โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด *Tylopilus* sp. เพื่อการผลิตหัวเชื้อสำหรับกล้าไม้ยูคาลิปตัส

Screening of ectomycorrhizal fungi *Tylopilus* sp. for inoculum production for Eucalyptus seedlings

ชื่อนิสิต นางสาวชมจันทร์ พันธ์พัฒนะ **เลขประจำตัว** 5932010823

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด *Tylopilus* sp. เพื่อการผลิตหัวเชื้อสำหรับกล้าไม้ยูคาลิปตัส

Screening of ectomycorrhizal fungi *Tylopilus* sp. for inoculum production for Eucalyptus seedlings

นางสาวชมจันทร์ พันธ์พัฒนะ

อาจารย์ที่ปรึกษา
อาจารย์ ดร.ณัฏฐ์ ทรงวรวิทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: การคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด *Tylopilus* sp. เพื่อการผลิตหัวเชื้อสำหรับกล้าไม้ยูคาลิปตัส
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวชมจันทร์ พันธ์พัฒนะ
อาจารย์ที่ปรึกษา	: อาจารย์ ดร.ณัฏฐ์ ทรงวรวิทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

ยูคาลิปตัส *Eucalyptus camaldulensis* เป็นไม้เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งในประเทศไทย ในธรรมชาติรากของต้นยูคาลิปตัสมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) กับเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด *Tylopilus* sp. เมื่อถึงต้นฤดูฝนในทุก ๆ ปี เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดนี้จะสร้างดอกเห็ดเสม็ดซึ่งได้รับความนิยมนำไปรับประทานในพื้นที่ทางใต้และตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด *Tylopilus* sp. สำหรับการผลิตเป็นหัวเชื้อสำหรับกล้าไม้ยูคาลิปตัส จากการทดลองการศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด 3 สายพันธุ์ ได้แก่เห็ดเสม็ดน่าน I-2 เห็ดเสม็ดน่าน I-3 และเห็ดเสม็ดกระบี่ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 21 วัน พบว่าเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อนำเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่ไปทดสอบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ชนิด ได้แก่ potato dextrose broth (PDB), modified Melin-Norkrans broth (MMN) และ malt extract broth (MEB) เป็นเวลา 16 วัน พบว่าเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุด จากการนำหัวเชื้อราเอคโตไมคอไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทดสอบการติดเชื้อเข้าสู่รากในกล้าไม้ยูคาลิปตัสเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าราเอคโตไมคอไรซาเห็ดเสม็ดที่เจริญใน MEB สามารถเกิดการติดเชื้อในรากยูคาลิปตัสได้ถึง 65.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่หัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MEA และหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN พบร้อยละของการติดเชื้อในรากกล้าไม้ยูคาลิปตัสเท่ากับ 53.0 เปอร์เซ็นต์ และ 45.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ด้วยเหตุนี้ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB จึงเหมาะสำหรับการใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับกล้าไม้ยูคาลิปตัส

คำสำคัญ: การเจริญของเส้นใยรา, ยูคาลิปตัส, การติดเชื้อ, หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา, เห็ดเสม็ด

Research Title	: Screening of ectomycorrhizal fungi *Tylopilus* sp. for inoculum production for *Eucalyptus* seedlings
Student name	: Miss Chomchan Phanphatthana
Advisor	: Nut Songvorawit, Ph.D.
Co-Advisor	: Assistant Professor Jittra Piapukiew, Ph.D.
Department of	: Biology

Abstract

River red gum (*Eucalyptus camaldulensis*) is one of the important commercial trees in Thailand. In natural habitats, river red gum roots have a symbiotic association with ectomycorrhiza, *Tylopilus* sp. or "Hed Sa Mhed" in Thai. During early rainy seasons, *Tylopilus* sp. produces fruiting bodies which are harvested as delicacy in southern and north-eastern parts of Thailand. This study aimed to screen ectomycorrhizal fungi *Tylopilus* sp. for inoculum production for river red gum seedlings. Three strains of *Tylopilus* sp., including Nan I-2, Nan I-3 and Krabi strains, were cultured in potato dextrose agar (PDA) for 21 days. The result showed that Krabi strain had the most well-developed mycelium. Thereafter, Krabi strain ectomycorrhiza was cultured in 3 different media, including potato dextrose broth (PDB), modified Melin-Norkrans broth (MMN) and malt extract broth (MEB) for 16 days. MEB yieled the highest average dry-weight of fungal mycelium. Krabi strain ectomycorrhiza was then subjected to root infection test in river red gum seedlings for 2 months. The result showed that the inoculum of Krabi strain ectomycorrhiza from MEB was able to infect 65.3% of river red gum roots, while the fungal inoculum from MEA and MMN had capability of infectinon of 53.0% and 45.5%, respectively. From these results, Krabi strain ectomycorrhiza cultured in MEB is suitable for using as inoculum for *Eucalyptus* seedlings.

Keywords: ectomycorrhizal inoculum, eucalyptus, mycelium growth, infection, *Tylopilus* sp.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เรื่อง การคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด *Tylopilus* sp. เพื่อการผลิตหัวเชื้อสำหรับกล้าไม้ยูคาลิปตัสสำเร็จไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ส่งผลให้การทำงานครั้งนี้เป็นไปอย่างราบรื่นและมีประสิทธิภาพ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ณัฏฐ์ ทรงวรวิทย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำรายละเอียดต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการทำงาน รวมถึงคอยดูแล ติดตามการทำงานและช่วยประสานงานในกระบวนการต่าง ๆ จนสำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วมที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำเกี่ยวกับหัวข้องานวิจัย เทคนิคการทำวิจัย และการวางแผนการดำเนินงาน รวมทั้งการให้คำปรึกษาที่ดีเมื่อเจอปัญหาและอุปสรรค นอกจากนี้ยังช่วยดูแลงานวิจัยในสถานการณ์ที่ยากลำบากและอนุเคราะห์สถานที่และอุปกณ์ในการปฏิบัติการทดลองจนงานวิจัยครั้งนี้สามารถสำเร็จและลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอบคุณพี่ ๆ นักวิจัยทุกท่านภายในห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ ทั้งเนื้อหาความรู้ การวางแผนดำเนินงาน และเทคนิคทางที่ใช้ภายในห้องปฏิบัติการ ตลอดการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้คำปรึกษารวมถึงการให้กำลังใจในระหว่างการทำโครงการครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สำหรับเงินทุนในการทำโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก
ABSTRACT ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ 1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ 2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 3
2.1. ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) 3
2.2. เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) 3
2.3. เห็ดเสม็ด 4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน 7
3.1. วัสดุอุปกรณ์ 7
3.2. ขั้นตอนการศึกษา 7
3.2.1. การเพิ่มจำนวนเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด 7
3.2.2. การคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดที่เหมาะสม 8
3.2.3. การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด 9
3.2.4. การผลิตหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด 9
3.2.5. การศึกษาความสามารถในการติดเชื้อของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดที่มีผลต่อกล้าไม้ยูคาลิป 9
3.2.5.1. การเตรียมกล้าไม้ยูคาลิปตัส 9
3.2.5.2. การเตรียมวัสดุสำหรับปลูก 10
3.2.5.3. การใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด 10
3.2.5.4. การหาร้อยละของการติดเชื้อ (percent infection) ของราเอคโตไมคอร์ไรซาในรากของกล้าไม้ยูคาลิปตัส 10
บทที่ 4 ผลการศึกษา 11
4.1. ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดที่เหมาะสม 11
4.2. ผลการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด 12
4.3. ผลการศึกษาร้อยละของการติดเชื้อ (percent infection) ของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดในรากของกล้าไม้ยูคาลิปตัส 13

บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา 15
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 17
6.1. สรุปผลการศึกษา 17
6.2. ข้อเสนอแนะ 18
6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ 18
6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต 18
เอกสารอ้างอิง 19
ภาษาไทย 19
ภาษาอังกฤษ 20
ภาคผนวกที่ 1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 23
ภาคผนวกที่ 2การเจริญเติบโตของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA 25
ภาคผนวกที่ 3 เส้นใยราเอคโตไมคอไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆ เป็นเวลา 16 วัน 26
ภาคผนวกที่ 4 ต้นกล้ายูคาลิปตัสในชุดการทดลองต่างๆ 27
ภาคผนวกที่ 1 รากยูคาลิปตัสหลังจากใส่หัวเชื้อเป็นเวลา 2 เดือน 28

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4-1 การเจริญเติบโตของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์จากกระบี่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ 13

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 เห็ดเสม็ด 4
ภาพที่ 3-1 ลักษณะของโคโลนีราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดอายุ 14 วัน ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทั้ง 3 สายพันธุ์ (A) น่าน I-2 (B) น่าน I-3 และ (C) กระบี่.....8
ภาพที่ 3-2 เส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบการเจริญเติบโต บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA.....8
ภาพที่ 4-1 การเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA เป็นเวลา 21 วัน 11
ภาพที่ 4-2 เส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อายุ 21 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA (A) น่าน I-2 (B) น่าน I-3 และ (C) กระบี่..... 12
ภาพที่ 4-3 การเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 16 วัน..... 12
ภาพที่ 4-4 รากต้นยูคาลิปตัส (A) รากที่ไม่ติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา และ (B) รากที่ติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา 14

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ปัจจุบันกรมป่าไม้ได้ส่งเสริมการปลูกไม้เศรษฐกิจในพื้นที่ของเอกชนเพื่อพัฒนาอาชีพและรายได้ของประชาชนให้สามารถยึดถือเป็นอาชีพหลักในอนาคต ตลอดจนเป็นไม้ใช้สอยและรองรับอุตสาหกรรมที่ใช้ไม้เป็นวัตถุดิบ ลดการนำเข้าไม้จากต่างประเทศ เพิ่มพื้นที่ป่าเศรษฐกิจ และส่งเสริมให้เกษตรกรใช้ที่ดินอย่างเต็มศักยภาพ (กรมป่าไม้, 2561) ยูคาลิปตัส *Eucalyptus camaldulensis* เป็นไม้เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งทนต่อสภาพแห้งแล้ง สามารถขึ้นได้ในพื้นที่ดินเสื่อมโทรมที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำและเป็นไม้โตเร็ว สามารถปลูกและตัดเพื่อใช้ประโยชน์ได้ตั้งแต่ 3 - 5 ปี และยังสามารถแตกหน่อได้โดยไม่ต้องทำการปลูกใหม่ การใช้ประโยชน์จากยูคาลิปตัสในประเทศไทยส่วนใหญ่ จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษมากกว่าร้อยละ 60 และบางส่วนถูกใช้ผลิตเป็นเชื้อเพลิง (กรมวิชาการเกษตร, 2562) นอกจากการใช้ประโยชน์จากเนื้อไม้แล้วยังสามารถใช้ประโยชน์จากส่วนอื่น ๆ ของยูคาลิปตัสได้อีก เช่น การสกัดน้ำมันจากใบยูคาลิปตัสเพื่อใช้เป็นน้ำมันหอมระเหย หรือสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์โดยการนำไปฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิด (Orwa et al., 2009)

เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) เป็นความสัมพันธ์การอยู่ร่วมกันแบบต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์(symbiosis) ระหว่างราเอคโคไมคอร์ไรซาและรากพืช รากพืชที่ติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาจะลดการสร้างขนราก ความยาวของรากแขนงและรากฝอยลง แต่จะเพิ่มการแตกแขนงมากขึ้น (Brundrett et al., 1996) โดยพืชที่มีการดำรงชีวิตสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซาจะได้รับน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตในขณะที่ราก็ได้รับสารอาหารจากพืชผ่านทางระบบราก เช่น น้ำตาล และกรดอะมิโน (สุนัดดา โยมญาติ, 2545) เส้นใยของราที่อยู่ภายนอกรากจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมธาตุอาหารให้แก่รากพืช จึงทำให้พืชที่มีราไมคอร์ไรซาอยู่ที่รากมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าพืชที่ไม่มีราอาศัยอยู่ร่วมกัน (Chilvers et al., 1987)

ราประมาณ 7,000-10,000 ชนิดมีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับรากพืชราว 8,000 ชนิด (Taylor and Alenxander, 2005) พืชส่วนใหญ่ที่พบการดำรงชีวิตสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นไม้ที่พบได้ในป่าเขตอบอุ่นและเขตร้อน เช่น ไม้วงศ์ Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Myrtaceae, Salicaceae และ Dipterocarpaceae (Brundrett et al., 1996) ราเอคโตไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่เป็นเป็นราใน Division Basidiomycota และบางส่วนเป็นราใน Division Ascomycota ซึ่งราทั้งสองกลุ่มนี้เป็นราที่มีการสร้างดอกเห็ด โดยดอกเห็ดของราบางชนิดสามารถนำมารับประทานได้ โดยทั่วไปพืชแต่ละชนิดมักมีความสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซาได้หลายชนิด ซึ่งลักษณะความสัมพันธ์เอคโตไมคอร์ไรซาก็จะอาจแตกต่างกันไปตามชนิดของรา

เห็ดเหม็ด หรือเห็ดเสม็ด *Tylopilus* sp. เป็นหนึ่งในราเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบได้ในป่าเขตอบอุ่น และเขตร้อน สามารถพบอยู่ร่วมกับรากของต้นไม้ได้หลายชนิด เช่น ต้นเสม็ด *Melaleuca leucadendron* กระถินเทพา *Acacia mangium* และ ยูคาลิปตัส *E. camaldulensis* (Seehanan and Petcharat, 2008) นอกจากบทบาทด้านการส่งเสริมการเจริญของต้นพืชแล้ว ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดยังสามารถนำมารับประทานได้ จึงเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในภาคใต้ของประเทศ

ไทย เนื่องจากเห็ดเสม็ดเป็นเห็ดป่าที่รับประทานได้และพบตามฤดูกาลจึงส่งผลให้มีราคาแพง ดังนั้น เห็ดเสม็ดจึงเป็นผลพลอยได้ที่คุ้มค่าสำหรับสวนป่ายูคาลิปตัส หรือการปลูกยูคาลิปตัส เพื่อการใช้ประโยชน์ทั้งในระดับครัวเรือนและระดับอุตสาหกรรม นอกจากจะช่วยในการเจริญของต้นยูคาลิปตัสแล้ว ยังสร้างผลผลิตที่สามารถรับประทานได้ หรือสามารถสร้างรายได้ให้แก่ผู้ปลูกในระหว่างรอไม้ยูคาลิปตัสโตพอที่จะนำไปใช้ประโยชน์

ปัจจุบันการเพาะกล้าไม้โดยใช้หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาร่วมด้วยเป็นสิ่งที่ได้รับความสนใจมากขึ้นงานวิจัยหลายฉบับรายงานการใช้หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในการเพาะกล้าไม้ เช่น การใช้เอคโตไมคอร์ไรซากับการควบคุมโรคเน่าคอดินของกล้าไม้ยูคาลิปตัส (กิตติมา ด้วงแค และคณะ, 2548) และผลกระทบของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Astraeus odoratus* ต่อการเจริญของกล้าไม้ต้นยาง *Dipterocapus alatus* (Kaewgrajang et al., 2013) ทั้งนี้ การใช้เอคโตไมคอร์ไรซาต่างชนิดอาจมีร้อยละของการติดเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซาแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการเจริญของกล้าไม้แตกต่างกันอีกด้วย (Lu et al., 2016) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด และศึกษาประสิทธิภาพของหัวเชื้อ เพื่อผลิตหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่จะใช้ในการเพาะกล้าไม้ยูคาลิปตัส ผลการศึกษาจะทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี และนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อยูคาลิปตัสต่อไป

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด *Tylopilus* sp. สำหรับการผลิตเป็นหัวเชื้อสำหรับกล้าไม้ยูคาลิปตัส

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1. ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza)

ไมคอร์ไรซา มาจากคำว่า mykes และ rhiza ในภาษากรีกซึ่งแปลว่าเชื้อราและราก ตามลำดับ ไมคอร์ไรซาเป็นความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยระหว่างราและรากพืช โดยรานั้นต้องไม่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคพืช การอยู่ร่วมกันนี้ ราที่อาศัยร่วมกับรากพืชจะได้รับสารประกอบคาร์บอนและสารอื่น ๆ จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช ในทางกลับกันพืชก็จะได้รับประโยชน์จากรา โดยเส้นใยส่วนที่แพร่กระจายอยู่ภายนอกและภายในรากจะทำหน้าที่เหมือนรากฝอยให้กับพืช ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมธาตุอาหารให้แก่รากพืช จึงทำให้พืชที่มีราไมคอร์ไรซาอยู่ที่รากมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าพืชที่ไม่มีราอาศัยอยู่ร่วมกัน (Chilvers et al., 1987)

Harley และ Smith (1983) แบ่งไมคอร์ไรซาออกเป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) เอคเท็นโดไมคอร์ไรซา (ectendomycorrhiza) เอนโดไมคอร์ไรซา (endomycorrhiza) อาร์บูทอยด์ไมคอร์ไรซา (arbutoid mycorrhiza) โมโนโทรพอยด์ไมคอร์ไรซา (monotropoid mycorrhiza) อีริคอยด์ไมคอร์ไรซา (ericoid mycorrhiza) และออร์คิดไมคอร์ไรซา (orchid mycorrhiza)

2.2. เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza)

เอคโตไมคอร์ไรซาเป็นไมคอร์ไรซากลุ่มหนึ่งที่เส้นใยราจะเจริญบริเวณปลายรากพืช เส้นใยราจะเจริญสานตัวกันเป็นแผ่นอัดแน่น (fungal sheath) หรือเป็นเยื้อหุ้ม (mantle) อยู่รอบ ๆ ราก และเส้นใยบางส่วนจะเจริญเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิสและเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์สานกันเป็นร่างแหเรียกว่า ใยฮาร์ติก (hartig net) (Smith and Read, 2008) เมื่อรากพืชติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา รากพืชจะลดการสร้างขนราก ความยาวของรากแขนงและรากฝอยจะลดลงแต่จะเพิ่มการแตกแขนงมากขึ้น และรูปแบบของการแตกแขนงขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราและพืชอาศัย (วรณิสร์ กลิ่นทอง, 2553)

มีการพบว่าราประมาณ 7,000-10,000 ชนิด เป็นเอคโตไมคอร์ไรซากับรากพืช (Taylor and Alenxander, 2005) โดยส่วนใหญ่เป็นเป็นราใน Division Basidiomycota และบางส่วนเป็นราใน Division Ascomycota ซึ่งราทั้งสองกลุ่มนี้เป็นราที่มีการสร้างดอกเห็ด และยังพบพืชที่มีความสัมพันธ์กับราแบบเอคโตไมคอร์ไรซากว่า 8,000 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นไม้ที่พบได้ในป่าเขตอบอุ่นและเขตร้อน เช่น ไม้วงศ์ Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Myrtaceae, Salicaceae และ Dipterocarpaceae (Brundrett et al., 1996)

2.3. เห็ดเสม็ด

เห็ดเสม็ดหรือเห็ดเหม็ดอยู่ในวงศ์ *Boletaceae* สกุล *Tylopilus* เป็นหนึ่งในราเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบตามธรรมชาติได้ในป่าเขตอบอุ่นและเขตร้อน สามารถพบอยู่ร่วมกับรากของต้นไม้ได้หลายชนิด เช่น ต้นเสม็ด *Melaleuca leucadendron* กระถินเทพา *Acacia mangium* และ ยูคาลิปตัส *E. camaldulensis* (Seehanan and Petcharat, 2008) มักขึ้นตามพื้นดินที่มีใบไม้ปกคลุมโดยดอกเห็ดจะงอกเพียงปีละ 1-2 ครั้ง ในช่วงต้นฤดูฝน ระหว่างเดือนเมษายน ถึงเดือนมิถุนายน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเร็วช้าของฝนตามฤดูกาล ลักษณะสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ของเห็ดเสม็ดได้แก่ ดินที่มีความเป็นกรดอยู่ในช่วง 4.5 - 6.0 และมีความชื้นอยู่ในสภาพอิ่มตัวเต็มที่ (ลัดดาวัลย์ แก้วส่งแสง และคณะ, 2561)

ลักษณะทั่วไปของเห็ดเสม็ด มีดอกทรงกระทะคว่ำ นูน มีสีม่วงอมเทาไปจนถึงสีน้ำตาล เสมือนสีของใบไม้ที่ปกคลุมอยู่ด้านบน ใต้หมวกเห็ดเป็น รูพรุน เมื่อยังอ่อนมีสีขาว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงอมชมพู ก้านดอกเห็ดสีม่วง โคนก้านใหญ่ปลายเรียว (ภาพที่ 2-1)

ภาพที่ 2-1 เห็ดเสม็ด

เห็ดเสม็ดเป็นเห็ดที่มีรสชาติขมเล็กน้อยแต่เป็นที่นิยมรับประทานในพื้นที่ทางใต้ของประเทศไทย เช่น จังหวัดสงขลา จังหวัดยะลา และจังหวัดปัตตานี (Aungaudchariya et al., 2010) รวมทั้งพื้นที่ทางภาคอีสานของไทยอีกด้วย เนื่องจากเป็นเห็ดป่าที่รับประทานได้และพบตามฤดูกาลจึงส่งผลให้มีราคาแพงกว่าเห็ดที่เพาะได้ทั่วไป (Aungaudchariya et al., 2012)

2.4. หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซามี 3 ประเภทคือ การใช้ดินเชื้อ (soil inoculum) ซึ่งเก็บจากป่าหรือสวนป่าที่เป็นแหล่งกำเนิดของต้นไม้ที่มีเชื้อไมคอร์ไรซา เป็นวิธีที่ใช้ได้ผลดีมานาน แต่เสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคพืช การใช้หัวเชื้อสปอร์ (spore inoculum) เหมาะกับราที่สร้างสปอร์จำนวนมาก หรือราที่ไม่สามารถเลี้ยงเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำสปอร์ของเห็ดราคลุกกับเมล็ดพันธุ์ก่อนเพาะกล้า ข้อดีคือสามารถทำได้ง่ายและค่าใช้จ่ายน้อย แต่อาจเกิดการงอกที่ไม่สม่ำเสมอเนื่องจากสปอร์มีระยะพักตัว (วรณิสร์ กลิ่นทอง, 2553) และหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาประเภทสุดท้ายคือ การใช้เชื้อเส้นใย (mycelial inoculum) เป็นประเภทที่นิยมมากที่สุดในปัจจุบัน (Marx, 1991) เนื่องจากสามารถนำไปขยายเพิ่มจำนวนเส้นใยได้มาก ทำได้โดยแยกและเลี้ยงเส้นใยจากดอกเห็ด ข้อดีคือจะได้หัวเชื้อที่บริสุทธิ์ปราศจากเชื้อปนเปื้อน

ปัจจุบันการเพาะต้นกล้าพืชโดยใช้หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาร่วมด้วย เป็นสิ่งที่ได้รับความสนใจมาก โดยพบว่ามีงานวิจัยหลายฉบับได้รายงานการใช้หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในการเพาะกล้าไม้เพื่อวัตถุประสงค์ที่หลายหลากแตกต่างกัน เช่น การศึกษาผลของหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *Russula* spp. ต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้รัง *Shorea siamensis* Miq. (เชาวณี อ้นลำพูน, 2554) การศึกษาเอคโตไมคอร์ไรซากับการควบคุมโรคเน่าคอดินของกล้าไม้ยูคาลิปตัส (กิตติมา ด้วงแค และคณะ, 2548) นอกจากนี้ยังมีการใช้หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในการเพาะกล้าไม้เพื่อพัฒนาการการปลูกป่าในประเทศไทย (จิตรตรา เพียภูเขียว, 2560)

2.5. ยูคาลิปตัส

ยูคาลิปตัสเป็นไม้ต่างประเทศในวงศ์ Myrtaceae มีมากกว่า 700 ชนิด มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปออสเตรเลียเป็นส่วนใหญ่ ประเทศไทยได้เริ่มนำยูคาลิปตัสชนิดต่าง ๆ มาทดลองปลูกประมาณปี พ.ศ. 2493 ยูคาลิปตัสสามารเจริญเติบโตได้ในทุกสภาพของดิน เช่น พื้นที่ริมน้ำ ดินที่เป็นทราย และมีความแห้งแล้งติดต่อกันเป็นเวลานาน รวมทั้งพื้นที่ที่มีดินเค็ม ดินเปรี้ยว แต่จะไม่ทนทานต่อดินที่มีหินปูนสูง (กรมป่าไม้, 2556) ลักษณะทั่วไปมีลำต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ รูปทรงสูง ตรง มีกิ่งก้านน้อย ใบเป็นเดี่ยวตรงข้ามเรียงสลับกัน สีเขียวอ่อนทั้งสองด้านบางครั้งมีสีเทา เปลือกมีลักษณะเรียบเป็นมัน มีสีเทาสลับสีขาวและน้ำตาลแดงเป็นบางแห่ง

มีการใช้ประโยชน์จากยูคาลิปตัสอย่างหลายหลาก อาทิ เนื้อไม้นำมาทำกระดาษ ใบสามารถนำมาสกัดเป็นน้ำมันเพื่อทำน้ำยาหอมระเหย ลำต้นสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุในการก่อสร้างเสาเข็ม ทำเครื่องเรือน เครื่องใช้สอย และเชื้อเพลิง ข้อมูลจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบว่าประเทศไทยมีความต้องการไม้ยูคาลิปตัสเพื่ออุตสาหกรรมต่าง ๆ 38.5 ล้านตัน/ปี ในขณะที่มีกำลังการผลิตไม้ยูคาลิปตัสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เพียงประมาณ 7.01 ล้านตัน/ปี (ประเสริฐ สุดใหม่, 2550) ดังนั้นไม้ยูคาลิปตัสถือเป็นไม้ที่มูลค่าทางเศรษฐกิจมากพอสมควร

นอกจากการใช้ประโยชน์ทางตรงแล้ว การปลูกยูคาลิปตัสยังให้ประโยชน์ทางอ้อมที่สำคัญ คือ การมีเห็ดที่บริโภคได้ขึ้นบริเวณสวนป่ายูคาลิปตัส อาทิเช่น เห็ดเสม็ด เห็ดไข่ เห็ดระโงกขาว โดยเห็ดที่ขึ้นคือเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีความสัมพันธ์กับระบบรากของไม้ยูคาลิปตัสนั่นเอง (อมรรัตน์ อังอัจฉะริยะ, 2561)

2.6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประเมินผลการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในยูคาลิปตัส

สุนัดดา โยมญาติ (2545) ได้ทำการศึกษาผลของราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาและราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. สายพันธุ์คัดต่อการกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้ยูคาลิปตัส *E. camaldulensis* โดยทำการสำรวจราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* spp. 22 สายพันธุ์และราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาจำนวน 4 สกุล 31 สายพันธุ์จากสวนป่ายูคาลิปตัส จากการคัดเลือกและทดสอบพบว่าหัวเชื้อจากราเอคโตไมคอร์ไรซา *P. albus* ร่วมกับราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา *Gigaspora albida* สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกล้าไม้ได้ดีที่สุด กล้ายูคาลิปตัสมีความสูงและมวลชีวภาพเพิ่มขึ้น 48.86 และ 70.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

กิตติมา ด้วงแค และคณะ (2548) ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *P. tinctorius* (Pers.) เพื่อทดสอบการควบคุมโรคเน่าคอดินจากเชื้อ *Cylindrocladium scoparium* ในกล้าไม้ยูคาลิปตัส พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซามีบทบาทต่อการป้องกันโรคที่เข้าทำลายกล้าไม้ยูคาลิปตัส รวมทั้งช่วยให้กล้าไม้มีการเจริญเติบโตทางด้านความสูงดีขึ้น

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยเพื่อการพัฒนาหัวเชื้อไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมเพื่อส่งเสริมการเจริญของยูคาลิปตัสที่ปลูกเป็นการค้า (สายสมร ลำยอง, 2557) โดยทำการคัดเลือกเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* spp. และ *Scleroderma* spp. และอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทีมีประสิทธิภาพ พบว่ายูคาลิปตัสมีการเจริญในด้านความสูงดีที่สุดหลังจากการปลูกเชื้อร่วมของเอคโตไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา รองลงมาคือการปลูกด้วยเชื้อเพียงอย่างเดียวของสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *P. albus*, *S. sinnamariense* และชุดควบคุมตามลำดับ

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

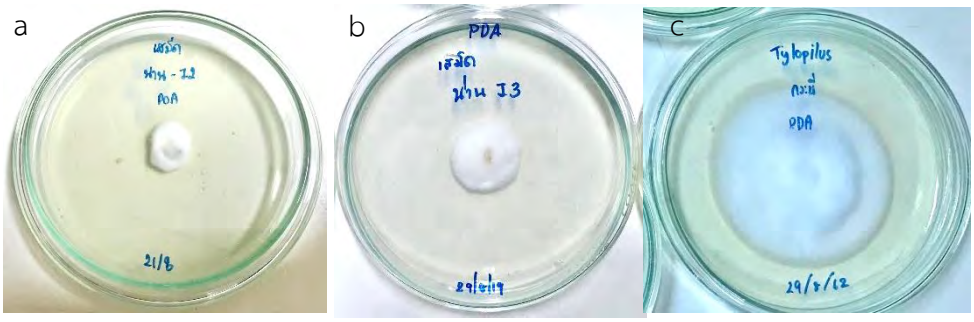
3.1. วัสดุอุปกรณ์

1. กระบอกตวง
2. บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร
3. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. Petri dish
5. เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
6. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
7. Cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร
8. กระดาษกรอง
9. กรวยบุชเนอร์ (Buchner funnel)
10. ปั๊มสูญญากาศ
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์
12. มีด
13. Microwave
14. Autoclave
15. เครื่องชั่งแบบละเอียด
16. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood)
17. อลูมิเนียมฟรอยด์
18. น้ำกลั่น

3.2. ขั้นตอนการศึกษา

3.2.1. การเพิ่มจำนวนเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด

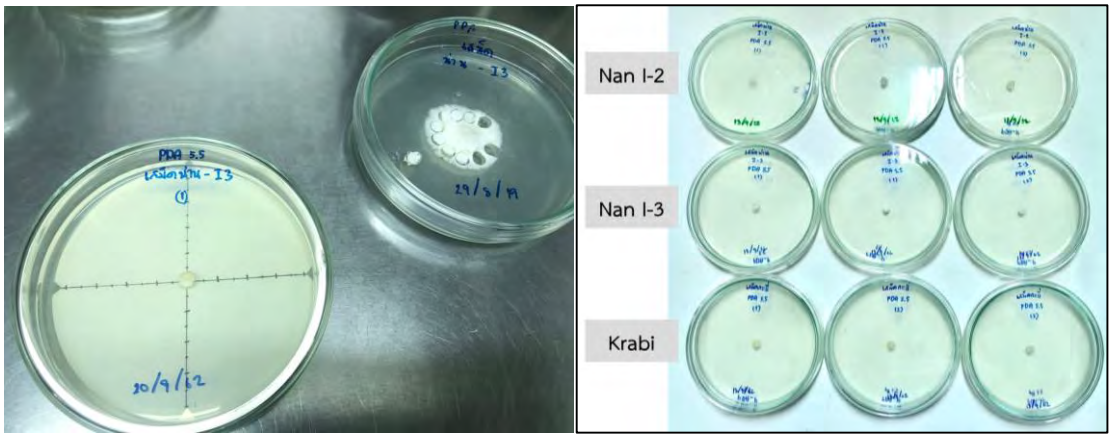
นำเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชา พฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ เห็ดเสม็ดน่าน I-2, เห็ดเสม็ดน่าน I-3 และเห็ดเสม็ดกระบี่ เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 3-1) และทำการต่อเชื้อ (subculture) ทุก ๆ 14 วัน เพื่อเพิ่มจำนวนเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด จากนั้นสังเกตลักษณะของเส้นใย และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเส้นใยที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง



ภาพที่ 3-1 ลักษณะของโคโลนีราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดอายุ 14 วัน ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทั้ง 3 สายพันธุ์ (a) น่าน I-2 (b) น่าน I-3 และ (c) กระบี่

3.2.2. การคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดที่เหมาะสม

นำเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดทั้ง 3 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่ pH 5.5 จำนวน 3 ซ้ำ โดยใช้ cork borer ขนาด 0.5 ซม. ในการแบ่งเชื้อเพื่อย้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA (ปริมาณ 25 มล.) จำนวน 9 เพลท (ภาพที่ 3-2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการวัดการเจริญเติบโตของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการเจริญเติบโต ด้วยวิธีการทางสถิติแบบ One-way ANOVA และเปรียบเทียบพหุคูณ (multiple comparison) ด้วยวิธี Duncan multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ $p<0.05$ ในโปรแกรม SPSS และนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 3-2 เส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA

3.2.3. การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด

นำเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกจากข้อ 3.2.2. ซึ่งทำการแบ่งเชื้อโดยใช้ cork borer ขนาด 0.5 ซม. ไปทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ชนิด คือ potato dextrose broth (PDB), modified Melin-Norkrans broth (MMN) และ malt extract broth (MEB) ที่ pH 5.5 (ปริมาณ 25 มล.) จำนวน 3 ซ้ำ แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (วรณิสร์ กลิ่นทอง, 2553) จากนั้นทำการวัดการเจริญเติบโตของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด โดยทำการหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 16 วัน ด้วยการกรองอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีเส้นใยราผ่านกระดาษกรองด้วยปั๊มสูญญากาศ ล้างเส้นใยบนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีเส้นใยเชื้อราไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจนมีน้ำหนักคงที่ ทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตด้วยวิธีการทางสถิติแบบ One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ $p<0.05$ โดยโปรแกรม SPSS จากนั้นคัดเลือกชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกจากข้อ 3.2.2 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

3.2.4. การผลิตหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นโดยการนำเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกจากข้อ 3.2.2. มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.2.3. ที่ pH 5.5 และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการปั่นหัวเชื้ออย่างหยาบให้เส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดขาดออกจากกันเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.2.5. การศึกษาความสามารถในการติดเชื้อของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดที่มีผลต่อกล้าไม้ยูคาลิป

3.2.5.1. <u>การเตรียมกล้าไม้ยูคาลิปตัส</u>

ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดยูคาลิปตัส โดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นแช่ในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (สุนัดดา โยมญาติ, 2545) จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะโดยใส่ในถุงเพาะชำขนาด 2.5 x 6.0 นิ้ว ที่บรรจุทรายผสมดินพรุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รดน้ำทุกวันจนต้นกล้าอายุ 1 เดือน โดยทำการเพาะต้นกล้าทั้งหมดจำนวน 20 ต้น

3.2.5.2. การเตรียมวัสดุสำหรับปลูก

นำทรายผสมดินพรุในอัตราส่วน 1:1 แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งหนึ่งห่างกัน 24 ชั่วโมง และเตรียมกล่องพลาสติกใสทรงสี่เหลี่ยม (rhizobox) ขนาด 30 x 12 x 5 เซนติเมตร เจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 5 รู กระจายทั่วพื้นที่ด้านล่างกล่อง และเจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร จำนวน 1 รู บริเวณตรงกลางของฝากล่อง จากนั้นเช็ดกล่องด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

3.2.5.3. การใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด

ทำการย้ายต้นกล้าจากข้อ 3.2.5.1. ที่มีอายุ 1 เดือน ลงใน rhizobox ที่บรรจุวัสดุปลูก กล่องละ 1 ต้น พร้อมใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.4. ปริมาณ 10 มล./กล่อง โดยชุดการทดลองที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อเป็นชุดการทดลองควบคุม ทำการทดลอง 2 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ดูแลต้นไม้โดยรดน้ำทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 2 เดือน ตามวิธีการทดลองของ สุนัดดา โยมญาติ (2545)

3.2.5.4. การหาร้อยละของการติดเชื้อ (percent infection) ของราเอคโตไมคอร์ไรซาในรากของกล้าไม้ยูคาลิปตัส

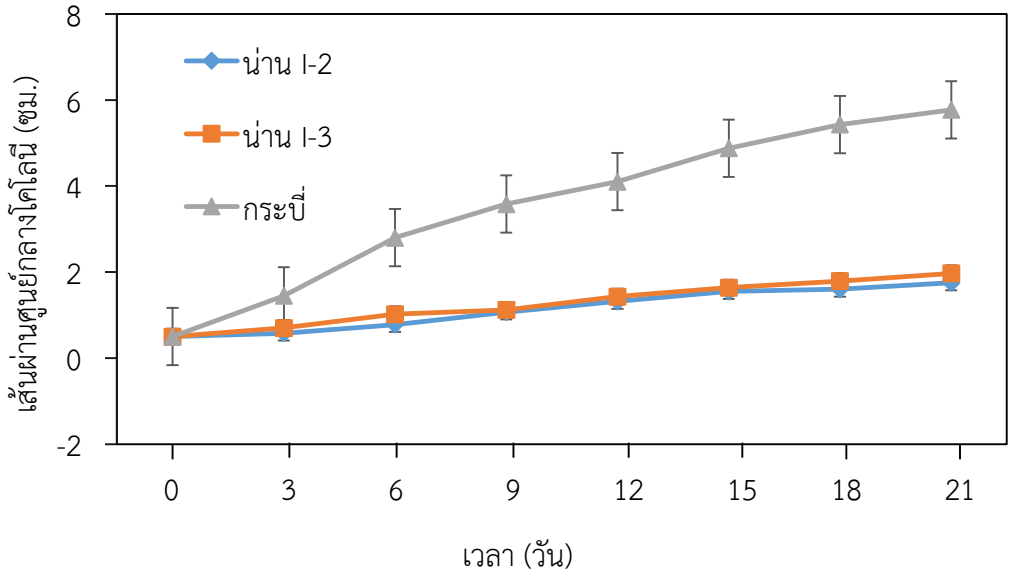
ทำการสุ่มรากจำนวน 3 ราก/ต้น ตัดรากออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดชิ้นละ 0.5 เซนติเมตร สุ่มชิ้นรากจำนวน 50 ชิ้นต่อ 1 ซ้ำ เพื่อทำการนับจำนวนรากที่มีการติดเชื้อภายใต้กล้องสเตอริโอ โดยนำมาวางบนแผ่นกริดขนาดตาราง 1 x 1 เซนติเมตร จากนั้นคำนวณหาร้อยละของการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา (Lu et al., 2016) ตามสมการดังนี้

$$\text{ร้อยละของการติดเชื้อ} = \frac{\textbf{จำนวนชิ้นของรากที่มีการติดเชื้อ}}{\textbf{จำนวนชิ้นของรากที่ทำการตรวจสอบ}} \times 100\%$$

บทที่ 4
ผลการศึกษา

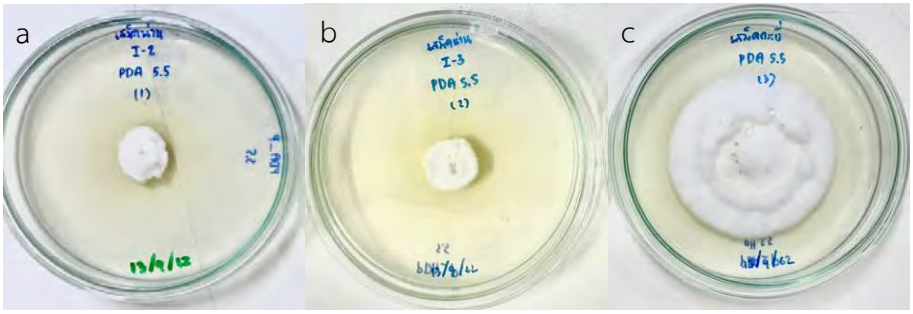
4.1.ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เห็ดเสม็ดน่าน I-2 เห็ดเสม็ดน่าน I-3 และเห็ดเสม็ดกระบี่ บนอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่ pH 5.5 เป็นเวลา 21 วัน ให้ผลการเจริญดังภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 การเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA เป็นเวลา 21 วัน

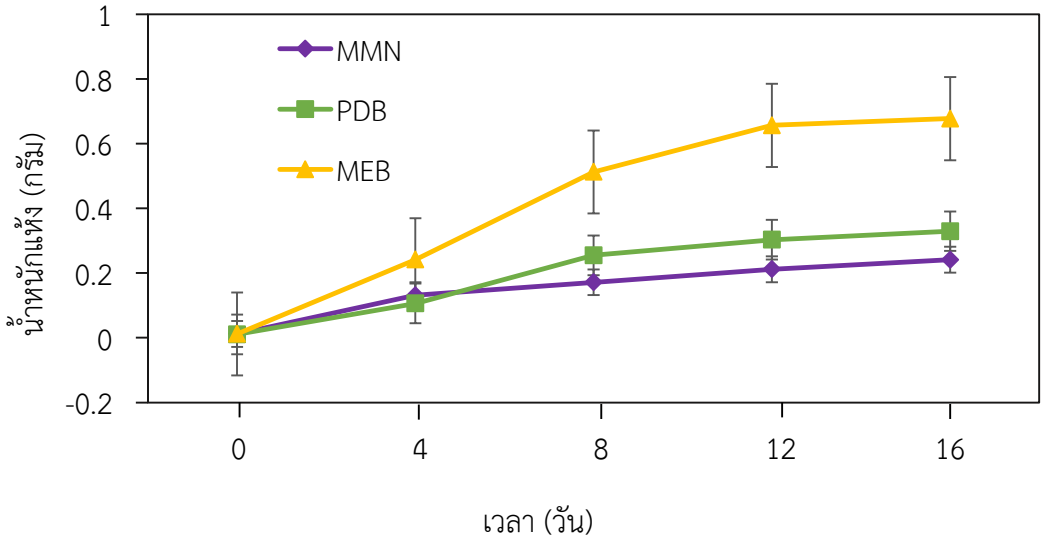
เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่า เส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาสายพันธุ์กระบี่มีอัตราการเจริญดีกว่าสายพันธุ์น่าน I-2 และน่าน I-3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยราเอคโตไมคอร์ไรซาสายพันธุ์กระบี่มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยสูงสุดเมื่ออายุ 21 วันเท่ากับ 5.77 เซนติเมตร สายพันธุ์น่าน I-2 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 1.75 เซนติเมตร และสายพันธุ์น่าน I-3 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 1.97 เซนติเมตร ลักษณะการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดทั้ง 3 สายพันธุ์แสดงดังภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 เส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อายุ 21 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA (a) น่าน I-2 (b) น่าน I-3 และ (c) กระบี่

4.2.ผลการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด

เมื่อนำเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่ที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุดมาทดสอบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ชนิด ได้แก่ PDB, MMN และ MEB ได้ผลการเจริญของเส้นใยแสดงดังภาพที่ 4-3 ดังนี้



ภาพที่ 4-3 การเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 16 วัน

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทั้ง 3 ชนิด พบว่าเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB ได้ดีมากกว่าการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB และ MMN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB เป็นเวลา 16 วัน เป็น 0.6772 กรัม ส่วนเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยเป็น 0.3293 กรัม และเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN เป็น 0.2411 กรัม (ตารางที่ 4-1)

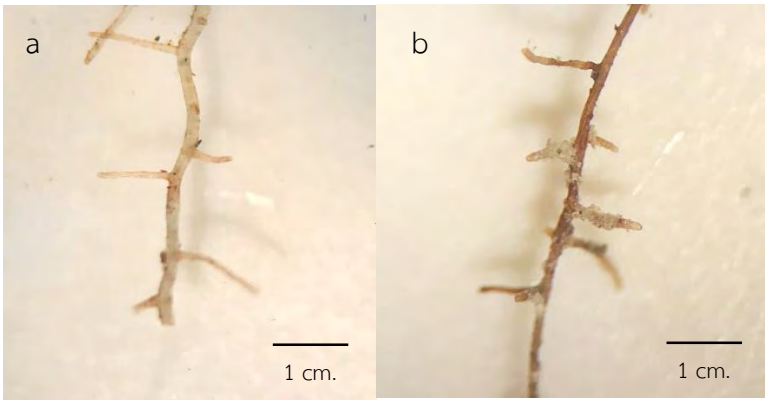
ตารางที่ 4-1 การเจริญเติบโตของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์จากกระบี่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

	ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้ง (กรัม)		
วันที่	MMN	PDB	MEB
0	0.0119	0.0105	0.0118
4	0.1311	0.1061	0.2413
8	0.1715	0.2547	0.5125
12	0.2117	0.3031	0.6564
16	0.2411^{a}	0.3293^{b}	0.6772^{c}

อักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

4.3.ผลการศึกษาร้อยละของการติดเชื้อ (percent infection) ของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดในรากของกล้าไม้ยูคาลิปตัส

จากการคัดเลือกสายพันธุ์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด ทำให้ได้หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดที่ใช้เห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB เมื่อนำมาทดสอบกับต้นกล้ายูคาลิปตัสเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าการติดเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดในรากกล้าไม้ยูคาลิปตัสเท่ากับ 65.3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดควบคุมไม่พบการติดเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยรากยูคาลิปตัสที่เกิดการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดพบว่ารากมีน้ำตาลอ่อน ที่ผิวมีเส้นใยสีขาวไปจนถึงเทาเล็กละเอียดอยู่โดยรอบ



ภาพที่ 4-4 รากต้นยูคาลิปตัส (a) รากที่ไม่ติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา และ (b) รากที่ติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

เมื่อทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้หัวเชื้อจากเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MEA และหัวเชื้อจากเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN พบว่าการติดเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดในรากกล้าไม้ยูคาลิปตัสเท่ากับ 53.0 เปอร์เซ็นต์ และ 45.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

จากการคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดพบว่าเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่มีการเจริญเติบโตของเส้นใยที่ดีที่สุดและเมื่อนำเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่มาทดสอบการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพบว่าเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว malt extract broth (MEB) เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MEB มีแหล่งคาร์บอนที่สำคัญคือ กลูโคส ซึ่งนิยมใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนใหญ่ และมีเปปโทน ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ราเอคโตไมคอร์ไรซาหลาย ๆ ชนิดสามารถนำไปใช้ได้ดี (Harvey, 1991) อย่างไรก็ตาม Angajchariya และคณะ (2017) รายงานว่าเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดที่เก็บจากพื้นที่จังหวัดตรัง เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Melin-Norkrans agar (MMN) ที่ผสมสารละลายสกัดจากดอกเห็ดเสม็ด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์และอายุของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด นอกจากการใช้หัวเชื้อจากเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงแล้วยังมีการผลิตหัวเชื้อโดยใช้วัสดุปลูกอาทิเช่น เวอร์มิคูไลต์ (vermiculite) พีทมอส แกลบ และขุยมะพร้าวเป็นพื้นผิวตัวกลางสำหรับการเจริญของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซา หรือการผลิตหัวเชื้อโดยใช้เม็ดแคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate gel) ทั้งนี้วิธีการผลิตหัวเชื้อที่เหมาะสมต้องพิจารณาลักษณะทางกายภาพและการเจริญเติบโตของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิด เช่น เส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายและเห็ดเผาะหนังสามารถติดเชื้อเข้าสู่รากพืชได้ดีเมื่อใช้หัวเชื้อผลิตจากเส้นใยที่เจริญในเวอร์มิคูไลต์ผสมพีทมอส และเส้นใยที่เจริญในแกลบผสมขุยมะพร้าว ในขณะที่เมื่อใช้หัวเชื้อผลิตจากเส้นใยที่เจริญในแคลเซียมอัลจิเนต และเส้นใยแขวนลอย มีผลให้การติดเชื้อเข้าสู่รากของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายและเห็ดเผาะหนังลดลง (วรณิสร์ กลิ่นทอง, 2553)

จากการทดสอบการติดเชื้อของหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดในรากกล้าไม้ยูคาลิปตัสพบว่าหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดที่ใช้เห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB สามารถเกิดการติดเชื้อในรากกล้าไม้ยูคาลิปตัสได้ถึง 65.3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดควบคุมไม่พบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด จากเกณฑ์การประเมินการติดเชื้อของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาของ Gong และคณะ (1997) ซึ่งประเมินให้เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่สามารถเกิดการติดเชื้อเข้าสู่รากพืชได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จะถือว่าเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถติดเชื้อเข้าสู่รากพืชได้อย่างสมบูรณ์ และจากงานวิจัยของสุนัดดา โยมญาติ (2545) ซึ่งพบว่าการใช้หัวเชื้อจากราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus albus* ร่วมกับราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา *Gigaspora albida* ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อเข้าสู่รากกล้าไม้ยูคาลิปตัสสูงสุด 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้เชื้อราไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ พบการติดเชื้อ 0 - 60 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการติดเชื้อเข้าสู่รากยูคาลิปตัสของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด 65.3 เปอร์เซ็นต์ของงานวิจัยนี้ ถือเป็นอัตราการติดเชื้อเข้าสู่รากพืชที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้ปริมาณหัวเชื้อที่ใส่ก็อาจมีผลต่อเปอร์เซ็นการติดเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซาเข้าสู่รากพืชได้เช่นกัน โดยงานวิจัยของ วรณิสร์ กลิ่นทอง (2553) พบว่าการใส่หัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้ายให้กับต้นยางนาในปริมาณ 10 มิลลิลิตร ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อเข้าสู่รากต้นยางนาได้มากกว่าการ

ใส่หัวเชื้อในปริมาณ 5 และ 20 มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mortier และคณะ (1989) ที่พบว่าหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซา *Laccaria laccata* ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตปริมาณ 5 กรัมของน้ำหนักแห้ง มีผลให้เกิดการติดเชื้อเข้าสู่รากพืชได้มากที่สุด นอกจากนี้เมื่อทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้หัวเชื้อจากเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MEA และหัวเชื้อจากเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN พบว่าร้อยละของการติดเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดในรากกล้าไม้ยูคาลิปตัสเท่ากับ 53.0 เปอร์เซ็นต์ และ 45.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในการทดลองชุดนี้ผลการติดเชื้อเข้าสู่รากกล้าไม้ยูคาลิปตัสของหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสอดคล้องกับความสามารถในการเจริญของเส้นใย อย่างไรก็ตามผลการติดเชื้อเข้าสู่รากพืชของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซายังขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อม สายพันธุ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา และชนิดของพืชที่ราไปมีความสัมพันธุ์ด้วย (สุนัดดา โยมญาติ, 2545)

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เห็ดเสม็ดน่าน I-2 เห็ดเสม็ดน่าน I-3 และเห็ดเสม็ดกระบี่ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 21 วัน เมื่อเปรียบเทียบความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีพบว่าเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยสูงกว่าเห็ดเสม็ดน่าน I-2 และเห็ดเสม็ดน่าน I-3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่มีค่า 5.77 เซนติเมตร และความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์น่าน I-2 และน่าน I-3 มีค่า 1.75 เซนติเมตรและ 1.97 เซนติเมตร ตามลำดับ

เมื่อนำเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่มาทดสอบการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ชนิด ได้แก่ potato dextrose broth (PDB), modified Melin-Norkrans broth (MMN) และ malt extract broth (MEB) ปริมาณ 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 16 วัน แล้วเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งพบว่าเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุด คือ 0.6772 กรัม ส่วนน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB และ MMN มีค่า 0.3293 กรัมและ 0.2411 กรัม ตามลำดับ

จากการนำหัวเชื้อราเอคโตไมคอไรซาเห็ดเสม็ดที่ใช้เส้นใยเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB ทดสอบการติดเชื้อเข้าสู่รากในกล้าไม้ยูคาลิปตัสเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าราเอคโตไมคอไรซาเห็ดเสม็ดสามารถเกิดการติดเชื้อเข้าสู่รากยูคาลิปตัสได้ถึง 65.3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดควบคุมไม่พบการติดเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซา และเมื่อทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้หัวเชื้อจากเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MEA และหัวเชื้อจากเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MMN พบว่าร้อยละของการติดเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดในรากกล้าไม้ยูคาลิปตัสเท่ากับ 53.0 เปอร์เซ็นต์ และ 45.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ดังนั้นราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB จึงเหมาะนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อสำหรับส่งเสริมการปลูกกล้าไม้ยูคาลิปตัสในลำดับถัดไป

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดที่ใช้เห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB ไปปลูกร่วมกับกล้าไม้ยูคาลิปตัส เพื่อกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้ยูคาลิปตัสและได้ผลพลอยได้เป็นดอกเห็ดเสม็ดที่สามารถรับประทานและจำหน่ายได้

6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

ควรมีการศึกษาผลของการติดเชื้อราเอคโตไมคอไรซาเห็ดเสม็ดต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้ายูคาลิปตัสเพิ่มเติม รวมถึงทดสอบการติดเชื้อและการเจริญของกล้ายูคาลิปตัสในแปลงปลูก เนื่องจากผลการทดลองในเรือนเพาะชำไม่สามารถแสดงผลที่แท้จริงเมื่ออยู่ในสภาพธรรมชาติ

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมป่าไม้. 2556. ยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส. Retrieved from http://forestinfo.forest.go.th/pdf/Files/FileEBook/EB5.pdf

กรมป่าไม้. 2561. แนวทางปฏิบัติกิจกรรมส่งเสริมปลูกไม้เศรษฐกิจในที่ดินของเอกชนเพื่อพัฒนาอาชีพและรายได้ประชาชน ประจำปีงบประมาณ 2561. Retrieved from http://forestinfo.forest.go.th/Download/DL188.doc

กรมวิชาการเกษตร. 2562. ยูคาลิปตัส. Retrieved from http://www.doa.go.th/pibai/pibai/n11/v_11-mar/ceaksong.html

กิตติมา ด้วงแค, วินันท์ดา หิมะมาน และจันจิรา อายะวงศ์. 2548. เอคโตไมคอร์ไรซ่ากับการควบคุมโรคเน่าคอดินของกล้าไม้ยูคาลิปตัส. จุลชีววิทยาป่าไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. Retrieved from http://www.ts.coj.go.th/doc/data/ts/ts_1463540212.pdf

จิตรตรา เพียภูเขียว. 2560. การใช้เห็ดไมคอร์ไรซาเพิ่มประสิทธิภาพการปลูกป่าไม้วงศ์ยาง. กรุงเทพมหานคร. สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ.

เชาวณี อ้นลำพูน. 2554. ผลของหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *Russula* spp. ต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้รัง *Shorea siamensis* Miq.. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประเสริฐ สุดใหม่. 2550. ยูคาลิปตัส ไม้เศรษฐกิจ สถานการณ์การผลิต ความต้องการ และการตลาดเป็นอย่างไร. Retrieved from https://www.thaigreenagro.com/ยูคาลิปตัส-ไม้เศรษฐกิจ-ส/

ลัดดาวัลย์ แก้วส่งแสง, เตือนใจ ปิยัง, สุวิทย์ จิตรภักดี, สุดคนึง ณ ระนอง, พิณทิพย์ จันทรเทพ และอมรรัตน์ อังอัจฉะริยะ. 2561. พฤติกรรมการเก็บและทัศนคติการอนุรักษ์เห็ดเสม็ดของชาวบ้านในพื้นที่ อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 20(2): 193-205.

วรณิสร์ กลิ่นทอง. 2553. ผลของหัวเชื้อเส้นใยเห็ดเผาะ *Astraeus* spp. ต่อการสร้างไมคอร์ไรซาและการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ยางนา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สายสมร ลำยอง. 2557. การพัฒนาหัวเชื้อไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมเพื่อส่งเสริมการเจริญของยูคาลิปตัสที่ปลูกเป็นการค้า. กรุงเทพมหานคร. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

สุนัดดา โยมญาติ. 2545. ผลของราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาและราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. สายพันธุ์คัดตัดต่อการกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้ยูคาลิปตัส *Eucalyptus camaldulensis*. วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อมรรัตน์ อังอัจฉะริยะ, อาคม ขัดฝั้น และ ดวงใจ ส่งเสริม. 2561. คุณค่าทางโภชนาการของน้ำพริกเผาเห็ดเสม็ดและการประเมินการยอมรับของผู้บริโภคต่อไส้ขนมปังจากเห็ดเสม็ด. Walailak Procedia. 2018(2): st48

ภาษาอังกฤษ

Angajchariya, A., Naranong, S., Phichairat, D., Kaewsongsang, L., Phupong, W. and Mahae, N. 2017. Mycelial growth, antioxidant and antibacterial properties of *Boletus griseipurpureus* from South Thailand. Journal of Agricultural Technology. 13(4): 521-529.

Aungaudchariya, A., Bangrak, P., Dell, B., Lumyong, S. and Kamlangdee, N. 2012. Preliminary molecular identification of *Boletus griseipurpureus* Corner from Thailand and its nutritional value. Journal of Agricultural Technology. 8(6): 1991-1998.

Aungaudchariya, A., P. Bangrak, B. Dell, and N. Kamlangdee 2010. Genetic study of *Boletus grisipurpureus* from Melaleuca forest. In International Conference on Biotechnology and Healthy Living October 20-22. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand.

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

Chilvers, G. A., Lapeyrie, F. F., and Horan, D. P. 1987. Ectomycorrhizal vs. endomycorrhizal fungi within the same root system. New Phytologist. 90: 677-699.

Gong, M. Q., Chen, Y. L. and Zhong, C. L. 1997. The research and application of mycorrhizas. China Forestry Press.

Harley, J. L. and Smith, S. E. 1983. Mycorhizal symbiosis. London: Academic Press.

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

Kaewgrajang, T., Sangwani, U., Iwase, K., Kodama, M. and Yamato, M. 2013. Effect of ectomycorrhizal fungus *Astraeus odoratus* on *Dipterocapus alatus* seedling. Journal of Tropical Forest Science. 25: 200–205.

Lu, N., Yu, M., Cui, M., Luo, Z., Feng, Y., Cao, S., Sun, Y. and Li, Y. 2016. Effects of different ectomycorrhizal fungal inoculates on the growth of *Pinus tabulaeformis* seedlings under greenhouse conditions. Forests. 7: 310.

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

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

Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R. and Anthony, S. 2009. *Eucalyptus camaldulensis*. Agroforestree Database 4.0. 2019: 1-5.

Seehanan, S. and Petcharat, V. 2008. Some species of wild boletes in Thailand. Journal of Agricultural Science and Technology. 4: 109-118.

Smith, S.E., Read, D.J. 2008. A survey of mycorrhizal infection in an Amazonian rain forest. Acta Amazonica. 10:527–533.

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

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 2 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง potato dextrose agar (PDA)
   - มันฝรั่ง 200 กรัม
   - น้ำตาลเดกโทรส (dextrose) 15 กรัม
   - ผงวุ้น (agar) 15 กรัม
   - น้ำกลั่น (distilled water) 1,000 มิลลิลิตร

   นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว potato dextrose broth (PDB)
   - มันฝรั่ง 200 กรัม
   - น้ำตาลเดกโทรส (dextrose) 15 กรัม
   - น้ำกลั่น (distilled water) 1,000 มิลลิลิตร

   นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว modified Melin-Norkrans broth (MMN)
   - Malt extract 3 กรัม
   - Glucose 20 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 1,000 มิลลิลิตร

   นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว malt extract broth (MEB)

- Malt extract 20 กรัม
- Peptone 1 กรัม
- น้ำตาลเดกโทรส (dextrose) 20 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

ภาคผนวกที่ 3 การเจริญเติบโตของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA

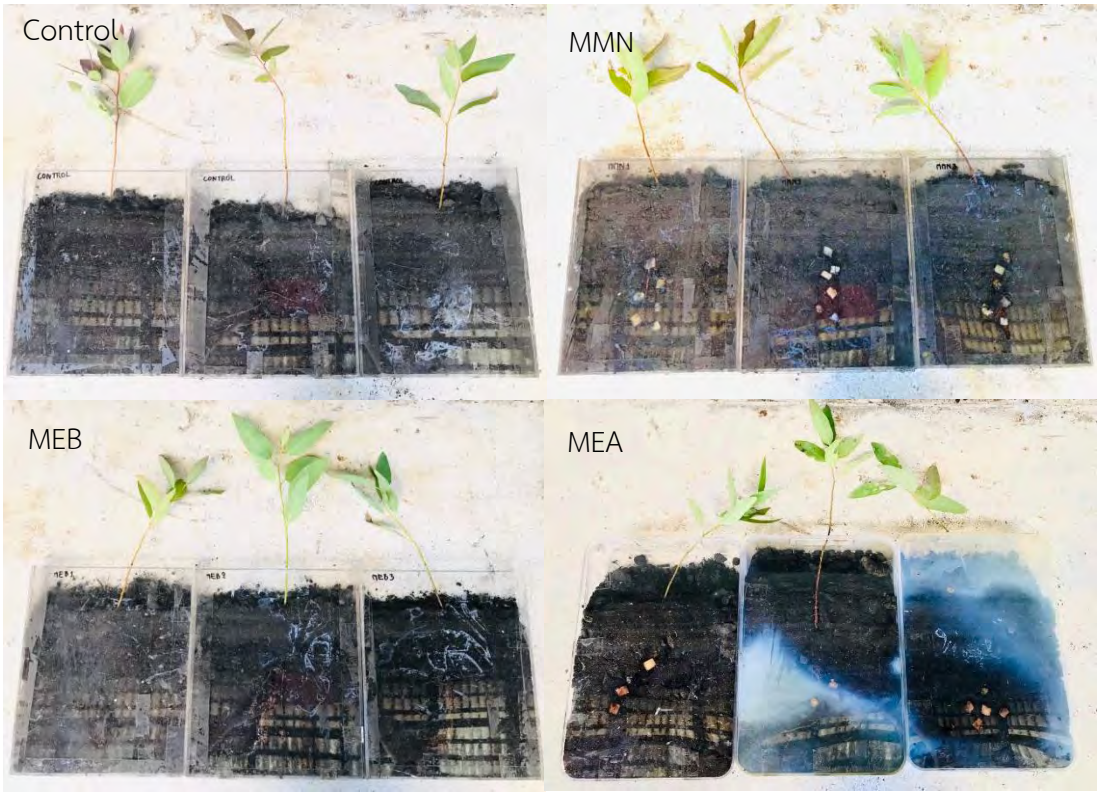
	ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)		
วันที่	น่าน I-2	น่าน I-3	กระบี่
0	0.5	0.5	0.5
3	0.58	0.70	1.45
6	0.78	1.02	2.80
9	1.07	1.12	3.58
12	1.32	1.43	4.10
15	1.55	1.64	4.88
18	1.60	1.79	5.43
21	1.75[a]	1.97[a]	5.77[b]

อักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ภาคผนวกที่ 4 เส้นใยราเอคโตไมคอไรซาเห็ดเสม็ดสายพันธุ์กระบี่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 16 วัน

PDA MMN MEB

ภาคผนวกที่ 5 ต้นกล้ายูคาลิปตัสในชุดการทดลองต่างๆ



ภาคผนวกที่ 6 รากยูคาลิปตัสหลังจากใส่หัวเชื้อเป็นเวลา 2 เดือน