ผลของหัวเชื้อเส้นใยเห็ดเผาะ *Astraeus* spp. ต่อการสร้างไมคอร์ไรซา
และการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา

นางสาววรณิสร์ กลิ่นทอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF *Astraeus* spp. MYCELIAL INOCULA ON MYCORRHIZAL FORMATION AND GROWTH STIMULATION OF *Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don SEEDLINGS

Miss Woranit Klintong

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของหัวเชื้อเส้นใยเห็ดเผาะ *Astraeus* spp. ต่อการสร้างไมคอร์ไรซาและการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา
โดย	นางสาววรณิสร์ กลิ่นทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุมพล คุณวาสี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วรณิสร์ กลิ่นทอง : ผลของหัวเชื้อเส้นใยเห็ดเผาะ *Astraeus* spp. ต่อการสร้างไมคอร์ไรซาและการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา (EFFECTS OF *Astraeus* spp. MYCELIAL INOCULA ON MYCORRHIZAL FORMATION AND GROWTH STIMULATION OF *Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don SEEDLINGS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว, 110 หน้า.

เห็ดเผาะฝ้าย (*Astraeus asiaticus*) และเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) เป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาของไม้วงศ์ไม้ยาง ซึ่งเป็นไม้ที่สำคัญของป่าเขตร้อนในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยเฉพาะในประเทศไทย ปัจจุบันการปลูกป่าไม้วงศ์ไม้ยางมักจะไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากขาดราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ร่วมด้วย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการใส่หัวเชื้อเพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการปลูกป่า ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เก็บตัวอย่างดอกเห็ดเผาะจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย มาทำการแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์ได้ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายและเห็ดเผาะหนัง 45 สายพันธุ์ และ 9 สายพันธุ์ ตามลำดับ จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะเพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อ โดยคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายและเห็ดเผาะหนังที่มีการเจริญดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่ออายุ 14 วัน คือสายพันธุ์ KANII6 และ TAK8 ตามลำดับ ทำการหาชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อและค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ พบว่าเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 มีการเจริญดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MMN ที่มีค่า pH 5.5 โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่ออายุครบ 35 วันเป็น 1.95 และ 2.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อประเมินผลของวิธีการใส่หัวเชื้อเส้นใยรูปแบบต่างๆ คือ เส้นใยแขวนลอย เส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส เส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบ และเส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต ที่มีต่อการติดเชื้อไมคอร์ไรซาและการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือน พบว่า ในชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ ไม่พบการติดเชื้อไมคอร์ไรซา สำหรับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาของราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้งสองสายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกันโดยชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา 5.67 – 13.44 % สำหรับชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา 5.33 – 14.78% และพบว่าชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:6 ของแต่ละสายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาสูงที่สุด ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้งสองสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมากกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และกล้าไม้ที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 แบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร มีการเติบโตทางความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น มวลชีวภาพเหนือดิน มวลชีวภาพใต้ดินและมวลชีวภาพรวมสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมีความแปรผันขึ้นอยู่กับปริมาณของหัวเชื้อและวิธีการใส่หัวเชื้อรูปแบบต่างๆ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ขุยมะพร้าวและแกลบเป็นทางเลือกสำหรับใช้เป็นวัสดุในการผลิตหัวเชื้อเส้นใยทางการค้าได้เนื่องจากหาได้ง่ายและมีราคาถูก

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....วรณิสร์ กลิ่นทอง.....

ปีการศึกษา...2553.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....จิตรตรา เพียภูเขียว.....

5072446523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : ECTOMYCORRHIZA / *Astraeus* spp. / DIPTEROCAPACEAE

WORANIT KLINTONG : EFFECTS OF *Astraeus* spp. MYCELIAL INOCULA ON MYCORRHIZAL FORMATION AND GROWTH STIMULATION OF *Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don SEEDLINGS. ADVISOR : ASST.PROF.JITTRA PIAPUKIEW, Ph.D., 110 pp.

Astraeus asiaticus and *A. odoratus* are edible ectomycorrhizal fungi associated with dipterocarp tree. Dipterocarpaceae is commercial hardwoods and important to tropical forest ecosystem in South East Asia especially in Thailand. Dipterocarp plantations are now not quite successful due to poor ectomycorrhizal association there is a need to develop inoculation programs for forest nurseries. In this study, 45 strains of *Astraeus asiaticus* and 9 strains of *A. odoratus* collected from various localities in Thailand were isolated and cultured on PDA medium. *A. asiaticus* strain KANII6 and *A. odoratus* strain TAK8 were selected for inoculum production based on giving the highest colony growth rate on PDA medium at 14 days. The effects of different media and pH on growth from both strains were studied with the aim of improving mycelial production. Among media and pH tested, MMN medium at pH 5.5 was found to be the best medium and pH for the both strains with the maximum mycelial dry weight of 1.95 mg/ml in *A. asiaticus* strain KANII6 and those of 2.17 mg/ml in *A. odoratus* strain TAK8 at 35 days. The effects of different inoculation techniques (mycelial suspension, mycelial inoculum grown in peat-vermiculite, mycelial inoculum grown in coconut dust-rice husk, alginate-entrapped mycelium) of both strains on mycorrhizal formation and growth stimulation of 8- months-old Dipterocarpus alatus seedlings were also evaluated. The results showed that no mycorrhizal infection was found in noninoculation treatments. The percentage of mycorrhizal infection showed similar values for both fungal species. The percentage of infection in treatments inoculated with the strain KANII6 was ranging from 5.67% to 13.44 %. The strain TAK8 colonized seedling roots ranging from 5.33% to 14.78%. The seedlings inoculated with mycelia inoculum grown in coconut dust-rice husk mixed with growing medium in a proportion 1:6 (v/v) of both strains had the highest percentage of infection. The both strains significantly stimulated growth of *D. alatus* seedlings having mycorrhizal colonization > 12%. The seedlings inoculated with mycelia inoculums of fungal strain TAK8 grown in coconut dust-rice husk mixed with growing medium in proportion 1:6 and 1:3 (v/v) had shoot height, stem diameter, shoot and root dry weight and total biomass significantly greater than non-inoculated seedlings. The results in this study indicated that the seedling colonization level was very variable depending on inoculums dose and inoculation techniques. Moreover coconut dust and rice husk are promising alternative substrates for commercial mycelial inoculum production because of their availability and cheapness.

Field of Study : Biotechnology Student's Signature Woranit Klintong

Academic Year : 2010 Advisor's Signature Jittra Piapukiew

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือเป็นอย่างดีของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุมพล คุณวาสี ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้ให้ข้อคิดเห็น ข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไข ปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้ให้ข้อคิดเห็น ข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไข ปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ของหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

โครงการนี้ได้รับเงินทุนวิจัยสนับสนุนโดย บัณฑิตวิทยาลัยและโครงการวิทยาเพื่อพื้นถิ่นตามแผนพัฒนาวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2551-2555)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 ไมคอร์ไรซา..... 4

2.2 เอคโตไมคอร์ไรซา..... 4

2.2.1 ลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซา..... 4

2.2.2 ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาและพืชอาศัย..... 6

2.2.3 ประโยชน์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 12

2.3 การประยุกต์ใช้ราเอคโตไมคอร์ไรซากับการปลูกป่าทดแทน..... 13

2.4 ชนิดของหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 15

2.4.1 ดินเชื้อ (soil inoculum)..... 15

2.4.2 หัวเชื้อสปอร์ (spore inoculum)..... 15

2.4.3 หัวเชื้อเส้นใย (mycelial inoculum)..... 16

2.5 ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ (*Astraeus* spp.)..... 17

2.6 ยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don)..... 19

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประเมินผลของการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 21

3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย..... 24

3.1 สารเคมี..... 24

3.2 อุปกรณ์และครุภัณฑ์..... 25

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 26

บทที่ หน้า

3.3.1 เก็บตัวอย่างและจำแนกชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ..... 26

3.3.2 แยกเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะและทำให้บริสุทธิ์..... 26

3.3.3 คัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่เหมาะสม..... 26

3.3.4 หาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่คัดเลือกได้..... 26

3.3.5 ผลิตหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ..... 27

3.3.6 ประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่มีต่อการติดเชื้อไมคอร์ไรซาและการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา..... 28

3.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... 31

4 ผลการวิจัย..... 32

4.1 เก็บตัวอย่างและจำแนกชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ..... 32

4.2 แยกเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะและทำให้บริสุทธิ์..... 32

4.3 คัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่เหมาะสม..... 32

4.4 ภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่คัดเลือกได้..... 41

4.5 ประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่มีต่อการติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนา..... 44

4.6 ประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา..... 54

5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 61

6 สรุปผลการทดลอง..... 69

รายการอ้างอิง..... 72

ภาคผนวก..... 83

ภาคผนวก ก..... 84

ภาคผนวก ข..... 86

ภาคผนวก ค..... 90

ภาคผนวก ง..... 94

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 110

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา.....	6
2.2	ชนิดพืชที่มีความสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซา.....	9
3.1	แสดงสาร ความเข้มข้น และปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	30
4.1	การเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย (*A. asiaticus*) สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA pH 5.5 อายุ 14 วัน.....	33
4.2	การเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA pH 5.5 อายุ 14 วัน.....	35
4.3	เปรียบเทียบการติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนาอายุ 8 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ.....	52
4.4	เปรียบเทียบการติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนาอายุ 8 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ.....	53
4.5	เปรียบเทียบการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนาอายุ 8 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ.....	55
4.6	เปรียบเทียบการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนาอายุ 8 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ.....	59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	Hartig net และแมนเทิล (mantle) ของรากเอคโตไมคอร์ไรซา…….	5
2.2	รูปแบบการแตกแขนงของรากเอคโตไมคอร์ไรซา……..	5
2.3	ลักษณะของดอกเห็ดเผาะฝ้าย (*A. asiaticus*) ระยะต่างๆ……..	18
2.4	ลักษณะของดอกเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) ระยะต่างๆ ……	19
2.5	ลักษณะลำต้น ดอก ใบ และผลของยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don) ……..	20
4.1	ลักษณะการเจริญและลักษณะโคโลนีของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย (*A. asiaticus*) สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหาร PDA เมื่ออายุ 14 วัน……..	36
4.2	ลักษณะการเจริญและลักษณะโคโลนีของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหาร PDA เมื่ออายุ 14 วัน……..	40
4.3	การเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 เป็นเวลา 35 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆ ……..	42
4.4	การเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 เป็นเวลา 35 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆ……	42
4.5	การเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 เป็นเวลา 35 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด MMN ที่มี pH ต่างๆ……	43
4.6	การเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 เป็นเวลา 35 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด MMN ที่มี pH ต่างๆ……	43
4.7	ดอกเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) ที่พบในชุดการทดลองที่ใส่เส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 แบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:6 โดยปริมาตร……	50
4.8	ลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซา……..	51
4.9	เปรียบเทียบการเติบโตของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ……..	56
4.10	เปรียบเทียบการเติบโตของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ……	60

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ป่าไม้ในประเทศไทยถูกทำลายไปจำนวนมาก จึงทำให้เกิดผลกระทบต่อความสมดุลของระบบนิเวศ การปลูกป่าเพื่อฟื้นฟูสภาพป่าที่เสื่อมโทรมในบริเวณที่เคยเป็นป่ามาก่อน (reforestation) หรือการปลูกป่าในบริเวณที่ไม่เคยเป็นป่ามาก่อน (afforestation) จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มพื้นที่ป่าไม้ โดยเฉพาะไม้วงศ์ไม้ยางซึ่งเป็นไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของประเทศไทยเพราะเป็นที่นิยมใช้สอยกันมากในการก่อสร้างบ้านเรือนและในการทำไม้อัด รวมทั้งส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศอีกด้วย แต่ในปัจจุบันป่าไม้ยางนามีน้อยลง จำเป็นต้องมีการปลูกสร้างสวนป่าไม้ยางนาขึ้นมาทดแทน แต่ไม้ในวงศ์ไม้ยางนี้มีอัตราการเจริญเติบโตช้าและมีอัตราการรอดตายต่ำเมื่อย้ายปลูก สาเหตุหนึ่งคือไม้ในวงศ์นี้ต้องการราเอคโตไมคอร์ไรซาซึ่งเป็นราที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับรากพืชชั้นสูง โดยรานั้นไม่ใช่ราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช การอยู่ร่วมกันนี้เป็นความสัมพันธ์แบบต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ พืชได้รับน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตจากรา โดยเฉพาะธาตุฟอสฟอรัส ส่วนราได้รับสารอาหารจากพืชผ่านมาทางระบบราก เช่น แป้ง น้ำตาล โปรตีน กรดอะมิโนและวิตามิน โดยราจะทำหน้าที่เหมือนเป็นรากฝอยให้แก่พืช เส้นใยที่อยู่ภายนอกรากจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมธาตุอาหารให้แก่พืช จึงทำให้ช่วยเร่งการเจริญและช่วยให้ต้นกล้าอยู่รอดจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้

ราประมาณ 7,000-10,000 ชนิดพบว่ามีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับรากพืช (Taylor และ Alexander, 2005) ส่วนใหญ่เป็นราใน Phylum Basidiomycota และส่วนน้อยใน Phylum Ascomycota ซึ่งเป็นราในกลุ่มที่สร้างดอกเห็ด ราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดสร้างดอกเห็ดที่รับประทานได้และมีราคาแพง พืชที่มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาพบได้ประมาณ 8,000 ชนิด (Meyer, 1973; Smith และ Read, 1997) ส่วนใหญ่มักจะเป็นพวกไม้ป่าที่พบได้ทั่วไปในเขตอบอุ่นและเขตร้อน เช่น ไม้ในวงศ์ Pinaceae Fagaceae Betulaceae Myrtaceae Salicaceae และ Dipterocarpaceae เป็นต้น (Brundrett และคณะ, 1996) ในธรรมชาติราเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีความสัมพันธ์กับรากพืชมีหลายชนิด ราแต่ละชนิดจะมีผลต่อพืชอาศัยแตกต่างกัน การคัดเลือกชนิดของราหรือสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อให้กับพืชจึงเป็นเรื่องที่จำเป็น สำหรับเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาหรือสายพันธุ์ที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับความต้องการ ซึ่งอาจจะพิจารณาได้จากอัตราการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความสามารถในการดูดซึมธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ความทนทานต่อความเป็นพิษของดิน ความจำเพาะกับพืชอาศัย ความชื้น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง หรือความสามารถในการผลิตดอกเห็ดเพื่อใช้เป็น

อาหาร (Trappe, 1977) ชนิดของหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซามีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิด คือ การใช้ดินเชื้อ (soil inoculum) จากป่าธรรมชาติหรือสวนป่า การใช้หัวเชื้อสปอร์ (spore inoculum) และการใช้หัวเชื้อเส้นใย (mycelial inoculum) รูปแบบของหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่นิยมใช้มากที่สุดคือ หัวเชื้อจากเส้นใย (Marx, 1991) ซึ่งอาจปั่นเส้นใยเป็นสารแขวนลอย (mycelial suspension) หรือให้เส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส (mycelial inoculum grown in peat-vermiculite) เนื่องจากสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ดีได้ หัวเชื้อที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนของแมลงและจุลินทรีย์ที่อาจเป็นสาเหตุของโรคพืช ข้อเสียของวิธีนี้คือไม่สามารถใช้กับราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากต้องใช้เทคโนโลยีในการผลิต การใช้เส้นใยบริสุทธิ์เป็นหัวเชื้อนิยมใช้ในการผลิตทางการค้าในต่างประเทศมีหลายบริษัทที่ผลิตหัวเชื้อเส้นใยหลายๆรูปแบบเพื่อใช้ในการปลูกป่า (Marx และ Kenny, 1982; Marx และคณะ, 1991; Peterson และ Chakravarty, 1991)

เห็ดเผาะหรือเห็ดถอบ (*Astraeus* spp.) เป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบได้ทั่วไปในป่าเขตอบอุ่นและเขตร้อน Zeller (1948) และ Kirk และคณะ (2001) ได้รายงานว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาในสกุล *Astraeus* มีเพียง 2 ชนิด คือ *Astraeus hygrometricus* และ *Astraeus pteridis* สำหรับประเทศไทยในอดีตได้มีรายงานว่าเห็ดเผาะที่พบมีเพียงชนิดเดียวคือ *A. hygrometricus* (อนิวรรต เฉลิมพงษ์และธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ, 2524, 2525) จนกระทั่ง Phosri และคณะ (2004, 2007)ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางอณูพันธุศาสตร์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาในสกุล *Astraeus* พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะในประเทศไทยมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิดคือ เห็ดเผาะหนัง *A. odoratus* และเห็ดเผาะฝ้าย *A. asiaticus* ซึ่งเห็ดเผาะทั้งสองชนิดนี้พบว่าอาศัยอยู่ร่วมกับรากไม้ในวงศ์ไม้ยางหลายชนิด เช่น เหียง กราด พลวง เต็ง รังและยางนา และสามารถเพาะเลี้ยงเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเพาะขยายเพื่อใช้ผลิตเป็นหัวเชื้อใส่ให้กับกล้าไม้ยางได้ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างดอกเห็ดที่รับประทานได้ ดังนั้นการประเมินผลของการใส่เส้นใยหัวเชื้อเห็ดเผาะที่มีต่อการสร้างไมคอร์ไรซาและการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยาง จึงมีความจำเป็นและสำคัญยิ่ง เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้รูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยดังกล่าวมาใช้ผลิตในเชิงการค้าและเพื่อให้โครงการปลูกป่าไม้วงศ์ไม้ยางของประเทศไทยประสบความสำเร็จ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่มีสมบัติที่ดีและเหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อและประเมินผลของการใส่เส้นใยหัวเชื้อเห็ดเผาะที่มีต่อการสร้างไมคอร์ไรซาและการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา

ขั้นตอนการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างและจำแนกชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ
2. แยกเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะและทำให้บริสุทธิ์
3. คัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่เหมาะสม
4. หาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่คัดเลือกได้
5. ผลิตหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ
6. ประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่มีต่อการติดเชื้อไมคอร์ไรซาและการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา
7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ได้สายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะเป็นหัวเชื้อที่กระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา

- ได้รูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เหมาะสม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza)

ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) มาจากภาษากรีกว่า mike แปลว่าเชื้อรา รวมกับคำว่า rhiza แปลว่า ราก ไมคอร์ไรซาเป็นความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยระหว่างราและรากพืช โดยรานั้นไม่ใช่ราที่ทำให้เกิดโรค พืชได้รับน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็นจากรา ส่วนราได้รับสารอาหาร เช่น แป้ง น้ำตาล และวิตามินจากพืช

Harley และ Smith (1983) แบ่งไมคอร์ไรซาออกเป็น 7 กลุ่ม คือ Ectomycorrhiza, Ectendomycorhiza, Endomycorrhiza, Arbutoid mycorrhiza, Monotropoid mycorrhiza, Ericoid mycorrhiza และ Orchid mycorrhiza

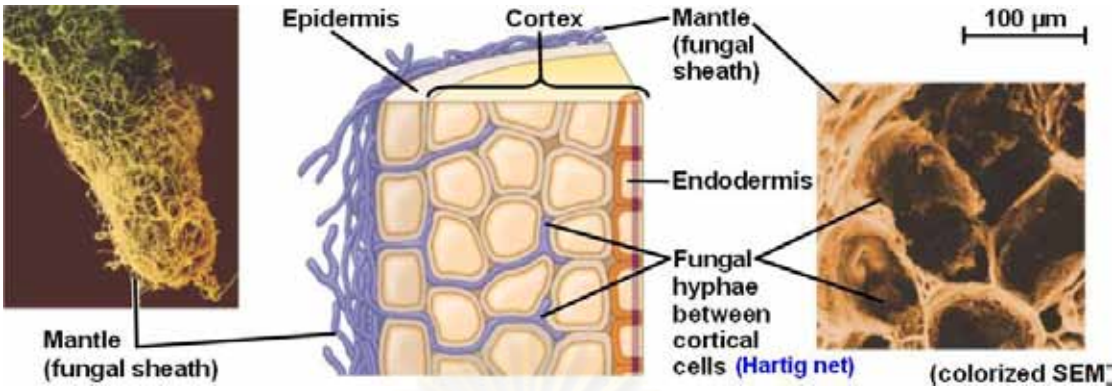
2.2 เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza)

เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) เป็นไมคอร์ไรซากลุ่มหนึ่งที่เส้นใยราจะเจริญบริเวณรอบปลายรากพืช ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของรากจึงช่วยในการดูดซับน้ำและธาตุอาหารจากดิน เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม เป็นต้น และราสามารถย่อยสลายอินทรียวัตถุให้อยู่ในสภาพที่ดูดซึมไปใช้ง่ายรวมทั้งทำให้พืชสามารถทนแล้งและต้านทานโรคได้ ทำให้ต้นกล้ารอดชีวิตและส่งเสริมการเจริญเติบโต ส่วนราได้รับสารอาหาร เช่น แป้ง น้ำตาลและวิตามินจากพืช (Suvercha และคณะ, 1991)

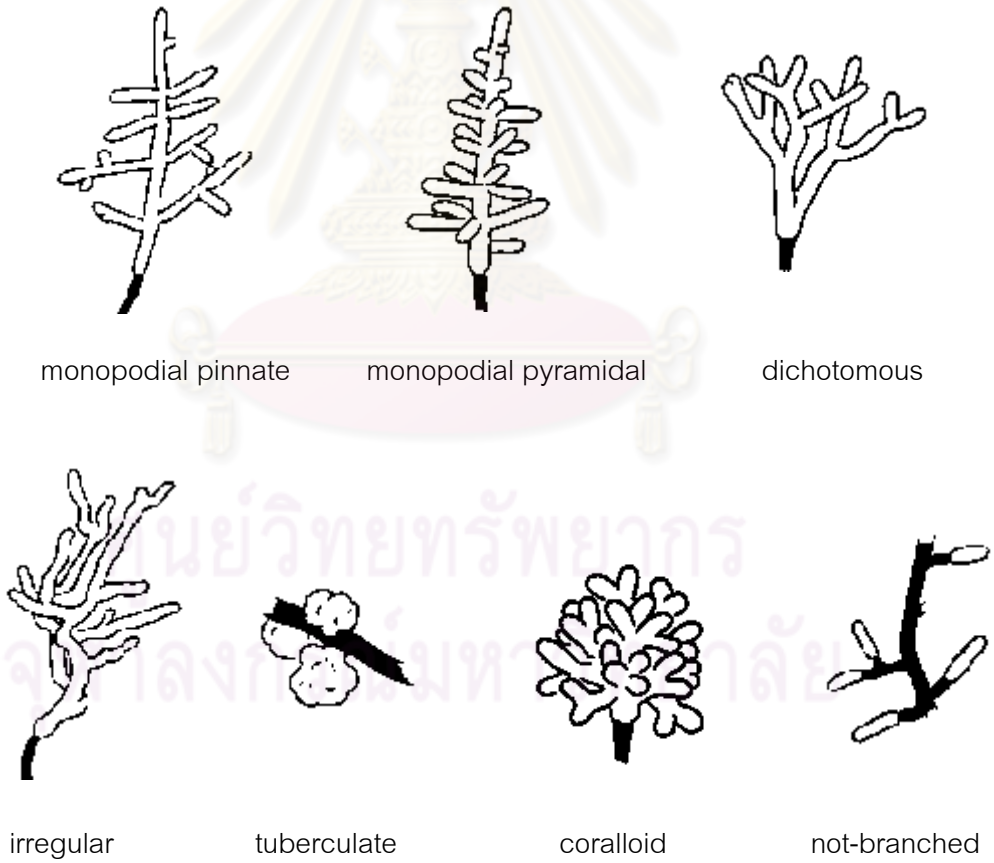
2.2.1 ลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซา

รากเอคโตไมคอร์ไรซา มีลักษณะที่สำคัญคือเส้นใยราจะเจริญสานตัวกันเป็นแผ่นอัดแน่น (fungal sheath) หรือเป็นเยื่อหุ้ม เรียก แมนเทิล(mantle) อยู่รอบๆราก และเส้นใยราบางส่วนจะเจริญเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิส (epidermis) กับเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ สานกันเป็นร่างแห เรียกว่า ใยฮาร์ติก (hartig net) (ภาพที่ 2.1) เยื่อหุ้มแมนเทิลอาจเรียบหรือมีเส้นใยแผ่เป็นรัศมีโดยรอบ ราต่างชนิดกันจะมีแมนเทิลที่แตกต่างกันทั้งความหนา พื้นผิวและสี ถึงแม้จะเป็นราชนิดเดียวกันแต่พืชอาศัยต่างกันก็มีลักษณะแมนเทิลต่างกันด้วย fungal sheath ส่วนใหญ่จะพบเป็น 2 ชั้น โดยชั้นนอกจะสานตัวกันอัดแน่นกว่าชั้นใน สีของเส้นใยอาจจะมีสีดำ ส้ม เหลือง น้ำตาล และไม่มีสีขึ้นอยู่กับชนิดของรา

เส้นใยราจะเจริญรอบๆรากแขนง (secondary root) หรือรากฝอย (tertiary root) เมื่อรากพืชติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา รากพืชจะลดการสร้างขนราก ความยาวของรากแขนงและรากฝอยลดลงแต่จะเพิ่มการแตกแขนงมากขึ้น และรูปแบบของการแตกแขนงขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราและชนิดของพืชอาศัย (Chilvers, 1968; Zak, 1971) (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.1 แสดง Hartig net และแมนเทิล (mantle) ของรากเอคโตไมคอร์ไรซา (http://invam.caf.wvu.edu/collection/pubs/abstracts/mcgrawhill.htm)



ภาพที่ 2.2 รูปแบบการแตกแขนงของรากเอคโตไมคอร์ไรซา (Durall และคณะ, 1996)

2.2.2 ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาและพืชอาศัย

จำนวนชนิดทั้งหมดของราเอคโตไมคอร์ไรซายังไม่ทราบแน่ชัด จากที่เคยมีการประมาณไว้ 5,500 ชนิด (Molina และคณะ,1992) นั้นยังเป็นการประมาณที่น้อยเกินไป จากความก้าวหน้าของเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ พบว่าราประมาณ 7,000-10,000 ชนิด มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับรากพืช (Taylor และ Alexander, 2005) ส่วนใหญ่เป็นราใน Phylum Basidiomycota และส่วนน้อยใน Phylum Ascomycota (ตารางที่ 2.1) ซึ่งเป็นราในกลุ่มที่สร้างดอกเห็ด และสามารถใช้รูปร่างลักษณะของดอกเห็ดในการจำแนกราเอคโตไมคอร์ไรซาได้ ดอกเห็ดบางชนิดมีลักษณะเฉพาะทำให้สามารถจำแนกชนิดได้ง่าย แต่ส่วนใหญ่ดอกเห็ดจะพบในระยะเวลาที่สั้นและจำกัด เช่น ฤดูฝนหรือฤดูหนาว

พืชที่มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาพบได้ประมาณ 8,000 ชนิด (Meyer, 1973; Smith และ Read, 1997) (ตารางที่ 2.2) ส่วนใหญ่มักจะเป็นพวกไม้ป่าที่พบได้ทั่วไปในเขตอบอุ่นและเขตร้อน เช่น ไม้ในวงศ์ Pinaceae Fagaceae Betulaceae Myrtaceae Salicaceae และ Dipterocarpaceae เป็นต้น (Smith และ Read, 1997) ราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดมีความจำเพาะต่อพืชอาศัย บางชนิดมีพืชอาศัยได้หลายชนิด

ตารางที่ 2.1 ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา (Miller, 1982; Brundrett และคณะ, 1996)

Class	Order	Family	Genera
Basidiomycota	Agaricales	Amanitaceae	*Amanita, Limacella*
		Boletaceae	*Boletus, Buchwaldoboletus, Heimiella, Leccinum, Pulveroboletus, Suillus, Xanthoconium, etc.*
		Cortinariaceae	*Astrosporina, Cortinarius, Dermocybe, Hebeloma, Leucocortinarius, etc.*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา (Miller, 1982; Brundrett และคณะ, 1996)(ต่อ)

Class	Order	Family	Genera
		Entolomataceae	*Clitopilus, Entoloma, Leptonia, Rhodocybe*
		Gomphidiaceae	*Chroogomphus, Cystogomphus, Gomphidius*
		Hygrophoraceae	*Bertrandia, Gliophorus, Camarophyllus, etc.*
		Paxillaceae	*Paxillus*
		Strobilomycetaceae	*Strobilomyces*
		Tricholomataceae	*Clitocybe, Cystoderma, Cantharellula, Laccaria*
	Aphyllophorales	Cantharellaceae	*Cantharellus, Craterellus*
		Clavariaceae	*Aphelaria, Clavaria, Clavariadelphus, Clavicorona, Clavulina, Clavulinopsis, Ramaria, Ramariopsis*
		Corticiaceae	*Amphinema, Byssocorticium, Byssosporia, Piloderma*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา (Miller, 1982; Brundrett และคณะ, 1996)(ต่อ)

Class	Order	Family	Genera
		Thelephoraceae	*Boletopsis, Thelephera*
	Gautieriales	Gautieriaceae	
	Hymenogastrales	Hydnangiaceae	
		Hymenogastraceae	
		Rhizopogonaceae	
		Octavindaceae	
	Lycoperdales	Lycoperdaceae	*Lycoperdon*
		Mesophelliaceae	
	Melanogastrales	Leucogastraceae	*Leucogaster, Leucophleps*
		Melanogastraceae	*Melanogaster*
	Phallales	Hysterangiaceae	*Hysterangium, Pseudohysterangium, Trappea*
	Russulales	Elasmomycetaceae	*Elasmomyces, Gymnomyces, Martellia, Zelleromyces*
		Russulaceae	*Lactarius, Russula*
	Sclerodermatales	Astraceae	*Astraeus*
		Sclerodermataceae	*Scleroderma, Horakiella, Pisolithus*
Ascomycetes	Eurotiales	Elaphomycetaceae	*Elaphomyces*
	Pezizales	Humariaceae	*Peziza*
		Pezizaceae	

ตารางที่ 2.1 ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา (Miller, 1982; Brundrett และคณะ, 1996)(ต่อ)

Class	Order	Family	Genera
	Tuberrales	Eutuberaceae	
		Geneaceae	

ตารางที่ 2.2 ชนิดพืชที่มีความสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซา (Lakhanpal, 1999)

Host	Ectomycorrhiza
Abies pindrow Royle	*Amanita pantherina* (DC ex Fr.) Secr. *Amanita vaginata* (Bull. ex Fr.) Vitt. *Citocybe gibba* (Fr.) Kummer
Betula utilis D. Don	*Amanita fulva* (Schaeff) Pers. *Leccinum scabrum* (Fr.) S.F. Gray *Leccinum oxydabile* Singer
Cedrus deodara (Roxb.) Loud.	*Agaricus silvaticus* Schaeff. ex.Secr. *Amanita emilii* Riel. *Amanita flavoconia* Atk. *Amanita gemmata* (Fr.) Bert. *Amanita inaurata* Secr. *Amanita pantherina* (DC ex Fr.) Secr. *Amanita rubescens* (Fr.) S.F. Gray *Boletus edulis* Bull. ex Fr. *Boletus* sp. *Clitocybe dealbata* (Fr.) Kummer *Clitocybe dialatata* Pers. ex Karst. *Cortinarius cinnabarinus* (Fr.) Fayod *Cystodermja amianthianum* (Fr.) Fayod *Inocybe fastigata* (Schaeff. ex. Fr.) Quel. *Lepiota depeolaria* (Bull. ex. Fr.) Quel. *Lepiota cristata* (Fr.) Kummer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 ชนิดพืชที่มีความสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซา (Lakhanpal, 1999) (ต่อ)

Host	Ectomycorrhiza
	Leucopaxillus gigenteus (Fr.) Singer *Macrolepiota* sp. *Russula densifolia* (Secr.) Gillet
Picea smithiana (Wall.) Boiss.	*Hygrophorus chrysodon* (Batsch ex Fr.) Fr. *Hygrophorus pudorinus* (Fr.) Fr. *Lactarius deliciosus* (Fr.) S.F. Gray *Leucopaxillus amareus* (A.& S. ex Fr.) Kuhn. *Suillus sibricus* (Singer) Singer
Pinus roxburghii Sarg.	*Amanita berkeleyi* (Hook. F.) Bas *Amanita emilii* Riel. *Amanita gemmata* (Fr.) Bert. *Amanita vaginata* (Bull. ex. Fr.) Vitt. *Lactarius sanguifluus* (Paulet ex Fr.) Fr.
Pinus wallichiana A.B. Jackson	*Clitocybe clavipes* (Pers. ex Fr.) Kummer *Clitocybe gibba* (Fr.) Kummer *Hygrocybe conica* (Fr.) *Laccaria amethystine* (Bull. ex Merat) Murrill Laccaria laccata (Scop. ex. Fr.) Berk. & Br. *Nematoloma fasciculate* *Suillus granulates* (Fr.) Kuntze *Suillus placidus* (Bonorden) Singer *Suillus umbonatus* Dick & Snell
Rhododendrom arboretum Smith	*Hygrophorus subalpinus* Smith *Russula subgalachora*
Quercus incana Roxb.	*Agaricus angustus* Fr. *Amanita rubescens* (Fr.) S.F. Gray *Amanita umbonata* Pomerleaus

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 ชนิดพืชที่มีความสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซา (Lakhanpal, 1999) (ต่อ)

Host	Ectomycorrhiza
	Boletus gertrudiae Peck *Boletus vermiculosoides* Smith & Thiers *Collybia fusipes* (Bull. Ex Fr.) Quel. *Gomphus clavatus* (Fr.) S. F. Gray *Hygrocybe* sp. *Lactarius hygrophoroides* Berk.& Curt. *Lactarius indicus* *Lactarius piperatus* (Scop.) Fr. *Lactarius zonarius* (Bull. ex St-Amans) Fr. *Leucoagaricus rubrotinctus* (Peck) Singer *Phylloporus rhodoxanthus* (Schw.) Bres. *Leccinum luteum* Smith, Thiers and Walting *Russula brevipes* Peck *Russula subflaviscesns* *Russula lilacea* Quel. *Russula mucronoides* *Russula subgalachora* *Strobilomyces annulatus* Corner *Strobilomyces mollis* Corner *Stropharia rugusoannulata* Farlow ex. Murr.
Quercus semicarpifolia Smith	*Lepista nuda* (Bull.) Fr.

2.2.3 ประโยชน์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา

2.2.3.1 กระตุ้นการเจริญของพืช ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถเพิ่มอัตราการเจริญของพืชได้ รากพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาจะมีขนาดใหญ่ เส้นใยราเปรียบเสมือนรากฝอยที่แผ่ไปได้ไกลจึงช่วยดูดน้ำและแร่ธาตุจากแหล่งที่รากพืชไปไม่ถึง ตัวอย่างเช่น ไม้ในสกุล *Hopea* ที่ใส่หัวเชื้อ *Pisolithus tinctorius* มีการอัตราการเจริญเพิ่มขึ้น (Yazid และคณะ, 1994) ต้นยูคาลิปตัสที่มีการใส่หัวเชื้อ *Scleroderma* sp. มีการอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นถึง 46เปอร์เซ็นต์ (Chen และคณะ, 2006) เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซาจะย่อยสลายธาตุอาหารและกระตุ้นการเคลื่อนที่ของธาตุอาหารที่สำคัญในดินทำให้พืชเอาไปใช้ได้ โดยเฉพาะกรดออกซาลิกหรือแคลเซียมออกซาเลทที่สร้างจากราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายสายพันธุ์ (Graustein และคณะ, 1977; Cromack และคณะ, 1979; Sollins และคณะ, 1981; Malajczuk และ Cromack, 1982; O'Connell และคณะ, 1983) จะเพิ่มการแตกตัวของ iron และ aluminium phosphate (Lopez-Hemandez และคณะ, 1986) และความเข้มข้นของการแลกเปลี่ยนธาตุอาหารในดิน เช่น aluminium iron manganese zinc และ copper เพิ่มสูงขึ้นจากการมีราเอคโตไมคอร์ไรซา *Hysierungiumse tchellii* (Entry และคณะ, 1987) นอกจากนี้กรดอินทรีย์ที่ผลิตจาก *H. tchellii* และ *Gaurierium onticol* จะทำให้ฟอสเฟตและซัลเฟตอยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ได้ (Griffith, 1994)

2.2.3.2 ความทนทานของพืชต่อภาวะที่ไม่เหมาะสม พืชที่มีไมคอร์ไรซาสามารถทนแล้งได้เนื่องจากมีเส้นใยราเจริญอยู่ทำให้มีระบบรากที่สามารถเพิ่มพื้นที่และซอนไซเพื่อดูดซับน้ำเอาไว้ได้มากกว่าพืชที่ไม่มีไมคอร์ไรซา นอกจากนี้รายังช่วยปกป้องไม่ให้รากสูญเสียน้ำมากจนเกินไปหรือรากแห้งตาย (Marx, 1980) นอกจากนี้กรดอินทรีย์ที่สร้างจากราจะปกป้องพืชจากความเป็นพิษของอลูมิเนียมและโลหะหนักในดิน และลดความเข้มข้นของโลหะหนักในเนื้อเยื่อพืช (Bradley และคณะ, 1982; Danielson, 1985; Jones และ Hutchinson, 1986)

2.2.3.3 ป้องกันรากพืชจากจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืช เส้นใยราเอคโตไมคอร์-ไรซาที่เจริญรอบๆรากพืช เปรียบเสมือนสิ่งกีดขวางต่อการบุกรุกของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืช ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถต่อต้านการเจริญของราที่ก่อโรคพืช และทำให้พืชสามารถต้านทานโรคได้ดีกว่าพืชที่ไม่มีไมคอร์ไรซา Tsantrizos และคณะ (1991) พบว่าสารปฏิชีวนะที่แยกได้จาก *Pisolithus tinctorius* สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และยับยั้งการเจริญของเส้นใยราที่ก่อโรคในพืชได้

2.2.3.4 อาหารของมนุษย์และสัตว์ ราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิดที่สร้างดอกเห็ดที่รับประทานได้หรือนำไปใช้เป็นยา เห็ดบางชนิดมีราคาแพง เช่น truffles *(Tuber* spp.) ที่นิยมรับประทานในแถบทวีปยุโรปและ matsutake *(Tricholoma matsutake)* ที่พบมากในประเทศจีน

เกาหลีและญี่ปุ่น สำหรับในประเทศไทยพบว่ามีเห็ดป่าหลายชนิดที่มักนิยมรับประทานและมีราคาแพงเช่นกัน เช่น เห็ดเผาะ (*Astraeus* spp.) เห็ดตับเต่า (*Boletus* spp.) เห็ดระโงกหรือเห็ดไข่ห่าน (*Amanita* spp.) เห็ดไคลหรือเห็ดน้ำหมาก (*Russula* spp.) เป็นต้น

2.2.3.5 **ระบบนิเวศ** ในปัจจุบัน ราเอคโตไมคอร์ไรซานับว่าเป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบนิเวศป่าเขตหนาว เขตเมดิเตอร์เรเนียนและเขตอบอุ่น เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซามีความสัมพันธ์กับพืชในวงศ์ Pinaceae Fagaceae Tiliaceae Betulaceae และ Myrtaceae เป็นต้น สำหรับป่าเขตร้อนนั้นส่วนใหญ่จะเป็นพืชในวงศ์ Dipterocarpaceae ในธรรมชาติราเอคโต-ไมคอร์ไรซามีความสำคัญต่อการเจริญและการอยู่รอดของไม้ในป่า โดยราจะเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุจากดิน โดยเฉพาะธาตุที่มีการเคลื่อนที่ (nutrient mobility) ต่ำในดิน เช่น ฟอสฟอรัส และธาตุอาหารรองต่างๆ (micronutrients)รวมทั้งไนโตรเจนด้วย (Smith และ Read, 2008) นอกจากนี้ธาตุคาร์บอนที่ได้จากการสังเคราะห์แสงของพืชจะถูกส่งผ่านมายังเส้นใยของราและกลับสู่ระบบนิเวศของดิน ดังนั้นความสัมพันธ์ของไมคอร์ไรซาจึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางชีววิทยาและวัฏจักรการหมุนเวียนสารคาร์บอน (Finlay และ Rosling, 2005) นอกจากนี้ราเอคโตไมคอร์ไรซายังพบว่ามีความสัมพันธ์กับจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและราชนิดอื่นทั้งในทางยับยั้งหรือสนับสนุนกันและกัน ตัวอย่างเช่น มีแบคทีเรียที่รากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบว่าช่วยส่งเสริมการสร้างไมคอร์ไรซา (mycorrhization helper bacteria, MHBs) (Garbaye, 1994; Frey-Klettand และ Garbaye, 2005) โดยราเอคโตไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียจะทำงานร่วมกันในกระบวนการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารต่างๆให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ได้ ไมคอร์ไรซาจึงอาจจัดว่าเป็นปุ๋ยทางธรรมชาติที่ทำให้รากพืชสามารถดูดธาตุอาหารได้ดีขึ้น ลดการพึ่งพาปุ๋ยเคมีที่อาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม Sousa และคณะ (2010) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ต่างๆเทียบกับกับการใช้ปุ๋ยเคมี พบว่าเมื่อใช้ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมกับต้นพืชแล้ว พืชมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.3 การประยุกต์ใช้ราเอคโตไมคอร์ไรซากับการปลูกป่าทดแทน

มีงานวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นว่าราเอคโตไมคอร์ไรซามีความสำคัญต่อพืชในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของต้นกล้าเมื่อต้องอยู่ในสภาพที่แห้งแล้งหรือสภาวะที่ไม่เหมาะสมและเนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซามีความสัมพันธ์กับไม้ยืนต้นที่พบส่วนใหญ่ในป่าเขตอบอุ่นและเขตร้อน ซึ่งพื้นที่ป่าเหล่านี้ได้ลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นในปัจจุบันการนำราเอคโตไม-คอร์ไรซามาประยุกต์ใช้ร่วมกับการปลูกป่าทดแทนจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก แต่อย่างไรก็ตามการที่กล้าไม้จะมีการติดราไมคอร์ไรซาได้นั้นยังขึ้นอยู่กับความจำเพาะระหว่างชนิดราเอคโต-ไมคอร์ไรซาและชนิดของพืชด้วย ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อและพัฒนาหัวเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใส่ให้กับ

กล้าไม้ก่อนที่นำไปใช้ในการปลูกป่าจึงมีความสำคัญ ตัวอย่างเช่น ป่าสน (Monterrey pine) ในประเทศสเปนตอนเหนือ ซึ่งพื้นที่ป่าได้ลดลงอย่างมากจากปัญหาการตัดไม้ทำลายป่า Dunabeitia และคณะ (2004) จึงได้ใช้พืชท้องถิ่น เช่น บีช (*Fagus sylvatica*) และโอ๊ค (*Quercus robur*) และราเอคโตไมคอร์ไรซา เช่น *Scleroderma citrinum* และ *Pisolithus arhizus* แล้วทำการคัดเลือกเชื้อที่เหมาะสมหรือจำเพาะกับพืชมากที่สุดก่อนที่จะนำมาใช้เป็นหัวเชื้อใส่ให้กับพืชในการปลูกป่าทดแทน Nunez และคณะ (2006) ได้ใช้ราเอคโตไมคอร์ไรซา *Tuber melanosporum* กับต้นโอ๊ค (*Quercus* spp.) เพื่อใช้ในการปลูกป่าพบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและการดูดซึมฟอสฟอรัสของต้นโอ๊คได้

สำหรับในประเทศไทยนั้นการลดลงของพื้นที่ป่าเกิดจากจำนวนประชากรในประเทศที่เพิ่มขึ้น และการขยายตัวทางด้านเศรษฐกิจทำให้ประชาชนใช้ประโยชน์จากป่าไม้มากขึ้น ทั้งในลักษณะของการเป็นที่อยู่อาศัย การตัดไม้เพื่อการค้า การใช้และการเผาพื้นที่ป่าเพื่อการเกษตร การเกิดไฟป่า การเปลี่ยนพื้นที่ป่าเป็นพื้นที่ท่องเที่ยว เป็นต้น โดยเฉพาะป่าไม้วงศ์ไม้ยางเป็นพรรณไม้ที่สำคัญของป่าเขตร้อนที่พบได้ทุกภาคของประเทศไทย มีการนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อม ในปัจจุบันมีการส่งเสริมการปลูกสวนป่าไม้ยางทดแทนกันอย่างกว้างขวาง แต่ไม้ในวงศ์ไม้ยางนี้มีอัตราการเจริญเติบโตช้าและมีอัตราการรอดตายต่ำเมื่อย้ายปลูก เนื่องจากไม้ในวงศ์นี้ต้องการราเอคโตไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัย ราเอคโตไมคอร์ไรซาจะช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของพืช แม้ว่าในป่าธรรมชาติจะมีราไมคอร์ไรซากระจายพันธุ์อยู่ทั่วไปก็ตาม แต่ในบางท้องที่โดยเฉพาะในท้องที่ป่าเสื่อมโทรมซึ่งถูกแผ้วถาง มีการทำไม้หรือทำไร่เลื่อนลอยนาน ๆ หน้าดินถูกชะล้างให้เสื่อมสภาพไปมาก เชื้อราจะมีอยู่อย่างจำกัดหรือเกิดการขาดแคลนขึ้นได้ ดังนั้นการพัฒนาหัวเชื้อและคัดเลือกเชื้อเพื่อใส่ให้กับกล้าไม้แล้วนำไปปลูกในพื้นที่เสื่อมโทรม หรือขาดไมคอร์ไรซา จึงเป็นที่สนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวางเพื่อที่จะทำให้การปลูกป่าไม้ยางประสบความสำเร็จ ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาการพัฒนาหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซากับไม้วงศ์ไม้ยาง เช่น

Turjaman และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผลของหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus arhizus* และ *Scleroderma* sp. ต่อการเจริญของกล้าไม้ *Shorea pinanga* เพื่อนำไปใช้ในการปลูกป่า จากการใส่หัวเชื้อให้กับกล้าไม้เป็นเวลา 7 เดือน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา 86 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของกล้าไม้ทางความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น จำนวนใบ น้ำหนักสดและแห้งของลำต้นและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตมากกว่าต้นกล้าที่ไม่ได้รับการใส่หัวเชื้อ

Lee และคณะ (2008) ได้แยกราเอคโตไมคอร์ไรซาตามธรรมชาติจากรากของสยาเหลือง (*Shorea parvifolia*) จากนั้นทำหัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส และใส่หัวเชื้อให้กับกล้าไม้ตะเคียนทอง (*Hopea odorata*) หลังจากผ่านไป 6 เดือน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา 53 เปอร์เซ็นต์ และราสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของกล้าไม้ทางความสูงได้ 30 เปอร์เซ็นต์

Yazid และคณะ (1994) ได้ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus tinctorius* ให้กับไม้ตะเคียนทอง (*Hopea odorata*) และกระบกกรัง (*Hopea helferi*) เพื่อจะนำไปประยุกต์ใช้ในการปลูกป่า เมื่อผ่านไป 9 เดือนพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาเฉลี่ย 80 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตทางความสูงของตะเคียนทอง (*H. odorata*) และกระบกกรัง (*H. helferi*) ได้ 82 เปอร์เซ็นต์และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.4 ชนิดของหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

หัวเชื้อชนิดต่างๆและวิธีการลงหัวเชื้อกับต้นกล้าได้ถูกพัฒนาอย่างต่อเนื่อง สามารถแบ่งชนิดของหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาได้ 3 ชนิด คือ

2.4.1 ดินเชื้อ (soil inoculum) จะเก็บจากบริเวณแหล่งกำเนิดของต้นไม้ที่มีเชื้อไมคอร์ไรซาอยู่ในธรรมชาติ เป็นวิธีปฏิบัติที่ได้ผลดีมานาน วิธีคือขุดดินเชื้อไมคอร์ไรซาที่ห่างจากลำต้นแม่ประมาณ 50 เซนติเมตร ลึก 10-20 เซนติเมตร ให้มีรากเดิมติดมาด้วย แล้วนำไปใช้ทันที หรือเก็บไว้ในที่ร่มประมาณไม่เกิน 7 วัน เชื้อไมคอร์ไรซาที่ติดอยู่กับดินนี้จะนำไปคลุกกับดินเพาะอัตรา 1:6 ถึง 1:10 ส่วน แล้วเพาะเมล็ดและต้นกล้า ข้อดีของวิธีนี้คือ ประหยัด เสียค่าใช้จ่ายน้อย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน แต่ข้อเสียคือดินมีน้ำหนักมาก ขนย้ายระยะทางไกล ๆ ไม่สะดวก และไม่สามารถทราบชนิดเชื้อราไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมกับต้นกล้าได้ และดินยังอาจมีเชื้อโรคติดมาระบาดกับต้นกล้าได้ง่ายอีกด้วย วิธีการป้องกันคือต้องเลือกดินจากรากต้นไม้ที่สมบูรณ์ปราศจากโรค และควรปัดกวาดซากพืชหน้าดินออกให้สะอาดก่อนขุดดินนำเอาไปใช้เพาะต้นกล้า

2.4.2 หัวเชื้อสปอร์ (spore inoculum) เหมาะกับราที่สร้างสปอร์มาก เช่น *Pisolithus* spp. *Scleroderma* spp. และ *Astraeus* spp. หรือราที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเส้นใยได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำสปอร์ของเห็ดราคลุกกับเมล็ดพันธุ์ก่อนเพาะกล้า หรือนำสปอร์ไปละลายน้ำแล้วฉีดพ่นกับต้นกล้าหรือเมล็ดพันธุ์ในแปลงเพาะ ข้อดีของวิธีการนี้คือ นำไปปฏิบัติได้ง่าย ค่าใช้จ่ายน้อย ไม่ต้องใช้เทคนิคพิเศษ แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถเก็บสปอร์ในปริมาณมากๆได้ ไม่สามารถคัดสายพันธุ์ที่ดีมีประสิทธิภาพสูง และสปอร์มีระยะพักตัว มีการงอกที่ไม่สม่ำเสมอ บางชนิดงอกยาก ต้องใช้วิธีกระตุ้นเป็นพิเศษ

2.4.3 **หัวเชื้อเส้นใย** (mycelial inoculum) เป็นวิธีการที่นิยมกันมากในปัจจุบันเพราะสามารถนำไปขยายเลี้ยงเพิ่มจำนวนเส้นใยได้มาก ทำได้โดยแยกและเลี้ยงเส้นใยจากดอกเห็ด ข้อเสียคือราไมคอร์ไรซาบางชนิดไม่สามารถเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ต้องใช้เทคนิคและอุปกรณ์ค่อนข้างซับซ้อน และต้องการความรู้และความชำนาญเป็นพิเศษโดยเฉพาะจึงจะดำเนินการได้ แต่ข้อดีคือ คัดเลือกราสายพันธุ์ดีได้ หัวเชื้อที่ได้จะบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อปนเปื้อน และได้สายพันธุ์เชื้อราที่ได้คัดเลือกเหมาะสมแล้วมาใช้จึงมีประสิทธิภาพสูง เป็นที่นิยมในการผลิตหัวเชื้อเชิงการค้า รูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยที่นิยมใช้มีดังนี้

2.4.3.1 **เส้นใยแขวนลอย** (mycelial suspension) เป็นการใช้เส้นใยที่แยกจากเนื้อเยื่อดอกเห็ดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหรือบนอาหารแข็งแล้ว จากนั้นนำเส้นใยที่ได้มาปั่นในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วใส่ให้กับต้นกล้า ข้อดีคือทำได้ง่ายปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ แต่มีข้อเสียคือราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดนั้นไม่สามารถเจริญได้หลังจากเส้นใยถูกปั่นเป็นชิ้นเล็กๆ (Brundrett และคณะ, 2005)

2.4.3.2 **เส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส** (mycelial inoculum grown in peat-vermiculite) (Marx และ Kenney, 1982) วิธีนี้เป็นการเลี้ยงเส้นใยราบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แล้วนำมาใส่ลงในภาชนะที่บรรจุเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร และทำให้ชุ่มด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสม หัวเชื้อชนิดนี้นับว่าเป็นหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพและได้รับความนิยม ทั้งนี้เพราะเวอร์มิคูไลท์มีข้อดีคือ อากาศถ่ายเทได้ดี มีรูพรุน เส้นใยเมื่อเจริญแทรกเข้าไปสามารถได้รับการปกป้องและพีทมอสช่วยในการปรับ pH ให้เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยซึ่งอยู่ในระหว่าง 4.8-5.5 และมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีธาตุอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต แต่มีข้อเสียคือ ใช้เวลานานในการบ่มเชื้ออาจส่งผลให้ราเอคโต-ไมคอร์ไรซาบางชนิดสูญเสียความสามารถในการเกิดไมคอร์ไรซาได้ (Molina, 1980)

2.4.3.3 **เส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต** (Alginate-entrapped mycelium) หัวเชื้อเส้นใยชนิดนี้สามารถทำได้โดยเลี้ยงเส้นใยบนอาหารเหลว แล้วนำเส้นใยมาปั่นในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จนเป็นสารแขวนลอยเส้นใย เติมโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรลงไปในปริมาตรเท่ากัน จากนั้นนำส่วนผสมนี้หยดลงไปในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ (Mauperin และคณะ, 1987) หัวเชื้อชนิดนี้มีข้อดีคือเส้นใยจะสามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน เพราะเม็ดอัลจิเนตเก็บรักษาความชื้นเอาไว้ได้ ราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิด เช่น *Descocolea* sp. *Hebeloma* sp. *Laccaria* sp. และ *Pisolithus* sp. ประสบความสำเร็จจากการทำหัวเชื้อด้วยวิธีนี้ และสามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิต่ำนานถึง 7 เดือน (Kuek และคณะ, 1992) มักนิยมผลิตเป็นการค้า ข้อเสียคือต้องใช้สารเคมีที่มีราคาค่อนข้างแพง

2.5 ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ (*Astraeus* spp.)

เห็ดเผาะหรือเห็ดถอบ (*Astraeus* spp.) เป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบได้ทั่วไปในป่าเขตอบอุ่นและเขตร้อน ในประเทศไทยมักพบทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดอกเห็ดเผาะ มีลักษณะกลม ไม่มีก้านดอก ดอกอ่อนมีสีขาวหม่น เมื่อแก่เปลือกหุ้มด้านนอกจะแตกออกเป็นแฉกและสปอร์จะกระจายไปตามลม เป็นเห็ดที่คนพื้นเมืองนิยมบริโภค ออกดอกปีละ 1 ครั้งในช่วงต้นฤดูฝน (เดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม)

Zeller (1948) และ Kirk และคณะ(2001) ได้รายงานว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาในสกุล *Astraeus* มีเพียง 2 ชนิด คือ *A. hygrometricus* และ *A. pteridis* สำหรับประเทศไทยในอดีตได้มีรายงานว่าเห็ดเผาะที่พบมีเพียงชนิดเดียวคือ *A. hygrometricus* (อนิวรรต เฉลิมพงษ์และธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ, 2524, 2525) จนกระทั่ง Phosri และคณะ (2004, 2007) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางอณูพันธุศาสตร์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาในสกุล *Astraeus* พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะในประเทศไทยมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิดคือ เห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus* Phosri, Watling, M. P. Martin & Whalley) และเห็ดเผาะฝ้าย (*Astraeus asiaticus* Phosri, M. P. Martin & Watling)

2.5.1 ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย (*A. asiaticus*)

อนุกรมวิธานของ *A. asiaticus* (Kirk และคณะ, 2008)

Kingdom Fungi

Phylum Basidiomycota

Class Agaricomycetes

Order Boletales

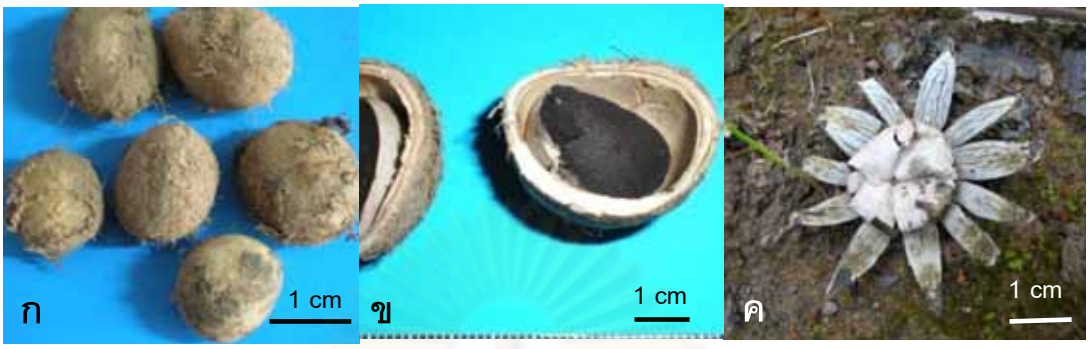
Family Astraeaceae

Genus *Astraeus*

Species *Astraeus asiaticus*

ดอกเห็ดมีลักษณะกลมถึงค่อนข้างกลม ไม่มีก้านดอก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 18.7-29.7 มิลลิเมตร ผนังด้านนอก (outer peridium) หนา สีค่อนข้างขาว เมื่อแก่ผนังด้านนอกจะแตกเป็นแฉกประมาณ 5-12 แฉก ด้านในของผนังชั้นนี้ (inner layer) ค่อนข้างขาวและเป็นสีเทาออกน้ำตาลเมื่อโตเต็มที่ endoperidium มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 13-24 มิลลิเมตร มีการแตกออกหรือเปิดออกที่ apical ดอกเห็ดอ่อนจะมี gleba สีขาว เมื่อโตเต็มที่จะมีสีน้ำตาลปนม่วง ภายในมีเบสิดิโอสปอร์ที่มีลักษณะกลมมีหนาม มีสีน้ำตาลปนม่วง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8.75-15.2 ไมโครเมตร มักพบดอกเห็ดในดินทรายหรือดินลูกรังในป่าเต็งรัง

ของภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในช่วงฤดูฝนเดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม (Phosri และคณะ, 2004, 2007) (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของดอกเห็ดเผาะฝ้าย (*A. asiaticus*) ระยะต่างๆ (ก) ดอกเห็ดเผาะฝ้ายจะพบเส้นใยปกคลุมด้านนอก (ข) ดอกเห็ดเผาะฝ้ายเมื่อเริ่มแก่ผ่าให้เห็นสปอร์ภายใน (ค) ดอกเห็ดเผาะฝ้ายเมื่อแก่จะแตกเป็นแฉกประมาณ 5-12 แฉก

2.5.2 ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*)

อนุกรมวิธานของ *A. odoratus* (Kirk และคณะ, 2008)

Kingdom Fungi

Phylum Basidiomycota

Class Agaricomycetes

Order Boletales

Family Astraeaceae

Genus *Astraeus*

Species *Astraeus odoratus*

ดอกเห็ดมีลักษณะกลมถึงค่อนข้างกลม ไม่มีก้านดอก เมื่อโตเต็มที่สามารถมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ถึง 65 มิลลิเมตร ดอกเห็ดมีกลิ่นแรงเหมือนดินชื้นๆ ผนังด้านนอก (Outer peridium) เรียบ มีสีน้ำตาลอ่อนๆ เมื่อแก่ผนังด้านนอกจะแตกเป็นแฉกประมาณ 3-9 แฉก ด้านในของผนังชั้นนี้ (inner layer) สีค่อนข้างน้ำตาล เทาจนถึงดำ endoperidium มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 13-25 มิลลิเมตร มีการแตกออกหรือเปิดออกที่ apical มี gleba สีน้ำตาลปนม่วง เบสิดิโอสปอร์มีลักษณะกลมมีหนาม มีสีน้ำตาลปนม่วง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5-15.2 ไมโครเมตร มักพบดอกเห็ดในดินทรายหรือดินลูกรังในป่าเต็งรังของภาคเหนือและภาค

ตะวันออกเฉียงเหนือ ในช่วงฤดูฝนเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน (Phosri และคณะ, 2004)(ภาพที่ 2.4)

ภาพที่ 2.4 ลักษณะของดอกเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) ระยะต่างๆ (ก) ดอกเห็ดเผาะหนังขณะยังอ่อน (ข) ดอกเห็ดเผาะหนังเมื่อเริ่มแก่ผ่าให้เห็นสปอร์ภายใน (ค) ดอกเห็ดเผาะหนังเมื่อแก่จะแตกเป็นแฉกประมาณ 3-9 แฉก

2.6 ยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don)

อนุกรมวิธานของ *D. alatus* Roxb. ex G.Don (Ashton, 1982)

Kingdom Plantae

Division Tracheophyta

Class Magnoliopsida

Order Theales

Family Dipterocarpaceae

Genus *Dipterocarpus*

Species *Dipterocarpus alatus*

ยางนา เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ เมื่อโตเต็มที่สูงได้ถึง 40-50 เมตร พบในป่าไม่ผลัดใบและป่าเต็งรัง มีการกระจายพันธุ์ในบังคลาเทศ พม่า ไทย มาเลเซีย กัมพูชา ลาวและเวียดนาม สำหรับในประเทศไทย ไม้ยางนามีเขตการกระจายพันธุ์ในที่ลุ่มต่ำริมห้วย ลำธาร และตามหุบเขาทั่วทุกภาคของประเทศที่ความสูงตั้งแต่ระดับทะเลปานกลางถึง 350 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่แกมรูปหอก ขนาดประมาณ 8-15 x 20-35 เซนติเมตร เนื้อใบหนาปลายใบสอบเรียว โคนใบเรียบ เส้นแขนงใบมี 11 – 18 คู่ ก้านใบยาว 2.5-4.5 เซนติเมตร ดอกเป็นสีชมพูออกดอกเป็นช่อสั้นๆตามซอกใบและปลายกิ่ง กลีบรองกลีบดอกตอนโคนเชื่อมติดกันเป็นรูปถ้วยและมีครีบตามยาว 5 ครีบ ปลายแยกเป็น 5 แฉก ยาว 2 แฉก สั้น 3 แฉก มีขนสั้นๆสี

น้ำตาลคลุมทั่วไป กลีบดอกมี 5 กลีบ ผลมีลักษณะกลม มีครีบตามยาวตลอด 5 ครีบ ปีกยาว 2 ปีก ขนาด 3 x 14 เซนติเมตร ปีกสั้น 3 ปีก ขนาด 12 x 14 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2.5) ระยะผลร่วงประมาณปลายเดือนมีนาคมถึงต้นเดือนพฤษภาคม ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด เนื้อไม้ยางนามีสีน้ำตาลแดงหรือน้ำตาลเทา เสี้ยนตรงเนื้อไม้หยาบ แข็งปานกลาง เลื่อยไสกบตกแต่งให้เรียบได้ง่าย จึงนิยมนำมาเลื่อยทำฝาบ้าน ไม้ระแนง โครงหลังคา ทำพื้น เพดานและเครื่องเรือนต่างๆ

ภาพที่ 2.5 ลักษณะลำต้น ดอก ใบ และผลของยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don)

(http://www.kasetloongkim.com/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=921, http://www.vncreatures.net/chitiet.php?page=1&loai=2&ID=3307, http://www.flickr.com/photos/haile/302072228/)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประเมินผลของการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

Brundrett และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาการผลิตหัวเชื้อเส้นใยแขวนลอย และได้ทดสอบความมีชีวิตของเส้นใยหลังจากถูกปั่นเป็นชิ้นเล็กๆ โดยเลี้ยงเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดไม่สามารถเจริญได้หลังจากเส้นใยถูกปั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แต่ราเอคโตไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ โดยสอดคล้องกับงานของ Danielson และคณะ (1984) และ Boyle และคณะ(1987) ที่รายงานว่าเส้นใยของรา *Pisolithus* sp. และ *Paxillus* sp. ไม่มีประสิทธิภาพหลังจากเส้นใยถูกปั่นซึ่งตรงข้ามกับรา *Hebeloma* sp. ที่สามารถเจริญได้

Parlade และคณะ (2004) ได้ศึกษาและประเมินรูปแบบการผลิตหัวเชื้อจากเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซา *Lactarius* spp. กับไม้สน (*Pinus* spp.) พบว่าการผลิตหัวเชื้อแบบเส้นใยแขวนลอยมีข้อดีคือ ได้เชื้อบริสุทธิ์และได้เส้นใยมาก ควบคุมการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้ง่าย Parlade ได้ใช้หัวเชื้อแบบเส้นใยแขวนลอยของ *L. deliciosus* 217 พบว่ากล้าไม้สน *P. pinaster* ประมาณ 24 เปอร์เซ็นต์และ *P. sylvestris* ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่เกิดไมคอร์ไรซา ในขณะที่การใช้หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส พบว่า *L. deliciosus* 217 ทำให้กล้าไม้สน *P. pinaster* ประมาณ 59 เปอร์เซ็นต์ และ *P. sylvestris* ประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์เกิดไมคอร์ไรซา สำหรับ *L. deliciosus* 178 เมื่อใช้เป็นหัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสสามารถเกิดไมคอร์ซากับ *P. pinaster* และ *P. sylvestris* 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหัวเชื้อรูปแบบต่างกันจะมีประสิทธิภาพต่างกัน หัวเชื้อชนิดนี้เคยถูกรายงานว่าเป็นหัวเชื้อที่เหมาะสมในการทำให้กล้าไม้ติดเชื้อไมคอร์ไรซา (Marx,1980; Marx และ Kenney, 1982) แต่มีข้อเสียสำหรับราที่เจริญเติบโตช้าและหัวเชื้อวิธีนี้จะควบคุมการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้ยาก ส่วนการทำหัวเชื้อแบบเส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตนั้น เมื่อทดสอบความมีชีวิตของเส้นใยเมื่อวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเส้นใยสามารถงอกออกมาจากเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตได้ แต่เมื่อลงหัวเชื้อกับพืชแล้ว พบว่าไม่ประสบความสำเร็จในการเกิดไมคอร์ไรซา อย่างไรก็ตามหัวเชื้อแบบเส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตได้ถูกรายงานว่าวิธีการผลิตหัวเชื้อนั้นควบคุมได้ง่ายและมีประสิทธิภาพกับราเอคโตไมคอร์ไรซา เช่น *Laccaria bicolor* และ *Hebeloma* spp. (Mauperin และคณะ, 1987; Mortier และคณะ, 1988)

Danielson และคณะ (1984) ได้ประเมินประสิทธิภาพของการใช้หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาแบบใช้เส้นใยแขวนลอย พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซา 7 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 15 สายพันธุ์ สามารถเกิดไมคอร์ไรซากับพืชตระกูลสน (Jack pine)ได้ และวิธีการใช้หัวเชื้อแบบเส้นใยแขวนลอย มีข้อดีคือประหยัดเวลาในการเตรียมหัวเชื้อ

Hung และ Trappe (1987) ได้ใส่หัวเชื้อรา *Laccaria laccata* และ *Hebeloma crustuliniforme* แบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสให้กับต้นเฟอร์ พบว่าหัวเชื้อรานี้มีประสิทธิภาพโดยมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ 83 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Molina (1980) ได้ทดลองใช้หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซา 15 สายพันธุ์กับพืชตระกูลสน โดยเพาะเลี้ยงเส้นใยในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสในอัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร ที่ชุ่มด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN แล้วผสมหัวเชื้อกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:6 โดยปริมาตร พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซา 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถเกิดไมคอร์ไรซากับพืชที่ทดลองทั้งหมด สำหรับการผลิตหัวเชื้อด้วยวิธีการนี้ พบว่าไม่ได้ผลกับราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะรา *Pisolithus tinctorius* ที่ไม่ประสบความสำเร็จ ทั้งที่ราสายพันธุ์นี้เคยเกิดไมคอร์ไรซาได้ดีในการทดลองก่อนหน้านี้ (Molina, 1979) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าวิธีนี้ใช้ระยะเวลาการผลิตหัวเชื้อที่นานและควบคุมการปนเปื้อนได้ยากอาจส่งผลให้ราเอคโตไมคอร์ไรซาสูญเสียความสามารถในการเกิดไมคอร์ไรซา แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ถูกจัดว่าเป็นการผลิตหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดที่ใส่ให้กับกล้าไม้ (Marx, 1980)

Mortier และคณะ (1989) ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์-ไรซา *Laccaria laccata* ระหว่างหัวเชื้อเส้นใยที่เจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสกับเส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต พบว่า กล้าไม้ที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อสูงกว่ากล้าไม้ที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการใส่หัวเชื้อเส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตปริมาณ 2 5 และ 10 กรัมของน้ำหนักแห้ง พบว่าเมื่อผ่านไป 11 สัปดาห์ ต้นกล้าที่ใส่หัวเชื้อ 10 กรัม มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาสูงที่สุด แต่เมื่อผ่านไป 25 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของชุดการทดลอง 2 5 และ 10 กรัมไม่แตกต่างกัน และต้นกล้าที่ใส่หัวเชื้อ 5 กรัม มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Kuek และคณะ (1992) ได้ทดสอบความชีวิตของหัวเชื้อแบบเส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าเส้นใยสามารถงอกออกมาจากเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตได้ในเวลา 1-3 วัน เมื่อนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN และเมื่อทดสอบการติดเชื้อไมคอร์ไรซากับต้นยูคาลิปตัสในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (growth chamber) พบว่าเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต 1 เม็ด สามารถทำให้รากติดเชื้อไมคอร์ไรซาได้ สำหรับความมีชีวิตของเส้นใยเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆกันนั้นพบว่าความมีชีวิตของเส้นใยขึ้นอยู่กับชนิดของรา โดย *Hebeloma westraliense* สามารถเก็บไว้ได้นานสูงสุดถึง 7 เดือน Kuek และคณะได้วิจารณ์ผล

การทดลองว่าหัวเชื้อแบบเส้นใยอยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตนั้นมีประสิทธิภาพในการใช้เป็นหัวเชื้อสะดวกในการขนส่งและการเก็บรักษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

เคมีภัณฑ์	บริษัทผู้ผลิต
-Agar	-
-Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	Merck, Germany
-Ammonium phosphate ($(NH_4)_2HPO_4$)	May and Baker , England
-Boric acid (H_3BO_3)	Merck, Germany
-Calcium chloride ($CaCl_2$)	May and Baker , England
-Cetyltrimethylammonum bromide (CTAB)	Serva
-Copper (II) sulphate ($CuSO_4.5H_2O$)	May and Baker , England
-Disodium hydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4)	May and Baker , England
-Ethanol	Merck, Germany
-Ferric chloride ($FeCl_3$)	Merck, Germany
-Ferric Ethylenediaminetetraacetic acid (FeEDTA)	May and Baker , England
-Glucose	-
-Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Merck, Germany
-Isoamyl alcohol	Carbo Erba
-Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	May and Baker , England
-Malt extract	Difco, U.S.A.
-Manganese chloride ($MnCl_2.4H_2O$)	May and Baker , England
-Peptone	Difco, U.S.A.
-Potassium chloride (KCl)	Merck, Germany
-Potassium phosphate (KH_2PO_4)	May and Baker , England
-Potato dextrose agar	HiMedia Laboratories, India.
-Sodium alginate	-
-Sodium chloride (NaCl)	Fluka, Switzerland
-Sodium molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	May and Baker , England

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 **สารเคมี (ต่อ)**

เคมีภัณฑ์	บริษัทผู้ผลิต
-10x Tris boric acid disodium ethylenediamine tetracetic acid (10xTBE buffer)	-
-Zinc sulphate ($ZnSO_4.7H_2O$)	May and Baker , England

3.2 **อุปกรณ์และครุภัณฑ์**

ชนิด	รุ่น/ยี่ห้อ	บริษัทผู้ผลิต
-กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo (Stereo Microscope)	sz60/Olympus	Olympus optical Co.,Ltd. Japan
-กล้องถ่ายรูปเจล (Gel-Doc)	ECX-26.MX	Vilber Lourmat, France
-ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร	Pyrex	Pyrex,Germany
-เครื่องชั่งละเอียด	AG204	Mettler Toledo, Switzerland
-เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Micro refrigerated centrifuge)	3700/Kubota	Kubota Corporation, Japan
-เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycler)	TP 600	TAKARA
-เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง(pH meter)	2000	Cyberscan
-จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (Plastic petridish)		Greiner bio-one Gmbh, Austria
-ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow)	H1	Lab Service Ltd.
-ตู้อบ (Oven)	UE600	Memmert
-หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)	SS-325/TOMY	Tomy Seiko Co., Ltd. Japan
-วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ขวดแก้ว สำลี กระดาษอลูมิเนียม เข็มเขี่ยเชื้อ มีดผ่าตัด เครื่องเจาะจุกคอร์ก ผ้าขาวบาง เครื่องปั่นไฟฟ้า ถุงดำ ทราย พีทมอส เพอร์ไลท์ เวอร์มิคูไลท์ แกลบ ขุยมะพร้าว		
-เมล็ดยางนา(*Dipterocapus alatus* Roxb. ex G.Don)		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 เก็บตัวอย่างและจำแนกชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ

เก็บตัวอย่างดอกเห็ดเผาะโดยซื้อจากตลาดท้องถิ่นในประเทศไทย 5 แหล่งคือ อ.เมือง จ.ชัยภูมิ อ.เมือง จ.ขอนแก่น อ.เมือง จ.ลำปาง อ.ศรีสวัสดิ์ และ อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี แหล่งละอย่างน้อย 5 ตัวอย่างและทำการจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดตามรายงานของ Phosri และคณะ (2004, 2007)

3.3.2 แยกเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะและทำให้บริสุทธิ์

นำดอกเห็ดเผาะมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อด้านในของผนังชั้นนอกวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส)เป็นเวลา 5 วัน สังเกตลักษณะของเส้นใยที่เจริญจากชิ้นของเนื้อเยื่อดอกเห็ด ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเส้นใยที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการเก็บรักษาเส้นใยบริสุทธิ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะสายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป สำหรับสายพันธุ์เส้นใยเห็ดเผาะหนังที่ได้จากจังหวัดตาก ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.สุนัดดา โยมญาติ

3.3.3 คัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่เหมาะสม

เลี้ยงเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่ได้จากข้อ 3.3.2 ทุกสายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน ทำการวัดการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุก 2 วัน คัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่มีการเจริญดีที่สุดของแต่ละชนิดมาใช้ในการศึกษาขั้นต่อ ไป

3.3.4 หาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่คัดเลือกได้

3.3.4.1 ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นโดยเลี้ยงเส้นใยราเอคโตไมคอร์-ไรซาเห็ดเผาะสายพันธุ์ที่คัดเลือกบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบด้านนอกของโคโลนีด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์ก แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว 3 ชนิด คือ Potato Dextrose Broth (PDB) Modified Melin- Norkrans Broth (MMN) และ Malt Extract Broth (MEB) pH 5.5 โดยใส่ชิ้นวุ้นเส้นใย 1 ชิ้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัดการเจริญโดยหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยทุก 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ

3.3.4.2 ค่า pH เลี้ยงเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.4.1 ที่มีค่า pH 5 5.5 6 6.5 และ 7 ที่อุณหภูมิห้อง วัดการ

เจริญโดยหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยทุก 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ

3.3.5 ผลิตหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ

ทำการผลิตหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ 3 รูปแบบ ดังนี้

3.3.5.1 **เส้นใยแขวนลอย** (mycelial suspension) เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นโดยเลี้ยงเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและค่า pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4.1 และ 3.3.4.2 เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง นำเส้นใยราเอคโต-ไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออก ปั่นเส้นใยราเอคโต-ไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ 10 กรัมในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 200 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค ภาพที่ 1)

3.3.5.2 **เส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต** (alginate entrapped mycelium) เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นโดยเลี้ยงเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและค่า pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4.1 และ 3.3.4.2 เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง นำเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออก ปั่นเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ 10 กรัมในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นนำเส้นใยแขวนลอยที่ได้มาหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ (M) (ภาคผนวก ค ภาพที่ 2)

3.3.5.3 **เส้นใยเจริญบนวัสดุ** เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นโดยเลี้ยงเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไร-ซาเห็ดเผาะสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและค่า pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4.1 และ 3.3.4.2 เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบด้านนอกของโคโลนีด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กจำนวน 8 ชิ้น นำไปใส่ในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตรที่มีวัสดุต่างๆ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วคือ (1) เวอร์มิคูไลท์และพีทมอสในอัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร (Garbaye, 1988) (2) ขุยมะพร้าวและแกลบในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ที่ทำให้ชุ่มด้วยอาหารเหลวและค่า pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4.1 และ 3.3.4.2 เพาะเลี้ยงเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน (ภาคผนวก ค ภาพที่ 3 และ 4 ตามลำดับ) จากนั้นทำการล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเส้นใยราที่เจริญบนวัสดุด้วยน้ำประปา ก่อนนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.6 ประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่มีต่อการติดเชื้อไมคอร์ไรซาและการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา

เปรียบเทียบการติดเชื้อและการเติบโตของกล้าไม้ยางนา (*Dipterocapus alatus* Roxb. ex G.Don)ที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังและราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายรูปแบบต่างๆ และชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ

3.3.6.1 การเตรียมกล้าไม้ยางนา ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด โดยแช่ใน 5 เปอร์เซ็นต์ Sodium Hypochlorite เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำไปเพาะเมล็ดในถุงเพาะชำโดยใส่ถุงละ 1 เมล็ด ที่บรรจุวัสดุปลูกได้แก่ เพอร์ไลท์:พีทมอส:ทราย อัตราส่วน 4:2:1 โดยปริมาตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รดน้ำทุกวันจนกล้าไม้อายุ 1 เดือน

3.3.6.2 การใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาและการดูแลกล้าไม้ ทำการย้ายต้นกล้าที่มีอายุ 1 เดือน ลงในวัสดุปลูกดังข้อ 3.3.6.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในถุงเพาะชำขนาด 3x6 นิ้ว ที่มีการใส่หัวเชื้อเส้นใยรูปแบบต่างๆ ในปริมาณต่างๆ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุมไม่ได้ใส่หัวเชื้อ (C)
ชุดการทดลองที่ 2 เส้นใยแขวนลอยปริมาณ 5 มิลลิลิตร (MS-5)
ชุดการทดลองที่ 3 เส้นใยแขวนลอยปริมาณ 10 มิลลิลิตร (MS-10)
ชุดการทดลองที่ 4 เส้นใยแขวนลอยปริมาณ 20 มิลลิลิตร (MS-20)
ชุดการทดลองที่ 5 เส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตปริมาณ 5 มิลลิลิตร (AE-5)
ชุดการทดลองที่ 6 เส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตปริมาณ 10 มิลลิลิตร (AE-10)
ชุดการทดลองที่ 7 เส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตปริมาณ 20 มิลลิลิตร (AE-20)
ชุดการทดลองที่ 8 เส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสโดยผสมกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 โดยปริมาตร (VM+PM-1:9)
ชุดการทดลองที่ 9 เส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสโดยผสมกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:6 โดยปริมาตร (VM+PM-1:6)
ชุดการทดลองที่ 10 เส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสโดยผสมกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน1:3 โดยปริมาตร (VM+PM-1:3)
ชุดการทดลองที่ 11 เส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบโดยผสมกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 โดยปริมาตร (CD + RH -1:9)
ชุดการทดลองที่ 12 เส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบโดยผสมกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:6 โดยปริมาตร (CD + RH -1:6)

ชุดการทดลองที่ 13 เส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบโดยผสมกับวัสดุปลูก
ในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร (CD + RH -1:3)

ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำๆ ละ 5 ตัวอย่าง วางแผนการทดลองแบบ CRD ดูแลต้นไม้โดยรดน้ำ ให้ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม ในระดับปานกลาง (ภาคผนวก ก) ทุกๆ 2 สัปดาห์เป็นเวลา 7 เดือน

3.3.6.3 ประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่มีต่อการติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนา

เมื่อต้นกล้าอายุ 8 เดือน ทำการย้ายกล้าไม้ออกจากถุงเพาะชำ จากนั้นล้างวัสดุปลูกออกจากรากด้วยน้ำประปาให้สะอาด ตรวจสอบชนิดของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบ ดังนี้

3.3.6.3.1 ตรวจลักษณะสัณฐานวิทยาของรากเอคโตไมคอร์ไรซา ได้แก่ รูปร่างลักษณะ โดยสังเกตจากสี ขนาด และลักษณะเส้นใยที่อยู่รอบๆราก ออกเป็นกลุ่มตามลักษณะที่พบตามรายงานของ Agerer (1991) และบันทึกภาพรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

3.3.6.3.2 ตรวจสอบชนิดรากเอคโตไมคอร์ไรซา ด้วยวิธีการทางอณูพันธุศาสตร์ โดยการหาลำดับเบสที่ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- นำตัวอย่างรากเอคโตไมคอร์ไรซา จำนวน 1-2 ราก และใส่ stainless steel ขนาด 2 มิลลิเมตร จำนวน 3 ลูก ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร นำไปบดด้วยเครื่อง Mixer MM 400 โดยใช้ความถี่ 20 เฮิรตซ์ เป็นเวลา 1 นาทีหรือจนกว่าตัวอย่างจะละเอียด ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างรากเอคโตไมคอร์ไรซาด้วยวิธี cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) ของ Zhou และคณะ (1999)

-เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ของราด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 มีลำดับเบสคือ 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' และ ITS4 มีลำดับเบสคือ 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' (White และคณะ, 1990) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสประกอบด้วยสารต่างๆ ที่ใช้ทำปฏิกิริยา ดังตารางที่ 3.1

- นำสารละลายพีซีอาร์ไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycler) โดยมีสภาวะของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลี-เมอร์เรสดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	38 รอบ
Annealing	51 องศาเซลเซียส	1นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Hold	4 องศาเซลเซียส		

- ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม SYBR Green ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 10 มิลลิลิตร ในสารละลาย 1XTBE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลล์ เป็นเวลา 90 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด100 bp + 1.5 Kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Transilluminator) และบันทึกภาพโดยใช้กล้องถ่ายรูปเจล (Gel-Doc) นำตัวอย่างที่ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จแล้วไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดงสาร ความเข้มข้น และปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

สาร	**ความเข้มข้นสุดท้าย**	**ปริมาตร**
DW	-	15.5
10XLA PCR ^{TM} Buffer (Mg^{2+}free)	1X	5
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	5
dNTP	2.5 mM	8
Primer ITS1	1µM	2.5
Primer ITS4	1µM	2.5
BSA	0.4 mg/ml	1
TaKaRa LA Taq^{TM}	5 units/µl	0.5
Template		1
	Total	50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ส่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ที่ผ่านการตรวจสอบและให้ผลที่ชัดเจนไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ณ สาธารณรัฐเกาหลี ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส รุ่น Biosystems 3730XL sequencers

- นำลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของราที่แยกได้ มาเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับเบสกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn (www.ddbj.nig.ac.jp/)

3.3.6.3.3 หาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (percent infection) ของราเอคโตไมคอร์ไรซาของรากกล้าไม้ตามรายงานของ Nara และคณะ (2003) โดยตัดรากออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีความยาวชิ้นละ 1 เซนติเมตร จำนวน 300 ชิ้นต่อ 1 ซ้ำ แล้วนำมาวางบนแผ่นกริดขนาดตาราง 1x1 ตารางเซนติเมตร แล้วสุ่มนับราก เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

3.3.6.4 ประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา

-ทำการวัดความสูงของลำต้นตั้งแต่คอรากจนถึงปลายลำต้นโดยใช้ไม้บรรทัด และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นที่ระดับคอรากโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (vernier caliper)

-หามวลชีวภาพของส่วนลำต้นและราก โดยนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้ง

3.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองโดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยวิธี One-way ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 เก็บตัวอย่างและจำแนกชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ

จากการเก็บตัวอย่างดอกเห็ดเผาะจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย 5 แหล่ง ได้แก่ ชัยภูมิ ลำปาง ขอนแก่น กาญจนบุรีแหล่งที่ 1 และกาญจนบุรีแหล่งที่ 2 พบว่าดอกเห็ดที่ได้มีลักษณะค่อนข้างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร ผิวด้านนอกมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม และพบลักษณะเป็นขุยเส้นใยปกคลุมด้านนอก ลักษณะภายในดอกอ่อนพบสปอร์มีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวอัดตัวกันแน่น ในดอกแก่พบสปอร์เป็นขุยผงสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลอมดำบรรจุอยู่ในถุงชั้นบางๆ ที่ห่อหุ้มสปอร์ดอกเห็ดไว้ เมื่อทำการจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด ตามรายงานของ Phosri และคณะ (2004, 2007) พบว่ามีลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นเป็นเห็ดเผาะฝ้าย (*A. asiaticus*)

4.2 แยกเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะและทำให้บริสุทธิ์

เมื่อแยกเส้นใยจากเนื้อเยื่อดอกเห็ดที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ สามารถแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์ได้ทั้งสิ้น 45 สายพันธุ์ ได้แก่ แหล่งชัยภูมิ 8 สายพันธุ์คือ CH1, CH2, CH3, CH4, CH5, CH6, CH7 และ CH8 แหล่งลำปาง 6 สายพันธุ์คือ LP1, LP2, LP3, LP4, LP5 และ LP6 แหล่งขอนแก่น 10 สายพันธุ์คือ KK1, KK2, KK3, KK4, KK5, KK6, KK7, KK8, KK9 และ KK10 แหล่งกาญจนบุรี-1 12 สายพันธุ์คือ KANI1, KANI2, KANI3, KANI4, KANI5, KANI6, KANI7, KANI8, KANI9, KANI10, KANI11 และ KANI12 และแหล่งกาญจนบุรี-2 9 สายพันธุ์คือ KANII1, KANII2, KANII3, KANII4, KANII5, KANII6, KANII7, KANII8 และ KANII9

4.3 คัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่เหมาะสม

ทำการคัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายและเห็ดเผาะหนังที่เหมาะต่อการทำหัวเชื้อ โดยเลือกเส้นใยเห็ดเผาะฝ้ายและเห็ดเผาะหนังที่เจริญดีที่สุด โดยเปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA pH 5.5 อายุ 14 วัน พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ต่างๆ มีการเจริญที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ยตั้งแต่ 1.25 - 4.95 เซนติเมตร และลักษณะของโคโลนีโดยส่วนใหญ่มีขอบโคโลนีเรียบ เส้นใยฟู สีน้ำตาลอ่อน (ดังภาพที่ 4.1) จากตารางที่ 4.1 พบว่าราเอคโตไมคอร์-ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 มีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ดีที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 4.95 เซนติเมตร สำหรับการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 14 วัน แสดงดังตารางที่ 4.2 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย

ตั้งแต่ 4.88 – 8.07 เซนติเมตร และลักษณะของโคโลนีโดยส่วนใหญ่มีขอบโคโลนีเรียบ เส้นใยฟูน้อยกว่าเห็ดเผาะฝ้าย มีสีน้ำตาลเข้ม (ดังภาพที่ 4.2) จากตารางที่ 4.2 พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 มีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ดีที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 8.07 เซนติเมตร

ตารางที่ 4.1 การเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย (*A. asiaticus*) สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA pH 5.5 อายุ 14 วัน

แหล่ง	สายพันธุ์	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) ± ค่า SD
ชัยภูมิ	CH1	2.77± 0.16
	CH2	3.20 ± 0.05
	CH3	2.02 ± 0.08
	CH4	2.25 ± 0.10
	CH5	1.25 ± 0.05
	CH6	2.98 ± 0.13
	CH7	3.17± 0.15
	CH8	3.27 ± 0.08
ลำปาง	LP1	1.88 ± 0.39
	LP2	4.22 ± 0.10
	LP3	2.02 ± 0.18
	LP4	2.32 ± 0.08
	LP5	1.93 ± 0.18
	LP6	2.40 ± 0.20
ขอนแก่น	KK1	3.23 ± 0.15
	KK2	1.67 ± 0.10
	KK3	3.03 ± 0.08
	KK4	4.08 ± 0.10
	KK5	3.35 ±0.13
	KK6	1.65 ± 0.05
	KK7	3.63 ± 0.10
	KK8	2.57 ± 0.08

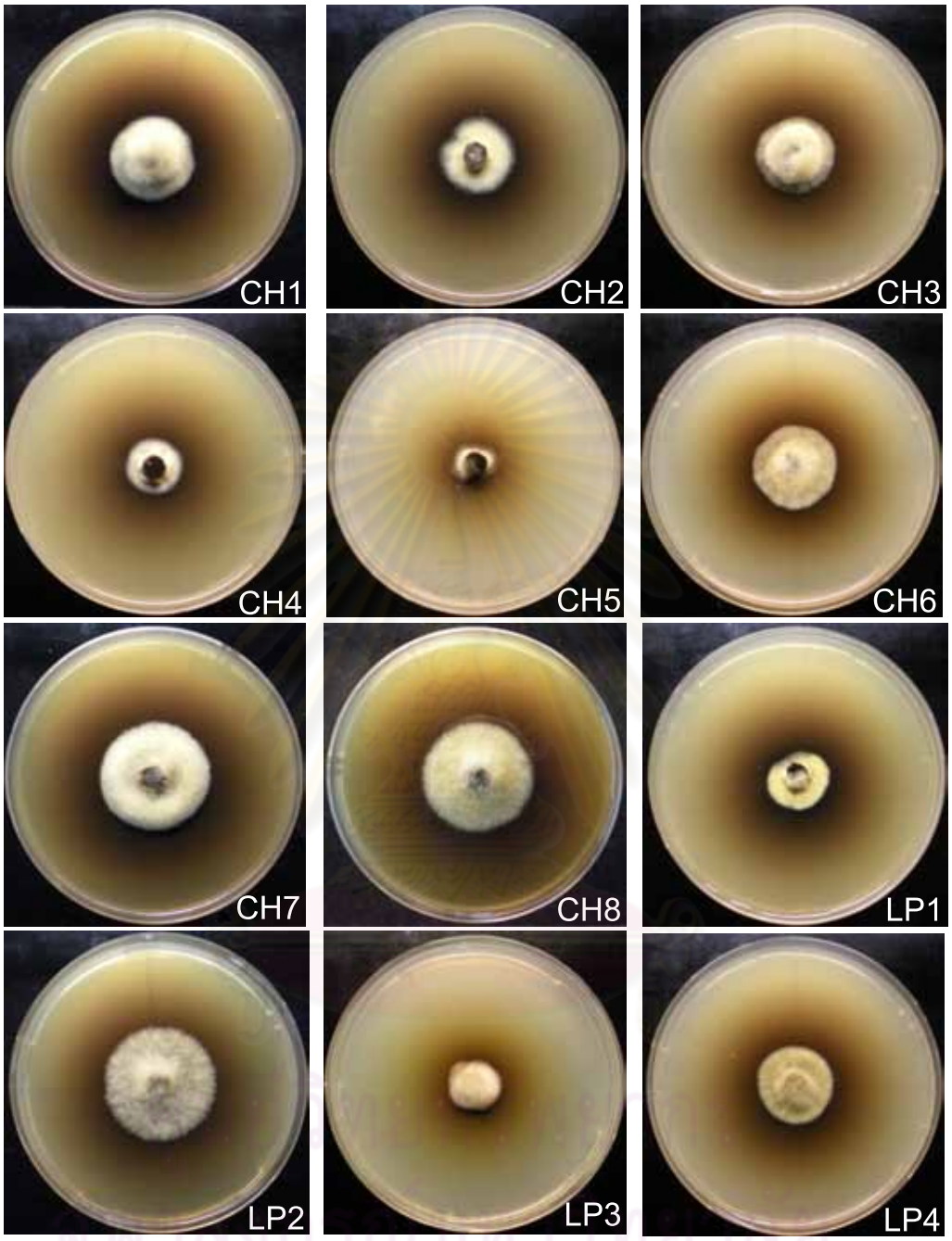
ตารางที่ 4.1 การเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย (*A. asiaticus*) สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA pH 5.5 อายุ 14 วัน (ต่อ)

แหล่ง	สายพันธุ์	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) ± ค่า SD
ขอนแก่น	KK9	2.93 ± 0.08
	KK10	2.55 ± 0.18
กาญจนบุรี-1	KANI1	1.92 ± 0.10
	KANI2	3.70 ±0.20
	KANI3	1.92 ± 0.08
	KANI4	2.83 ± 0.08
	KANI5	3.33 ± 0.13
	KANI6	3.63 ± 0.16
	KANI7	2.33 ± 0.26
	KANI8	3.43 ± 0.45
	KANI9	2.42 ± 0.10
	KANI10	4.50 ± 0.13
	KANI11	2.27 ± 0.08
	KANI12	4.73 ± 0.10
กาญจนบุรี-2	KANII1	2.32 ± 0.03
	KANII2	2.62 ± 0.10
	KANII3	2.32 ± 0.16
	KANII4	2.42 ± 0.10
	KANII5	2.50± 0.05
	KANII6	4.95± 0.26
	KANII7	2.50 ± 0.05
	KANII8	2.13 ± 0.39
	KANII9	2.00 ± 0.05

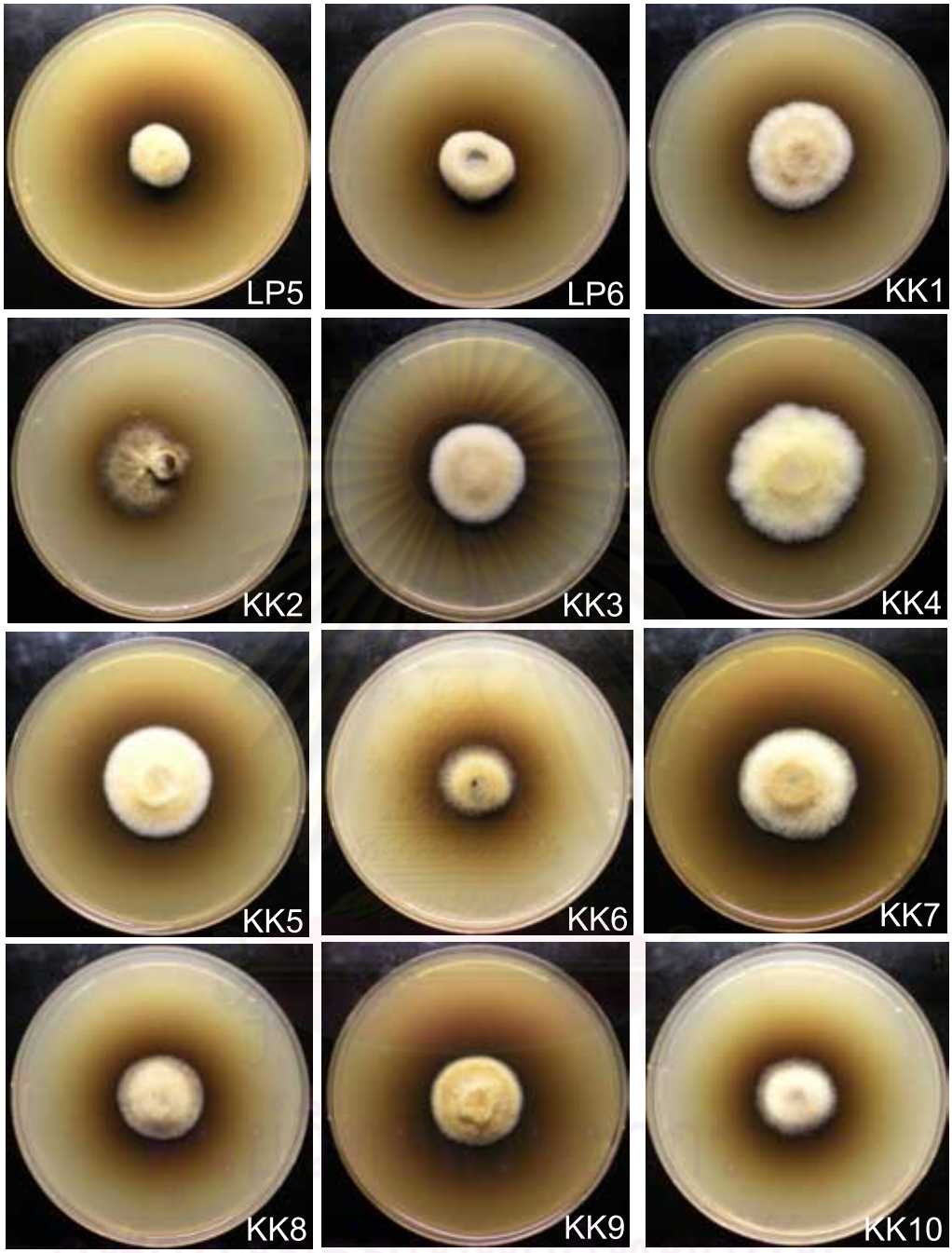
ตารางที่ 4.2 การเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA pH 5.5 อายุ 14 วัน

แหล่ง	**สายพันธุ์**	**เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) ± ค่า SD**
ตาก	TAK1	7.03 ± 0.10
	TAK2	6.85 ± 0.05
	TAK3	6.88 ± 0.03
	TAK4	6.55 ± 0.22
	TAK5	7.15 ± 0.18
	TAK6	6.65 ± 0.18
	TAK7	6.52 ± 0.33
	TAK8	8.07 ± 0.06
	TAK9	4.88 ± 0.03

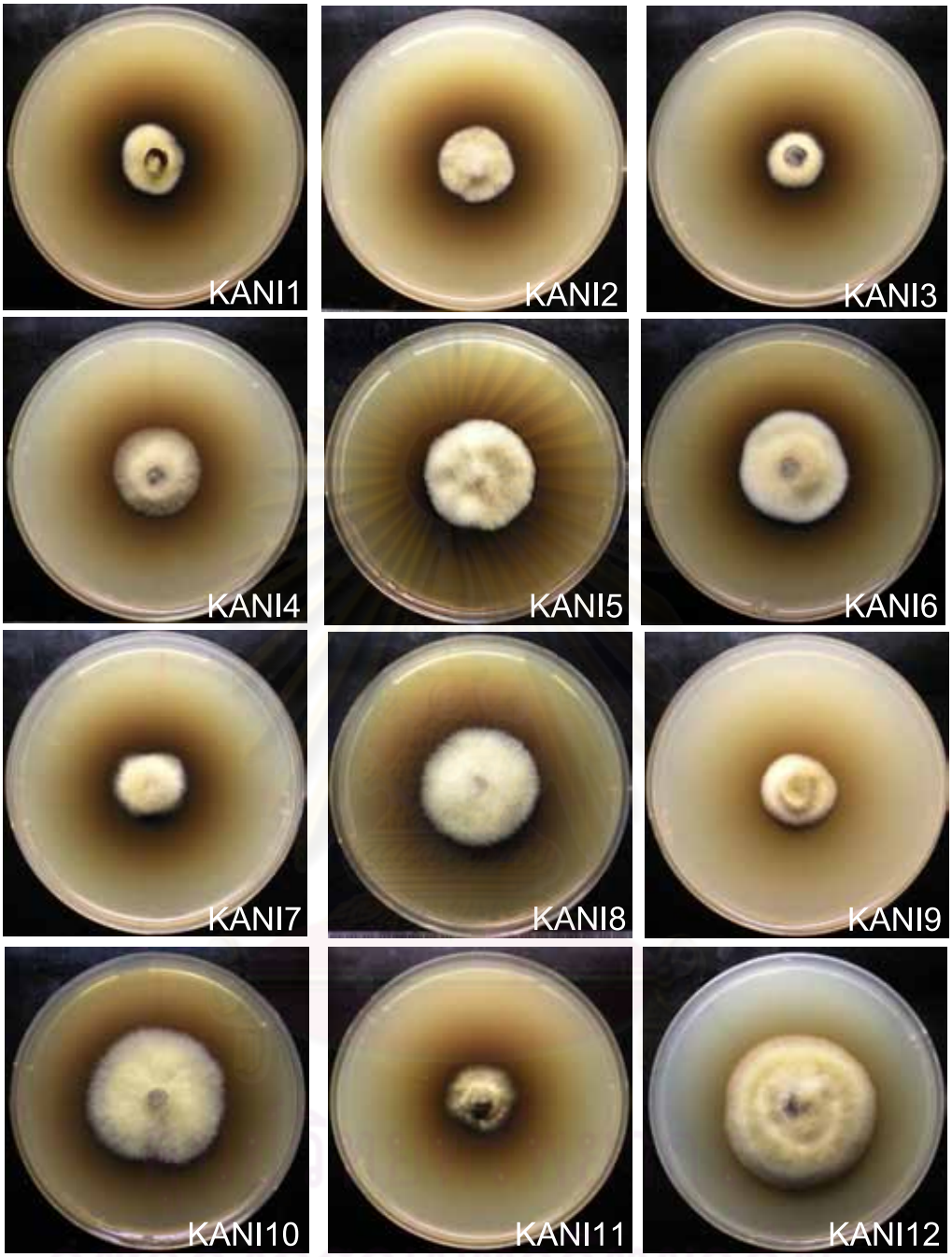
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



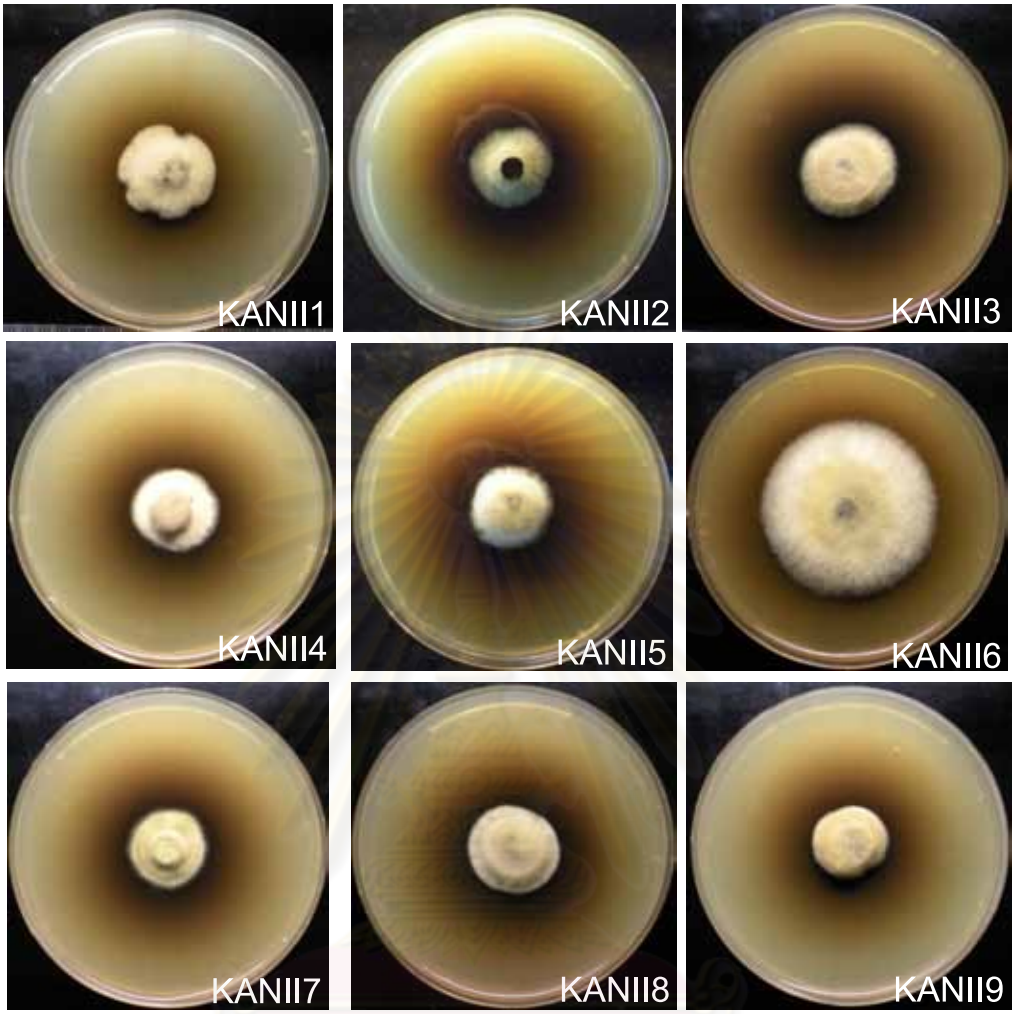
ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเจริญและลักษณะโคโลนีของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย (*A. asiaticus*) สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหาร PDA เมื่ออายุ 14 วัน



ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเจริญและลักษณะโคโลนีของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย (*A. asiaticus*) สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหาร PDA เมื่ออายุ 14 วัน (ต่อ)

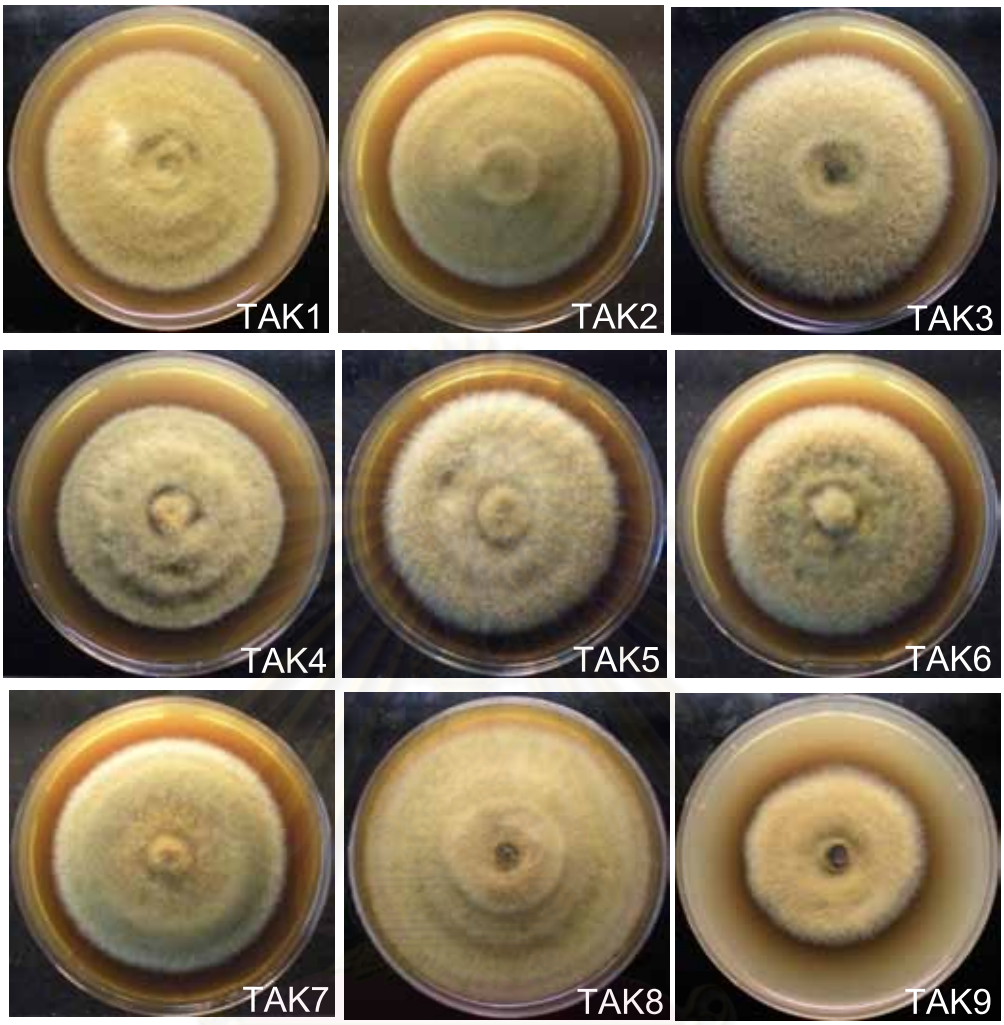


ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเจริญและลักษณะโคโลนีของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย (*A. asiaticus*) สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหาร PDA เมื่ออายุ 14 วัน (ต่อ)



ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเจริญและลักษณะโคโลนีของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย (*A. asiaticus*) สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหาร PDA เมื่ออายุ 14 วัน (ต่อ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและลักษณะโคโลนีของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหาร PDA เมื่ออายุ 14 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

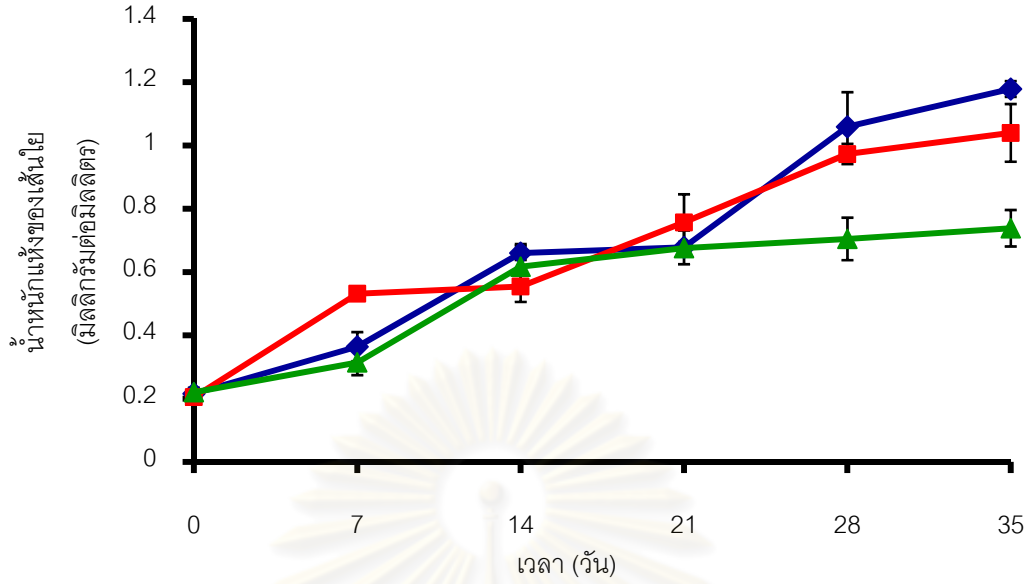
4.4 ภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่คัดเลือกได้

4.4.1 ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ

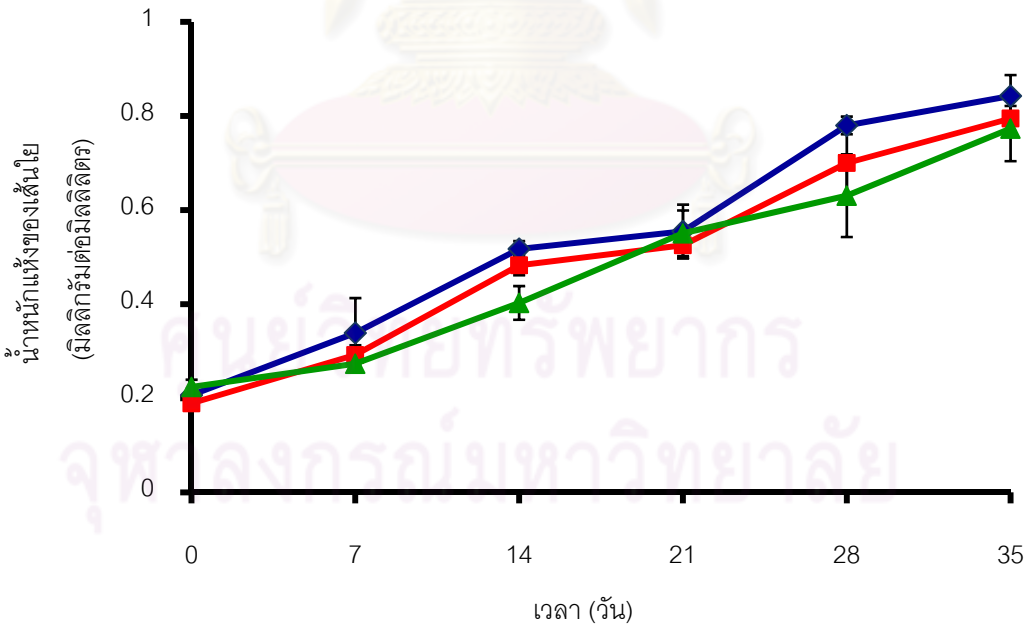
เมื่อเลี้ยงเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ชนิด ได้แก่ PDB MMN และ MEB pH 5.5 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 35 วัน ให้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.3 และภาคผนวก ง ตารางที่ 15 โดยเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 มีการเจริญดีที่สุดในอาหารเหลวชนิด MMN โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่ออายุครบ 35 วัน เป็น 1.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคืออาหารเหลวชนิด MEB และ PDB ตามลำดับ โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่ออายุครบ 35 วัน เป็น 1.04 และ 0.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 พบว่ามีการเจริญดีที่สุดในอาหารเหลวชนิด MMN โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่ออายุครบ 35 วัน เป็น 0.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคืออาหารเหลวชนิด MEB และ PDB ตามลำดับ โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่ออายุครบ 35 วัน เป็น 0.79 และ 0.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.4 และภาคผนวก ง ตารางที่ 15

4.4.2 ค่า pH

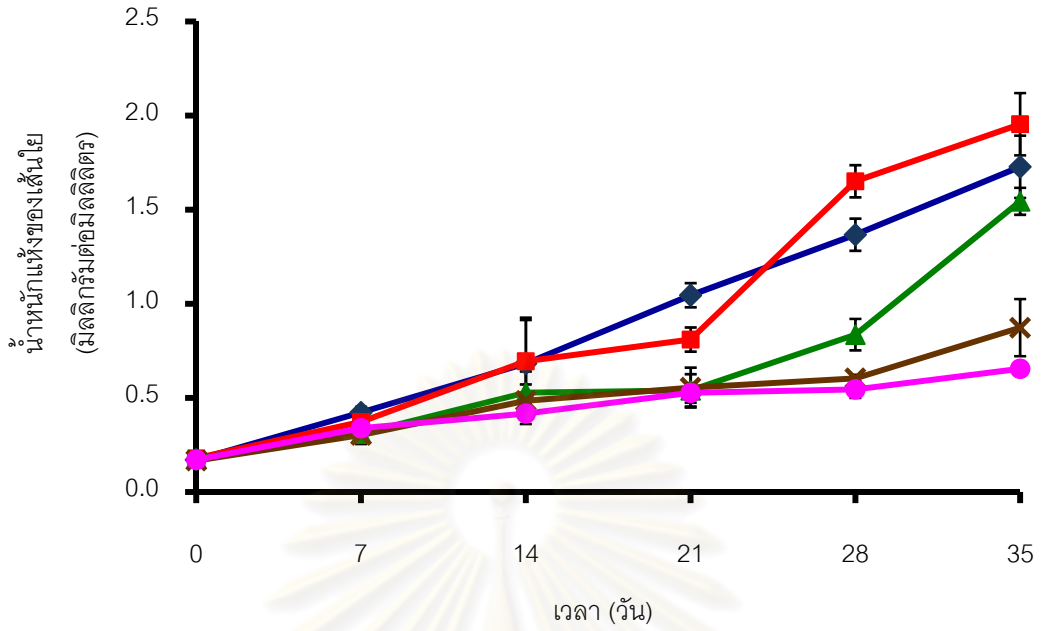
เมื่อเลี้ยงเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN ที่มีค่า pH เป็น 5 5.5 6 6.5 และ 7 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 35 วัน ให้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.5 และภาคผนวก ง ตารางที่ 16 โดยเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 มีการเจริญดีที่สุดในอาหารเหลวชนิด MMN ที่มีค่า pH เป็น 5.5 โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่ออายุครบ 35 วัน เป็น 1.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือค่า pH 5 6 6.5 และ 7 ตามลำดับ โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่ออายุครบ 35 วัน เป็น 1.73 1.54 0.87 และ 0.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 มีการเจริญดีที่สุดในอาหารเหลวชนิด MMN ที่มีค่า pH เป็น 5.5 โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่ออายุครบ 35 วัน เป็น 2.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือค่า pH 5 6.5 6 และ 7 ตามลำดับ โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่ออายุครบ 35 วัน เป็น 1.93 1.72 1.63 และ 1.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.6 และภาคผนวก ง ตารางที่ 16



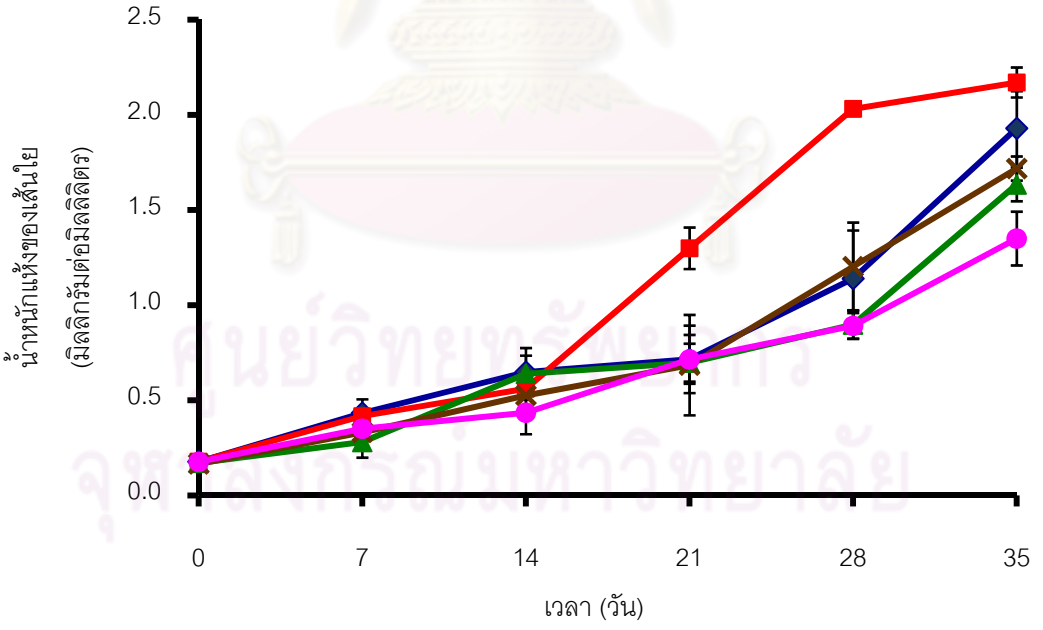
ภาพที่ 4.3 การเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 เป็นเวลา 35 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆ Potato Dextrose Broth [▲] Modified Melin-Norkans Broth [◆] และ Malt Extract Broth [■]



ภาพที่ 4.4 การเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 เป็นเวลา 35 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆ Potato Dextrose Broth [▲] Modified Melin-Norkans Broth [◆] และ Malt Extract Broth [■]



ภาพที่ 4.5 การเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 เป็นเวลา 35 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด MMN ที่มี pH ต่างๆ pH 5 [◆] pH 5.5 [■] pH 6 [▲] pH 6.5 [✕] และ pH 7 [●]



ภาพที่ 4.6 การเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 เป็นเวลา 35 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด MMN ที่มี pH ต่างๆ pH 5 [◆] pH 5.5 [■] pH 6 [▲] pH 6.5 [✕] และ pH 7 [●]

4.5 ประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่มีต่อการติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนา

จากการประเมินผลวิธีการใส่หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 4 รูปแบบ คือ เส้นใยแขวนลอย เส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต ในปริมาณ 5 10 และ 20 มิลลิลิตร เส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส และเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบ โดยผสมหัวเชื้อและวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร ที่มีต่อการติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนา พบว่าเมื่อตรวจสอบลักษณะรากเอคโต-ไมคอร์ไรซาในชุดการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 พบรากเอคโตไมคอร์ไรซามีลักษณะการแตกแขนงแบบ monopodial pinnate มีแผ่นแมนเทิลสีเหลืองอมน้ำตาล (ECM1) (ภาพที่ 4.8 ก) และเมื่อตรวจสอบชนิดของรากเอคโตไมอร์ไรซา ECM1 โดยการหาลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ให้ผลดังแสดงในภาคผนวก ข เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS กับราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย *A. asiaticus* (EU718089) เป็น 97 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการจัดเรียงลำดับเบสเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW (www.ddbj.nig.ac.jp/) ดังนี้

```
ECM1        ----------------------------------------------------------------------------------------------------AGC
EU718089    TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGC
                                                                                                              ***

ECM1        GAATTCTGAGGCGGGAGAGCGCAAGGGGGTTCTAGCATTTCGGAATGCTGTCGCTGGCCT
EU718089    GAATTCTGAGGCGGGAGAGCGCAAGGGGGTTCTAGCATTTCGGAGTGCTGTCGCTGGCCT
            ********************************************   ***************

ECM1        TTCGGGGCATGTGCCCGTCTTCCGAGTGTCTGCCTTCGGACCTCCGAACCCTCTCCTATA
EU718089    TTCGGGGCATGTGCACGTCTTCGGAGTGTCTGCCTTCGGACCTCCGAACCCTCTCCTATA
            ***************  ******* ************************************

ECM1        CCTTCCAAACACACCTGTGTGCACCTGTTGGAGGCCTTGTCTATTAGGCAGACCTATGTA
EU718089    CCTCCCAAACACACCTGTGTGCACCTGTTGTAGGCCTTGTCTATTAGGCAGACCTATGTA
            *** ***************************  ******************************

ECM1        TTACTTTCATAAACATCGAA-GTATAAAAGAATGTTTGAACACACGATATATATGAATAA
EU718089    TTACTTTCATAAACATCGCATGTATAAAAGAATGTTTGAACACACGATATATATGAATAA
            ****************** * ************************************
```

```
ECM1        ATATA- CTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGC
EU718089    ATATAACTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGC
            ***** **************************************************

ECM1        GATAAGTAATGGGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCA-CGAATCTTTGAACGCACCTTGCG
EU718089    GATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC ACCTTGCG
            ********** ********************** **********************

ECM1        CTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAAATCTCAAAATCCTAGC
EU718089    CTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAAATCTCAAAATCCTAGC
            ************************************************************

ECM1        TTTGCCTTGTCGGAACTTGGTTTTTGGACTTTGGGAGTTTGCGGGCGACCCCTTTGCTTT
EU718089    TTTGCCTTGTCGGAGCTTGGTTTTTGGACTTTGGGAGTTTGCGGGCGACCCCTTTGCTTT
            ************** ******************************************

ECM1        GGGAAGTCGGCTCTCCTTAAATTGATTAGCAGTGGGTGCAAGTCCTTTGCATGGCACGGC
EU718089    GGGATGTCGGCTCTCCTTAAATGTATTAGCAGTGGGTGCAAGTCCTTTGCATGGCACGGC
            ****  ******************  ************************************

ECM1        CTGTTCGACGTCGTAGTGATCGTCGCGGGCTGGAAGGGCTTGGATTGACATGTCTCATGC
EU718089    CTGTTCGACGTCGTAGTGATCGTCGCGGGCTGGAAGTGCTTGGATTGACATGTCTCATGC
            ********************************** ************************

ECM1        TTCCAACTTTTACATGCGCCAAGTTTAGTCTAGGCTACTCTAGCGTGTGTCCTTTTCTCT
EU718089    TTCCAACTTTTACATGCGCCAAGTTTAGTCTAGGCTACTCTAGCGTGTGTCCTTTTCTCT
            ************************************************************

ECM1        AAGGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAA----------------
EU718089    AAGGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
            ************************************
```

จากการหาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาพบว่าในชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3 สำหรับชุดการทดลองที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ ไม่พบการติดเชื้อไมคอร์ไรซา เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 แบบเส้นใยแขวนลอยปริมาณ 5 10 และ 20 มิลลิลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์-ไรซาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตปริมาณ 5 10 และ 20 มิลลิลิตร พบว่าชุดการทดลองที่ใส่ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาสูงกว่าชุดการทดลองที่ใส่ปริมาณ 5 มิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองที่ใส่ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ1:3 โดยปริมาตร พบว่าชุดการทดลองที่ใส่อัตราส่วน 1:6 มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์-ไรซาสูงกว่าชุดการทดลองที่ใส่อัตราส่วน 1:9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองที่ใส่อัตราส่วน 1:3 ชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร พบว่าชุดการทดลองที่ใส่อัตราส่วน 1:6 มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาสูงกว่าชุดการทดลองที่ใส่อัตราส่วน 1:9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองที่ใส่อัตราส่วน 1:3

จากการประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 4 รูปแบบ คือ เส้นใยแขวนลอย เส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต ในปริมาณ 5 10 และ 20 มิลลิลิตร เส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส และเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบ โดยผสมหัวเชื้อและวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร ที่มีต่อการติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนา พบว่าเมื่อตรวจสอบลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซาในชุดการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 พบรากเอคโตไม-คอร์ไรซามีลักษณะการแตกแขนงแบบ monopodial pinnate มีแผ่นแมนเทิลสีเหลืองอมน้ำตาล (ECM2) (ภาพที่ 4.8 ข) และเมื่อตรวจสอบชนิดของรากเอคโตไมอร์ไรซา ECM2 โดยการหาลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ให้ผลดังแสดงในภาคผนวก ข เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS กับราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนัง *A. odoratus* (AJ629879) เป็น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการจัดเรียงลำดับเบสเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW (www.ddbj.nig.ac.jp/) ดังนี้

```
ECM2        ATTACCGAATCGTGCAAGGAGCGTAAGACGGTCGGAGGAGGAACCTCGGGGGGGTGTCT
AJ629879    ATTACCGAATCGTGCAAGGAGCGTAAGACGGTCGGAGGAGGAACCTCGGGGGGGTGTCT
            ************************************************************

ECM2        AGTAGTATTTCGGAGTTGCTGGTCGCTGGCCTTTCGGCCATGTGCACGTCTCCGGAGTCC
AJ629879    AGTAGTATTTCGGAGT-GCTG- TCGCTGGCCTTTCGGCAATGTGCACGTCTCCGGAGTCC
            **************** **** *************** ********************

ECM2        GATGGGGTGTGTATACACCCAACCCCCCCCTCGGCCTCGGTCTCCTTCGGAACCTCTGAAG
AJ629879    GATGGGGTGTGTATACACCCAACCCCCCCCTCGGCCTCGGTCTCCTTCCGAACCTCTGAAG
            ********************************************  ************
```

```
ECM2        CTCCTGTACCTCTCTAACACCATTGTGCACCTTGTTGTAGGTCTCGTCGAGGGACCTATG
AJ629879    CTCCTGTACCTCTCTAACACCATTGTGCACCTTGTTGTAGGTCTCGTCGAGGGACCTATG
            ************************************************************

ECM2        TATTCCTTTTTTTT-ATAAAGCTCTCTGCATGTATACAGAACGTTGTCTTTTGACAAACA
AJ629879    TATTCCTTTTTTTTTATAAAGCTCTCTGCATGTATACAGAACGTTGTCTTTTGACAAACA
            ************** *******************************************

ECM2        TGTCATATAAACATATATATAACTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
AJ629879    TGTCATATAAACATATATATAACTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
            ************************************************************

ECM2        GAACGCAGCGAATCGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCT
AJ629879    GAACGCAGCGAATCGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCT
            ************************************************************

ECM2        TTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAA
AJ629879    TTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAA
            ************************************************************

ECM2        ATCTCAAATCCTAAGCTTTGCTTCGGTCGCCGACTCGGAGCGAGCTCGGACTTGGACTTT
AJ629879    ATCTCAAATCCTAAGCTTTGCTTCGGTCGCCGACTCGGAGCGAGCTCGGACTTGGACTTT
            ************************************************************

ECM2        GGGAGTCTGCGGGCGACCCGACTTTGCTCGGGACGCCGGCTCTCCTCAAATGCATTAGCG
AJ629879    GGGAGTCTGCGGGCGACCCGACTTTGCTCGGGACGCCGGCTCTCCTCAAATGCATTAGCG
            ************************************************************

ECM2        GTGGGCTTCGAGCCTTTGCACGGCACGGCCTGTTCGACGTCGTAGTGATCGTCGCGGGCT
AJ629879    GTGGGCTTCGAGCCTTTGCACGGCACGGCCTGTTCGACGTCGTAGTGATCGTCGCGGGCT
            ************************************************************

ECM2        GGAAGTGCTTGGATCGACGTGTCTCATGCTTCCAACCATGTGCCGCGCCGCGCCGGGGTT
AJ629879    GGAAGTGCTTGGATCGACGTGTCTCATGCTTCCAACCATGTGCCGCGCCGCGCCGGGGTT
            ************************************************************

ECM2        GTTAATCCCGGGGCCGGAACTCTTCT-  -AAGGCGTGACGTCGA-------
AJ629879    GTTAATCCCGGGGCCGGAACTCTTTTT TAAGGCTTGACC TCAAATCAGGT
            ************************ *   *****  ****  ** *
```

จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาพบว่าในชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4 สำหรับชุดการทดลองที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ ไม่พบการติดเชื้อไมคอร์ไรซา เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 แบบเส้นใยแขวนลอยปริมาณ 5 10 และ 20 มิลลิลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตปริมาณ 5 10 และ 20 มิลลิลิตร พบว่าชุดการทดลองที่ใส่ปริมาณ 10 มิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาสูงกว่าชุดการทดลองที่ใส่ปริมาณ 5 และ 20 มิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนชุดการทดลองที่ใส่ปริมาณ 5 และ 20 มิลลิลิตรนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร พบว่าชุดการทดลองที่ใส่อัตราส่วน 1:6 มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาสูงกว่าชุดการทดลองที่ใส่อัตราส่วน 1:9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองที่ใส่อัตราส่วน 1:3 ชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร พบว่าชุดการทดลองที่ใส่อัตราส่วน 1:6 มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาสูงกว่าชุดการทดลองที่ใส่อัตราส่วน 1:9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองที่ใส่อัตราส่วน 1:3

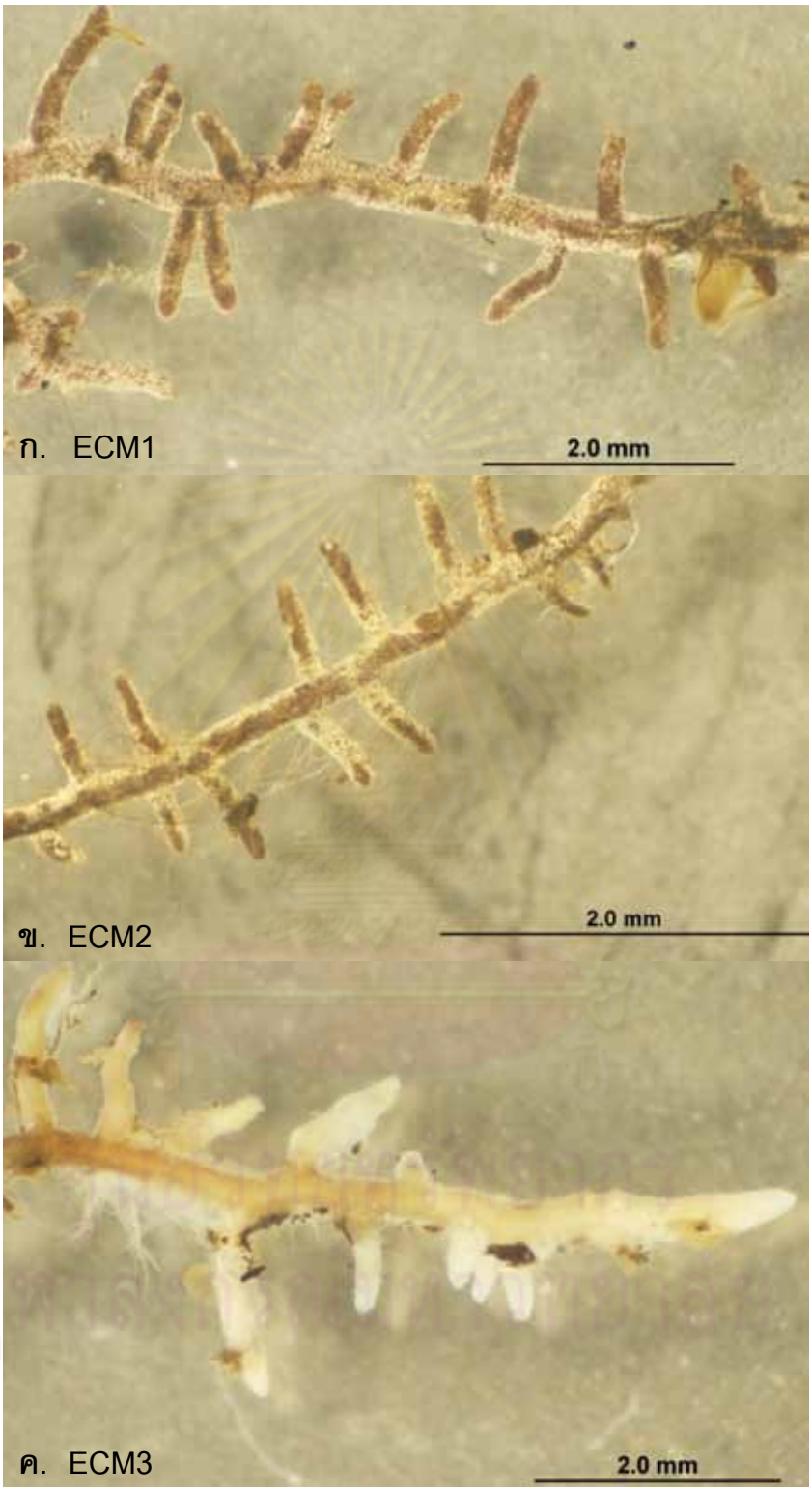
นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซาในชุดการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 พบรากเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่นในบางชุดการทดลอง มีลักษณะการแตกแขนงแบบ monopodial pinnate มีแผ่นแมนเทิลสีขาว (ECM3) แต่มีปริมาณการติดเชื้อน้อยประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.8 ค) และเมื่อตรวจสอบชนิดของรากเอคโตไมอร์ไรซา ECM3 โดยการหาลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ดังแสดงในภาคผนวก ข แล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS กับราเอคโตไมคอร์ไรซาในกลุ่ม *Tomentella* sp. (EU819522) เป็น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการจัดเรียงลำดับเบสเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW (www.ddbj.nig.ac.jp/) ดังนี้

```
ECM3        TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAA
EU819522    CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAA
            ************************************************************
```

```
ECM3       GGATCATTACCGAATTGTCAACACGGGTTGTTGCTGGCCCCCGTAGGGGGGCATGTGCAC
EU819522   GGATCATTACCGAATTGTCAACAAGAGTTGTTGCTGGTCCT CAAATGGGGGCATGTGCAC
           ********************** *  *********** ** *   *  **************

ECM3       ACTCTGTTCACACATCCACTCACACC- TGTGCACCCTCTGTAGTTCTGTGGTCTGGGGGG
EU819522   GCTCTGTTCACACATCCACTCACACCCTGTGCACCCTYTGTAGTTCTATGGTCAGGGGG-
             ************************* ********** ********* ***** *****

ECM3       CCCTGTCCTCCTGCTGTGGT-CTGCATCTTTACACACACACACTGTAACAAAGTCTAATG
EU819522   - CCTGTCCTCCTGCTGTGGTTCTGCATCTTTACACACACA--  CTGTAACAAAGTCTCATG
            ******************  ******************  ************** ***

ECM3       GAATGCATGTCGCGTTTAACGCAATACAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCT
EU819522   GAATGCATGTCGCGTTTAACGCAATACAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCT
           ************************************************************

ECM3       CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA
EU819522   CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA
           ************************************************************

ECM3       TCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGCTATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTG
EU819522   TCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGCCATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTG
           ********************************** ****** ****************

ECM3       AGTATCATGAACACCTCAACTC-TTGTGGTTTTCCATGATGTATGCTTGGACTTTGGGGG
EU819522   AGTATCATGAACACCTCAACTCATTGTGGTTTTCCATGATGTA-GCTTGGACTTTGGGGG
           ********************** ******************** ****************

ECM3       TCTTGCTGGC-TACAGTCGGCTCCTCTCAAATGAATCAGCTTACCGGTGTTTGGTGGGTA
EU819522   TTTTGCTGGCCTACAGTCGGCTCCTCTAAAATAAATCAGCTTACCGGTGTTTGGTGGGTA
           * ******** ***************** ****  ****************************

ECM3       TCATGGGTGTGATAACTATCTACGCTTGTGGATTT-CCACCAGGTAACCTTCATCAATGG
EU819522   TCATGGGTGTGATAACTATCTACGCTTATGGTTTTTCCACCAGGTAACCTTCATCAGTGG
           **************************** *** *** ******************** ***

ECM3       AGGTTCACTGGAGCTCATA
EU819522   AGGTTCACYGGAAATCATA
           ******** ***  *****
```

ในการทดลองครั้งนี้พบดอกเห็ดเผาะหนังในชุดการทดลองที่ใส่เส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 แบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:6 โดยปริมาตร ดังภาพที่ 4.7 ลักษณะดอกเห็ดมีขนาดเล็ก แตกเป็นแฉก 5 แฉก เมื่อจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด ตามรายงานของ Phosri และคณะ (2004, 2007) พบว่ามีลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นเป็นเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*)

ภาพที่ 4.7 ดอกเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) ที่พบในชุดการทดลองที่ใส่เส้นใยราเอคโตไมคอร์-ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 แบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:6 โดยปริมาตร



ภาพที่ 4.8 ลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซา (ก) รากเอคโตไมคอร์ไรซา ECM1 (ข) รากเอคโตไมคอร์ไรซา ECM2 (ค) รากเอคโตไมคอร์ไรซา ECM3

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบการติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนาอายุ 8 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ

หัวเชื้อรูปแบบต่าง ๆ	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาชนิดอื่น
C	0g	0
MS-5	6.33ef	1.44
MS-10	6.22ef	3.89
MS-20	5.67f	3.11
AE-5	9.44cd	0.00
AE-10	12.00ab	0.00
AE-20	9.56cd	0.00
VM+PM-1:9	8.22de	3.67
VM+PM-1:6	12.67ab	3.33
VM+PM-1:3	10.67bc	3.00
CD+RH-1:9	9.56cd	0.00
CD+RH-1:6	13.44a	0.00
CD+RH-1:3	12.44ab	0.00

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวตั้ง ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบการติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนาอายุ 8 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ

หัวเชื้อรูปแบบต่าง ๆ	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนัง	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาชนิดอื่น
C	0f	0
MS-5	5.44e	3.44
MS-10	5.33e	3.22
MS-20	5.89e	2.89
AE-5	10.89cd	0.00
AE-10	14.22a	0.00
AE-20	10.78cd	0.00
VM+PM-1:9	9.00d	3.22
VM+PM-1:6	12.00bc	3.56
VM+PM-1:3	11.11cd	3.22
CD+RH-1:9	10.11cd	0.00
CD+RH-1:6	14.78a	0.00
CD+RH-1:3	13.56ab	0.00

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวตั้ง ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 ประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา

จากการประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 4 รูปแบบ คือ เส้นใยแขวนลอย เส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต ในปริมาณ 5 10 และ 20 มิลลิลิตร เส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส เส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบ โดยผสมหัวเชื้อและวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร ที่มีต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา เมื่อทำการวัดการเจริญทางความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นระดับคอราก มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน และมวลชีวภาพรวม เมื่อต้นกล้าอายุได้ 8 เดือน ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5 และลักษณะของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือน แสดงดังภาพที่ 4.9 จากตารางที่ 4.5 เมื่อเปรียบเทียบความสูงของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ พบว่า ความสูงของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร มีความสูงมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่กล้าไม้มีความสูงเพิ่มขึ้น 21.54 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบชุดการทดลองแบบเส้นใยแขวนลอยปริมาณ 5 10 และ 20 มิลลิลิตร พบว่าความสูงในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตปริมาณ 5 10 และ 20 มิลลิลิตร พบว่าความสูงของชุดการทดลองที่ใส่ปริมาณ 20 มิลลิลิตรสูงกว่าชุดการทดลองที่ใส่ปริมาณ 5 และ10 มิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร พบว่าความสูงในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร พบว่าความสูงในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

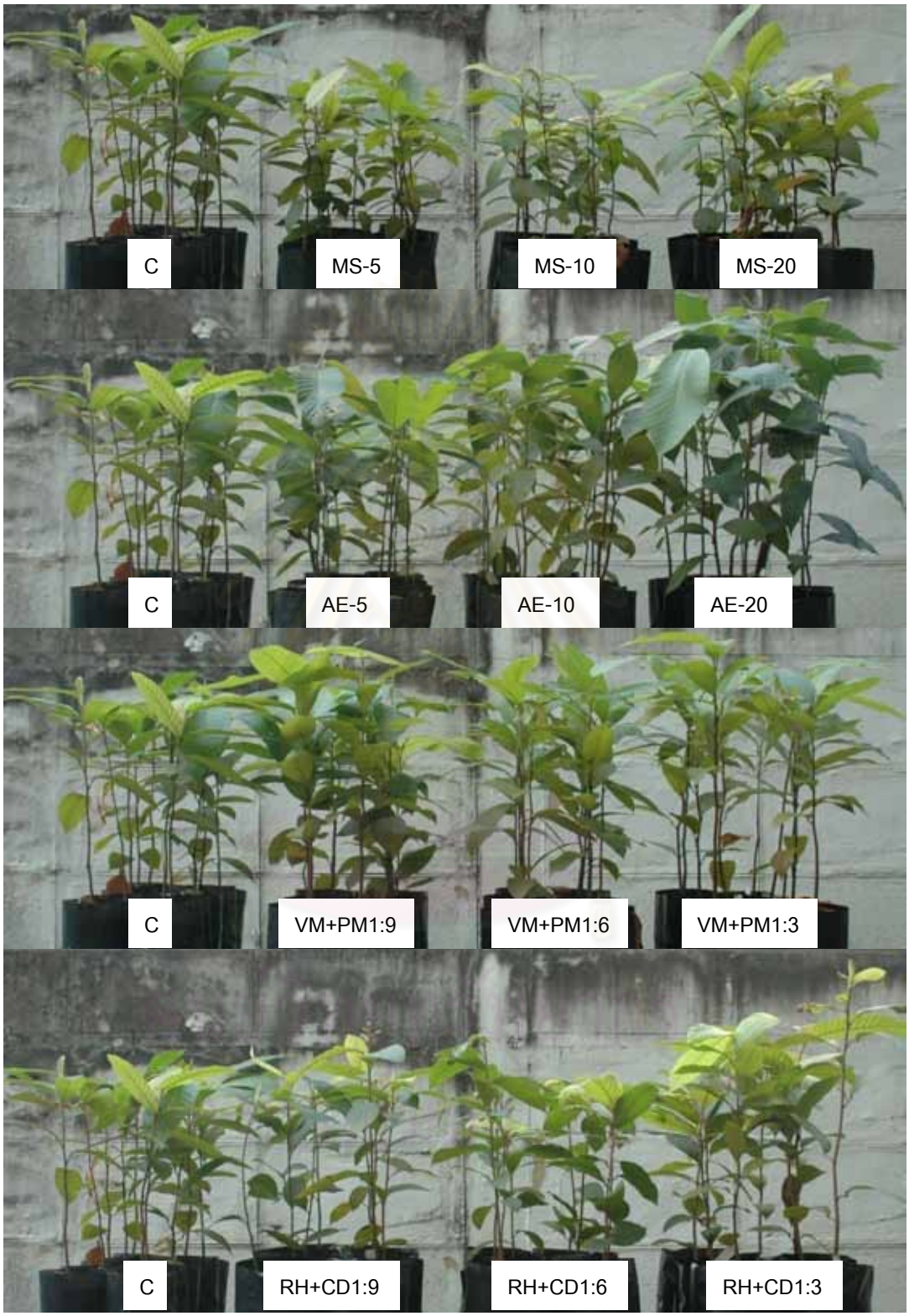
เมื่อเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นที่ระดับคอรากของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่กล้าไม้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มขึ้น 17.86 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดการทดลองอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม

เมื่อเปรียบเทียบมวลชีวภาพส่วนเหนือดิน มวลชีวภาพส่วนใต้ดินและมวลชีวภาพรวมของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนาอายุ 8 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ

รูปแบบหัวเชื้อ	**ความสูง (ซม.)**	**เส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก (มม.)**	**มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน(กรัม)**	**มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน (กรัม)**	**มวลชีวภาพรวม(กรัม)**
C	28.83bcd	4.87bc	1.93abc	0.65abcd	2.58abc
MS-5	25.58de	4.56c	1.51d	0.53bcd	2.04cd
MS-10	24.41de	4.59c	1.49d	0.48cd	1.96d
MS-20	22.90e	4.88bc	1.46d	0.49cd	1.95d
AE-5	23.45e	4.91bc	1.49d	0.43d	1.92d
AE-10	27.88cde	4.63c	1.78bcd	0.53bcd	2.31bcd
AE-20	33.29ab	4.97bc	2.13ab	0.67abc	2.80ab
VM+PM-1:9	28.91bcd	4.88bc	1.68cd	0.56bcd	2.24bcd
VM+PM-1:6	31.02abc	5.02abc	1.96abc	0.74ab	2.70ab
VM+PM-1:3	32.13abc	5.24abc	2.05abc	0.66abc	2.71ab
RH+CD-1:9	32.04abc	5.58ab	2.03abc	0.73ab	2.76ab
RH+CD-1:6	30.93abc	5.27abc	2.03abc	0.74ab	2.77ab
RH+CD-1:3	35.04a	5.74a	2.27a	0.84a	3.11a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวตั้ง ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.9 เปรียบเทียบการเติบโตของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ใส่หัวเชื้อรา เอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ

จากการประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 4 รูปแบบ คือ เส้นใยแขวนลอย เส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต ในปริมาณ 5 10 และ 20 มิลลิลิตร เส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส เส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบ โดยผสมหัวเชื้อและวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร ที่มีต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา เมื่อทำการวัดการเจริญทางความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นระดับคอราก มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน และมวลชีวภาพรวม เมื่อต้นกล้าอายุได้ 8 เดือน ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6 และลักษณะของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือน แสดงดังภาพที่ 4.10 จากตารางที่ 4.6 เมื่อเปรียบเทียบความสูงของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ พบว่า ความสูงของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร และเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ1:3 โดยปริมาตร มีความสูงมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร มีความสูงเพิ่มขึ้นมากที่สุดคือ 44 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นที่ระดับคอรากของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนชุดการทดลองอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม

เมื่อเปรียบเทียบมวลชีวภาพส่วนเหนือดินของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไร-ซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ พบว่ามวลชีวภาพส่วนเหนือดินของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร และชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบมวลชีวภาพส่วนใต้ดินของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ พบว่ามวลชีวภาพส่วนใต้ดินของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสกับวัสดุ

ปลูกในอัตราส่วน 1:3 และชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบมวลชีวภาพรวมของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ พบว่ามวลชีวภาพรวมของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร และชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

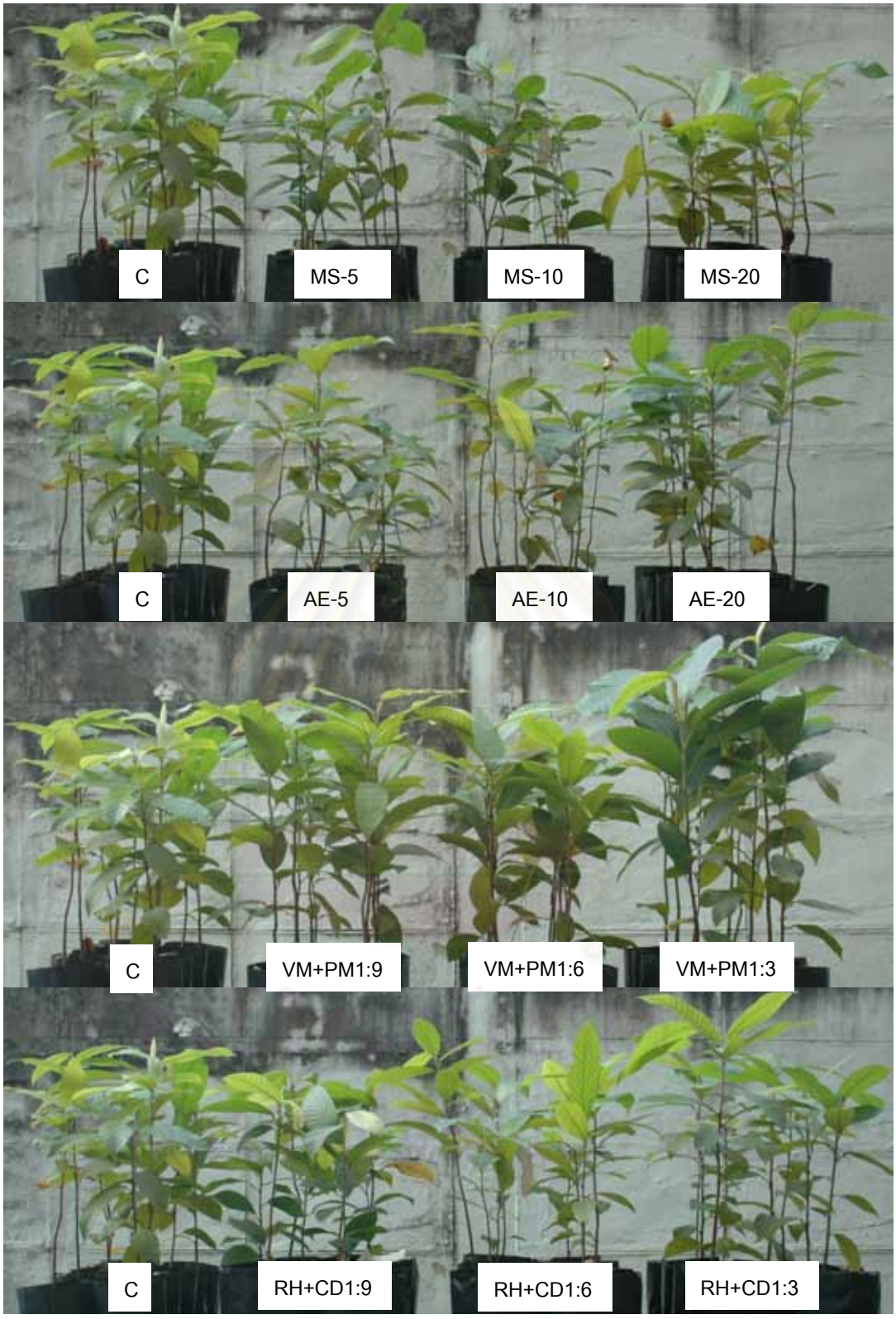
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนาอายุ 8 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อรา เอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ

รูปแบบหัวเชื้อ	ความสูง (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก (มม.)	มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน(กรัม)	มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน (กรัม)	มวลชีวภาพรวม(กรัม)
C	27.62d	4.68bc	1.96cde	0.66de	2.62cd
MS-5	27.57d	3.76e	1.77def	0.61def	2.38de
MS-10	28.17bcd	3.71e	1.55fg	0.57ef	2.12e
MS-20	23.54e	4.61c	1.32g	0.41g	1.73f
AE-5	28.45bcd	4.90bc	1.62f	0.52fg	2.14e
AE-10	28.89bcd	4.06de	1.51fg	0.53f	2.04ef
AE-20	27.69cd	4.39cd	1.70ef	0.50fg	2.20e
VM+PM-1:9	31.72b	4.91bc	2.02bcd	0.70cd	2.72cd
VM+PM-1:6	31.43bc	4.85bc	1.91cde	0.66de	2.58cd
VM+PM-1:3	37.25a	5.18b	2.28ab	0.80bc	3.08ab
RH+CD-1:9	31.45bc	5.84a	2.11abc	0.83b	2.94bc
RH+CD-1:6	38.60a	6.17a	2.23ab	0.86b	3.09ab
RH+CD-1:3	39.80a	6.02a	2.37a	0.97a	3.34a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวตั้ง ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.10 เปรียบเทียบการเติบโตของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ใส่หัวเชื้อรา เอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

เห็ดเผาะ (*Astraeus* spp.) เป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาที่อยู่ร่วมกับไม้วงศ์ไม้ยางแบบพึ่งพาอาศัย สร้างดอกเห็ดที่กินได้และมีราคาแพง สามารถนำดอกเห็ดมาแยกเนื้อเยื่อและเพาะเลี้ยงเส้นใยได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดอกเห็ดมีสปอร์จำนวนมาก จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาทำเป็นหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเพื่อใส่ให้กับกล้าไม้ยางนา ซึ่งเป็นไม้เศรษฐกิจและไม้ประจำถิ่นในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ไทย ลาว มาเลเซีย และพม่า เป็นต้น ในการปลูกป่าทดแทนป่าที่ถูกทำลายเพื่อรักษาสมดุลของระบบนิเวศ ในปัจจุบันราเอคโตไมคอร์ไรซาที่สามารถสร้างดอกเห็ดที่รับประทานได้และมีราคาแพงเป็นที่ได้รับความสนใจอย่างมากในการนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อใส่ให้กับกล้าไม้หลายชนิดเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของกล้าไม้และผลิตดอกเห็ด ตัวอย่างเช่น Chanterelles (Danell, 1997) *Boletus* sp. (Olivier และคณะ, 1997) *Lactarius* sp. (Palade, และคณะ, 2004) และเห็ดทรัฟเฟิล (truffles) (Pinkas และคณะ,2000; Nunez และคณะ, 2006*)* การผลิตหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะอาจใช้ที่เป็นเส้นใยหรือใช้สปอร์ แต่การใช้หัวเชื้อเส้นใยมีข้อดีคือสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้มาก เก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อและป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ได้ ในขณะที่การใช้หัวเชื้อสปอร์มีความสะดวก ปฏิบัติได้ง่ายแต่มีข้อเสียคือต้องใช้ดอกเห็ดเผาะปริมาณมาก ไม่สามารถเพิ่มปริมาณหัวเชื้อได้และทำได้ในช่วงเวลาจำกัดเนื่องจากไม่สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน นอกจากนี้รายงานของ Hua และคณะ (1991) ที่ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพหัวเชื้อเส้นใยและหัวเชื้อสปอร์ของรา *Pisolithus tinctorius* พบว่าการใช้หัวเชื้อจากเส้นใยทำให้มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อสูงกว่าการใช้หัวเชื้อสปอร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการผลิตหัวเชื้อราเห็ดเผาะจากเส้นใยจึงมีความเหมาะสมมากที่สุด อย่างไรก็ตาม ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการผลิตหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อไมคอร์ไรซาได้นั้น จะต้องทำการคัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีสมบัติที่ดีเพื่อใช้ในการทำหัวเชื้อ คุณสมบัติที่สำคัญคือเชื้อต้องเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยมีปัจจัยคืออายุของเชื้อ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือปัจจัยทางกายภาพ เคมีและสิ่งแวดล้อมอื่นๆ (Calam, 1971; Pirt, 1975) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายและเห็ดเผาะหนังที่มีการเจริญเร็วที่สุด และหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยได้แก่ ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อและค่า pH

เมื่อทำการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 ที่คัดเลือกได้ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสาย

พันธุ์ TAK8 มีการเจริญดีที่สุดคือ อาหารชนิด MMN รองลงมาคืออาหารชนิด MEA และ PDA ตามลำดับ อาหารชนิด MMN เป็นอาหารกึ่งสังเคราะห์ที่จัดว่าเป็นอาหารที่เหมาะสมและมักถูกใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิด (Molina และ Palmer, 1982) เนื่องจากในอาหารชนิด MMN มีแหล่งคาร์บอนที่สำคัญคือ กลูโคสซึ่งนิยมใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนใหญ่ Daza และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของรา *Amanita caesarea* พบว่ากลูโคสและแมนนิทอลทำให้เส้นใยรามีมวลชีวภาพดีที่สุด Hatakeyama และ Ohmasa (2004) รายงานว่า *Suillus* sp. และ *Boletinus* sp. เจริญได้ดีอาหารเลี้ยงเชื้อ Ohta ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MMN คือ Ammonium phosphate ($(NH_4)_2HPO_4$) ซึ่งโดยทั่วไปพบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งในรูปแบบของเกลืออนินทรีย์ของแอมโมเนียมและสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ เช่น กรดนิวคลิอิก และเปปโทน เป็นต้น แต่โดยส่วนใหญ่แล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งสังเคราะห์จะใช้เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก (Harvey, 1991) Baar และคณะ (1997) รายงานว่ามวลชีวภาพและอัตราการเจริญเติบโตของ *L. hepaticus* และ *P. involutus* ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมจะสูงกว่าในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นไกลซีน Sarjala (1999) รายงานว่า *Paxillus involutus* *Suillus variegatus* และ *Lactarius rufus* เจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียม นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียมคือแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของราเอคโตไมคอร์ไรซา (Melin และ Mikola, 1948; Norkrans,1950; Middleton และ Smith, 1979; France, 1984; Keller, 1996; Rangel-Castro และคณะ, 2002; Sawyer และคณะ, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับแหล่งไนโตรเจนในดินธรรมชาติที่พบอยู่ในรูปของแอมโมเนียมและไนเตรท แต่โดยทั่วไปแล้วจะพบแอมโมเนียมมากกว่าไนเตรท (Cole, 1981; Aguilera และคณะ, 1993) แอมโมเนียมจึงจัดว่าเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนหลักที่ราเอคโตไมคอร์ไรซาใช้ (Carrodus, 1967; Keeney, 1980) อย่างไรก็ตามพบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายสายพันธุ์ที่สามารถใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดี (Finlay และคณะ , 1989; Vare, 1989) สำหรับไอออนอนินทรีย์ (inorganic ions)ในอาหารชนิด MMN นั้นมีโปแตสเซียมและแมกนีเซียม ซึ่งจัดว่าเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นสำหรับราเอคโตไมคอร์ไรซาเช่นเดียวกัน (Harvey, 1991) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA มีส่วนประกอบคือเปปโทน ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถใช้ได้ดีเช่นกัน

เมื่อทำการหาค่า pH ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ที่คัดเลือกได้ พบว่าค่า pH ที่ทำให้ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 มีการเจริญดีที่สุดคือ 5.5 รองลงมาคือค่า pH 5 6 6.5 และ 7 ตามลำดับ และค่า pH ที่ทำให้ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์

TAK8 มีการเจริญดีที่สุดคือ 5.5 รองลงมาคือค่า pH 5 6.5 6 และ 7 ตามลำดับ สำหรับค่า pH ที่เหมาะสมกับการเจริญนั้นจะขึ้นกับชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา แต่โดยทั่วไปราเอคโตไมคอร์ไรซาจะเจริญได้ดีใน pH ที่เป็นกรด (Palmer และ Hacskaylo, 1970; Erland และคณะ, 1990; Kuek, 1996) และสามารถเจริญได้ในช่วง pH 2.5 – 6.9 สำหรับค่า pH ที่จัดว่าเหมาะสมจะอยู่ในช่วง 3.5 – 5.9 (Hung, 1983) Sundari และ Adholeya (2003) ทำการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของราเอคโตไมคอร์ไรซาพบว่าราหลายสายพันธุ์ใน Order Agaricales (ยกเว้น *Laccaria laccata*) และ Order Aphyllophorales เจริญได้ดีใน pH ที่เป็นกลางหรือค่อนข้างเป็นกลาง ในขณะที่ราใน Order Sclerodermatales เจริญได้ดีใน pH ที่เป็นกรด

จากการตรวจสอบลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซาในชุดการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 พบว่ารากเอคโตไมคอร์ไรซา ECM1 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับรากเอคโตไมคอร์ไรซา ECM2 ที่พบในชุดการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 จึงไม่สามารถจำแนกรากได้โดยใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มาช่วยในการจำแนกชนิดรากเอคโตไมคอร์ไรซา โดยการหาลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS แล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ในฐานข้อมูล GenBank มีงานวิจัยจำนวนมากที่ใช้ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS มาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเอคโตไมคอร์ไรซา (Palmer และคณะ, 2008; Kranabetter, 2009; Ishida และคณะ, 2009; Tedersoo และคณะ, 2010)

นอกจากนี้ยังตรวจสอบพบรากเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่นในชุดการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 แต่มีจำนวนไม่มาก ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนของราเอคโตไมคอร์ไรซาตามธรรมชาติ เมื่อตรวจสอบลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาดังกล่าวกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank พบว่าเป็นราเอคโตไมคอร์ไรซา *Tomentella* sp. ซึ่งราที่อยู่ในสกุลนี้พบได้ทั่วไปและเป็นชนิดเด่นในป่าสนและป่าเต็งรัง พบอาศัยอยู่ร่วมกับพืชหลายชนิด (Jakucs และ Eros-Honti, 2008) จึงอาจปนเปื้อนมากับลม น้ำ หรือเมล็ดยางนา สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yomyart (2008) ที่ได้ทำการสำรวจโครงสร้างสังคมของราเอคโตไมคอร์ไรซาในป่าเต็งรังในประเทศไทย พบว่า *Tomentella* spp. เป็นชนิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบเด่นในป่าเต็งรัง นอกจากนี้ยังเป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบปนเปื้อนอยู่กับรากกล้าไม้ในเรือนเพาะชำ และ Yuwa-Amornpitak และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของราเอคโตไมคอร์ไรซาในป่าไม้วงศ์ไม้ยางในประเทศไทย พบรากเอคโตไมคอร์ไรซา *Tomentella* spp. ในรากไม้ยางนา (*D. alatus*) เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามการ

ปนเปื้อนราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่นๆเป็นสิ่งที่ต้องควรตระหนักเนื่องจากส่งผลให้การติดเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ต้องการลดลง ซึ่งหากเป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาที่สามารถสร้างดอกเห็ดที่รับประทานได้ อาจทำให้ไม่สามารถเกิดดอกเห็ดได้เนื่องจากปริมาณการติดเชื้อที่น้อย ถึงแม้ว่าการมีราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ต้องการร่วมกับราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ปนเปื้อนจะให้ผลการกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้ก็ตาม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องคัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีการเจริญเติบโตเร็วและสามารถแข่งขันในการเข้าอาศัยรากพืชได้ดีมาใช้ผลิตเป็นหัวเชื้อ นอกจากนี้การใช้วัสดุปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อและการฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเมล็ดก่อนปลูกอาจเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยในการลดปนเปื้อนราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่นได้

จากการประเมินผลรูปแบบหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 ทั้ง 4 รูปแบบที่มีต่อการติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนา พบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา เมื่อใช้หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 ใส่ให้กับกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไร-ซา 5.67 – 13.44 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา 5.33 – 14.78 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาเมื่อใช้หัวเชื้อทั้ง 4 รูปแบบ พบว่าหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไร-ซาเห็ดเผาะฝ้ายและเห็ดเผาะหนังที่เจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสและที่เจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบที่ผสมกับวัสดุปลูกในอัตราส่วนที่เหมาะสมทำให้กล้าไม้มีการติดเชื้อไมคอร์ไรซาสูงที่สุด รองลงมาคือเส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต ส่วนเส้นใยแขวนลอยทำให้กล้าไม้มีการติดเชื้อไมคอร์ไรซาต่ำที่สุด ดังนั้นแสดงว่าวิธีการใส่และปริมาณของหัวเชื้อที่ต่างกัน ส่งผลให้กล้าไม้มีการติดเชื้อไมคอร์ไรซาต่างกัน

เมื่อใช้หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 แบบเส้นใยแขวนลอย พบว่ากล้าไม้มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาที่ต่ำเมื่อเทียบกับวิธีการอื่นๆ และพบว่าการใส่หัวเชื้อวิธีนี้ในปริมาณที่ต่างกันไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา สอดคล้องกับงานวิจัยของ Palade และคณะ (2004) ที่รายงานว่าหัวเชื้อแบบเส้นใยแขวนลอยของ *Lactarius deliciosus* 217 ในปริมาณ 5 มิลลิลิตร หรือ 0.025 กรัมของน้ำหนักแห้ง ทำให้กล้าไม้สน *Pinus pinaster* มีการติดเชื้อไมคอร์ไรซา 24 เปอร์เซ็นต์ และ *P. sylvestris* 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น Brundrett และคณะ (2005) รายงานว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดไม่สามารถเจริญได้หลังจากเส้นใยถูกปั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Danielson และคณะ(1984) และ Boyle และคณะ(1987) ที่รายงานว่าเส้นใยของรา *Pisolithus* sp. และ *Paxillus* sp. ไม่มีประสิทธิภาพหลังจากเส้นใยถูกปั่น ดังนั้นแสดงว่าเมื่อเส้นใยถูกใส่ให้กับกล้าไม้

โดยที่เส้นใยไม่ได้รับการปกป้องหรือปรับตัวให้เข้ากับธรรมชาติ ก็อาจทำให้เส้นใยถูกทำลายหรือรอดชีวิตได้น้อยจนไม่สามารถเข้าไปเกิดไมคอร์ไรซาได้ อย่างไรก็ตาม หัวเชื้อรูปแบบนี้ได้รับความนิยมในการทำเป็นหัวเชื้อเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย เพิ่มปริมาณหัวเชื้อได้รวดเร็วและปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (Danielson และคณะ, 1984; Boyle และคณะ, 1987; Richter และ Bruhn,1989) จากผลการทดลองนี้ หากต้องการใช้หัวเชื้อเห็ดเผาะในรูปแบบนี้อาจต้องมีการใส่หัวเชื้อในปริมาณที่มากกว่า 20 มิลลิลิตร ถึงจะส่งผลต่อการติดเชื้อไมคอร์ไรซา

สำหรับหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 แบบเส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าทำให้กล้าไม้มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาสูงกว่าเมื่อใช้หัวเชื้อแบบเส้นใยแขวนลอย เนื่องจากหัวเชื้อรูปแบบนี้มีข้อดีคือเส้นใยจะสามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน เพราะเม็ดอัลจิเนตเก็บรักษาความชื้นเอาไว้ได้ เส้นใยราจึงได้รับการปกป้อง สามารถปรับตัวและสามารถเจริญเข้าไปติดเชื้อที่รากกล้าไม้ได้ ราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิด เช่น *Descocolea* sp. *Hebeloma* sp. *Laccaria* sp. และ *Pisolithus* sp. ประสบความสำเร็จจากการทำหัวเชื้อด้วยวิธีนี้ และสามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิต่ำนานถึง 7 เดือน (Kuek และคณะ, 1992) และเมื่อใช้หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายและเห็ดเผาะหนังในปริมาณที่ต่างกันคือ 5 10 และ 20 มิลลิลิตร พบว่าการใช้หัวเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตร ทำให้กล้าไม้มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาสูงกว่าการใช้ปริมาณ 5 และ 20 มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นแสดงว่าการใช้หัวเชื้อในปริมาณที่เหมาะสม จะสามารถเพิ่มการติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ได้ โดยไม่จำเป็นต้องใช้ปริมาณหัวเชื้อมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mortier และคณะ (1989) ที่ได้เปรียบเทียบปริมาณการใส่หัวเชื้อเส้นใยที่อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตปริมาณ 2 5 และ 10 กรัมของน้ำหนักแห้ง พบว่าเมื่อผ่านไป 11 สัปดาห์ ต้นกล้าที่ใส่หัวเชื้อ 10 กรัมของน้ำหนักแห้ง มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาสูงที่สุด แต่เมื่อผ่านไป 25 สัปดาห์พบว่าชุดการทดลอง 2 5 และ 10 กรัมของน้ำหนักแห้ง มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปริมาณหัวเชื้อมีความสำคัญกับระยะเวลาในการติดเชื้อ การใช้หัวเชื้อในปริมาณที่น้อย อาจต้องใช้ระยะเวลานานขึ้นในการจะให้เชื้อนั้นเข้าสู่รากและพัฒนาเป็นรากเอคโตไมคอร์ไรซา

สำหรับหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 แบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส และวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบ พบว่าทำให้กล้าไม้มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาสูงกว่าหัวเชื้อรูปแบบอื่น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Palade และคณะ (2004) ที่รายงานว่า *L. deliciosus* 178 เมื่อใช้เป็นหัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสสามารถเกิดไมคอร์ไรซากับ

P. pinaster และ *P. sylvestris* 100 เปอร์เซ็นต์ Hung และ Trappe (1987) ได้ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Laccaria laccata* และ *Hebeloma crustuliniforme* แบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสให้กับต้นเฟอร์ พบว่าหัวเชื้อรารูปแบบนี้เป็นหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง โดยมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ 83 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าการใช้อัตราส่วนระหว่างหัวเชื้อต่อวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:6 ทำให้กล้าไม้มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อสูงกว่าการใช้ในอัตราส่วน 1:9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่ต่างกันทางสถิติกับการใช้ในอัตราส่วน 1:3 ดังนั้นแสดงว่าการใช้หัวเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมก็จะทำให้กล้าไม้มีการติดเชื้อไมคอร์ไรซาได้ โดยที่ไม่จำเป็นต้องสิ้นเปลืองหัวเชื้อในปริมาณมากถึงจะทำให้กล้าไม้มีการติดเชื้อมาก หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสนี้ถูกจัดว่าเป็นการผลิตหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดที่ใส่ให้กับกล้าไม้ (Marx, 1980) ทั้งนี้เพราะเวอร์มิคูไลท์มีข้อดีคือ อากาศถ่ายเทได้ดี มีรูพรุน เส้นใยเมื่อเจริญแทรกเข้าไปสามารถได้รับการปกป้องและพีทมอสช่วยในการปรับ pH ให้เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยซึ่งอยู่ในระหว่าง 4.8-5.5 และมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีธาตุอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต การเลี้ยงเส้นใยบนวัสดุจึงเป็นการปรับสภาพเส้นใยราให้สามารถเจริญแทรกได้ดีก่อนที่จะนำไปผสมกับวัสดุปลูก นอกจากนี้วิธีการใส่หัวเชื้อนั้นไม่เป็นการทำลายเส้นใยราอีกด้วยเพราะไม่ต้องปั่นเส้นใยเหมือนการทำหัวเชื้อเส้นใยรูปแบบอื่น และหัวเชื้อรูปแบบนี้สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อได้มาก เพราะเส้นใยจะเจริญแทรกเข้าไปในวัสดุ ต่างจากการทำหัวเชื้อแบบเส้นใยแขวนลอยที่ต้องเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อจึงทำให้เพิ่มปริมาณเชื้อได้น้อยและมีค่าใช้จ่ายสูง แต่อย่างไรก็ตามเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสนั้นมีราคาแพงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศอาจไม่เหมาะสำหรับใช้ในการผลิตเป็นหัวเชื้อปริมาณมากหรือเชิงการค้าสำหรับประเทศไทยหรือประเทศที่ต้องนำเข้าเวอร์มิคูไลท์ ซึ่งจะทำให้การผลิตหัวเชื้อมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นการประยุกต์ใช้วัสดุที่มีอยู่ในท้องถิ่นมาใช้ผลิตหัวเชื้อจึงมีความจำเป็น จากผลการทดลองนี้พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการใช้หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสกับการใช้หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบในปริมาณที่ใส่ให้กับกล้าไม้เท่ากัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาไม่ต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ ยังพบว่าเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 สามารถเจริญได้ในวัสดุคือขุยมะพร้าวและแกลบที่ทำให้ชุ่มด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้ดีเช่นเดียวกับเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส ดังนั้น จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วัสดุคือแกลบและขุยมะพร้าวซึ่งหาได้ง่ายและมีราคาถูกกว่ามาทดแทนการใช้เวอร์มิคูไลท์และพีทมอสได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการลดต้นทุนในการผลิตหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

เมื่อประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเส้นใยเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 ต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา พบว่าชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร สามารถเพิ่มการเติบโตทางความสูงและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นของกล้าไม้ยางนาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม สำหรับเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 พบว่าชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสและหัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:9 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร สามารถเพิ่มการเติบโตทางความสูงของกล้าไม้ยางนาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และหัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:6 และ 1:3 โดยปริมาตร สามารถเพิ่มการเติบโตทางความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น มวลชีวภาพเหนือดิน มวลชีวภาพใต้ดินและมวลชีวภาพรวมของกล้าไม้ยางนาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม หากพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะและการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา พบว่าชุดการทดลองที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป จะสามารถกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนาทางความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น มวลชีวภาพเหนือดิน มวลชีวภาพใต้ดินและมวลชีวภาพรวมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Thomson และคณะ (1994) ที่รายงานว่าการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชมีความสัมพันธ์โดยตรงกับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา อย่างไรก็ตาม Mortier และคณะ (1989) รายงานว่ากล้าไม้ที่มีการเจริญเติบโตมากที่สุดอาจไม่ได้มาจากชุดการทดลองที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อสูงที่สุด ดังนั้นเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อที่เหมาะสมจะสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกล้าไม้ได้ดีที่สุด ซึ่งเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อที่เหมาะสมจะมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดพืชและชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซา

ในการทดลองครั้งนี้พบดอกเห็ดเผาะหนัง ในชุดการทดลองที่ใส่เส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 หลังจากใส่เชื้อให้กับต้นกล้าได้เพียง 8 เดือน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้อย่างสูงในการสร้างดอกเห็ดของราชนิดนี้หลังจากย้ายปลูกในแปลง ดังรายงานของ Guerin-Laguette และคณะ (2000) ที่พบตุ่มดอกเห็ด (primodia)ของ *Lactarius deliciosus* ในถุงเพาะชำของต้นสน *Pinus sylvestris* หลังจากใส่เชื้อได้ 1 ปี นอกจากนี้ Guinberteau และคณะ (1989) ได้รายงานการเกิดดอกเห็ด *Lactarius* ในแปลงทดลองปลูกต้นสน *P. pinaster* ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซาดังกล่าวได้หลังย้ายปลูกได้ 3 ปี อย่างไรก็ตามการทดลองติดตามการเจริญเติบโต การอยู่รอดของต้นกล้าและราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะทั้งสองชนิด รวมทั้ง

ความสามารถในการสร้างดอกเห็ด หลังจากย้ายปลูกในแปลงเป็นสิ่งที่จำเป็นที่ต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างดอกเห็ดเผาะจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย 5 แหล่ง ได้แก่ ชัยภูมิ ลำปาง ขอนแก่น กาญจนบุรีแหล่งที่ 1 และกาญจนบุรีแหล่งที่ 2 พบว่าดอกเห็ดที่ได้มีลักษณะค่อนข้างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร ผิวด้านนอกมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม และพบลักษณะเป็นขุยเส้นใยปกคลุมด้านนอก เมื่อทำการจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด ตามรายงานของ Phosri และคณะ (2004, 2007) พบว่ามีลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นเป็นเห็ดเผาะฝ้าย (*A. asiaticus*) จากนั้นแยกเส้นใยจากเนื้อเยื่อดอกเห็ดที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ ได้ทั้งสิ้น 45 สายพันธุ์ ได้แก่ แหล่งชัยภูมิ 8 สายพันธุ์ แหล่งลำปาง 6 สายพันธุ์ แหล่งขอนแก่น 10 สายพันธุ์ แหล่งกาญจนบุรี-1 12 สายพันธุ์ และแหล่งกาญจนบุรี-2 9 สายพันธุ์ สำหรับสายพันธุ์เส้นใยเห็ดเผาะหนังที่ได้จากจังหวัดตาก ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.สุนัดดา โยมญาติ จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายและเห็ดเผาะหนังที่เหมาะต่อการทำหัวเชื้อ โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ดีที่สุด เมื่ออายุ 14 วัน คือราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 ตามลำดับ จากนั้นทำการหาชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อและค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ พบว่าเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 มีการเจริญดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MMN ที่มีค่า pH 5.5 โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่ออายุครบ 35 วันเป็น 1.95 และ 2.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการประเมินผลรูปแบบของหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 4 รูปแบบที่มีต่อการติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนา พบลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซาในชุดการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 มีลักษณะการแตกแขนงแบบ monopodial pinnate มีแผ่นแมนเทิลสีเหลืองอมน้ำตาล (ECM1)และเมื่อตรวจสอบชนิดของราก ECM1 โดยการหาลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS แล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS กับราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย *A. asiaticus* (EU718089) เป็น 97 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในชุดการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 พบรากเอคโตไมคอร์ไรซามีลักษณะการแตกแขนงแบบ monopodial pinnate มีแผ่นแมนเทิลสีเหลืองอมน้ำตาล (ECM2) และเมื่อตรวจสอบชนิดของรากเอคโตไมอร์ไรซา ECM2 โดยการหาลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS แล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับลำดับ

เบสที่ตำแหน่ง ITS กับราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนัง *A. odoratus* (AJ629879) เป็น 99 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซาในชุดการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 พบรากเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่นในบางชุดการทดลอง มีลักษณะการแตกแขนงแบบ monopodial pinnate มีแผ่นแมนเทิลสีขาว (ECM3) แต่มีปริมาณการติดเชื้อน้อยประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบชนิดของรากเอคโตไมอร์ไรซา ECM3 โดยการหาลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS แล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS กับราเอคโตไมคอร์ไรซาในกลุ่ม *Tomentella* sp. (EU819522) เป็น 95 เปอร์เซ็นต์

จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือน พบว่า ในชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ ไม่พบการติดเชื้อไมคอร์ซา สำหรับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้งสองสายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกันโดยชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา 5.67 – 13.44 เปอร์เซ็นต์ สำหรับชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา 5.33 – 14.78 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:6 ของแต่ละสายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาสูงที่สุด ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้งสองสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมากกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และกล้าไม้ที่ได้รับหัวเชื้อแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบกับวัสดุปลูกในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร มีการเติบโตทางความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น มวลชีวภาพเหนือดิน มวลชีวภาพใต้ดินและมวลชีวภาพรวมสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมีความแปรผันขึ้นอยู่กับปริมาณของหัวเชื้อและวิธีการใส่หัวเชื้อรูปแบบต่างๆ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ขุยมะพร้าวและแกลบเป็นทางเลือกสำหรับใช้เป็นวัสดุในการผลิตหัวเชื้อเส้นใยทางการค้าได้เนื่องจากหาได้ง่ายและมีราคาถูก

ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยนี้พบว่า ได้หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่เหมาะสมที่สามารถกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนาได้ แต่ควรทำการวิจัยเพิ่มเติมในแปลงปลูก เนื่องจากผลทดลองในเรือนเพาะชำไม่สามารถแสดงผลที่แท้จริงเมื่ออยู่ในสภาพธรรมชาติได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

อนิวรรต เฉลิมพงษ์ และ ธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ. 2524. การสำรวจเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่สัมพันธ์กับรากต้นไม้ในระบบนิเวศวิทยาป่าเต็งรังท้องที่สะแกราช. กรุงเทพมหานคร: กรมป่าไม้.

อนิวรรต เฉลิมพงษ์ และ ธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ. 2525. การสำรวจเอคโตไมคอร์ไรซาในระบบนิเวศวิทยาป่าดิบแล้ง. กรุงเทพมหานคร: กรมป่าไม้.

ภาษาอังกฤษ

Agerer, R. 1991. Characterization of ectomycorrhiza. In Norris, J. R., Read, D. J., and Varma, A. K., eds, Methods in Microbiology, vol. 23. pp. 25-73. London: Academic Press.

Aguilera, I. M., Griffiths, R. P., and Caldwelt, B. A. 1993. Nitrogen in ectomycorrhizal mat and non-mat soils of different-age Douglas-fir forests. Soil Biology and Biochemistry. 25: 1015-1019.

Ashton, P. S. 1982. Dipterocarpaceae. In Van Steenis C. G. G. J.,ed, Flora Malesiana, vol. 9. pp. 271-326. Massachusetts: Kluwer Boston.

Baar, J., Comini, B., Elferink, M. O., and Kuyper, TH. W. 1997. Performance of four ectomycorrhizal fungi on organic and inorganic nitrogen sources. Mycological Research. 101: 523-529.

Boyle, C. D., Robertson, W. J., and Salonius, P. O. 1987. Use of mycelia slurries of mycorrhizal fungi as inoculums for commercial tree seedling nurseries. Canadian Journal of Forest Research. 17: 1480-1486.

Bradley, R., Burt, A. J., and Read, D. J. 1982. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae VIII. The role of mycorrhizal infection in heavy metal resistance. New Phytologist. 91: 197-209.

Brundrett , M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., and Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Canberra: Pirie Printers.

Brundrett , M., Malajczuk, N., Mingqin, G., Daping, X., Snelling, S., and Dell, B. 2005. Nursery inoculation of Eucalyptus seedlings in Western Australia and Southern China using spores and mycelial inoculum of diverse ectomycorrhizal fungi from

different climatic regions. Forest Ecology and Management. 209: 193-205.

Calam, C. T. 1971. The evaluation of mycelial growth. In: Norris, J. R. and Ribbons, D. W., eds, Methods in Microbiology., Vol.1. pp. 567-591. New York: Academic press.

Carrodus, B. B. 1967. Absorption of nitrogen by mycorrhizal roots of beech. II. ammonium and nitrate as sources of nitrogen. New Phytologist. 66: 1-4.

Chen, Y. L., Dell, B., and Malajczuk, N. 2006. Effect of Scleroderma spore density and age on mycorrhiza formation and growth of containerized *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla* seedlings. New Forests. 31: 453- 467.

Chilvers, G. A. 1968. Some distinctive types of eucalypt mycorrhiza. Australian Journal of Botany. 26: 49-70.

Cole, D. W. 1981. Nitrogen uptake and translocation by forest ecosystems. In Clark, F. E. and Rosswall, T.,ed, Terrestrial Nitrogen Cycles, vol .33. pp. 219-232. Stockholm: Ecological Bulletins.

Cromack, K., Sollins, P., Graustein, W. C., Speidel, K., Todd, A. W., Spycher, G., Li, C. Y., and Todd, R. L. 1979. Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of the hypogeous fungus *Hysterangium crassum*. Soil Biology and Biochemistry. 11: 463-468.

Danell, E. 1997. Les progres dans la maitrise de la culture de la chanterelle, *Cantharellus cibarius*. Revue Forestiere Francaise. 49: 214-221.

Danielson, R. M., Visser, S., and Parkinson, D. 1984. The effectiveness of mycelia slurries of mycorrhizal fungi for the inoculation of container-grown jack pine seedlings. Canadian Journal of Botany. 14: 140-142.

Danielson, R. M. 1985. Mycorrhizae and reclamation of stressed terrestrial environments. In Tate, R. L., and Klein, D. A., eds, Soil Reclamation Processes: Microbial Analyses and Applications, pp. 173-201. New York: Marcel Dekker.

Daza, A. , Manjon, J. L., Camacho, M., Romero de la Osa, L., Aguilar, A., Santamaría, C. 2006. Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on in vitro culture of several isolates of *Amanita caesarea*. Mycorrhiza. 16: 133-136.

Dunabeitia, M., Rodriguez, N., Salcedo, I., and Sarrionandia, E. 2004. Field

mycorrhization and its influence on the establishment and development of the seedlings in a broadleaf plantation in the Basque Country. Forest Ecology and Management. 195: 129-139.

Durall, D. M., Harniman, S. M., Berch, S. M., and Goodman, D. M. 1996. Morphology Of ectomycorrhizal system (Dissection Microscope). In Good, D. M., Durall, D. M., Trofymow, J. A., and Berch, S. M., eds, Concise Description of North American Ectomycorrhizal, pp. CDE1.1-CDE1.4, Mycologue Publications and Canada B. C. Forest Resource Development Agreement, Canadian forest service.

Entry, J. A., Rose, C. L., and Cromack, K. 1987. Litter decomposition and nutrient release in ectomycorrhizal mat communities in a Douglas-fir forest soil. Soil Biology and Biochemistry. 23: 285- 290.

Erland, S., Soderstrom, B., and Andersson, S. 1990. Effects of liming on ectomycorrhizal fungi infecting *Pinus sylvestris* L. II. Growth rates in pure culture at different pH values compared to growth rates in symbiosis with host plant. New Phytologist. 115: 683-688.

Finlay, R. D., Ek. H., Odham, G., and Soderstrom, B. 1989. Uptake, translocation and assimilation of nitrogen from 15N-labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of *Fagus sylvatica* infected with *Paxillus involufus.* New Phytologist. 113: 47-55.

Finlay, R. D., and Rosling, A. 2005. Integrated nutrient cycles in forest ecosystems: the role of ectomycorrhizal fungi. In Gadd, G. M., ed, Fungi in Biogeochemical Cycles. Cambridge: Cambridge University Press.

France, R. C., and Reid, C. P. P. 1984. Pure culture growth of ectomycorrhizal fungi on inorganic nitrogen sources. Microbial Ecology. 10: 187-195.

Frey-Klett, P., and Garbaye, J. 2005. Mycorrhiza helper bacteria: a promising model for the genomic analysis of fungal-bacterial interactions. New Phytologist. 168: 4-8.

Garbaye, J., Delwaulle, J. C., and Diangana, D. 1988 . Growth response of eucalypts in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. Forest Ecology and Management. 24: 151-157.

Garbaye, J. 1994. Tansley review No. 76 helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. New Phytologist. 128: 197-210.

Graustein, W. C., Cromack, K., and Sollins, P. 1977. Calcium oxalate: occurrence in soils and effect on nutrient and geochemical cycles. Science. 198: 1252-1254.

Griffith, P. R., Baham, J. E., and Cladwell, B. A. 1994. Soil solution chemistry of ectomycorrhizal mats in forest soil. Soil Biology and Biochemistry. 26: 331-337.

Guerin-Laguette, A., Plassard, C., and Mousain, D. 2000. Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the saffron milk cap under controlled soilless conditions. Canadian Journal of Microbiology. 46: 790-799.

Guinberteau, J., Ducamp, M., Poitou, N., Mamoun, M., Olivier, J. M. 1989. Ecology of various competitors from an experimental plot of *Pinus pinaster* inoculated with *Suillus granulatus* and *Lactarius deliciosus*. Agriculture Ecosystems and Environment. 28: 161-165.

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

Harvey, L. M. 1991. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. Biotechnology Advances. 9: 13-29.

Hatakeyama, T., and Ohmasa, M. 2004. Mycelial growth of strains of the genera *Suillus* and *Boletinus* in media with a wide range of concentrations of carbon and nitrogen sources. Mycoscience. 45: 169-176.

Hua, X., Cordell, C. E., and Stambaugh, W. J. 1991. Synthesis of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae and growth responses on some commercially important Chinese tree species. Forest Ecology and Management. 42: 283-292.

Hung, L. L. 1983. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH in vitro. Mycologia. 75: 234-241.

Hung, L. L., and Trappe, J. M. 1987. Ectomycorrhizal inoculation of Douglas-fir transplanted container seedlings with commercially produced inoculum. New Forests. 1: 141-152.

Ishida, T. A., Nara, K., Ma, S., Takano, T., and Liu, S. 2009. Ectomycorrhizal fungal community in alkaline-saline soil in northeastern China. Mycorrhiza. 19: 329-335.

Jakucs, E., and Eros-Honti, Z. 2008. Morphological-anatomical characterization and identification of *Tomentella* ectomycorrhizas. Mycorrhiza. 18: 277-285.

Jones, M. D. and Hutchinson, T. C. 1986. The effects of mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. New Phytologist. 102: 429-442.

Keeney, D. R. 1980. Prediction of soil nitrogen availability in forest ecosystems: a literature review. Forest Science. 26: 159-171.

Keller, G. 1996. Utilization of inorganic and organic nitrogen sources by highsubalpine ectomycorrhizal fungi of *Pinus cembra* in pure culture. Mycological Research. 100: 989-998.

Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., and Stalpers, J. A. 2001. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 9th ed, Wallingford : CABI Publishing.

Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., and Stalpers, J. A. 2008. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th ed, Wallingford : CABI Publishing.

Kranabetter, J. M., and Durall, D. M., and MacKenzie, W. H. 2009. Diversity and species distribution of ectomycorrhizal fungi along productivity gradients of a southern boreal forest. Mycorrhiza. 19: 99-111.

Kuek, C., Tommerup, I. C., and Malajczuk, N. 1992. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalypts for plantations. Mycological Research. 96: 273-277.

Kuek, C. 1996. Shake-flask culture of *Laccaria laccata*, an ectomycorrhizal basidiomycete. Applied Microbiology and Biotechnology. 45: 319–326.

Lakhanpal, T. N. 1999. Ectomycorrhiza-An Overview. In Mukerji, K. G., Chamola, B. P., and Jigjit Singh, eds, Mycorrhizal Biology., pp. 101-108. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Lee, S. S., Patahayah, M., Chong, W. S., and Lapeyrie, F. 2008. Successful ectomycorrhizal inoculation of dipterocarp species with a locally isolated fungus in Peninsular Malaysia. Journal of Tropical Forest Science. 20: 237-247.

Lopez-Hernandez, D., Sieaert, G., and Rodriauez, J. V. 1986. Competitive absorption of phosphate with malate and oxalate by tropical soils. Soil Science Society of

America Journal. 50: 1460-1462.

Malajczuk, N., and Cromack, K. 1982. Accumulation of calcium oxalate in the mantle of ectomycorrhizal roots of *Pinus radiata* and *Eucalyptus marginata.* New Phytologist. 92: 527-531.

Marx, D. H. 1980. Ectomycorrhizal fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. In Mikola, P., ed, Tropical Mycorrhiza Research., pp. 13-71. Oxford: Clarendon.

Marx, D. H., and Kenny, D. S. 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. In Schenck, N. C., ed, Methods and Principles of Mycorrhizal Research., pp. 131-146. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society.

Marx, D. H., Ruehle, J. L., and Cordell, C. E. 1991. Methods for studing nursery and field reponse of trees to specific ectomycorrhiza. In Norris, J. R., Read, D. J., and Varma, A. K., eds, Methods in Microbiology., pp. 383-411. London: Academic Press.

Marx, D. H. 1991. The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. In The Marcus Wallenberg Foundation Symposia. Ecophysiology of ectomycorrhizae of forest trees., pp. 54-90. Stockholm: Marcus Wallenberg Foundation.

Mauperin, CH., Mortier, F., Garbaye, J., Le Tacon F., and Carr, G. 1987. Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. Canadian Journal of Botany. 65: 2329-2336.

Melin, E. ,and Mikola, P. 1948. Effect of some amino acids on the growth of *Cenococcum graniforme.* Physiologia Plantarum. 1: 109-112.

Meyer, F. H. 1973. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In Marks, G. C., and Kozlowski, T. T., eds, Ectomycorrhizae., pp. 79-105. New York: Academic Press.

Middleton, K. R., and Smith, G. S. 1979. A comparison of ammoniacal and nitrate nutrition of perennial ryegrass through a thermodynamic model. Plant and Soil. 53: 487- 504.

Miller, O. K. Jr. 1982. Taxonomy of ecto-and ectendomycorrhizal fungi. In Schenck N.

C., ed., Method and principles of mycorrhizal research., pp. 91-101. St. Paul Minnesota: The American Phytopathological society Publication.

Molina, R. 1979. Ectomycorrhizal inoculation of containerized Douglas-fir and Lodgepole pine seedlings with six isolates of *Pisolithus tinctorius*. Forest Science. 25: 585-590.

Molina, R. 1980. Ectomycorrhizal Inoculation of Containerized Western Conifer Seedlings. Available from: http://www.fs.fed.us/pnw/pubs/pnwrn357.pdf[2009, February 6].

Molina, R., and Palmer, J. G. 1982. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In Schenck, N. C., ed., Methods and principles of mycorrhizal research. USA: American Phytopathological Society.

Molina, R., Massicotte, H., and Trappe, J. M. 1992. Specificity phenomenon in mycorrhizal symbiosis: community ecological consequences and practical implications. In Allen, M. F., ed, Mycorrhizal Functioning., pp. 357- 423. London: Chapman and Hall.

Mortier, F., Le Tacon, F., and Garbaye, J. 1988. Effect of inoculum type and inoculum dose on ectomycorrhizal development, root necrosis and growth of Douglas-fir seedlings inoculated with *Laccaria laccata* in a nursery. Annales des Sciences Forestieres. 45: 301-310.

Mortier, F., Le Tacon, F., and Garbaye, J. 1989. Effect of dose and formulation of *Laccaria laccata* inoculum on mycorrhizal infection and growth of Douglas fir in nursery. Agriculture, Ecosystems and Environment. 28: 351-354.

Nara, K., Nakaya, H., Wu, B., Zhou, Z., and Hogetsu, T. 2003. Underground primary succession of ectomycorrhizal fungi in a volcanic desert on Mount Fuji. New Phytologist. 159: 743-756.

Norkrans, B. 1950. Studies in growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma* with special reference to mycorrhiza formation. Symbolae botanicae Upsalienses. 11: 1-126.

Nunez, J. A. D., Serrano, J. S., Barreal, J. A. R., and Gonzalez, J. A. S. O. 2006. The influence of mycorrhization with *Tuber melanosporum* in the afforestation of

a mediterranean site with *Quercus ilex* and *Quercus faginea*. Forest Ecology and Management. 231: 226 - 233.

O'Connell, A. M., Malaiczuk, N., and Gailitis, V. 1983. Occurrence of calcium oxalate in karri *(Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) forest ecosystems of south western Australia. Oecotogia. 56: 239 - 244.

Olivier, J. M., Guinberteau, J., Rondet, J., Mamoun, M. 1997. Vers l'inoculation controlee des cepes et bolets comestibles?. Revue Forestiere Francaise. 49: 222-234.

Palmer, J. G., and Hacskaylo, E. 1970. Ectomycorrhizal fungi in pure culture I. Growth on single carbon sources. Physiologia Plantarum. 23: 1187-1197.

Palmer, J. M., Lindner, D. L., and Volk, T. J. 2008. Ectomycorrhizal characterization of an American chestnut (*Castanea dentata*)-dominated community in Western Wisconsin. Mycorrhiza.19: 27-36.

Parlade, J., Pera, J., and Luque, J. 2004. Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. Mycorrhiza. 14: 171-176.

Peterson, R. L., and Chakravarty, P. 1991. Techniques in systhesizing ectomycorrhiza. In Norris, J. R., Read, D. J., and Varma, A. K., eds, Methods in Microbiology., pp. 75-106. London: Academic Press.

Phosri, C., Watling, R., Martin, M. P., and Whalley, A. J. S. 2004. The genus Astraeus in Thailand. Mycotaxon. 89: 453-463.

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

Pinkas, Y., Maimon, M., Shabi, E., Elisha, S., Shmulewich, Y., and Freeman, S. 2000. Inoculation, isolation and identification of *Tuber melanosporum* from old and new oak hosts in Israel. Mycological Research. 104: 472-477.

Pirt ,S. J. 1975. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Oxford: Black well Scientific Publications.

Rangel-Castro J. I., Danell, E., and Taylor, A. F. S. 2002. Use of different nitrogen sources by the edible ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*.

Mycorrhiza. 12: 131-137.

Richter, D. L., and Bruhn, J . N. 1989. Field survival of containerized red and jack pine seedlings inoculated with mycelial slurries of ectomycorrhizal fungi. New Forest. 3: 247-258.

Sarjala, T. 1999. Effect of organic and inorganic nitrogen sources on endogenous polyamines and growth of ectomycorrhizal fungi in pure culture. Mycorrhiza. 8: 277-281.

Sawyer, N. A., Chambers, S. M., and Cairney, J. W. G. 2003. Utilisation of inorganic and organic nitrogen sources by *Amanita* species native to temperate eastern Australia. Mycological Research. 107: 413-420.

Smith, S. E., and Read, D. J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Harcourt Brace & Company, Publishers, San Diego: Academic Press.

Sollins, P., Cromack, K., Li, C. Y., and Fogel, R. 1981. Role of low-molecular-weight organic acids in the inorganic nutrition of fungi and higher plants. In Wicklow, D. T., and Carroll ,G. C., eds, The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem., pp. 607-619. New York : Marcel Dekker.

Sousa, N. R., Franco, A. R., Oliveira, R. S., and Castro, P. M. L. 2010. Ectomycorrhizal fungi as an alternative to the use of chemical fertilisers in nursery production of *Pinus pinaster*. Journal of Environmental Management. 1-6.

Sundari, S. K., and Adholeya, A. 2003. Growth profile of ectomycorrhizal fungal mycelium: emphasis on substrate pH influence. Antonie van Leeuwenhoek. 83: 209 - 214.

Suvercha, Mukerji, K. G., and Arora, D. K. 1991. Ectomycorrhizae. In Arora, D. K., Rai, B., Mukerji, K. G., and Knudson, G. R., eds, Handbook of Applied Mycology, vol.1.pp. 187-217. New York: Marcel Dekker Inc.

Taylor, A. F. S., and Alexander, I. J. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. Mycologist. 19: 102 -112.

Tedersoo, L., May, T. W., and Smith, M. E. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. Mycorrhiza.

20: 217-263.

Thomson, B. D., Grove, T. S., Malajczuk, N., and Hardy, G. E. STJ. 1994. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to root colonization and hyphal development in soil. New Phytologist. 126: 517-524.

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

Tsantrizos, Y. S., Kope, H. H., Fortin, J. A., and Ogilvie, K. K. 1991. Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. Phytochemistry. 30: 1113-1118.

Turjaman, M., Tamai, Y., Segah, H., Limin, S. H., Cha, J. Y., Osaki, M., and Tawaraya, K. 2005. Inoculation with the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus arhizus* and *Scleroderma* sp. improves early growth of *Shorea pinanga* nursery seedlings. New Forests. 30: 67-73.

Vare, H. 1989. Effects of nitrogen on the growth of *Suillus variegatus* and on mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. Aquila Series Bolallica. 26: 19-24.

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

Yazid, M. S., Lee, S. S., and Lapeyrie, F. 1994. Growth stimulation of *Hopea* spp. (Dipterocarpaceae) seedlings following ectomycorrhizal inoculation with an exotic strain of *Pisolithus tinctorius*. Forest Ecology and Management. 67: 339-343.

Yomyart, S. 2008. Community structure of ectomycorrhizal fungi and reforestation application in Dipterocapaceae. Doctor dissertation. Field of study Biotechnology,Graduate School, Chulalongkorn University.

Yuwa-Amornpitak, T., Vichitsoonthonkul, T., Tanticharoen, M., Cheevadhanarak, S., and Ratchadawong, S. 2006. Diversity of ectomycorrhizal fungi on Dipterocarpaceae in Thailand. Journal of Biological Sciences. 6: 1059-1064.

Zak, B. 1971. Characterization and identification of Douglas fir mycorrhizae. In Haeskaylo, E.,ed, Mycorrhizae. pp. 38 - 53. Washington DC: US Government Printing Office.

Zeller, S. M. 1948. Notes on certain gasteromycetes, including two new orders. Mycologia. 40: 639-668.

Zhou, Z., Miwa, M., and Hogetsu, T. 1999. Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *larix keampferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). New Phytologist. 144: 55-63.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและปุ๋ย

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

Malt extract	3	กรัม
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
$FeCl_3$	1.2	มิลลิลิตร
NaCl	0.025	กรัม
Thiamine HCl	100	ไมโครกรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA)

Malt extract	20	กรัม
glucose	20	กรัม
Peptone	1	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
D-glucose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สูตรปุ๋ย

NH_4NO_3	15 กรัม/ น้ำ 500 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตร / น้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ N 10.5 ppm
Na_2HPO_4	11.5 กรัม/ น้ำ 250 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตร / น้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ P 10 ppm
KCl	4.5 กรัม/ น้ำ 250 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตร / น้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ K 9.4 ppm
$CaCl_2$	7 กรัม/ น้ำ 250 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตร / น้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Ca 10.1 ppm
$MgSO_4$	24 กรัม/ น้ำ 400 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตร / น้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Mg 40 ppm
$Na_2MoO_4.2H_2O$	25 มิลลิกรัม/ น้ำ 100 มิลลิลิตร ทำ dilution 10^{-2} ใช้ 1 มิลลิลิตร / น้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Mo 0.001 ppm
$CuSO_4.5H_2O$	15 มิลลิกรัม/ น้ำ 100 มิลลิลิตร ทำ dilution 10^{-1} ใช้ 1 มิลลิลิตร / น้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Cu 0.006 ppm
H_3BO_3	64 มิลลิกรัม/ น้ำ 100 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตร / น้ำ 1 ลิตร
$ZnSO_4.7H_2O$	44 มิลลิกรัม/ น้ำ 100 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตร / น้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Zn 0.1 ppm
$MnCl_2.4H_2O$	0.25 กรัม/ น้ำ 100 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตร / น้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Mn 0.7 ppm
FeEDTA	18.1 กรัม/ น้ำ 500 มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตร / น้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Fe 5.5 ppm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอและพิสูจน์เอกลักษณ์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

<u>สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ</u>

Tris-Cl pH 8

Tris base	121 กรัม
น้ำกลั่น	800 มิลลิลิตร

ละลาย Tris base ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

0.5 M EDTA

EDTA	186.10 กรัม
น้ำกลั่น	800 มิลลิลิตร

ละลาย EDTA ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย NaOH ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Washing buffer

PVP(Polyvinylpyrrolidone)	2 กรัม
Ascorbic acid	1.76 กรัม
1 M Tris-Cl (pH 8)	20 มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	4 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2X CTAB lysis buffer

CTAB	4	กรัม
1 M Tris-Cl (pH 8)	20	มิลลิลิตร
0.5M EDTA (pH 8)	8	มิลลิลิตร
NaCl	16.36	กรัม
2-mercaptoethanol	1	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

Chloroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v)

Chloroform	192	มิลลิลิตร
isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร

20% Polyethylene glycol 6000 (PEG)

Polyethylene glycol 6000	20	กรัม
NaCl	14.61	กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

Tris-EDTA buffer (TE buffer)

1 M Tris-Cl, pH 7.4,7.5 หรือ 8	10	มิลลิลิตร
0.5M EDTA (pH 8)	2	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3 M NaOAc

ละลายสาร NaOAc 4.08 กรัม ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.2 จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์และอิเลคโตรโฟเรซีส

10 X Tris-boric acid EDTA (10X TBE)

Tris(hydroxymethyl amino methane	54	กรัม
EDTA	4.65	กรัม
Boric acid	27.50	กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.5% เจลอะกาโรส (w/w)

อะกาโรส	1.65	กรัม
0.5 X TBE	110	มิลลิลิตร
GelStar	1	ไมโครลิตร

<u>พิสูจน์เอกลักษณ์ราเอคโตไมคอร์ไรซา</u>

ผล ITS sequences ของราก ECM1 ในชุดการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 ได้ดังนี้คือ

AGCGAATTCTGAGGCGGGAGAGCGCAAGGGGGTTCTAGCATTTCGGAATGCTGTCG
CTGGCCTTTCGGGGCATGTGCCCGTCTTCCGAGTGTCTGCCTTCGGACCTCCGAACC
CTCTCCTATACCTTCCAAACACACCTGTGTGCACCTGTTGGAGGCCTTGTCTATTAGGC
AGACCTATGTATTACTTTCATAAACATCGAAGTATAAAAGAATGTTTGAACACACGATAT
ATATGAATAAATATACTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAATTGCGATAAGTAATGGGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCACGAATCTTTGAAC
GCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAAATCT
CAAAATCCTAGCTTTGCCTTGTCGGAACTTGGTTTTTGGACTTTGGGAGTTTGCGGGCG
ACCCCTTTGCTTTGGGAAGTCGGCTCTCCTTAAATTGATTAGCAGTGGGTGCAAGTCC
TTTGCATGGCACGGCCTGTTCGACGTCGTAGTGATCGTCGCGGGCTGGAAGGGCTTG
GATTGACATGTCTCATGCTTCCAACTTTTACATGCGCCAAGTTTAGTCTAGGCTACTCT
AGCGTGTGTCCTTTTCTCTAAGGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAA

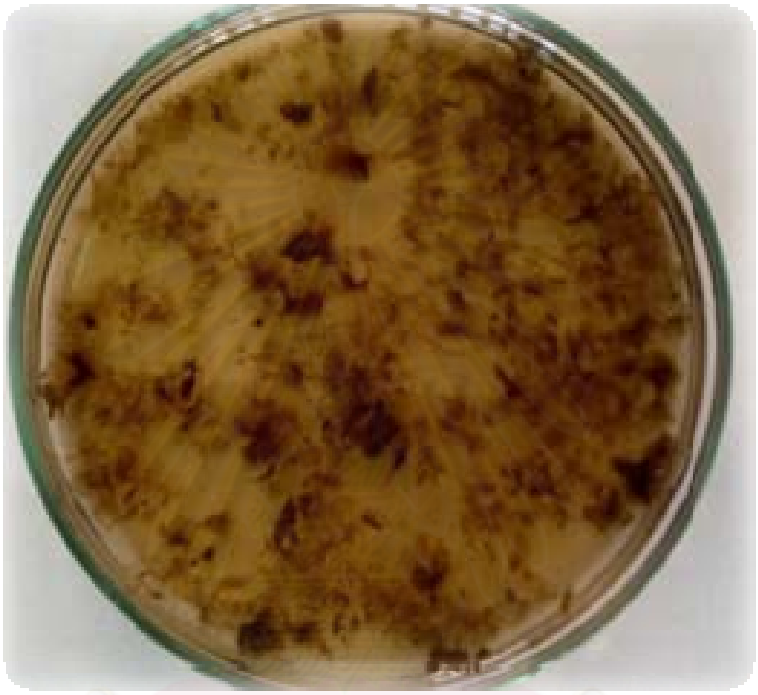
ผล ITS sequences ของราก ECM2 ในชุดการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 ได้ดังนี้คือ

ATTACCGAATCGTGCAAGGAGCGTAAGACGGTCGGAGGAGGAACCTCGGGGGGGT
GTCTAGTAGTATTTCGGAGTTGCTGGTCGCTGGCCTTTCGGCCATGTGCACGTCTCCG
GAGTCCGATGGGGTGTGTATACACCCAACCCCCCCTCGGCCTCGGTCTCCTTCGGAA
CCTCTGAAGCTCCTGTACCTCTCTAACACCATTGTGCACCTTGTTGTAGGTCTCGTCGA
GGGACCTATGTATTCCTTTTTTTTATAAAGCTCTCTGCATGTATACAGAACGTTGTCTTTT
GACAAACATGTCATATAAACATATATATAACTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAATCGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAA
TCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTT
GAGTGTCATCGAAATCTCAAATCCTAAGCTTTGCTTCGGTCGCCGACTCGGAGCGAG
CTCGGACTTGGACTTTGGGAGTCTGCGGGCGACCCGACTTTGCTCGGGACGCCGGC
TCTCCTCAAATGCATTAGCGGTGGGCTTCGAGCCTTTGCACGGCACGGCCTGTTCGA
CGTCGTAGTGATCGTCGCGGGCTGGAAGTGCTTGGATCGACGTGTCTCATGCTTCCA
ACCATGTGCCGCGCCGCGCCGGGGTTGTTAATCCCGGGGCCGGAACTCTTCTAAGG
CGTGACGTCGA

ผล ITS sequences ของราก ECM3 ในชุดการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และในชุดการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 ได้ดังนี้คือ

TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGG
AAGGATCATTACCGAATTGTCAACACGGGTTGTTGCTGGCCCCCGTAGGGGGGCATG
TGCACACTCTGTTCACACATCCACTCACACCTGTGCACCCTCTGTAGTTCTGTGGTCTG
GGGGGCCCTGTCCTCCTGCTGTGGTCTGCATCTTTACACACACACACTGTAACAAAGT
CTAATGGAATGCATGTCGCGTTTAACGCAATACAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCT
TGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGCTATTCCGGAGGG
CATGCCTGTTTGAGTATCATGAACACCTCAACTCTTGTGGTTTTCCATGATGTATGCTTG
GACTTTGGGGGTCTTGCTGGCTACAGTCGGCTCCTCTCAAATGAATCAGCTTACCGGT
GTTTGGTGGGTATCATGGGTGTGATAACTATCTACGCTTGTGGATTTCCACCAGGTAAC
CTTCATCAATGGAGGTTCACTGGAGCTCATA

ภาคผนวก ค
หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะรูปแบบต่าง ๆ



ภาคผนวก ค ภาพที่ 1 หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะแบบเส้นใยแขวนลอย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค ภาพที่ 2 หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะแบบเส้นใยที่ทำให้อยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค ภาพที่ 3 หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสในอัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตรที่ทำให้ชุ่มด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค ภาพที่ 4 หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะแบบเส้นใยเจริญในวัสดุผสมขุยมะพร้าวและแกลบในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรที่ทำให้ชุ่มด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง
ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ภาคผนวก ง ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Oneway – ANOVA ของความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นที่ระดับคอราก มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน มวลชีวภาพรวมและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความสูง	Between Groups	551.201	12	45.933	6.122	.000
	Within Groups	195.090	26	7.503		
	Total	746.291	38			
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นที่ระดับคอราก	Between Groups	4.705	12	.392	2.523	.023
	Within Groups	4.040	26	.155		
	Total	8.745	38			
มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน	Between Groups	2.826	12	.235	6.009	.000
	Within Groups	1.019	26	.039		
	Total	3.845	38			
มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน	Between Groups	.557	12	.046	3.518	.004
	Within Groups	.343	26	.013		
	Total	.899	38			
มวลชีวภาพรวม	Between Groups	5.712	12	.476	5.103	.000
	Within Groups	2.425	26	.093		
	Total	8.138	38			
เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา	Between Groups	495.325	12	41.277	23.879	.000
	Within Groups	44.944	26	1.729		
	Total	540.269	38			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของความสูงของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย สายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความสูง

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
4.00	3	22.9033				
5.00	3	23.4533				
3.00	3	24.4100	24.4100			
2.00	3	25.5833	25.5833			
6.00	3	27.8800	27.8800	27.8800		
1.00	3		28.8333	28.8333	28.8333	
8.00	3		28.9133	28.9133	28.9133	
12.00	3			30.9333	30.9333	30.9333
9.00	3			31.0200	31.0200	31.0200
11.00	3			32.0400	32.0400	32.0400
10.00	3			32.1333	32.1333	32.1333
7.00	3				33.2933	33.2933
RH+CD-1:3	3					35.0400
Sig.		.055	.081	.108	.093	.116

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นที่ระดับคอรากของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นที่ระดับคอราก

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2.00	3	4.5600		
3.00	3	4.5933		
6.00	3	4.6267		
1.00	3	4.8733	4.8733	
4.00	3	4.8767	4.8767	
8.00	3	4.8800	4.8800	
5.00	3	4.9100	4.9100	
7.00	3	4.9667	4.9667	
9.00	3	5.0200	5.0200	5.0200
10.00	3	5.2400	5.2400	5.2400
12.00	3	5.2733	5.2733	5.2733
11.00	3		5.5800	5.5800
RH+CD-1:3	3			5.7400
Sig.		.070	.069	.054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของมวลชีวภาพส่วนเหนือดินของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4.00	3	1.4600			
3.00	3	1.4867			
5.00	3	1.4867			
2.00	3	1.5100			
8.00	3	1.6767	1.6767		
6.00	3	1.7833	1.7833	1.7833	
1.00	3		1.9300	1.9300	1.9300
9.00	3		1.9633	1.9633	1.9633
11.00	3		2.0300	2.0300	2.0300
12.00	3		2.0300	2.0300	2.0300
10.00	3		2.0533	2.0533	2.0533
7.00	3			2.1300	2.1300
13.00	3				2.2700
Sig.		.088	.051	.071	.077

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ภาคผนวก ง ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของมวลชีวภาพส่วนใต้ดินของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
5.00	3	.4333			
3.00	3	.4767	.4767		
4.00	3	.4933	.4933		
2.00	3	.5267	.5267	.5267	
6.00	3	.5300	.5300	.5300	
8.00	3	.5633	.5633	.5633	
1.00	3	.6467	.6467	.6467	.6467
10.00	3		.6600	.6600	.6600
7.00	3		.6700	.6700	.6700
11.00	3			.7333	.7333
12.00	3			.7367	.7367
9.00	3			.7400	.7400
13.00	3				.8400
Sig.		.056	.085	.060	.082

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ภาคผนวก ง ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของมวลชีวภาพรวมของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

มวลชีวภาพรวม

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
5.00	3	1.9200			
4.00	3	1.9533			
3.00	3	1.9633			
2.00	3	2.0367	2.0367		
8.00	3	2.2400	2.2400	2.2400	
6.00	3	2.3133	2.3133	2.3133	
1.00	3		2.5767	2.5767	2.5767
9.00	3			2.7033	2.7033
10.00	3			2.7133	2.7133
11.00	3			2.7633	2.7633
12.00	3			2.7667	2.7667
7.00	3			2.8000	2.8000
13.00	3				3.1100
Sig.		.176	.056	.062	.072

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ภาคผนวก ง ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไม-คอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 รูปแบบต่างๆ

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
1.00	3	.0000						
4.00	3		5.6667					
3.00	3		6.2200	6.2200				
2.00	3		6.3367	6.3367				
8.00	3			8.2200	8.2200			
5.00	3				9.4433	9.4433		
7.00	3				9.5533	9.5533		
11.00	3				9.5567	9.5567		
10.00	3					10.6667	10.6667	
6.00	3						11.9967	11.9967
13.00	3						12.4433	12.4433
9.00	3						12.6667	12.6667
12.00	3							13.4433
Sig.		1.000	.562	.089	.266	.308	.099	.229

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Oneway – ANOVA ของความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นที่ระดับคอราก มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน มวลชีวภาพรวมและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความสูง	Between Groups	851.702	12	70.975	17.741	.000
	Within Groups	104.019	26	4.001		
	Total	955.722	38			
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นที่ระดับคอราก	Between Groups	22.828	12	1.902	23.010	.000
	Within Groups	2.150	26	.083		
	Total	24.978	38			
มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน	Between Groups	3.842	12	.320	14.721	.000
	Within Groups	.566	26	.022		
	Total	4.408	38			
มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน	Between Groups	.954	12	.079	20.025	.000
	Within Groups	.103	26	.004		
	Total	1.057	38			
มวลชีวภาพรวม	Between Groups	8.445	12	.704	17.097	.000
	Within Groups	1.070	26	.041		
	Total	9.515	38			
เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา	Between Groups	650.156	12	54.180	41.158	.000
	Within Groups	34.226	26	1.316		
	Total	684.382	38			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของความสูงของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความสูง

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
4.00	3	23.5433				
2.00	3		27.5667			
1.00	3		27.6200			
7.00	3		27.6933	27.6933		
3.00	3		28.1700	28.1700	28.1700	
5.00	3		28.4467	28.4467	28.4467	
6.00	3		28.8867	28.8867	28.8867	
9.00	3			31.4333	31.4333	
11.00	3			31.4467	31.4467	
8.00	3				31.7200	
10.00	3					37.2533
12.00	3					38.6000
13.00	3					39.8000
Sig.		1.000	.484	.051	.064	.152

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นที่ระดับคอรากของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นที่ระดับคอราก

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
3.00	3	3.7100				
2.00	3	3.7600				
6.00	3	4.0600	4.0600			
7.00	3		4.3867	4.3867		
4.00	3			4.6133		
1.00	3			4.6800	4.6800	
9.00	3			4.8467	4.8467	
5.00	3			4.9000	4.9000	
8.00	3			4.9133	4.9133	
10.00	3				5.1800	
11.00	3					5.8400
13.00	3					6.0200
12.00	3					6.1667
Sig.		.170	.176	.057	.066	.200

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของมวลชีวภาพส่วนเหนือดินของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
4.00	3	1.3167						
6.00	3	1.5100	1.5100					
3.00	3	1.5500	1.5500					
5.00	3		1.6233					
7.00	3		1.7033	1.7033				
2.00	3		1.7667	1.7667	1.7667			
9.00	3			1.9133	1.9133	1.9133		
1.00	3			1.9633	1.9633	1.9633		
8.00	3				2.0200	2.0200	2.0200	
11.00	3					2.1100	2.1100	2.1100
12.00	3						2.2333	2.2333
10.00	3						2.2833	2.2833
13.00	3							2.3700
Sig.		.077	.066	.057	.063	.147	.054	.057

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ภาคผนวก ง ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของมวลชีวภาพส่วนใต้ดินของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
4.00	3	.4133						
7.00	3	.4967	.4967					
5.00	3	.5200	.5200					
6.00	3		.5300					
3.00	3		.5700	.5700				
2.00	3		.6133	.6133	.6133			
1.00	3			.6567	.6567			
9.00	3			.6633	.6633			
8.00	3				.6967	.6967		
10.00	3					.8000	.8000	
11.00	3						.8333	
12.00	3						.8567	
13.00	3							.9667
Sig.		.059	.051	.108	.150	.055	.308	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ภาคผนวก ง ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของมวลชีวภาพรวมของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

มวลชีวภาพรวม

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
4.00	3	1.7300					
6.00	3	2.0400	2.0400				
3.00	3		2.1200				
5.00	3		2.1433				
7.00	3		2.2000				
2.00	3		2.3800	2.3800			
9.00	3			2.5767	2.5767		
1.00	3			2.6200	2.6200		
8.00	3			2.7167	2.7167		
11.00	3				2.9433	2.9433	
10.00	3					3.0833	3.0833
12.00	3					3.0900	3.0900
13.00	3						3.3367
Sig.		.073	.076	.073	.051	.412	.160

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ภาคผนวก ง ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนาเมื่ออายุ 8 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อราเอคโตไม-คอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 รูปแบบต่างๆ

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมคอร์ไรซา

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
1.00	3	.0000					
3.00	3		5.3333				
2.00	3		5.4447				
4.00	3		5.8890				
8.00	3			9.0000			
11.00	3			10.1110	10.1110		
7.00	3			10.7777	10.7777		
5.00	3			10.8890	10.8890		
10.00	3			11.1113	11.1113		
9.00	3				12.0000	12.0000	
13.00	3					13.5557	13.5557
6.00	3						14.2223
12.00	3						14.7777
Sig.		1.000	.582	.052	.081	.109	.229

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ภาคผนวก ง ตารางที่ 15 แสดงน้ำหนักแห้ง(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของเส้นใยราเอคโตไมคอร์-ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ชนิด เป็นเวลา 35 วัน

ชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซา	วันที่	น้ำหนักแห้งของเส้นใย (มก./มล.)		
		MMN	MEA	PDA
เห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6	0	0.2160 ± 0.0048	0.2053 ± 0.0061	0.2204 ± 0.0143
	7	0.3644 ± 0.0460	0.5320 ± 0.0162	0.3147 ± 0.0402
	14	0.6604 ± 0.0222	0.5547 ± 0.0489	0.6173 ± 0.0712
	21	0.6782 ±0.0532	0.7573 ± 0.0887	0.6760 ± 0.0192
	28	1.0591 ± 0.1095	0.9733 ± 0.0321	0.7049 ± 0.0671
	35	1.1787 ± 0.0249	1.0400 ± 0.0912	0.7387 ± 0.0576
เห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8	0	0.2067 ± 0.0133	0.1893 ± 0.0061	0.2240 ± 0.0154
	7	0.3387 ± 0.0742	0.2920 ± 0.0208	0.2733 ± 0.0122
	14	0.5173 ± 0.0167	0.4827 ± 0.021	0.4027± 0.0358
	21	0.5547 ± 0.0569	0.5253 ± 0.0276	0.5507 ± 0.0485
	28	0.7800 ± 0.0188	0.700 ± 0.0817	0.6307 ± 0.0879
	35	0.8427 ± 0.0444	0.7947 ± 0.0267	0.7733 ± 0.0693

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง ตารางที่ 16 แสดงน้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของเส้นใยราเอคโตไมคอร์-ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6 และเห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN ที่มีค่า pH ต่างๆ กัน เป็นเวลา 35 วัน

ชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซา	วันที่	น้ำหนักแห้งของเส้นใย (มก./มล.)				
		pH 5	pH 5.5	pH 6	pH 6.5	pH 7
เห็ดเผาะฝ้ายสายพันธุ์ KANII6	0	0.1711 ± 0.002	0.1791± 0.0167	0.1769 ± 0.0107	0.1667 ± 0.0071	0.1707 ± 0.0046
	7	0.4227 ± 0.0295	0.3724 ± 0.0489	0.3107 ± 0.0367	0.3027 ± 0.0477	0.3387 ± 0.0061
	14	0.6827 ± 0.2311	0.6947 ± 0.2105	0.5280 ± 0.1121	0.4844 ± 0.0869	0.4169 ± 0.0561
	21	1.0453 ± 0.0642	0.8102 ± 0.0424	0.5400 ± 0.0856	0.5547 ± 0.1062	0.5267 ± 0.0520
	28	1.3671 ±0.0855	1.6511 ± 0.1501	0.8360 ± 0.0837	0.6040 ± 0.0189	0.5449 ± 0.0449
	35	1.7280 ± 0.1655	1.9542 ± 0.1165	1.5444 ± 0.0717	0.8733 ± 0.1518	0.6547 ± 0.0285
เห็ดเผาะหนังสายพันธุ์ TAK8	0	0.1769 ± 0.0271	0.1778 ± 0.0127	0.1707 ± 0.0083	0.1653 ± 0.0071	0.1764 ± 0.0116
	7	0.4329 ± 0.0716	0.4169 ± 0.0304	0.2804 ± 0.0824	0.3307 ± 0.0407	0.3507 ± 0.0139
	14	0.6480 ± 0.0861	0.5604 ± 0.0322	0.6387 ± 0.1352	0.5249 ± 0.1261	0.4347 ± 0.1134
	21	0.7147 ± 0.1284	1.2982 ± 0.1090	0.6973 ± 0.0995	0.6844 ± 0.2640	0.7147 ± 0.1774
	28	1.1387± 0.2530	2.0307 ± 0.0359	0.8973 ± 0.0751	1.2018 ± 0.2317	0.8907 ± 0.0673
	35	1.9284 ± 0.1949	2.1693 ± 0.0787	1.6333 ± 0.0881	1.7173 ± 0.0636	1.3493 ± 0.1414

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววรณิสร์ กลิ่นทอง เกิดวันที่ 25 สิงหาคม 2524 ที่จังหวัดสมุทรสงคราม สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ (สาขาพันธุศาสตร์) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2547 ปัจจุบันทำงานเป็นครูวิชาการ โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์

การเสนอผลงาน

Klintong, W., and Piapukiew, J. 2009. OPTIMIZATION FOR MYCELIAL GROWTH OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI *Astraeus odoratus* AND *Astraeus asiaticus*. In Proceeding of The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย