. (สิริลักษณ์ และคณะ, 2550) หรือเห็ดที่มีรายงานลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันมากแต่เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแล้วพบว่าเป็นคนละชนิดกัน เช่นใน *Gyrodon* spp. ที่มีรายงานลักษณะสัณฐานวิทยาเหมือนกับ *Boletinellus* spp. (Binder และ Hibbett, 2006)

เมื่อทำการแยกเส้นใยจากเนื้อเยื่อดอกเห็ด *P. portentosus* สามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้ 22 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะเส้นใย สี การเจริญของเส้นใยที่แตกต่างกัน และพบอยู่กับพืชอาศัยหลายชนิดมาก ทำให้อาจเกิดความผิดพลาดในการจำแนกชนิดของเห็ดได้ ดังที่มีรายงานใน Marx

(1980) ว่า *Pisolithus tinctorius* สายพันธุ์ 270 ที่แยกได้จากดอกเห็ดในป่าสนของอเมริกา นำมาทำเป็นหัวเชื้อสำหรับโครงการปลูกป่าทั่วโลก และมีความแปรผันของการเจริญของพืช (Marx และคณะ, 1982) จึงมีข้อสังเกตุว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาสกุล *Pisolithus* มีเพียงชนิดเดียวคือ *Pisolithus tinctorius* จริงหรือไม่ เนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้าพบความแปรปรวนของลักษณะดอกเห็ด สปอร์ และเส้นใยที่อยู่ร่วมกับพืชอาศัยที่ต่างกัน (Kope และ Fortin, 1990; Burgess และคณะ, 1994) นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของอัตราการเจริญของเส้นใยและกิจกรรมของเอนไซม์ (Ho, 1987) และความสามารถในการเกิดเอคโตไมคอร์ไรซาในพืชอาศัยชนิดต่างๆ (Tonkin และคณะ, 1989; Lamhamedi และคณะ, 1990) เนื่องจากการใช้เพียงลักษณะของดอกเห็ดไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *P. portentosus* ได้ จึงมีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์มาใช้

ผลการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วง ITS มาคำนวณหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดเป็นกลุ่มของสายพันธุ์ต่างๆ ในรูปของแผนภูมิต้นไม้ โดยใช้วิธี Neighbour-joining (NJ) พบว่ารา *P. portentosus* ทั้ง 22 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดโดยมีค่า bootstrap สูงถึง 100% และจัดอยู่ในกลุ่ม A ร่วมกับ *Phlebopus* sp.REH8795 (Accession EU718111) และ *Phlebopus portentosus* WPPH2 (Accession FJ603112) แต่เมื่อพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่าทุกสายพันธุ์มีความแตกต่างกันของลำดับเบสในบริเวณ ITS1 ส่วนกลุ่ม B ซึ่งประกอบด้วย *P. portentosus* Php1 (Accession DQ534569) และ *Phlebopus portentosus* Php1 (Accession EU718110) นั้นแยกเป็นอีกกลุ่มอย่างชัดเจน แต่เนื่องจากรา *P. portentosus* เป็นราที่มีการศึกษาน้อยทำให้ข้อมูลทางพันธุกรรมของรา *P. portentosus* มีน้อยเช่นกัน จึงไม่อาจแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของรา *P. portentosus* ที่มาจากแหล่งที่มีลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันตามที่มีรายงานการพบในหลายประเทศ และสรุปได้ว่าเห็ดชนิดนี้ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บได้จากหลายท้องถิ่นของประเทศไทยมีความแปรผันทางพันธุกรรมน้อยมาก และถึงแม้ว่าจะเคยมีรายงานในชื่อที่ต่างกันเพราะลักษณะของสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย แต่น่าจะเป็นเห็ดชนิดเดียวกัน

Binder และ Bresinsky (2002); Binder และคณะ (2005); Bruns และคณะ (1998); Grubisha และคณะ (2001); Jarosch (2001); Kretzer และ Bruns (1999) รายงานผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ rDNA ในไมโตคอนเดรียของราในลำดับ Boletales ว่ามาจากชาติพันธุ์เดียวกัน รวมทั้ง Binder และ Hibbett (2006) ได้รายงานถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างรา *Phlebopus portentosus* และ *Boletinellus merulioides* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Boletinellaceae ที่มีค่า bootstrap สูงถึง 85% และจัดอยู่ในกลุ่มลำดับย่อย Sclerodermatineae

เหมือนกับที่รายงานไว้โดย Binder และ Bresinsky (2002); Hughey และคณะ (2000) แต่ต่างจากที่ Kretzer และ Bruns (1999) รายงานว่าราในวงศ์ Boletinellaceae จัดเป็นกลุ่มที่แยกเป็นอิสระออกจากราอื่นๆ ในลำดับย่อย Sclerodermatineae และ Yang และคณะ (2006) ที่ใช้ลำดับเบสของยีน atp6 มาพิจารณาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของราสกุล *Rhodactina* ของภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งอยู่ในลำดับ Boletales พบว่าราสกุล *Rhodactina* กับรา *Phlebopus portentosus* มีค่า bootstrap 75% และรา *Phlebopus portentosus* กับรา *Boletinellus merulioides* มีค่า bootstrap เพียง 60% แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งของลำดับเบสในช่วงที่นำมาใช้ในการพิจารณาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนั้น มีผลต่อตำแหน่งของความสัมพันธ์ที่อยู่บนแผนภูมิต้นไม้

เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชทดสอบ โดยพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ กระถิน แค โสน มะขามเทศ และ สะแก พบว่าหลังจากใส่เชื้อรา *P. portentosus* แล้ว 2 สัปดาห์ นำรากพืชทดสอบไปทำการตัดตามขวางบนกระจกสไลด์แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากของพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด ไม่พบว่ามีการสร้าง hartig net ซึ่งการสร้าง hartig net เป็นวิธีที่ใช้ในการจำแนกชนิดของรากเอคโตไมคอร์ไรซา (Harley และ Smith, 1983) และในการทดลองเกี่ยวกับราเอคโตไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่ พบว่าการเกิด hartig net เป็นตัวชี้วัดที่ดีของการเข้ากันได้กับพืชอาศัย และเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเจริญของพืชอาศัยอีกด้วย (Tonkin และคณะ, 1989; Burgess และคณะ, 1994; Dell และคณะ, 1994)

Holiday (1998) กล่าวว่าเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นความสัมพันธ์ที่รามีความจำเพาะต่อพืชอาศัยเท่านั้น และไม่พบกับพืชชนิดอื่นที่มีแหล่งที่อยู่เดียวกัน ขัดแย้งกับ ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ (2546) ที่รายงานว่าเห็ดตับเต่าดำเป็นเห็ดที่เกิดกับพืชอาศัยหลายชนิด พบใน ป่าเต็งรัง ป่าแพะ ป่าสะแก ใต้ต้นโพธิ์ ไทร และกุ่ม รวมถึงใต้ต้นของไม้ผลในสวน เช่น สวนมะม่วง มะไฟ ลำไย มะกอกน้ำ มะขาม ส้มโอ แค โสน และมะขามเทศ สวนไม้ผลที่มีต้นทองหลาง กระถินยักษ์ กระถินเทพา ฯลฯ Molina และคณะ (1992) และ Cairney และ Chambers (1999) กล่าวว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาส่วนมากมีความจำเพาะต่อพืชอาศัยที่ต่ำ ต่างจากที่ Sato และคณะ (2007) รายงานว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีพืชอาศัยกว้างหรือหลายชนิดนั้น อาจพบได้ยากกว่าที่มีการคาดกันไว้และราเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีความจำเพาะต่อพืชอาศัยมากๆ น่าจะมีอยู่หลายชนิด Galán และ Moleno (1998) รายงานว่ารา *Ruhlandiella berolenensis* ที่พบในยุโรปมีความจำเพาะต่อ *Eucalyptus* spp. ส่วน Borowicz และ Juliano(1991) ได้เปรียบเทียบชนิดของพืชอาศัยระหว่างราเอคโตไมคอร์ไรซา และราก่อโรคที่รากและยอด ซึ่งสรุปได้ว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิดมีความจำเพาะต่อพืชอาศัย Newton และ Haigh (1998) สรุปว่า ราเอคโตไมคอร์ไรซามี

ความจำเพาะต่อพืชอาศัย จากการทำการสำรวจพืชอาศัยของราเอคโตไมคอร์ไรซาในอังกฤษ โดยอาศัยข้อมูลจากงานวิจัยก่อนๆ และการพบดอกเห็ดที่ใต้ต้นพืชอาศัยนั้นๆ แต่วิธีการจำแนกชนิดของพืชอาศัยที่ใช้ในอดีตมักขาดความน่าเชื่อถือ เหมือนที่ Molina และคณะ (1992) ทดสอบความจำเพาะของราต่อพืชอาศัย โดยใช้การสำรวจการเกิดดอกเห็ดใต้ต้นไม้แล้วจำแนกว่าพืชชนิดนั้นคือพืชอาศัย แต่พบว่าในกรณีที่เป็นป่าผสม การตัดสินว่าพืชนั้นๆ เป็นพืชอาศัยที่แท้จริงทำได้ยาก เนื่องจากการตรวจสอบการสัมผัสกันของเส้นใยราและรากของพืชอาศัยในธรรมชาติเป็นไปได้ลำบาก (Trappe, 1962; Bills และคณะ, 1986) เนื่องจากรากพืชบางชนิด (Stone และ Kalisz, 1991) และเส้นใยราสามารถแผ่ออกไปได้ไกลมาก ดังนั้นการใช้รากเอคโตไมคอร์ไรซาของพืชมาตรวจทางพันธุศาสตร์เพื่อจำแนกชนิดของพืชอาศัยจึงน่าจะมีความถูกต้องมากกว่า รวมถึงการใช้เส้นใยราจากตัวอย่างดินมาตรวจสอบ เพราะรานั้นอาจไม่สร้างดอกเห็ดทุกปี เนื่องจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม และจำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการจำแนกชนิดที่ถูกต้อง รวมถึงการไม่พบดอกเห็ดนั้นไม่สามารถเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าไม่มีเส้นใยรานั้นๆ อยู่ในดิน (Cairney, 2005)

หากพืชทดสอบที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นพืชอาศัยของรา *P. portentosus* จริงก็น่าจะเกิดการสร้างแมนเทิลและ hartig net ขึ้น เพราะเนื้อเยื่อพืชนั้นสามารถตอบสนองต่อราที่มีประโยชน์และไม่มีประโยชน์ได้ โดยพืชสามารถตรวจหา microbe associated molecular patterns (MMAPs) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ (Altenbach และ Robatzek, 2008) เช่น ไคติน และ ergosterol ของผนังเซลล์รา lipo-chito-oligosaccharides และ flagellin ของแบคทีเรีย (Felix และคณะ, 1999; Melotto และคณะ, 2006; Meyer และคณะ, 2001; Zipfel และคณะ, 2006) โดยที่โครงสร้างเหล่านี้พืชหลายวงศ์สามารถตรวจพบได้ (Altenbach และ Robatzek, 2007) โดยราไมคอร์ไรซาที่มีความสัมพันธ์แบบได้ประโยชน์ทั้ง 2 ฝ่ายกับพืช ซึ่งจำเป็นต่อการหาธาตุอาหารและการเจริญของพืช (Smith และ Read, 1997) พบว่าปกติแล้วพืชมักลดการป้องกันลงชั่วคราวเพื่อตอบสนองต่อการเจริญร่วมกันกับราเอคโตไมคอร์ไรซา ซึ่ง Adomas และคณะ (2007) รายงานว่า พืชมีการตอบสนองน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการตอบสนองของพืชที่ถูกรุกรานโดยราก่อโรค

สรุปได้ว่าพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิดไม่เป็นพืชอาศัยของรา *P. portentosus* และ *P. portentosus* ไม่สร้างราเอคโตไมคอร์ไรซา เพราะการที่พบเห็ดชนิดนี้ขึ้นอยู่กับพืชอาศัยหลายชนิดมากและพืชบางชนิดก็ไม่เคยมีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของราเอคโตไมคอร์ไรซามาก่อน ทำให้ขัดแย้งกับเรื่องความจำเพาะของราเอคโตไมคอร์ไรซาต่อรากพืชอาศัย แต่จากผลการทดลองที่พบว่ามีเส้นใยราพันอยู่รอบรากบางๆ ในรากของพืชทดสอบทุกชนิด และในการทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยนี้อาจให้ระยะเวลาที่เชื้ออยู่ร่วมกับรากพืชอาศัยสั้นเกินไป จึงทำการ

ทดสอบโดยใส่เชื้อร่วมกับพืชทดสอบที่เลือกมา 2 ชนิด คือ กระถิน และสะแก ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับพืชอาศัยที่เคยมีรายงานไว้ใน Kendrik (1985) โดยให้ระยะเวลาของการอยู่ร่วมกันระหว่างรากับรากพืชนาน 6 เดือน

เมื่อทดสอบผลของรา *P. portentosus* ที่มีต่อการเจริญของกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแก โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแกเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และไม่พบรากเอคโตไมคอร์ไรซาในทุกชุดการทดลอง ตรงกับรายงานใน Sanmee (2004) ที่ทดสอบหาพืชอาศัยของเห็ดห้า โดยใช้พืช 6 ชนิด คือ ก่อเดือย ยางนา ลำไย สนสามใบ ยูคาลิปตัส และหว้า พบว่าไม่มีรากเอคโตไมคอร์ไรซาเกิดขึ้นในพืชทดลองทุกชนิด แต่ผลการทดสอบทางพันธุศาสตร์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาของสนสามใบที่ใส่เชื้อเห็ดห้านั้น ให้ผลที่แสดงว่ารากดังกล่าวเป็นเอคโตไมคอร์ไรซาของเห็ดชนิดนี้นั้น อาจเป็นความผิดพลาดที่เนื่องมาจาก ปกติแล้วสนสามใบเป็นพืชอาศัยของราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิด และการนำรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะแตกต่างกัน ที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ไปทำการทดสอบทางพันธุศาสตร์ ซึ่งทำให้อาจมีเส้นใยรา *P. portentosus* พันอยู่รอบๆ รากเอคโตไมคอร์ไรซาของราชนิดอื่น และเกิดการเข้าใจผิดว่ารา *P. portentosus* ที่พันอยู่รอบรากนั้นสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับรากสนสามใบ รวมถึงการใช้ไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นซึ่งมีความจำเพาะต่อ *P. portentosus* ทำให้เส้นใยเห็ด *P. portentosus* ที่ติดไปกับรากเอคโตไมคอร์ไรซามีผลที่ได้เป็นบวก การที่รากของสนสามใบที่มีเส้นใยรา *P. portentosus* พันอยู่นั้น สอดคล้องกับงานวิจัยฉบับนี้ที่ว่ารา *P. portentosus* พันอยู่รอบๆ รากพืชเท่านั้น ไม่มีการสร้างแมนเทิล และ hartig net กับรากของกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแก

จากการทดสอบครั้งนี้ทำให้สรุปได้ว่ารา *P. portentosus* นั้นไม่ใช่ราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างที่เคยเข้าใจกันมาตลอด เพราะเมื่อพิจารณาจากการที่ไม่มีการสร้างแมนเทิล และ hartig net รวมถึงไม่มีการกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้ทดสอบ ทำให้ขัดแย้งกับข้อเท็จจริงที่ว่าเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นการอยู่ร่วมกันแบบต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ และต้องมีการสร้างแมนเทิล และ hartig net รวมทั้งมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของพืชอาศัย เช่น เพิ่มความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก มวลของลำต้นและราก และมวลชีวภาพรวม โดยการศึกษาครั้งนี้มีผลสอดคล้องกับที่รายงานโดย Bruns และคณะ (1998) ว่ารา *P. portentosus* ไม่น่าที่จะมีความสัมพันธ์กับพืชแบบเอคโตไมคอร์ไรซา นอกจากนี้รายงานการเกิดดอกเห็ด *P. portentosus* บนอาหารเมล็ดข้าวฟ่างโดยปราศจากพืชอาศัยของ Sanmee (2004) ยิ่งเป็นข้อบ่งชี้ที่ชัดเจนมากขึ้น เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซาต้องการปัจจัยที่จำเป็นจากพืชอาศัยในการสร้างดอกเห็ด และ Bruns (2002) ที่รายงานว่า ไม่มีหลักฐานที่ยืนยันชัดเจนว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถเจริญได้เองในธรรมชาติเพียงลำพัง

โดยที่ไม่มีการเชื่อมต่อกับพืชอาศัย นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Singer (1986) อ้างถึงใน Binder และ Hibbett (2006) ว่ารูปแบบการดำรงชีวิตของราในวงศ์ Boletinellaceae นั้นยังเป็นที่สับสนกันอยู่มาก เช่น *Phlebopus tropicus* ที่พบอยู่ร่วมกับแมลง *Pseudococcus comstockii* ซึ่งร่วมกันทำลายรากของต้นส้ม คล้ายกับที่รายงานใน จริยา วิสิทธิ์พานิช และคณะ (2543) ว่าพบเส้นใยเห็ด *P. portentosus* ที่รากลำไยอยู่ร่วมกับเพลี้ยแป้งรากลำไย (*Paraputo* sp.) ซึ่งเป็นสาเหตุให้ต้นลำไยเกิดการทรุดโทรม แสดงอาการยืนต้นตาย แต่เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับรา *P. portentosus* และการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับราชนิดนี้มีอยู่น้อยมาก ทำให้ไม่อาจชี้ชัดได้ว่ารา *P. portentosus* เป็นพวก saprobe หรือ parasite เพราะจากที่ Hall และคณะ (2003) รายงานว่า ราบางชนิดที่เคยคิดว่าเป็นไมคอร์ไรซากลับมีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยที่ซับซ้อนมาก และไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่ม symbiont saprobe หรือ pathogen เช่น ราไมคอร์ไรซา *Tricholoma matsutake* ในช่วงแรกของการเจริญบนรากอายุน้อยพบว่าเป็นไมคอร์ไรซา แต่เมื่อมีอายุมากขึ้นกลับแสดงความเป็นราก่อโรค และทำลายชั้นคอร์เท็กซ์ของรากพืช แต่ในท้ายที่สุดกลับแสดงความสามารถแบบรา saprobe คือสามารถอาศัยในเนื้อเยื่อของพืชได้ถึงแม้ว่าพืชอาศัยต้นนั้นจะถูกตัดไปแล้วก็ตาม รวมถึงรา *Lactarius deliciosus* ที่สามารถรุกรานเซลล์ชั้น cortical ของพืชอาศัยได้

ถึงแม้ว่ารา *P. portentosus* จะไม่ใช่ราเอคโตไมคอร์ไรซา แต่ก็ยังควรมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งในเรื่องปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างดอกเห็ด และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตดอกเห็ดทางการค้า เนื่องจากราเห็ดตับเต่าดำนั้น มีราคาสูง มีขนาดดอกเห็ดที่ค่อนข้างใหญ่ เป็นที่นิยมรับประทาน และพบกระจายอยู่ทั่วทุกภาคในประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ด *Phaeogyroporus portentosus* จากสวนไม้ผลต่างๆ และตามตลาดท้องถิ่นในพื้นที่ 8 จังหวัด ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก ได้แก่ กรุงเทพฯ กาฬสินธุ์ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา นนทบุรี ปทุมธานี ยโสธร และสมุทรปราการ ระหว่างช่วงฤดูฝนของแต่ละปี ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม พ.ศ. 2549 ถึง 2550 ดอกเห็ดที่เก็บมาได้นั้น หมวกเห็ดมีสีดำจนถึงสีน้ำตาลอ่อน เนื้อเยื่อมีสีเหลือง รูสร้างสปอร์มีขนาดเล็กและติดกันแน่น ก้านดอกขนาดใหญ่เนื้อแน่น ผิวไม่เรียบเป็นร่องปุ่ม สปอร์สีน้ำตาลอ่อน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 ไมโครเมตร เส้นใยเห็ดมีการสร้าง clamp connection เมื่อนำมาแยกเส้นใยจากเนื้อเยื่อดอกเห็ด *P. portentosus* ที่เก็บรวบรวมได้ สามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้ 22 สายพันธุ์

จากการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อพิจาราณาจากแผนภูมิต้นไม้พบว่า รา *P. portentosus* ทั้ง 22 สายพันธุ์ นั้นมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดแม้ว่าจะเป็นสายพันธุ์ที่มาจากจังหวัดต่างกันก็ตาม โดยราทั้ง 22 สายพันธุ์ จัดรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกับตัวอย่างรา *Phlebopus* sp.REH8795 และ *Phlebopus portentosus* WPPH2 ที่เป็นตัวอย่างสายพันธุ์จากเชียงใหม่

จากการคัดเลือกราสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อทดสอบเอคโตไมคอร์ไรซา เมื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เส้นใยมากและเจริญเร็วที่สุด โดยเปรียบเทียบจากความกว้างของโคโลนีของราอายุ 4 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMN พบว่า *P. portentosus* แต่ละสายพันธุ์มีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราที่ต่างกัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.6 ถึง 8.0 เซนติเมตร เลือกรา *P. portentosus* สายพันธุ์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ได้ดีที่สุด 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ XK2 และ MM

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด พบว่าไม่มีพืชชนิดใดที่มีการสร้างความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซากับรา *P. portentosus* เลย โดยในกล้ากระถินเส้นใยของราจะมีการเจริญอยู่รอบรากอย่างหลวมๆ เมื่อนำรากกระถินที่มีราพันอยู่ไปทำการตัดตามขวางบนกระจกสไลด์ แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากของกระถิน

ไม่มี hartig net เกิดขึ้น ในกล้าแคพบว่าเส้นใยราจะเจริญอยู่รอบรากบางๆ เมื่อนำรากที่มีเส้นใยราพันอยู่ไปทำการตัดตามขวางบนกระจกสไลด์ แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากของแคไม่มี hartig net เกิดขึ้น การทดสอบในกล้าโสนพบว่าเส้นใยราจะเจริญอยู่รอบๆ ราก แต่เมื่อนำรากที่มีเส้นใยราพันอยู่ไปทำการตัดตามขวางบนกระจกสไลด์แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากของโสนไม่มีการสร้าง hartig net แต่พบการเกิด clamp connection ของเส้นใยที่พันอยู่รอบราก ในกล้ามะขามเทศพบว่าเส้นใยราจะเจริญอยู่รอบรากบางๆ เมื่อนำรากที่มีเส้นใยราพันอยู่ไปทำการตัดตามขวางบนกระจกสไลด์ แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากของมะขามเทศไม่มี hartig net เกิดขึ้น ในกล้าสะแกพบว่าเส้นใยราจะเจริญอยู่รอบๆ ราก และเมื่อนำรากที่มีเส้นใยราพันอยู่ไปทำการย้อมสีและตัดตามขวางบนกระจกสไลด์ แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากของสะแกไม่มี hartig net เกิดขึ้น

เมื่อทดสอบผลของรา *P. portentosus* สายพันธุ์ที่คัดเลือกต่อการเจริญของกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแก โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่ารา *P. portentosus* ที่คัดเลือกทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแกเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยอัตราการเจริญทางความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน และมวลชีวภาพรวม ในชุดการทดลอง CXK2 XK2 CMM และ MM ของกล้าไม้กระถินและกล้าไม้สะแก ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนอัตราการติดเชื้อรา *P. portentosus* ในกล้าไม้ทั้ง 2 ชนิดเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้สรุปได้ว่ารา *Phaeogyroporus portentosus* นั้นไม่ใช่ราเอคโตไมคอร์ไรซา เพราะราชนิดนี้ไม่มีการสร้างแมนเทิล และ hartig net รวมถึงไม่มีการกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้ทดสอบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะในการวิจัย

1. ถึงแม้ว่ารา *P. portentosus* จะไม่ใช่ราเอคโตไมคอร์ไรซา แต่เนื่องจากราชนิดนี้สร้างดอกเห็ดที่สามารถรับประทานได้ มีราคาสูง และพบกระจายอยู่ทั่วประเทศ จึงควรศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อส่งเสริมให้เป็นเห็ดเศรษฐกิจ

2. รา *P. portentosus* มีการสร้างสารทุติยภูมิค่อนข้างมาก จึงควรศึกษาและทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพ เพื่อเป็นข้อมูลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ต่อไป

3. ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์พบว่า รา *P. portentosus* มีอัตราการเจริญในช่วงแรกๆ ที่ช้ามาก ทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ง่าย จึงควรทำการถ่ายเชื้อเป็นประจำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2542. การศึกษาเห็ดกลุ่มเห็ดตับเต่าในประเทศไทย. การสัมมนาไมคอร์ไรซา: สถานภาพการวิจัยในปัจจุบันและแนวทางในอนาคต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตร-ศาสตร์. 8-9 ธันวาคม.

จริยา วิสิทธิ์พานิช, ชาตรี สิทธิกุล และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง. 2543. อาการตายเฉียบพลันของมะม่วงและลำไย. ว. เคหการเกษตร 24: 169-173.

วสันณ์ เพชรรัตน์. 2542. เห็ดเสม็ด. ข่าวสารเพื่อผู้เพาะเห็ด 4(3): 13-15.

สิริลักษณ์ สีหนันท์, วสันณ์ เพชรรัตน์ และสมปอง เตชะโต. 2550. เห็ดโบลีทส์บางชนิดในประเทศไทย. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 29(3): 737-754.

ออมทรัพย์ นพอมรบดี. 2542. การวิจัยและพัฒนาการใช้เชื้อราวีเอไมคอร์ไรซาในกรมวิชาการเกษตร. การสัมมนาไมคอร์ไรซา: สถานภาพการวิจัยในปัจจุบันและแนวทางในอนาคต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 8-9 ธันวาคม.

ภาษาอังกฤษ

Aggangan, N. S., Dell, B., Malajczuk, N., dela Cruz, R. E., and Barrow, K. D. 1996. Soil fumigation and phosphorus supply affect the formation of *Pisolithus – Eucalyptus urophylla* ectomycorrhizas in two acid Philippines soils. Plant and Soil 180(2): 259-266.

Alexander, I. J., and Högberg, P. 1986. Ectomycorrhizas of tropical angiospermous trees. New Phytologist 102: 541–549.

Asbjornsen, H., Cayetano, A., Valdes, M., Palacios-Mayorga, S., and Vogt, K. 1996. Mycorrhizal inoculum potential as an indicator of ecosystem disturbance in the mountain tropics of southern Mexico. International Conference on Mycorrhizae August 4-9, California.

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 Phytologist 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 Genetics and Biology 28(1): 21-33.

Bending, G. D., and Read, D. J. 1997. Lignin and soluble phenolic degradation by ectomucorrhizal and ericoid mycorrhizal fungi. Mycological Research 101: 1348-1354.

Binder, M., and Bresinsky, A. 2002. Derivation of a polymorphic lineage of Gasteromycetes from boletoid ancestors. Mycologia 94(1): 85-98.

Binder, M., and Hibbett, D. S. 2006. Molecular systematics and biological diversification of *Boletales*. Mycologia 98(6): 971-981.

Bonfante-Fasolo, P., and Gianinazzi-Pearson, V. 1982. Ultrastructure aspects of endomycorrhiza in the Ericaceae III. Morphology of dissociated simians and modifications occurring during their reassociation in axenic culture. New Phytologist 91: 691-704.

Brundrett, M. C., Bougher, N., Dell, B., and Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. The Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia: ACIAR Monograph.

Brundrett, M. C., Piche, Y., and Peterson, R. L. 1985. A developmental study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. Canadian Journal of Botany 63: 194.

Bruns, T. D., Bidartondo, M. I., and Taylor, D. L. 2002. Host specificity in ectomycorrhizal communities: What do the exceptions tell us? Journal of Comparative Biology 42.

Bruns, T. D., Szaro, T. M., Gardes, M., Cullings, K. W., Pan, J. J., Taylor, D. L., Horton, T. R., Kretzer, A., Garbelotto, M., and Li, Y. 1998. A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. Molecular Ecology 7: 257-272.

Burgess, T., Dell, B., and Malajczuk, N. 1994. Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W Hill ex Maiden. New Phytologist 127: 731-739.

Carling, D. E., and Brown, M. F. 1982. Anatomy and physiology of vesicular-arbuscular and non-mycorrhizal roots. Phytopathology 72: 1108-1114.

Chilvers, G. A., Lapeyrie, F. F., and Horan, D. P. 1987. Ectomycorrhizal vs. endomycorrhizal fungi within the same root system. New Phytologist 107: 441-448.

Claridge, A., and May, T. W. 1994. Mycophagy among Australian mammals. Journal of Ecology 19: 251-275.

Dell, B., Malajczuk, N., Bougher, N. L., and Thomson, G. 1994. Development and function of *Pisolithus* and *Scleroderma* ectomycorrhizas forms in-vitro with *Allocasuarina, Casuarina* and *Eucalyptus*. Mycorrhiza 5: 129-138.

Domisch, T., Finer, L., Lehto, T., and Smolander, A. 2002. Effect of soil temperature on nutrient allocation and mycorrhizas in Scots pine seedlings. Plant and Soil 243(2): 253.

Durall, D. M., Harniman, S. M., Berch, S. M., and Goodman, D. M. 1996. Morphology of ectomycorrhizal system (Dissection Microscope). In D. M. Good; D. M. Durall; J. A. Trofymow; and S. M. Berch (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.

Frank, A. B. 1885. Über die auf Wurzelsymbisc beruhende Ernahrung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. Dustch Journal of Botany 3: 128-145.

Garcia, M. A., Finer, L., Lehto, T., and Smolander, A. 2002. Effect of soil temperature on nutrient allocation and mycorrhizas in Scots pine seedlings. Plant and Soil 243(2): 253.

Hadley, G. 1982. Orchid Biology: Reviews and Perspectives. New York: Cornell University press.

Hall, I. R., Yun, W., and Amicucci, A. 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. Trends in Biotechnology 21(10): 433-438.

Halling, R. E., Osmundso, T. W., and Neves, M. A. 2008. Pacific boletes: Implications for biogeographic relations. Mycological Research 112: 437-447.

Harley, J. L., and Smith, S. E. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. London: Academic Press.

Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., and Pegler, D. N. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 8th ed. Wallingford: CAB International.

Ho, I. 1987. Vesicular arbuscular mycorrhizae of halophytic grasses in the Aluvard desert of Oregon. Journal of Northwest SCI-TECH University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition) 61: 148-151.

Hutchison, L. J., and Pitch, Y. 1995. Effects of exogenous glucose on mycorrhizal colonization in-vitro by early-stage and late-stage ectomycorrhizal fungi. Canadian Journal of Botany 73: 898-904.

Ingham, E. R., and Massicotte, H. B. 1994. Protozoan communities around conifer roots colonized by etomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 5(1): 53-61.

Kainulainen, P., Holopainen, J., Palomaki, V., and Holipainen, T. 1996. Effects of nitrogen fertilization on secondary chemistry and ectomycorrhizal state of Scots pine seedlings and on growth of gray pine aphid. Journal of Chemical Ecology 22(4): 617-636.

Kohn, L. M., and Stasovski, E. 1990. The mycorrhizal status of plants at Alexandra Fiord, Ellesmere Island, Canada, a high arctic site. Mycologia 82: 23–35.

Kovmanik, P. P., and McGraw, A. C. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In N. C. Schenck (ed.), Methods and Principles of Mycorrhizal Research Minnesota: APS Press.

Kraigher, H., Grayling, A., Wang, T. L., and Hanke, D. E. 1991. Cytokinin production by 2 ectomycorrhizal fungi in liquid culture. Phytochemical Analysis 30(7): 2249-2254.

Laatikainen, T., and Heinonen-Tanski, H. 2002. Mycorrhizal growth in pure cultures in the presence of pesticides. Mycological Research 157(2): 127-137.

Lamhamedi, M. S., Fortin, J. A., Kope, H. H., and Kropp, B. R. 1990. Genetic variation in ectomycorrhiza formation by *Pisolithus arhizus* on *Pinus pinaster* and *Pinus banksiana*. New Phytologist 115: 689-697.

Marx, D. H. 1980. Ectomycorrhizal fungus inoculation: A tool for improving forestation practices. In P. Mikola (ed.), Tropical mycorrhiza research, pp. 13–71. New York: Oxford University Press.

Marx, D. H., Maaul, S. B., and Cordell, C. E. 1992. Application of specific ectomycorrhizal fungi in world forestry. In G. F. Leafham (ed.), Frontiers in industrial mycology. USA: Chapman and Hall.

Marx, D. H., Ruehle, J. L., Kenny, D. S., Cordel, C. E., Riffle, J. W., Molina, R. J., Pawuk, W. H., NAuratil, S., Tinus, R. W., and Goodwin, O. C. 1982. Commercial vegetation inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizal on container-grown seedlings. Forest Science 28: 374-400.

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.) seedling inoculated with two different ectomycorrhizal fungi. Forest Ecology and Management 128(3): 259-268.

Massicotte, H. B., Melville, L. H., Peterson, R. L., and Luoma, D. L. 1998. Anatomical aspects of field ectomycorrhizas on *Polygonum viviparum (*Polygonaceae) and *Kobresia bellardii* (Cyperaceae). Mycorrhiza 7: 287-292.

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.

Miersch, O., Regvar, M., and Wasternack, C. 1999. Metabolism of jasmonic acid in *Pisolithus tinctorius* cultures. Annals of Botany 39(3): 243-247.

Miller, O. K. Jr. 1982. Taxonomy of ecto- and ectendomycorrhizal fungi. In N. C. Schenck (ed.), Method and principles of mycorrhizal research, pp. 91-101, St. Paul Minnesota: The American Phytopathological society publication.

Molina, R., Massicote, H., and Trappe, J. M. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: Community-ecological consequences and practical implications. In M. J. Allen (ed.), Mycorrhizal Functioning pp. 357-423. New York: Chapman and Hall.

Molina, R., and Palmer, J. G. 1982. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In N. C. Schenck (ed.), Method and Principles of Mycorrhizal research, pp. 115-129. St. Paul: Am. Phytopath. Soc.

Mortier, F., Tacon. L., and Garbaye. 1988. Effect of inoculum type and inoculation dose on ectomycorrhizal development, root necrosis and growth of Douglas fir seedlings inoculated with *Laccaria laccata* in a nursery. Annals of Forest Science 45: 301-310.

Moser, M. 1963. Förderung der Mykorrhizenbildung in der forstlichen Praxis. Mitteilungen der Forstllichen Bundesversuchsanstalt Wien 60: 691–720.

Park, J. Y. 1971. Preparation of mycorrhizal grain spawn and its practical feasibility in artificial inoculation. USDA Forest Service Miscellaneous Publish 1189: 239-240.

Phillips, J. M., and Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transaction of the British Mycological Society 55: 158–161.

Phosri, C., Martin, M. P., Sihanonth, P., Whalley, A. J. S., and Watling, R. 2007. Molecular study of the genus Astraeus. Mycological Research 111: 275-286.

Pirozynski, K. A., and Malloch, D. W. 1975. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. Biosystems. 153-164.

Rajkumar, Sharma, G. D., and Mishra, R. R. 1990. Development of ectomycorrhizae on pine and its effect on the growth of *Pinus kesiya* under different moisture regimes. In B. L. Jalali; and H. Charnd (eds.), Trends in Mycorrhizal research, Proceedings of the National Conference on Mycorhiza, Feb. 14-16, pp.199-200. Haryana Agricultural University, Hisar, India.

Reddy, M. S., and Natrajan, K. 1994. Effect of a synthetic pyrethroids on the growth of ectomycorrhizal fungi and mycorrhiza formation in *Pinus patula*. Mycorrhiza 5: 115-117.

Robertson, D., and Robertson, J. 1985. Ultrastructural aspects of *Pyrola* mycorrhiza. Canadian Journal of Botany 63: 1089-1098.

Sanmee, R., Dell, B., Lumyong, P., Izumori, K. and Lumyong, S. 2003. Nutritive value of popular wild edible mushrooms from Northern Thailand. Food Chemistry 82: 527–532.

Sato, H., Yomoto, T., and Murakami, N. 2007. Cryptic species and host specificity in the ectomycorrhizal genus Strobilomyces (Strobilomycetaceae). American Journal of Botany 94(10): 1630-1641.

Sbrana, C., Avio, L., and Giovannetti, M. 1995. Utilization of sucrose by *Hymenoscyphu sericae* (an ericoid endomycorrhizal fungus) and ectomycorrhizal fungi. Mycological Research 99: 1233-1238.

Seehanan, S., Petcharat, V., and Te-chato, S. 2007. Some Boletes of Thailand. Songklanakarin Journal of Science and Technology 29(3): 737-754.

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 Phytologist 137: 529-542.

Smith, S., and Read, J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2nd ed. In H. Brace (ed.). San Diego, CA: Academic Press.

Stoyke, G., and Currah, R. S. 1991. Endophytic fungi from mycorrhizas of alpine ericoid plants. Canadian Journal of Botany 69: 347-352.

Thoen, D., and Ducousso, M. 1989. Mycorrhizal habit and sclerogenesis of *Phlebopus sudanicus* (Gyrodontaceae) in Senegal. Agricultural, Ecosystem and Environment 28: 519-523.

Tibbett, M., Sanders, F. E., Minto, S. J., Dowell, M., and Cairney, J. W. G. 1998. Utilization of organic nitrogen by ectomycorrhizal fungi (*Hebeloma* spp.) of arctic and temperate origin. Mycological Research 102: 1525-1532.

Trappe, J. M. 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. Botanical Review 28: 538-605.

Trappe, J. M. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. Annual Review of Phytopathology 15: 203–222.

Tsanttrizos, Y. S., Kope, H. H., Fortin, J. A., and Ogilvie, K. K. 1991. Antifungal antibiotics from Pisolithis tinctorius. Phytochem 30(4): 1113-1118.

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis; D. H. Gelfand, J. J. Sninsky; and T. J. White (eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications, pp. 315–322. New York: Academic Press.

Yang, Z. L., Trappe, J. M., Binder, M., Sanmee, R., Lumyong, P., and Lumyong, S. 2006. The sequestrate genus *Rhodactina* (Basidiomycata, *Boletales*) in northern Thailand. Mycotaxon 96: 133-140.

Zak. 1973. Classification of Ectomycorrhizae. In G. C. Marks; and T. T. Kozlowski, Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology, 43-78. New York: Academic press.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและปุ๋ย

อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Melin-Norkrans (MMN) (Marx, 1969)

Malt extract	3	กรัม
D-glucose	10	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
$(NH_4)_2HPO_4$	0.25	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.15	กรัม
$CaCl_2$	0.05	กรัม
$FeCl_3$ (1% solution)	1.2	มิลลิลิตร
NaCl	0.025	กรัม
Thiamine HCl	100	ไมโครกรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH เป็น 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สูตรปุ๋ย

NH_4NO_3	15 กรัม ต่อน้ำ 500 มิลลิลิตร โดยใช้ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ N 10.5 ppm
Na_2HPO_4	11.5 กรัม ต่อน้ำ 250 มิลลิลิตร โดยใช้ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ P 10.0 ppm
KCl	4.5 กรัม ต่อน้ำ 250 มิลลิลิตร โดยใช้ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ K 9.4 ppm
$CaCl_2$	7 กรัม ต่อน้ำ 250 มิลลิลิตร โดยใช้ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Ca 10.1 ppm
$MgSO_4$	24 กรัม ต่อน้ำ 400 มิลลิลิตร โดยใช้ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Mg 40 ppm
$Na_2MoO_4.2H_2O$	25 มิลลิกรัม ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ทำการเจือจาง 10^{-2} โดยใช้ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Mo 0.001 ppm

$CuSO_4.5H_2O$	15 มิลลิกรัม ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ทำการเจือจาง 10^{-2} โดยใช้ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Cu 0.006 ppm
H_3BO_3	64 มิลลิกรัม ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร
$ZnSO_4.7H_2O$	44 มิลลิกรัม ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตรได้ธาตุ Zn 0.1 ppm
$MnCl_2.4H_2O$	0.25 กรัม ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Mn 0.7 ppm
FeEDTA	18.1 กรัม ต่อน้ำ 500 มิลลิลิตร โดยใช้ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Fe 5.5 ppm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
วิธีการเตรียมสารเคมี

1. Washing buffer

PVP (polyvinylpyrrolidone)	2.00	กรัม
กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid)	1.76	กรัม
Tris-buffer ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	20.00	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	4.00	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. 2X CTAB lysis buffer

CTAB	4.00	กรัม
Tris-buffer ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	20.00	มิลลิลิตร
EDTA ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	8.00	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	16.36	กรัม
2-mercaptoethanol	1.00	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. **คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์** (24:1 v/v)

คลอโรฟอร์ม (chloroform)	192.00	มิลลิลิตร
ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol)	8.00	มิลลิลิตร

4. 20% Polyethylene glycol (PEG)

PEG	20.00	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	14.61	กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. 1% Agarose gel (w/w)

agarose	1.00	กรัม
0.5X TBE	100.00	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. Tris-buffer **ความเข้มข้น** 1 **โมลาร์** pH 8.0

Tris base	0.20 กรัม
น้ำกลั่น	800.00 มิลลิลิตร

ละลาย Tris base ให้เข้ากับน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)

EDTA	186.10 กรัม
น้ำกลั่น	800.00 มิลลิลิตร

ละลาย EDTA ให้เข้ากับน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย NaOH ให้เท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. Tris-EDTA buffer (TE buffer)

Tris-buffer ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	10.00 มิลลิลิตร
EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	2.00 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. Bovine serum albumin

Bovine serum albumin	20.00 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.00 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. 10X Tris-boric acid EDTA (10XTBE)

Tris (hydroxymethyl) amino methane	54.00 กรัม
EDTA	4.65 กรัม
Boric acid	27.50 กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ค

Clearing and staining method

(Kormaik และ McGraw, 1982 ดัดแปลงจาก Phillips และ Hayman, 1970)

1. ล้างตัวอย่างรากด้วยน้ำให้สะอาด
2. ต้มรากในสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ KOH ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 15-60 นาที (ขึ้นกับปริมาณของราก)
3. รินสารละลาย KOH ออก ล้างรากด้วยน้ำให้สารละลายออกให้หมด
4. ถ้ารากยังมีสีน้ำตาลอยู่ให้แช่ในสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่อุณหภูมิห้องนาน 10-20 นาที หลังจากนั้นล้างรากด้วยน้ำเพื่อล้างสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกให้หมด
5. แช่รากในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ กรดไฮโดรคลอริกนาน 3-4 นาที ล้างรากให้สะอาด
6. ย้อมสีด้วย lactophenol trypan blue นาน 1-24 ชั่วโมง แล้วแช่รากในสารละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลเพื่อล้างสีส่วนเกินออก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง
ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผังการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD)

กำหนดการทดลอง 3 บล็อก แต่ละบล็อกมี 4 ทรีตเมนต์ โดยแต่ละทรีตเมนต์ที่ใช้ในการทดลองเป็นดังนี้

ทรีตเมนต์ A ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ *P. portentosus* isolate XK2 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ทรีตเมนต์ B หัวเชื้อ *P. portentosus* isolate XK2

ทรีตเมนต์ C ชุดควบคุมที่ใส่หัวเชื้อ *P. portentosus* isolate MM ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ทรีตเมนต์ D หัวเชื้อ *P. portentosus* isolate MM

เมื่อสุ่มทรีตเมนต์ลงในบล็อก อาจได้ผังการทดลองดังนี้

บล็อกที่ 1	B	C	D	A
บล็อกที่ 2	C	D	A	B
บล็อกที่ 3	B	A	C	D

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

กล้าไม้กระถิน

ตารางที่ 1 ตารางเปรียบเทียบการเจริญทางความสูงเฉลี่ยของลำต้นกล้าไม้กระถินอายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *Phaeogyroporus portentosus*

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
CXK2	56.67	78.47	97.47	77.80 ± 14.75a
XK2	72.84	68.82	70.62	75.68 ± 10.80a
CMM	70.14	88.70	70.61	76.51 ± 12.91a
MM	85.96	80.34	65.13	77.14 ± 14.41a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source of variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	5.90	1.97	0.0093
Replication	2	170.11	85.06	0.402
Error	6	1270.53	211.76	
Total	11	1446.54		

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ตารางเปรียบเทียบการเจริญทางเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากเฉลี่ยของลำต้นกล้าไม้กระถินอายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus*

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
CXK2	0.79	0.85	0.91	0.85 ± 0.16a
XK2	0.95	0.72	0.78	0.82 ± 0.15a
CMM	0.92	0.75	0.81	0.83 ± 0.14a
MM	0.88	0.69	0.82	0.80 ± 0.16a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source of variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	0.003	0.0008	0.1456
Replication	2	0.034	0.0167	2.95
Error	6	0.034	0.0057	
Total	11	0.07		

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ตารางเปรียบเทียบการเจริญทางมวลชีวภาพส่วนเหนือดินเฉลี่ยของลำต้นกล้าไม้กระถินอายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus*

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
CXK2	4.93	13.42	9.57	9.31 ± 4.06a
XK2	6.29	12.65	9.74	9.56 ± 3.06a
CMM	7.15	8.43	12.09	9.22 ± 2.60a
MM	5.48	10.76	12.50	9.58 ± 3.47a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source of variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	0.29	0.10	0.02
Replication	2	70.95	35.48	8.41
Error	6	25.34	4.22	
Total	11	96.58		

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ตารางเปรียบเทียบการเจริญทางมวลชีวภาพส่วนใต้ดินเฉลี่ยของลำต้นกล้าไม้กระถิน อายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus*

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
CXK2	8.63	5.09	2.75	5.49 ± 2.73a
XK2	5.64	6.39	3.93	5.32 ± 2.73a
CMM	6.20	7.92	2.81	5.64 ± 2.36a
MM	4.74	8.14	3.56	5.48 ± 2.44a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source of variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	0.16	0.05	0.02
Replication	2	30.27	15.14	5.94
Error	6	15.27	2.55	
Total	11	45.70		

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ตารางเปรียบเทียบการเจริญทางมวลชีวภาพรวมเฉลี่ยของลำต้นกล้าไม้กระถินอายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus*

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
CXK2	13.56	18.51	12.32	14.80 ± 4.74a
XK2	11.93	19.04	13.67	14.88 ± 3.51a
CMM	13.35	16.35	14.90	14.86 ± 4.17a
MM	10.22	18.90	16.06	15.06 ± 4.31a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

ตารางที่ 10 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source of variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	0.11	0.04	0.01
Replication	2	73.09	36.55	11.24
Error	6	19.51	3.25	
Total	11	92.71		

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาต่อการเจริญของกล้าไม้กระถิน ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ANOVA

HIGH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.899	3	1.966	.011	.998
Within Groups	1440.640	8	180.080		
Total	1446.539	11			

HIGH

Duncan [a]

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05 1
2.00	3	75.6833
3.00	3	76.5067
4.00	3	77.1433
1.00	3	77.5367
Sig.		.877

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA

DIAMETER

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.425E-03	3	1.475E-03	.170	.914
Within Groups	6.940E-02	8	8.675E-03		
Total	7.383E-02	11			

DIAMETER

Duncan [a]

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05 1
4.00	3	.7967
2.00	3	.8167
3.00	3	.8267
1.00	3	.8500
Sig.		.526

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA

TRUNK

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.290	3	9.655E-02	.008	.999
Within Groups	96.256	8	12.032		
Total	96.546	11			

TRUNK

Duncan [a]

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05
		1
3.00	3	9.2233
1.00	3	9.3073
2.00	3	9.5600
4.00	3	9.5800
Sig.		.908

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA

ROOT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.157	3	5.233E-02	.009	.999
Within Groups	45.537	8	5.692		
Total	45.694	11			

ROOT

Duncan [a]

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05
		1
2.00	3	5.3200
4.00	3	5.4800
1.00	3	5.4900
3.00	3	5.6433
Sig.		.879

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.113	3	3.779E-02	.003	1.000
Within Groups	92.597	8	11.575		
Total	92.710	11			

BIOMASS

Duncan [a]

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05
		1
1.00	3	14.7967
3.00	3	14.8667
2.00	3	14.8800
4.00	3	15.0600
Sig.		.931

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กล้าไม้สะแก

ตารางที่ 12 ตารางเปรียบเทียบการเจริญทางความสูงเฉลี่ยของลำต้นกล้าไม้สะแกอายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus*

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
CXK2	17.67	18.59	17.37	17.88 ± 2.43a
XK2	19.02	17.12	18.66	18.27 ± 2.06a
CMM	17.41	18.26	19.16	18.28 ± 1.64a
MM	17.08	18.65	17.92	17.88 ± 1.91a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

ตารางที่ 13 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source of variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	0.46	0.15	0.20
Replication	2	0.5	0.25	0.34
Error	6	4.43	0.74	
Total	11	5.39		

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 ตารางเปรียบเทียบการเจริญทางเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากเฉลี่ยของลำต้นกล้าไม้สะแกอายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus*

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
CXK2	0.24	0.26	0.26	0.25 ± 0.05a
XK2	0.28	0.24	0.25	0.26 ± 0.05a
CMM	0.28	0.26	0.27	0.27 ± 0.05a
MM	0.24	0.28	0.26	0.26 ± 0.05a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

ตารางที่ 15 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source of variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	0.0005	0.0002	0.0016
Replication	2	0	0	0
Error	6	0.7324	0.1221	
Total	11	0.7329		

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 ตารางเปรียบเทียบการเจริญทางมวลชีวภาพส่วนเหนือดินเฉลี่ยของลำต้นกล้าไม้สะแกอายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus*

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
CXK2	0.81	0.54	0.79	0.71 ± 0.40a
XK2	0.64	0.72	0.83	0.73 ± 0.33a
CMM	0.77	0.81	0.68	0.75 ± 0.33a
MM	0.59	0.66	0.82	0.69 ± 0.35a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

ตารางที่ 17 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source of variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	0.0065	0.0022	0.1679
Replication	2	0.0213	0.0107	0.8168
Error	6	0.0788	0.0131	
Total	11	0.1066		

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 ตารางเปรียบเทียบการเจริญทางมวลชีวภาพส่วนใต้ดินเฉลี่ยของลำต้นกล้าไม้สะแก อายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus*

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
CXK2	0.28	0.22	0.32	0.27 ± 0.14a
XK2	0.21	0.25	0.29	0.25 ± 0.10a
CMM	0.29	0.33	0.24	0.29 ± 0.12a
MM	0.26	0.25	0.34	0.28 ± 0.11a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

ตารางที่ 19 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source of variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	0.0025	0.0008	0.3478
Replication	2	0.0036	0.0018	0.7826
Error	6	0.0136	0.0023	
Total	11	0.0197		

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 ตารางเปรียบเทียบการเจริญทางมวลชีวภาพรวมเฉลี่ยของลำต้นกล้าไม้สะแกอายุ 6 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา *P. portentosus*

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
CXK2	1.09	0.76	1.11	0.98 ± 0.42a
XK2	0.85	0.97	1.12	0.98 ± 0.34a
CMM	1.06	1.14	0.92	1.01 ± 0.35a
MM	0.85	0.91	1.16	0.97 ± 0.37a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05)

ตารางที่ 21 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source of variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	0.0084	0.0028	0.1111
Replication	2	0.0415	0.0208	0.8254
Error	6	0.1512	0.0252	
Total	11	0.2011		

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาต่อการเจริญของกล้าไม้สะแก ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ANOVA

HIGH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.460	3	.153	.219	.881
Within Groups	5.611	8	.701		
Total	6.072	11			

HIGH

Duncan [a]

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05
		1
1.00	3	17.8767
4.00	3	17.8833
2.00	3	18.2667
3.00	3	18.2767
Sig.		.596

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA

DIAMETER

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.667E-04	3	1.556E-04	.583	.642
Within Groups	2.133E-03	8	2.667E-04		
Total	2.600E-03	11			

DIAMETER

Duncan [a]

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05
		1
1.00	3	.2533
2.00	3	.2567
4.00	3	.2600
3.00	3	.2700
Sig.		.273

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA

TRUNK

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.600E-03	3	8.667E-04	.080	.969
Within Groups	8.680E-02	8	1.085E-02		
Total	8.940E-02	11			

TRUNK

Duncan [a]

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05 1
1.00	3	.7133
4.00	3	.7233
2.00	3	.7300
3.00	3	.7533
Sig.		.668

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA

ROOT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.467E-03	3	8.222E-04	.382	.769
Within Groups	1.720E-02	8	2.150E-03		
Total	1.967E-02	11			

ROOT

Duncan [a]

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05 1
2.00	3	.2500
1.00	3	.2733
4.00	3	.2833
3.00	3	.2867
Sig.		.388

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.367E-03	3	2.789E-03	.116	.948
Within Groups	.193	8	2.409E-02		
Total	.201	11			

BIOMASS

Duncan [a]

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05 1
4.00	3	.9733
2.00	3	.9800
1.00	3	.9867
3.00	3	1.0400
Sig.		.632

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนในช่วง ITS

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1 รา *Phaeogyroporus portentosus* สายพันธุ์ AJ1

5'TCAGGGGAAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCAT
GTGCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCT
GTTGTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATG
TCTACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTC
AGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATG
CCTGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTG
GGAGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAG
CAAAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGA
GGGAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGC
ATGCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAGGTCAGGTACG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 2 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ HF

5'AGCACAAAGTCCGAAGGGGGGAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGC
ATATATCGTATGCATGTGCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAAT
ACACCTGTGAACCTGTTGTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCTTC
ACACTACATGTATGTCTACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAAC
TATAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCCCCTTGCGCTCCTTGGTAT
TCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTAACTTTCGAGGCA
TGGCTTGGACTTGGGAGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTC
CTCAAAAGCATTAGCAAAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGAT
CGTCGTGGCTGGAGGGAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGG
GCTTGTGTCACGCATGCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGTAGG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 3 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ KA2

5'CACAAAGTCAGAAGGAGAGAAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCA
TATATCGTATGCATGTGCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATA
CACCTGTGAACCTGTTGTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCA
CACTACATGTATGTCTACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACT
ATAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTAT
TCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGC
ATGGCTTGGACTTGGGAGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCT
CCTCAAAAGCATTAGCAAAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGA
TCGTCGTGGCTGGAGGGAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGG
GGCTTGTGTCACGCATGCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGTACG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 4 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ KL1

5'GAAGGGGGGAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCAT
GTGCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCT
GTTGTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATG
TCTACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTC
AGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATG
CCTGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTG
GGAGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAG
CAAAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGA
GGGAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGC
ATGCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGTATG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 5 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ MA2

5'GATCCGAAGGGGGGAAAAAAAAGAAGGTGAAGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATC
GTATGCATGTGCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCT
GTGAACCTGTTGTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTA
CATGTATGTCTACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAAT
ACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGA
GGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGC
TTGGACTTGGGAGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAA
AAGCATTAGCAAAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCG
TGGCTGGAGGGAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTG
TGTCACGCATGCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAAGTAGG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 6 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ ML1

5'GTCCTGAGGGGGGGGAAAAAAAAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCG
TATGCATGTGCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGT
GAACCTGTTGTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACA
TGTATGTCTACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATAC
AACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAG
GAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTT
GGACTTGGGAGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAA
AGCATTAGCAAAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGT
GGCTGGAGGGAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGT
GTCACGCATGCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGTACG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 7 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ ML3

5'CAAACTCCGGACGGGGGAAAAAAAAGTGGGTGTGCTAGGTGGGACGACTGTCGTTGGCATATAT
CGTATGCATGTGCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCT
GTGAACCTGTTGTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCTTCACACTA
CATGTATGTCTACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAAT
ACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGA
GGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGC
TTGGACTTGGGAGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAA
AAGCATTAGCAAAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCG
TGGCTGGAGGGAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTG
TGTCACGCATGCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAGGGCAG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 8 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ MM

5'GGGAAAAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATGT
GCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGTT
GTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATGTCT
ACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCAG
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGGG
AGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCA
AAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAGG
GAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCAT
GCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGGTTAT3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 9 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ NJ2

5'GGGGAAAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATGT
GCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGTT
GTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATGTCT
ACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCAG
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGGG
AGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCA
AAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAGG
GAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCAT
GCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAAGCAGGTACG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 10 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ SN2

5'GGAGAAAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGGGGGACGCCTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATGT
GCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGTT
GTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATGTCT
ACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCAG
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCCCCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGGG
AGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCA
AAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAGG
GAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCAT
GCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGTACG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 11 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ SN3

5'GGAAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATGTGC
ACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGTTGT
AGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATGTCTAC
AGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCAGCA
ACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
ATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTG
TTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGGGA
GCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCAA
AAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAGGG
AAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCATG
CCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGTCTG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 12 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ SP1

5'GGGGAAAAAAAAAAGAGGGTGAAGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATGT
GCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGTT
GTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATGTCT
ACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCAG
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCCCCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGGG
AGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCA
AAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAGG
GAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCAT
GCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGTGAC3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 13 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ SP2

5'GGGAAAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATGT
GCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGTT
GTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATGTCT
ACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCAG
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGGG
AGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCA
AAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAGG
GAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCAT
GCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAGATCATCTGCG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 14 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ TC1

5'AGGTGGGAAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCA
TGTGCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCT
GTTGTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATG
TCTACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTC
AGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATG
CCTGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTG
GGAGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAG
CAAAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGA
GGGAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGC
ATGCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGTACG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 15 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ TC2

5'GGGGAAAAAAAAAGGAGGAGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATGTG
CACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGTTG
TAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCTTCACACTACATGTATGTCTA
CAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCAGC
AACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCA
GATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCT
GTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGGG
AGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCA
AAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAGG
GAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCAT
GCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGCTACG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 16 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ TN1

5'GGGAAAAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATG
TGCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGT
TGTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATGTC
TACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCA
GCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGC
CTGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGG
GAGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGC
AAAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAG
GGAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCA
TGCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGTATG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 17 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK2

5'GGGGAAAAAAAAAGAGGGTGAAGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATGT
GCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGTT
GTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATGTCT
ACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCAG
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGGG
AGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCA
AAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAGG
GAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCAT
GCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGCACC3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 18 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ XK3

5'GGGAAAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATGT
GCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGTT
GTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATGTCT
ACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCAG
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGGG
AGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCA
AAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAGG
GAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCAT
GCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGTCTCG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 19 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ XS

5'GGGGGAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATGT
GCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGTT
GTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATGTCT
ACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCAG
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCCCCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGGG
AGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCA
AAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAGG
GAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCAT
GCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGTACG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 20 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ XY1

5'GGGAAAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATGT
GCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGTT
GTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATGTCT
ACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCAG
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGGG
AGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCA
AAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAGG
GAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCAT
GCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGGTACG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 21 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ XY2

5'GGGAAAAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATGT
GCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGTT
GTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATGTCT
ACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCAG
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGGG
AGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCA
AAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAGG
GAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCAT
GCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCGAATGAGGTAG3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 22 รา *P. portentosus* สายพันธุ์ XY3

5'GGGAAAAAAAAAAAGAGGGTGATGCTAGGTGGGACGACTGTCGCTGGCATATATCGTATGCATGT
GCACGTCGAAACCTTGGCTCGCCCCTCTTCCTTTCGGCGTAATGCTTAATACACCTGTGAACCTGTT
GTAGGTTGTTCCCCTACGAGCAGTAGGAGGACGATCTATGTCTTTCCATCACACTACATGTATGTCT
ACAGAACGTTGAAAGTCGTCTCGACCCTTGACGGGGTTGGACGCAAAACTATAATACAACTTTCAG
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTGTCATCGAATTCTCAACCATGTCTTGATGTTAACTTTCGAGGCATGGCTTGGACTTGGG
AGCTTTGCTGGTTGGACCCCCCTCTCTTCGAGGGGGGAATGTCAGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCA
AAAGGGACGTGTTCGTCGCATGAACTGACGGCCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGGCTGGAGG
GAAAAGTGTGATGGCGAAGGTCTGTCCTAGCTTCTAATCAAAGGCGAGGGGCTTGTGTCACGCAT
GCCCTCTGTCTTATCGAACCTTGACCTCAAATCAGTCT3'

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสุรเชษฐ์ พัฒนพานิชสวัสดิ์ เกิดวันที่ 18 มีนาคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปีการศึกษา 2547 และเข้าศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย