โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ **ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเอ็กโทไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ตะเคียนทอง** (*Hopea odorata* Roxb.) **พะยอม** (*Shorea roxburghii* G. Don) **และยางนา** (*Dipterocarpus alatus* Roxb.)

Morphological characters of ectomycorrhizal roots in *Hopea odorata* Roxb., *Shorea roxburghii* G. Don and *Dipterocarpus alatus* Roxb. seedlings.

ชื่อนิสิต นายพบธรรม โกศลวัฒนา **เลขประจำตัว** 5832129823

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเอ็กโทไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ตะเคียนทอง (*Hopea odorata* Roxb.) พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) และยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb.)

นาย พบธรรม โกศลวัฒนา

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

Morphological characters of ectomycorrhizal roots in *Hopea odorata* Roxb., *Shorea roxburghii* G. Don and *Dipterocarpus alatus* Roxb. seedlings.

Mister Phobthum Kosolwattana

This Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirement

For the Degree of Bachelor of Science in Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2018

ชื่อโครงงาน	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ตะเคียนทอง (*Hopea odorata* Roxb.), พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) และยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb.)
ชื่อนิสิต	นาย พบธรรม โกศลวัฒนา
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของภาคการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี)

ชื่อโครงงาน ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ตะเคียนทอง (*Hopea odorata* Roxb.), พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) และยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb.)

ชื่อนิสิต นาย พบธรรม โกศลวัฒนา

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซานับเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการจำแนกกลุ่มราเอ็กโทไมคอร์ไรซา โครงงานวิจัยนี้จึงวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการพัฒนาของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus*) เห็ดน้ำหมาก (*Russula sanguinaria*) และเห็ดระโงกเหลือง (*Amanita javanica*) ในกล้าไม้ตะเคียนทอง (*Hopea odorata*) พะยอม (*Shorea roxburghii*) และยางนา (*Dipterocarpus alatus*) จากการเติมหัวเชื้อราเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนัง เห็ดน้ำหมาก และเห็ดระโงกเหลืองให้กับกล้าไม้ พบว่าเห็ดเผาะหนังสามารถสร้างเอ็กโทไมคอร์ไรซากับรากกล้าไม้ทดสอบทั้ง 3 ชนิด ภายในเวลา 2 เดือน โดยพบรูปแบบของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาแบบ irregular, unbranched และ dichotomous ในกล้าไม้ยางนา รูปแบบ monopodial pinnate และ irregular ในกล้าไม้พะยอม และรูปแบบ monopodial pinnate และ unbranched ในกล้าไม้ตะเคียนทอง สำหรับต้นกล้าไม้ที่ใส่หัวเชื้อเห็ดน้ำหมากพบการสร้างเอ็กโทไมคอร์ไรซากับรากกล้าไม้ยางนาเท่านั้น โดยมีรูปแบบของรากเป็นแบบ unbranched และไม่พบการสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในต้นกล้าไม้ที่ใส่หัวเชื้อเห็ดระโงกเหลือง จากการตรวจสอบชนิดของรากเอ็กไทไมคอร์ไรซาที่ได้ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS พบว่ารากเอ็กโทไมคอร์ไรซาที่ได้เป็นของเห็ดเผาะหนัง แต่รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาที่ได้จากการใส่หัวเชื้อเห็ดน้ำหมากนั้นเป็นรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาของราเอ็กโทไมคอร์ไรซาสกุล *Tomentella* และไม่พบการสร้างเอ็กโทไมคอร์ไรซาในรากต้นกล้าไม้ทุกชนิดในชุดการทดลองควบคุม

คำสำคัญ: เอ็กโทไมคอร์ไรซา, ไม้วงศ์ไม้ยาง, สัณฐานวิทยาราก

Project Title	Morphological characters of ectomycorrhizal roots in *Hopea odorata* Roxb., *Shorea roxburghii* G. Don and *Dipterocarpus alatus* Roxb. seedlings
Student name	Phobthum Kosolwattana
Major	Botany
Department	Botany
Advisor	Assistant Professor Dr. Jittra Piapukiew
Academic Year	2018

Abstract

Morphology of ectomycorrhizal root is the fundamental information for ectomycorrhizal fungi classification. The objective of this project was to study the morphology and development of ectomycorrhizal roots of *Hopea odorata*, *Shorea roxburghii* and *Dipterocarpus alatus* seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi *Astraeus odoratus*, *Russula sanguinaria* and *Amanita javanica*. The results showed that *A. odoratus* was able to form ectomycorrhizal with roots of all tested plant species within 2 months. The morphotypes of *D. alatus* ectomycorrhizal roots were irregular, unbranched and dichotomous. The morphotypes of *S. roxburghii* ectomycorrhizal roots were monopodial pinnate and irregular. The morphotypes of *H. odorata* ectomycorrhizal roots were monopodial pinnate and unbranched. Only *D. alatus* seedlings inoculated with *R. sanguinaria* formed ectomycorrhizal roots with unbranched morphotype and none of tested seedlings inoculated with *A. javanica* formed ectomycorrhiza. The molecular identification based on ITS sequence analysis of ectomycorrhizal roots confirmed that the ectomycorrhizal roots inoculated with *A. odoratus* were belonged to *A. odoratus*. but the ectomycorrhizal roots inoculated with *R. sanguinaria* were identified to ectomycorrhizal fungus *Tomentella*. Ectomycorrhizal formations were not found in control seedlings.

Key words: Ectomycorrhizae, Dipterocarpaceae, Root morphology

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจสอบแก้ไขโครงงานนี้ ตลอดจนคอยดูแล สนับสนุน และให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ เพื่อให้โครงงานนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ ผู้เอื้อเฟื้อให้ใช้เครื่อง freezing microtome และ amphibian and reptile research unit รวมถึงให้คำแนะนำแนวทางในการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคสำหรับการทดลองโครงงานนี้

ขอขอบพระคุณทุนส่งเสริมโครงงานวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนโครงงานวิทยาศาสตร์ และขอขอบพระคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทดลองโครงงานนี้

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกร้านอินเตอร์อลูมิเนียมทุกคนที่ให้กำลังใจ สนับสนุน และให้ความช่วยเหลือในการค้นหาดอกเห็ดสำหรับเป็นหัวเชื้อเอ็กโทไมคอร์ไรซา

ขอขอบคุณ นางสาวปวรายร์ ปาจิตร์ ที่ให้คำแนะนำเทคนิคในการเตรียมชุดการชุดลองสำหรับศึกษาพัฒนาการของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในกล้าไม้วงศ์ไม้ยาง และการระบุชนิดด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุล

ขอขอบคุณนางสาวพลอยรุ้ง แก้วศรีใส และสมาชิกในห้องปฏิบัติการราวิทยาทุกคน ที่ให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญภาพ.....ญ
สารบัญตาราง.....ฏ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 วัตถุประสงค์ของโครงงาน.....2
1.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร..... 3
2.1 ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza)..... 3
2.2 เอ็กโทไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza)..... 3
2.3 ไม้วงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae)..... 4
2.4 รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในไม้วงศ์ไม้ยาง..... 5
2.5 ตะเคียนทอง (*Hopea odorata* Roxb.)..... 6
2.6 พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don)..... 7
2.7 ยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb.)..... 8
2.8 ราเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ
(*Astraeus odoratus* Phosri, Watling, M.P. Martín & Whalley)..... 9
2.9 ราเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมาก (*Russula sanguinaria* (Schumach.) Rauschert).. 10
2.10 ราเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดระโงกเหลือง
(Amanita javanica (Corner & Bas) T. Oda, C. Tanaka & Tsuda)..... 11
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 12

หน้า

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน..... 14
3.1 อุปกรณ์และครุภัณฑ์ 14
3.1.1 เครื่องแก้ว……..……...……14
3.1.2 เครื่องมือ……...……14
3.1.3 ลูกยางและราเอ็กโทไมคอร์ไรซา……..……14
3.1.4 เครื่องแก้ว……..……...……14
3.1.5 วัสดุและอุปกรณ์อื่นๆ.....……...……15
3.2 สารเคมี……..……15
3.2.1 สารเคมีสำหรับการสกัดและเพิ่มปริมาณ DNA ……..……...……15
3.2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับการเตรียมตัวอย่างสำหรับตัดด้วย
เครื่อง freezing microtome ……..……...……15
3.3 วิธีการดำเนินงาน……..……..16
3.3.1 การเตรียมกล้าไม้วงศ์ไม้ยาง..... 16
3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อเอ็กโทไมคอร์ไรซา 16
3.3.3 การเติมหัวเชื้อราเอ็กโทไมคอร์ไรซาและการดูแลกล้าไม้..... 17
3.3.4 ศึกษาการพัฒนาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา...19
3.3.5 ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา.....19
3.3.6 การตรวจสอบชนิดรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา 19
3.3.6.1 การสกัด DNA จากดอกเห็ดและรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา
ด้วยวิธี CTAB 20
3.3.6.2 การเพิ่มชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง
Internal transcribed spacer (ITS) 20
3.3.6.3 การตรวจสอบชนิดของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาด้วยการวิเคราะห์
ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS 21

หน้า

บทที่ 4 ผลการดำเนินงาน..... 22
4.1 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา ในกล้าไม้ยางนา 22
4.1.1 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา เห็ดเผาะหนังในกล้าไม้ยางนา……..……..……...……22
4.1.2 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา เห็ดน้ำหมากในกล้าไม้ยางนา……..……..……...……24
4.1.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากกล้าไม้ยางนาชุดควบคุม.....…..…26
4.2 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา ในกล้าไม้ตะเคียน……26
4.2.1 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา เห็ดเผาะหนังในกล้าไม้ตะเคียน……..……..……..……26
4.2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากกล้าไม้ตะเคียนชุดควบคุม.....……28
4.3 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา ในกล้าไม้พะยอม……29
4.3.1 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา เห็ดเผาะหนังในกล้าไม้พะยอม……..……..……..……..29
4.3.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากกล้าไม้พะยอมชุดควบคุม…...…31
4.4 ตรวจสอบชนิดรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา ด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล……...32
บทที่ 5 อภิปรายผลการดำเนินงานและสรุปผล……..……..33
เอกสารอ้างอิง……35
ภาคผนวก……..……39

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ต้นตะเคียนทอง (อภิชาติ รัตนวิระกุล, 2546) 6
ภาพที่ 2.2 ต้นพะยอม (อภิชาติ รัตนวิระกุล, 2546) 7
ภาพที่ 2.3 ต้นยางนา (อภิชาติ รัตนวิระกุล, 2546) 8
ภาพที่ 2.4 ราเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนัง 9
ภาพที่ 2.5 ราเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมาก 10
ภาพที่ 2.6 ราเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดระโงกเหลือง 11
ภาพที่ 3.1 ต้นกล้าไม้วงศ์ไม้ยางอายุ 1 เดือนที่เพาะจากผลที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิว 16
ภาพที่ 3.2 เห็ดน้ำหมาก (*R. sanguinaria*) และเห็ดเอ็กโทไมคอร์ไรซาอื่นๆในตลาดสด 16
ภาพที่ 3.3 หัวเชื้อเอ็กโทไมคอร์ไรซาจากดอกเห็ดน้ำหมาก (*R. sanguinaria*)……..……17
ภาพที่ 3.4 เส้นใยเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) บนอาหาร Potato Dextrose Agar อายุ 3 สัปดาห์..17
ภาพที่ 3.5 ลักษณะการเติมหัวเชื้อราเอ็กโทไมคอร์ไรซาให้กับต้นกล้าไม้วงศ์ไม้ยาง
ในกล่อง rhizobox ……..……..18
ภาพที่ 3.6 ลักษณะต้นกล้าในกล่อง rhizobox ที่ผ่านการห่ออลูมิเนียมฟอยล์
จัดเรียงบริเวณเรือนต้นไม้ ภาควิชาพฤกษศาสตร์…….……...…..18
ภาพที่ 4.1 พัฒนาการของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากยางนา หลังจากการเติม
เชื้อลงในกล่อง rhizobox..... 23
ภาพที่ 4.2 พัฒนาการของ sclerotium และ rhizomorph ของเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับ
รากยางนา หลังจากการเติมเชื้อลงในกล่อง rhizobox 23
ภาพที่ 4.3 รูปแบบสัณฐานที่พบในรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากยางนา..... 23
ภาพที่ 4.4 ลักษณะกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังในกล้าไม้ยางนา 24
ภาพที่ 4.5 พัฒนาการของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมากกับรากยางนา หลังจากการเติม
เชื้อลงในกล่อง rhizobox..... 25
ภาพที่ 4.6 รูปแบบสัณฐานที่พบในรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมากกับรากยางนา 25
ภาพที่ 4.7 ลักษณะกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมากในกล้าไม้ยางนา..... 25
ภาพที่ 4.8 รากแขนงของต้นกล้ายางนาในชุดควบคุม..... 26
ภาพที่ 4.9 พัฒนาการของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากตะเคียน หลังจากการเติม
เชื้อลงในกล่อง rhizobox..... 27

หน้า

ภาพที่ 4.10 พัฒนาการของ sclerotium และ rhizomorph ของเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากตะเคียน หลังจากการเติมเชื้อลงในกล่อง rhizobox 27
ภาพที่ 4.11 รูปแบบสัณฐานที่พบในรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากตะเคียน 28
ภาพที่ 4.12 ลักษณะกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังในกล้าไม้ตะเคียน..... 28
ภาพที่ 4.13 รากแขนงของต้นกล้าตะเคียนในชุดควบคุม 29
ภาพที่ 4.14 พัฒนาการของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากพะยอม หลังจากการเติมเชื้อลงในกล่อง rhizobox..... 30
ภาพที่ 4.15 พัฒนาการของ sclerotium และ rhizomorph ของเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากพะยอม หลังจากการเติมเชื้อลงในกล่อง rhizobox 30
ภาพที่ 4.16 รูปแบบสัณฐานที่พบในรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากพะยอม 30
ภาพที่ 4.17 ลักษณะกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังในกล้าไม้พะยอม..... 31
ภาพที่ 4.18 รากแขนงของต้นกล้าพะยอมในชุดควบคุม 31

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 กล้าไม้และหัวเชื้อเอ็กโทไมคอร์ไรซาของแต่ละชุดการทดลอง 19
ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจสอบชนิดของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส
นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS……..……...32

บทที่ 1
บทนำ

ไมคอร์ไรซาเป็นความสัมพันธ์แบบพึ่งพาระหว่างราและพืชในบริเวณรากที่มีประวัติวิวัฒนาการร่วมกันมายาวนาน (Ducousso et al., 2004) โดยราได้รับสารอาหารที่พืชสังเคราะห์ด้วยแสงและพืชได้รับธาตุอาหารจำเป็น (Heijden, Marcel and Sanders, 2002; Smith and Read, 2008) ไมคอร์ไรซามีประโยชน์อื่นๆอีกหลายประการโดยเฉพาะ ช่วยขยายขอบเขตในการรับแร่ธาตุของรากพืช โดยเฉพาะแร่ธาตุอนินทรีย์ที่ลำเลียงได้ยาก ดังเช่น ฟอสฟอรัส (Brearley et al., 2004; Paoli, Curran and Zak, 2006) Read (1999) รายงานว่าจากชนิดพืชบกทั้งหมดกว่า 95% มีความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซากับรากลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง แม้ราส่วนใหญ่ที่เป็นไมคอร์ไรซาจะจัดอยู่ในกลุ่มอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Arbuscular mycorrhiza) ซึ่งจัดเป็นราในไฟลัม Glomeromycota (Béreau, Gazel and Garbaye, 1997; McGuire et al., 2008) แต่ในสังคมป่าธรรมชาติ ไม้ยืนต้นที่เป็นไม้เด่นหลายสกุลเกิดความสัมพันธ์แบบเอ็กโทไมคอร์ไรซากับราในไฟลัม Ascomycota และ Basidiomycota (Henkel, 2003; Peh, Lewis and Lloyd, 2011) ปัจจุบันมีรายงานว่ามีรากว่า 7,000-10,000 ชนิด เป็นเอ็กโทไมคอร์ไรซากับรากพืช (Taylor and Alexander, 2005) และมีพืชอาศัยของราเอ็กโทไมคอร์ไรซากว่า 8,000 ชนิด (Smith and Read, 1997)

พืชไม้วงศ์ไม้ยางเป็นพืชเด่นในป่าแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทย (Newman, Burgess and Whitmore, 1998; Brearley et al., 2004) นอกจากเป็นพืชเด่นในทางนิเวศวิทยาแล้ว ไม้วงศ์ไม้ยางยังมีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกด้วย เพราะไม้ยางเป็นแหล่งผลิตของ ไม้ก่อสร้าง และยางไม้ (Shiva and Jantan, 1998) ปัจจุบันการลดปริมาณลงของไม้วงศ์ไม้ยางในป่าเขตร้อนแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทำให้ประเทศต่างๆมีมาตรการปลูกไม้ยางฟื้นฟูมากขึ้น ปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของไม้วงศ์ไม้ยางจึงเริ่มเป็นที่สนใจมากยิ่งขึ้น (Kettle, 2010) ถึงแม้ว่าเอ็กโทไมคอร์ไรซาจะเป็นปัจจัยทางชีวภาพที่สำคัญของไม้วงศ์ไม้ยางในการส่งเสริมการเจริญเติบโต แต่การศึกษาเอ็กโทไมคอร์ไรซาในไม้วงศ์นี้ยังคงมีน้อยมาก

ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคศาสตร์ของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในพืชอาศัยแต่ละชนิดเป็นข้อมูลสำคัญในการจำแนกราเอ็กโทไมคอร์ไรซา (Agerer, 1991; Miller, Koo and Molina, 1991) ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีการระบุชนิดด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล แต่การระบุชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยายังคงรวดเร็วกว่าและเหมาะสมสำหรับใช้ในภาคสนามหรือการจัดกลุ่มเบื้องต้น (Nugroho et al., 2010) ปัจจุบันฐานข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่เป็นไม้ในเขตอบอุ่นและเขตหนาว ในขณะที่ไม้วงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae) เช่น ยางนา ยางเหียง เต็ง รัง พะยอม ตะเคียนทอง พลวง เป็นต้น มีความสัมพันธ์แบบเอ็กโทไมคอร์ไรซากับราหลายชนิดซึ่งสร้างดอกเห็ดรับประทานได้ เป็นแหล่งรายได้และแหล่งอาหารตามฤดูกาลของประชาชนท้องถิ่น เช่น เห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus*)

เห็ดน้ำหมาก (*Russula sanguinaria*) และเห็ดระโงกเหลือง (*Amanita javanica*) (อนิวรรต เฉลิมพงษ์ และ ธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ, 2524; 2525) เป็นต้น ยังไม่มีรายงานข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการพัฒนารากเอ็กโทไมคอร์ไรซาที่เป็นระบบ ทำให้ระบุชนิดหรือประเภทของราโดยใช้รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาได้ยากและขาดข้อมูลในการอ้างอิงที่ถูกต้อง โครงงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาการพัฒนาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากเอ็กโท-ไมคอร์ไรซาดังกล่าวเพื่อเป็นฐานข้อมูลประกอบการศึกษารากเอ็กโทไมคอร์-ไรซาในไม้วงศ์ไม้ยางต่อไป

1.1 วัตถุประสงค์

ศึกษาการพัฒนาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาของเห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus* Phosri, Watling, M.P. Martín & Whalley), เห็ดน้ำหมาก (*Russula sanguinaria* (Schumach.) Rauschert) และเห็ดระโงกเหลือง (*Amanita javanica (Corner & Bas) T. Oda, C. Tanaka & Tsuda*) ในกล้าไม้ตะเคียนทอง (*Hopea odorata* Roxb.) พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) และยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb.)

1.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลการพัฒนาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาประกอบการศึกษาราเอ็กโทไมคอร์ไรซาในไม้วงศ์ไม้ยางของประเทศไทย

บทที่ 2
ตรวจสอบเอกสาร

2.1 ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza)

ไมคอร์ไรซา (Mycorrhiza) เป็นคำภาษากรีก ซึ่ง mike แปลว่า รา และ rhiza แปลว่า ราก คือ ความสัมพันธ์แบบพึ่งพาระหว่างราไม่ก่อโรคและรากพืช (หรืออวัยวะอื่นของพืชที่สัมผัสดิน) ซึ่งมีหน้าที่หลัก คือการแลกเปลี่ยนสาร โดยพืชได้รับน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็นจากรา ส่วนราได้รับแป้ง น้ำตาลและวิตามินจากพืช (Smith and Read, 2008)

Brundrett (2004) ได้แบ่งไมคอร์ไรซาออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ คือ อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (VAM: Arbuscular mycorrhiza), เอ็กโทไมคอร์ไรซา (ECM: Ectomycorrhiza), ออร์คิดไมคอร์ไรซา (Orchid mycorrhiza), อิริคอยด์ไมคอร์ไรซา (Ericoid mycorrhiza) และ ซับอีพิเดอร์มอลไมคอร์ไรซา (Sub-epidermal mycorrhiza)

2.2 เอ็กโทไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza)

เอ็กไทไมคอร์ไรซาเป็นไมคอร์ไรซาชนิดหนึ่งที่เส้นใยราจะสานปกคลุมรากแขนง เส้นใยที่เป็นแผ่นอัดแน่นอยู่ภายนอกของรากแขนงจะเรียกว่า แผ่นแมนเทิล (mantle) และเส้นใยส่วนที่เจริญเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิสกับเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ของรากพืชสานกันเป็นร่างแหเรียกว่าใยฮาร์ติก (hartig net) (Smith and Read, 2008) โดยราที่มีความสัมพันธ์นี้ส่วนใหญ่เป็นราในไฟลัม Basidiomycota และบางส่วนในไฟลัม Ascomycota (Peh, Lewis and Lloyd, 2011) รากพืชที่มีเอ็กโทไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างไปจากเดิม รากพืชที่ติดเชื้อราเอ็กโทไมคอร์ไรซาจะลดการสร้างขนรากและลดความยาวของรากแขนง แต่จะเพิ่มจำนวนรากแขนงมากขึ้น (Brundrett et al., 1996) โดยรูปแบบการแตกแขนงเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชอาศัยและชนิดของรา (Dames, Straker and Scholes, 1999) ราเอ็กโท-ไมคอร์ไรซามีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ เช่น ช่วยฟื้นฟูป่าจากความสามารถในการลำเลียงธาตุอาหารจำเป็นโดยเฉพาะฟอสฟอรัสซึ่งมักเป็นปัจจัยจำกัดในธรรมชาติ (Pedersen and Sylvia, 1996; Smith and Read, 2008) นอกจากนี้ยังป้องกันรากพืชจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (Tsantrizos et al., 1991) ทำให้พืชทนต่อสภาวะเครียดทางกายภาพ เช่น โลหะหนักในดิน มากขึ้น (Jones and Hutchinson, 1986) ช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ เป็นแหล่งอาหารของสัตว์และเป็นรายได้ของประชาชนท้องถิ่น

2.3 ไม้วงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae)

ไม้วงศ์ไม้ยางเป็นวงศ์ของพืชดอก (Angiosperm) กลุ่มที่มีกลีบดอกเชื่อมติดกัน (Gamopetalae) ประกอบไปด้วย 16 สกุลและมีชนิดที่เป็นที่รู้จักและได้รับการตั้งชื่อ 695 ชนิด (Christenhusz and Byng, 2016). *Dipterocarpus* เป็นคำภาษากรีก ซึ่ง di แปลว่า สอง pteron แปลว่า ปีก และ karpos แปลว่า ผล จึงแปลความหมายได้ว่า ผลที่มีปีกคู่ ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของพืชในวงศ์ที่มีปีก 2 ปีกจากกลีบเลี้ยงของดอก ช่วยในการลอยลมเพิ่มขอบเขตในการกระจายพันธุ์

พืชในวงศ์เป็นไม้ยืนต้นทั้งหมด ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงตัวแบบ alternate ขอบใบเรียบมี stipule (bud scale) ผลเป็นชนิด capsule หรือ nut มักไม่แตกเมื่อโตเต็มที่ มีปีกขนาดใหญ่ที่มาจากกลีบเลี้ยง เรียกผลรวมปีกว่า Samaroid ไม้วงศ์ไม้ยางมีการแพร่กระจายทั่วทุกเขตร้อน พบได้ทั้งในอเมริกา แอฟริกา อินเดีย หมู่เกาะเขตร้อน และมีความหลากหลายมากที่สุดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Gardner, Sidisunthorn and Lai, 2011) โดยพืชสกุล *Dipterocarpus*, *Hopea* และ *Shorea* เป็นสกุลที่มีความหลากหลายของชนิดสูงที่สุดภายในวงศ์ Dipterocarpaceae (Ashton, 2004)

ไม้วงศ์ไม้ยางเป็นพันธุ์ไม้ที่ประชาชนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากที่สุดวงศ์หนึ่ง เพราะประกอบไปด้วยพันธุ์ไม้ที่มีคุณสมบัติเฉพาะ มีความหลากหลายตรงกับความต้องการใช้งาน ทั้งเป็นวัตถุดิบของโรงงานอุตสาหกรรมทำเครื่องเรือน การเกษตร การก่อสร้างที่ต้องรองรับน้ำหนักมากๆ และเครื่องมือการคมนาคม เช่น หมอนรถไฟ ตัวถังรถยนต์ เรือขุด เป็นต้น พรรณไม้วงศ์ยางเป็นสังคมพืชที่เอื้ออำนวยต่อการรักษาสภาพแวดล้อม เพราะมีความลดหลั่นในเชิงความสูงและความกว้างของเรือนยอด จึงช่วยปกป้องความร้อนความหนาว ควบคุมแสงแดดและการระเหยของน้ำจากผิวดินได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้บนพื้นดินภายใต้ร่มเงายังเป็นที่เกิดของเห็ดที่ประชาชนนามาบริโภคได้หลายชนิดตามฤดูกาล พรรณไม้วงศ์ยางสามารถกระจายแพร่พันธุ์ตามสภาพภูมิประเทศได้อย่างกว้างขวาง ทั้งในที่ชื้นที่น้ำท่วมขังไปจนถึงที่แห้งแล้งจัดที่สภาพดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ จึงกล่าวได้ว่าพรรณไม้วงศ์ไม้ยางมีความสำคัญกับวิถีชีวิตของคนไทย มีและศักยภาพในการนำไปพัฒนาด้านอื่นๆในอนาคต (อุทัยวรรณ แสงวณิช และคณะ, 2559)

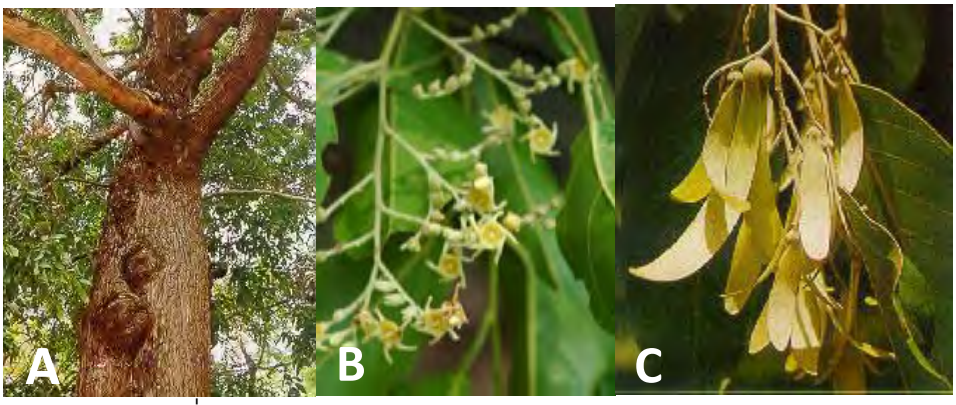
2.4 รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในไม้วงศ์ไม้ยาง

ความสัมพันธ์แบบเอ็กไทไมคอร์ไรซาในไม้วงศ์ยางพบครั้งแรกในปี ค.ศ 1920 (Smits, 1992) และ Peterson, Massicotte และ Melville (2004) กล่าวว่า พรรณไม้วงศ์ยางแทบทุกชนิดมีความสัมพันธ์แบบเอ็กไทไมคอร์ไรซา

สำหรับงานวิจัยในประเทศไทย ชนิดของไม้วงศ์ยางที่มีความสัมพันธ์แบบเอ็กไทไมคอร์ไรซามีหลายชนิดเช่นเดียวกับที่มีการรายงานในประเทศอื่นๆ โดย อนิวรรต เฉลิมพงษ์ และ ธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ (2524; 2525) และ Chalermpongse (1995) ได้ทำการสำรวจไม้วงศ์ยางในป่าเต็งรัง ป่าดิบแล้ง และป่าเบญจพรรณ พบว่าไม้วงศ์ยาง 11 ชนิดมีความสัมพันธ์แบบเอ็กไทไมคอร์ไรซา ได้แก่ ยางนา (*Dipterocarpus alatus*) เหียง (*D. obtusifolius*) พลวง (*D. tuberculatus*) กราด (*D. intricatus*) ยางปาย (*D. costatus*) เต็ง (*Shorea obtusa*) พะยอม (*S. roxburghii*) รัง (*S. siamensis*) เคี่ยมคะนอง (*S. henryana*) ตะเคียนทอง (*H. odorata*) และตะเคียนหิน (*H. ferrea*)

เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาสามารถแตกต่างกันได้จากทั้งระหว่างราสองชนิดบนพืชอาศัยสกุลเดียวกัน และราชนิดเดียวกันบนพืชอาศัยต่างสกุล (Dames, Straker and Scholes, 1999) ลักษณะทางสัณฐานวิทยารวมถึงกายวิภาคจึงสามารถใช้ในการจำแนกชนิดราเอ็กโทไมคอร์ไรซาได้ (Agerer, 1991) ในปัจจุบันมีฐานข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมคำอธิบายรูปวิธานของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดเพียงพืชในเขตอบอุ่นเท่านั้น แม้จะมีรายงานการนำรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในไม้วงศ์ไม้ยางมาบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตัดเพื่อศึกษาลักษณะทางกายวิภาคในหลายๆงานวิจัย (ทนุวงศ์ แสงเทียน, 2534; อุทัยวรรณ แสงวณิช และคณะ, 2559) แต่ข้อมูลที่ได้ก็ยังไม่เพียงพอและขาดการรวบรวมอย่างเป็นระบบเพื่อใช้เป็นรูปวิธานที่สามารถใช้งานได้จริงในอนาคต

2.5 ตะเคียนทอง (*Hopea odorata* Roxb.)



ภาพที่ 2.1 ต้นตะเคียนทอง (A: ลักษณะวิสัย, B: ดอก, C: ผล)

อนุกรมวิธานของ *H. odorata*

Kingdom: Plantae

Division: Angiosperms

Class: Magnoliopsida

Order: Theales

Family: Dipterocarpaceae

Genus: *Hopea*

Species: *Hopea odorata*

ตะเคียนทองเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่สูงประมาณ 20 - 40 เมตร พบได้ในป่าไม่ผลัดใบของประเทศไทย เป็นไม้ไม่ผลัดใบในป่าดงดิบขึ้นเป็นหมู่กระจัดกระจายอยู่ตามที่ราบหรือค่อนข้างราบใกล้ฝั่งแม่น้ำ เรือนยอดเป็นพุ่มทึบกลม เปลือกหนาสีน้ำตาลดำ ใบเป็นชนิดใบเดี่ยวรูปไข่แกมรูปหอกหรือรูปดาบ ขนาด 3–6 x 10-15 เซนติเมตร เนื้อใบค่อนข้างหนา ปลายใบเรียว โคนใบมนป้านและเบี้ยว หลังใบมีคุ่มคอมเมเซียเกลี้ยงๆ อยู่ตามง่ามแขนงใบ เส้นแขนงใบมี 9-13 คู่ ปลายโค้งแต่ไม่จรดกันดอกสีขาว มีขนาดเล็ก ออกเป็นช่อยาวๆ ตามง่ามใบและปลายกิ่ง มีกลิ่นหอม ก้านช่อดอก ก้านดอกและกลีบรองกลีบดอกมีขนนุ่ม กลีบดอกและกลีบรองกลีบดอกมีอย่างละ 5 กลีบโคนกลีบเชื่อมติดกัน ผลกลมหรือรูปไข่เกลี้ยง ปลายมนเป็นติ่งคล้ายหนามแหลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 ซม. ปีกยาว 1 คู่ รูปใบพาย ปลายปีกกว้างค่อยๆ เรียวสอบมาทางโคนปีก เส้นปีกตามยาวมี 7 เส้น ปีกสั้นมีความยาวไม่เกินความยาวตัวผล เนื้อไม้สีเหลืองหม่น หรือสีน้ำตาลอมเหลือง มักมีเส้นขาวหรือเทาขาวผ่านเสมอ ซึ่งเป็นท่อน้ำมันหรือยาง เสี้ยนมักสน เนื้อละเอียด ปานกลาง แข็งเหนียว ตะเคียนทอง จัดเป็นไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื้อไม้ใช้ในการก่อสร้างอาคารบ้านเรือน สะพาน หมอนรองรางรถไฟ ตัวถังรถ เครื่องเรือนต่างๆ

(อภิชาติ รัตนวิระกุล, 2546)

2.6 **พะยอม** (*Shorea roxburghii* G. Don)

ภาพที่ 2.2 ต้นพะยอม (A: ลักษณะวิสัย, B: ดอก, C: ผล)

อนุกรมวิธานของ *S. roxburghii*

Kingdom: Plantae

Division: Angiosperms

Class: Magnoliopsida

Order: Theales

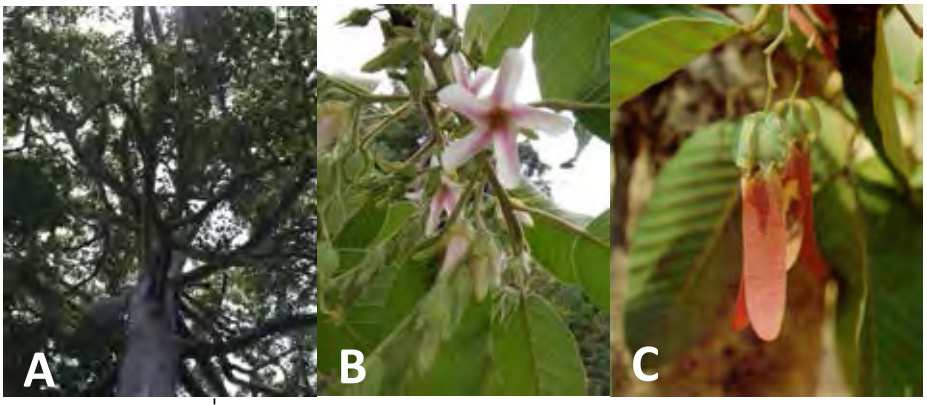
Family: Dipterocarpaceae

Genus: *Shorea*

Species: *Shorea roxburghii*

พะยอมเป็นไม้ยืนต้นผลัดใบ สูง 20–30 เมตร พบได้ในป่าเบญจพรรณแล้งและป่าดิบ ในประเทศไทยพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศ ที่ความสูงจากระดับทะเลปานกลาง 50–1200 เมตร เรือนยอดเป็นพุ่มกลม ลำต้นเปลาตรง เปลือกสีเทาคล้ำ แตกร่องและเป็นสะเก็ดหนา เปลือกในสีน้ำตาลแกมเหลือง ใบเดี่ยวเรียงสลับ แผ่นใบรูปขอบขนาน ถึงรูปรีแกมรูปขอบขนาน กว้าง 3.5–6 เซนติเมตร ยาว 9–13 เซนติเมตร ปลายใบเป็นติ่งแหลม โคนใบมน ผิวใบเกลี้ยงถึงมีขนนุ่มทางด้านล่าง เส้นแขนงใบ 14–16(–20) คู่ ก้านใบยาว 2–2.5 เซนติเมตร ดอกสีขาวนวลถึงเหลืองอ่อน กลิ่นหอมแรง ออกเป็นช่อตามกิ่งและปลายกิ่ง ผลกลมรี ถึงรูปไข่ปลายแหลม กว้างประมาณ 1.2 เซนติเมตร ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร มีปีกยาว 3 ปีก และปีกสั้น 2 ปีก เนื้อไม้สีเหลืองอ่อนถึงน้ำตาล ใช้ก่อสร้างทั่วไป เช่น เสา รอด ตง พื้น ฝา (อภิชาติ รัตนวิระกุล, 2546)

2.7 ยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb.)



ภาพที่ 2.3 ต้นยางนา (A: ลักษณะวิสัย, B: ดอก, C: ผล)

อนุกรมวิธานของ *D. alatus*

Kingdom: Plantae

Division: Angiosperms

Class: Magnoliopsida

Order: Theales

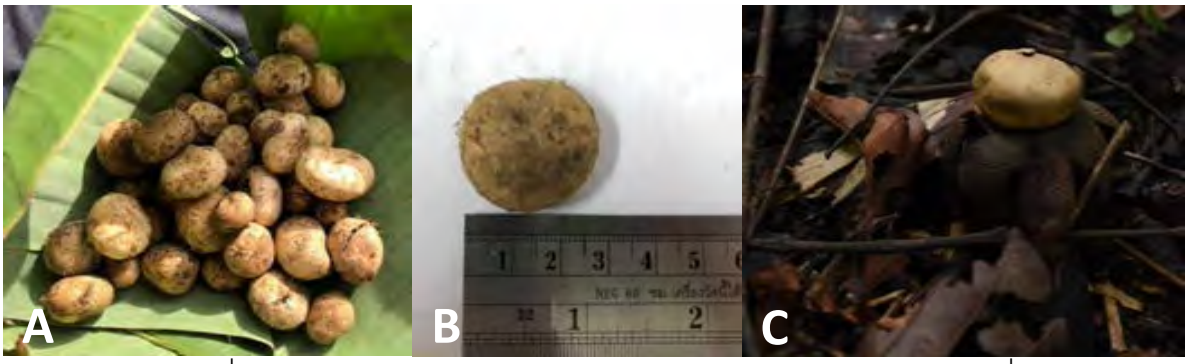
Family: Dipterocarpaceae

Genus: *Dipterocarpus*

Species: *Dipterocarpus alatus*

ยางนาเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ เมื่อโตเต็มที่สูงได้ถึง 40-50 เมตร พบได้ในป่าไม่ผลัดใบและป่าเต็งรัง ในประเทศไทยยางนามีการกระจายพันธุ์ในที่ลุ่มต่ำ ริมห้วย และตามหุบเขาทั่วทุกภาคของประเทศที่ความสูงที่ระดับน้ำทะเลปานกลางถึง 350 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่แกมรูปหอก ขนาดประมาณ 8-15 x 20-35 เซนติเมตร เนื้อใบหนาปลายใบสอบเรียว โคนใบเรียบ เส้นแขนงใบ 11-18 คู่ ก้านใบยาว 2.5-4.5 เซนติเมตร ดอกเป็นสีชมพูออกดอกเป็นช่อสั้นๆตามซอกใบและปลายกิ่ง กลีบรองกลีบดอกตอนโคนเชื่อมติดกันเป็นรูปถ้วยและมีครีบตามยาว 5 ครีบ ปลายแยกเป็น 5 แฉกยาว 2 แฉก สั้น 3 แฉก มีขนสั้นๆสีน้ำตาลคลุมทั่วไป กลีบดอกมี 5 กลีบ ผลมีลักษณะกลม มีครีบตามยาวตลอดผล 5 ครีบ ปียาว 2 ปีก ขนาด 3 x 14 เซนติเมตร ปีกสั้นสามปีกขนาด 12 x 14 มิลลิเมตร เนื้อไม้มีสีน้ำตาลแดงหรือสีน้ำตาลเทา เสี้ยนตรงเนื้อไม้หยาบ เนื้อแข็งปานกลาง นิยมนำมาเลื่อยทำฝาบ้าน ไม้ระแนง โครงหลังคา และเครื่องเรือนต่างๆ (อภิชาติ รัตนวิระกุล, 2546)

2.8 ราเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus* Phosri, Watling, M.P. Martín & Whalley)



ภาพที่ 2.4 ดอกเห็ดเผาะ (A,B: ดอกเห็ดอ่อน, C: ดอกเห็ดแก่และบานเต็มที่)

อนุกรมวิธานของ *A. odoratus*

Kingdom: Fungi

Division: Basidiomycota

Class: Agaricomycetes

Order: Boletales

Family: Diplocystaceae

Genus: *Astraeus*

Species: *A. odoratus*

ดอกเห็ดมีลักษณะกลมถึงค่อนข้างกลม ไม่มีก้านดอก เมื่อโตเต็มที่สามารถมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ถึง 65 มิลลิเมตร ดอกเห็ดมีกลิ่นแรงเหมือนดินชื้น ผนังด้านนอก (outer peridium) เรียบ มีสีน้ำตาลอ่อนๆ เมื่อแก่ผนังด้านนอกจะแตกเป็นแฉกประมาณ 3-9 แฉก ด้านในของผนังสีน้ำตาลเทา ผนังด้านใน (endoperidium) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 13-25 มิลลิเมตร มีการเปิดออกที่ apical มี gleba สีน้ำตาลปนม่วง เบสิดิโอสปอร์มีลักษณะกลมมีหนาม มีสีน้ำตาลปนม่วง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5-15.2 ไมโครเมตร มักพบดอกเห็ดในดินทรายหรือดินลูกรังในป่าเต็งรังภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กินได้ มีรสชาติอร่อย สามารถนำมาปรุงเป็นอาหารได้หลายอย่างมีราคาสูงในท้องตลาด (Phosri et al., 2004)

2.9 ราเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมาก (*Russula sanguinaria* (Schumach.) Rauschert)

ภาพที่ 2.5 ดอกเห็ดน้ำหมาก

อนุกรมวิธานของ *R. sanguinaria*

Kingdom: Fungi

Division: Basidiomycota

Class: Agaricomycetes

Order: Russulales

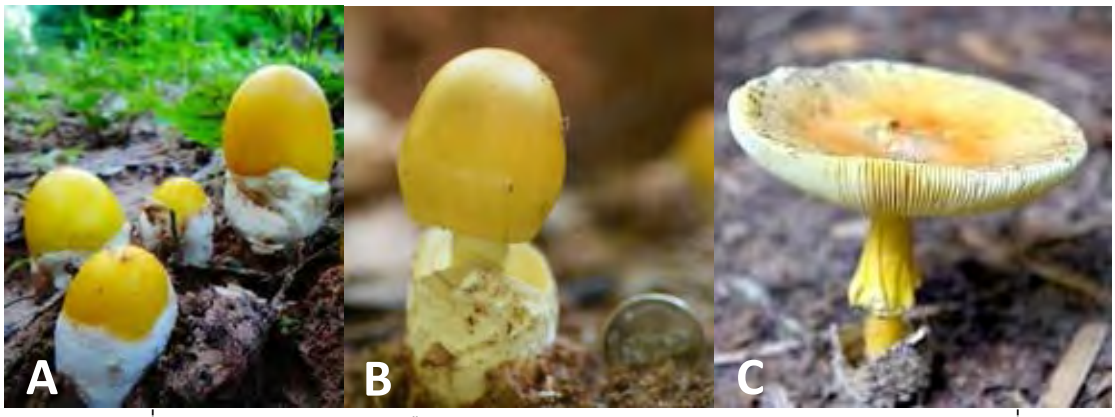
Family: Russulaceae

Genus: *Russula*

Species: *R. sanguinaria*

หมวกเห็ดมีขนาด 3-10 เซนติเมตร นูน กลางหมวกเป็นแอ่งเล็กน้อย เรียบ หนืดมือ ขอบงอลง สีแดงไปจนถึงชมพู ครีบติดก้าน กว้าง เรียบถี่ ขาวหรือเหลืองอ่อน ก้านมีขนาด 5-10 x 1-2 เซนติเมตร ทรงกระบอก มักมีรอยย่นยาวขาว เนื้อแน่นขาว เบสิดิโอสปอร์มีขนาด 7.5-12 x 6-9 ไมโครเมตร ทรงรียาว มีปุ่มนูนใหญ่และเส้นละเอียดเชื่อมเป็นตาข่ายรูห่าง อาศัยบนพื้นดินในป่าผลัดใบทั่วไป กินได้ (อนงค์ จันทร์ศรีกุล และคณะ, 2551)

2.10 ราเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดระโงกเหลือง (*Amanita javanica (Corner & Bas) T. Oda, C. Tanaka & Tsuda*)



ภาพที่ 2.6 ดอกเห็ดระโงกเหลือง (A,B: ดอกเห็ดอ่อน, C: ดอกเห็ดแก่และบานเต็มที่)

อนุกรมวิธานของ *A. javanica*

Kingdom: Fungi

Division: Basidiomycota

Class: Agaricomycetes

Subclass: Hymenomycetes

Order: Agaricales

Family: Amanitaceae

Genus: *Amanita*

Species: *A. javanica*

หมวกเห็ดมีขนาด 5-12 เซนติเมตร นูนแล้วแบน เรียบ ขอบเป็นคลื่นและริ้วสีเหลือง กลางหมวกสีเข้มกว่า ครีบไม่ติดก้าน เรียงห่างเล็กน้อยหรือชิดกันสีเหลืองอ่อนหรือเหลือง ก้านมีขนาด 8-15 x 0.5-2 เซนติเมตร ทรงกระบอก มีขนยาวสีเหลืองบางๆ กลวงเหลือง วงแหวนบางเหลือง เปลือกหุ้มดอกอ่อนรูปถ้วยสีขาว เนื้อสีเหลืองอ่อน เบสิดิโอสปอร์มีขนาด 7-9 x 5-7 ไมโครเมตร เรียบมีทรงรีกว้าง ผนังบาง ขาว บนกระดาษพิมพ์ อาศัยบนพื้นดินในป่าผลัดใบทั่วไป กินได้ (อนงค์ จันทร์ศรีกุล และคณะ, 2551)

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทนุวงศ์ แสงเทียน (2534) ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ดที่ขึ้นอยู่บริเวณใต้ต้นยางนา บริเวณสถานีฝึกนิสิต วนศาสตร์วังน้ำเขียว อำเภอปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา พบดอกเห็ดจำนวน 9 ชนิดที่คาดว่ามีความสัมพันธ์แบบเอ็กโทไมคอร์ไรซากับรากไม้ยางนา เห็ดส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Russula* และในป่าธรรมชาติรากของยางนาที่มีความสัมพันธ์แบบเอ็กโทไมคอร์ไรซามี 3 รูปแบบ คือ

รูปแบบที่ 1 รากมีสีน้ำตาลปนดำ ผิวเรียบ รูปสัณฐานแบบ monopodial-pinnate

รูปแบบที่ 2 รากมีสีเหลือง ผิวเรียบ รูปสัณฐานแบบ irregularpinnate

รูปแบบที่ 3 รากมีสีขาวปนเหลืองอ่อน ผิวหยาบ รูปสัณฐานแบบ monopodial-pinnate

จากนั้นได้ทำการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาด้วยวิธี pure culture ectomycorrhizal synthesis พบว่าเห็ด *A. hygrometricus* (Pers.) Morg., *Cenococcum geophilum* Fr. และ *P. tinctorius* (Pers.) Coker & Couch สามารถก่อให้เกิดรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาซาได้ สำหรับการเติบโตของกล้าไม้ยางนาที่มีและไม่มีราเอ็กโทไมคอร์ไรซาที่รากในสภาพเรือนเพาะชำ ได้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 ปลูกราเอ็กโทไมคอร์ไรซาให้กับกล้าไม้ด้วยดินเชื้อที่ได้จากบริเวณใต้ต้นยางนาในป่าธรรมชาติ และการทดลองที่ 2 ใช้ดินสีดานึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ดอกเห็ด 1 ใน 3 ชนิด ได้แก่ เห็ดตะไคล (*Russula aeruginea* Lindbl.) เห็ดน้ำแป้ง (*R. albida* Peck.) และเห็ดน้ำหมาก (*R. sanguinea* Fr.) โดยทั้งสองการทดลองมีกล้าไม้ที่ปลูกอยู่ในดินสีดานึ่งฆ่าเชื้อเป็นกล้าไม้เปรียบเทียบ พบว่ากล้าไม้ยางนาที่ปลูกในดินเชื้อ มีการเติบโตมากกว่ากล้าไม้ที่ปลูกในดินสีดานึ่งฆ่าเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกล้าไม้ยางนาที่ปลูกในดินสีดานึ่งฆ่าเชื้อที่ใส่ดอกเห็ดตะไคลมีการเติบโตมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ กล้าไม้ที่ปลูกในดินสีดานึ่งฆ่าเชื้อที่ใส่ดอกเห็ดน้ำหมาก ดอกเห็ดน้ำแป้ง และไม่ใส่ดอกเห็ดชนิดใดเลย ตามลำดับ

วสันณ์ และคณะ (2548) ได้จุ่มรากที่มีดินติดอยู่ของกล้ายางนาอายุ 3 ปี ลงในน้ำที่มีสปอร์เห็ดเผาะแขวนลอยอยู่ หลังจากนั้น 2 ปี พบว่าทุกรากเกิดรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา โดยเส้นใยที่พบมีสีน้ำตาลอ่อน มี clamp connection ซึ่งคล้ายกับเส้นใยเห็ดเผาะ แต่ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเส้นใยของเห็ดเผาะ เนื่องจากไม่พบดอกเห็ดขึ้นบริเวณรากยางนา นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะในสภาพการเลี้ยงที่แตกต่างกัน โดยปลูกเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดเผาะในขวดซึ่งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางนาไว้แล้ว พบว่าขวดที่อยู่ในสภาพที่มีกล้ายางนาเจริญอยู่ร่วมกับเห็ดเผาะนั้น เส้นใยเจริญได้เร็วกว่าในขวดที่ไม่มีต้นยางนาเจริญอยู่ถึงประมาณ 3 เท่า เส้นใยเห็ดเผาะเมื่อเจริญมาพบกับรากยางนาได้เจริญแนบไปกับรากและแตกแขนง เมื่อถึงบริเวณปลายรากเส้นใยมีการฟูออก

อุทัยวรรณ แสงวณิช และคณะ (2559) ได้ทดลองการตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกในวัสดุปลูก 2 สูตรต่อการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง คือ สูตร 1 พีทมอส:เวอร์มิคูไลท์:ทราย= 1:9:0

และสูตร 2 พีทมอส:เวอร์มิคูไลท์:ทราย = 2:7:1 เมื่อกล้าไม้พะยอมมีอายุครบ 8 เดือน พบรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเกิดขึ้นในกล้าไม้พะยอมทั้งที่ปลูกเชื้อและไม่ปลูกเชื้อ โดยมีรูปสัณฐานของรากทั้งหมด 3 แบบ

1. Monopodial pinnate สีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาลปนส้ม ผิวเรียบมีความมัน พบ rhizomorph สีน้ำตาลอ่อน เจริญพันกับราก ส่วนลักษณะทางกายวิภาคของรากนั้น มีแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยใสไม่มีสี เรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma หนา 20-40 ไมโครเมตร ประกอบด้วยเซลล์ขนาดใหญ่ เรียงตัวค่อนข้างหลวม มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้น

2. Irregular pinnate สีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลปนส้ม ผิวเรียบมีความมัน พบ rhizomorph สีน้ำตาลอ่อน เจริญพันกับราก และมี sclerotium สีน้ำตาลปนส้ม รูปทรงกลม ผิวเรียบเป็นมัน เกิดปนและกระจายรอบราก ส่วนลักษณะทางกายวิภาคของรากนั้น มีแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยใสไม่มีสี เรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma หนา 20-30 ไมโครเมตร มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้น พบ clamp connection

3. Unramified สีน้ำตาลปนส้ม ผิวเรียบมีความมัน พบ rhizomorph สีน้ำตาลอ่อน เจริญพันกับราก ส่วนลักษณะทางกายวิภาคของรากนั้น มีแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยใสไม่มีสี เรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma หนา 10-30 ไมโครเมตร มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้น

พบ rhizomorph และ sclerotium เป็นจำนวนมาก โดยวัสดุปลูกที่ต่างกันไม่มีผลต่อปริมาณรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา เมื่อนำเส้นใยเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกจากรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาและเม็ด sclerotium และรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1F และ ITS4 พบว่าชนิดของราที่อยู่ร่วมกับรากคือเห็ดเผาะหนัง จากการวิเคราะห์ข้อมูลการเติบโตทางสถิติพบว่า วิธีการปลูกเชื้อไม่ทำให้การเติบโตทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก ความสูง น้ำแห้งส่วนยอดและน้ำหนักแห้งรวมของกล้าไม้แตกต่างกัน แต่ทำให้น้ำหนักแห้งส่วนรากแตกต่างกัน โดยพบว่ากล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์มีน้ำหนักแห้งส่วนรากมากกว่ากล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยบริสุทธิ์และกล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อ สำหรับวัสดุปลูก 2 สูตร ไม่ทำให้กล้าไม้มีการเติบโตที่แตกต่างกันในทุกด้าน

Yuwa-Amornpitak และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายของราเอ็กโทไมคอร์ไรซาของไม้วงศ์ยางในประเทศไทย โดยเพิ่มปริมาณ ribosomal DNA ส่วนที่เรียกว่า Internal transcribed spacer (ITS) แล้วนำไปหาลำดับเบสเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกชนิดของราเอ็กโทไมคอร์ไรซา พบว่ารากไม้ยางนาที่นำมาทำการศึกษามีความสัมพันธ์แบบเอ็กโทไมคอร์ไรซากับรา 3 ชนิด คือ *Amanita virosa*, *Pisolithus* sp. และ *Tomentella* sp.

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน

3.1 อุปกรณ์และครุภัณฑ์

3.1.1 เครื่องแก้ว

1. บีกเกอร์ (beaker)
2. ขวดรูปชมพู่ (flask)
3. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
4. แท่งแก้วคนสาร (glass stirrer)
5. ขวดแก้ว Duran
6. Columbia jar

3.1.2 เครื่องมือ

1. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติรุ่น TP600 (authorize DNA thermal cycler)
2. ชุดตรวจสอบดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า (electrophoresis chamber set)
3. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
4. กล้องจุลทรรศน์สเตอรีโอ (stereomicroscope)
5. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound light microscope)
6. กล้องถ่ายรูปรุ่น Olympus omd em5 mark II + 12-40mm lens f/2.8
7. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแช่แข็ง (freezing microtome) Leica CM1850
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงแช่เย็น (refrigerated centrifuge)
9. เครื่องบดตัวอย่าง Micro smash (beads cell disrupter)
10. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-transilluminator)
11. กล้องถ่ายรูปวุ้น (Gel-doc)
12. เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสรุ่น ABI 3730XL DNA Analyzer

3.1.3 ลูกยางและราเอ็กโทไมคอร์ไรซา

1. ผลยางนา (*D. alatus*)
2. ผลพะยอม (*S. roxburghii*)
3. ผลตะเคียนทอง (*H. odorata*)
4. เส้นใยเห็ดเผาะ (*A. odoratus*) บนอาหารเลี้ยง potato dextrose agar
5. ดอกเห็ดระโงกเหลือง (*A. javanica*)
6. ดอกเห็ดน้ำหมาก (*R. sanguinaria*)

3.1.4 วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ

1. กล่อง rhizobox พลาสติกใสขนาด 16.7x32.5x2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ (foil)
3. ตะเกียงแอลกอฮอลล์
4. มีดคัตเตอร์
5. พีทมอส
6. เพอร์ไลท์
7. ตาข่ายไนลอน ความถี่ 104 ไมโครเมตร
8. ขาตั้งกล้องถ่ายรูปพร้อมสเกลเปรียบเทียบ
9. Microtube 1.5 มิลลิลิตร

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับการสกัดและเพิ่มปริมาณ DNA

1. Washing buffer
2. CTAB extraction buffer (2% cetyltrimethyl ammonium bromide, 1% polyvinyl pyrrolidone, 100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA)
3. Chloroform/isoamyl alcohol
4. Isopropanol
5. TE buffer
6. 70% Ethyl alcohol
7. EmeraldAmp GT PCR master mix 15
8. ไพรเมอร์ ITS-1F และ ITS4
9. Gel stain (GelStar)
10. Agarose

3.2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับการเตรียมตัวอย่างสำหรับตัดด้วยเครื่อง freezing microtome

1. Cryoprotectant Tissue-Tek
2. สีย้อม methylene blue

3.3 วิธีการดำเนินการ

3.3.1 การเตรียมกล้าไม้วงศ์ไม้ยาง

นำผลตะเคียนทอง (*H. odorata* Roxb.) พะยอม (*S. roxburghii* G. Don) และยางนา (*D. alatus* Roxb.) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณนพพร นนทภา นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ สาขาวิชาเภสัชเวทและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวตามวิธีการของ วรณิสร์ กลิ่นทอง (2553) โดยแช่ใน 5% Sodium Hypochlorite ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วนำไปเพาะเมล็ดบริเวณเรือนเพาะชำภาควิชาพฤกษศาสตร์ โดยใส่ในถุงเพาะชำถุงละ 1 ผล ที่บรรจุวัสดุปลูก เพอร์ไลท์:พีทมอส:ทราย อัตราส่วน 4:2:1 โดยปริมาตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูแลรดน้ำจนกล้าไม้อายุ 1 เดือน ดังแสดงในภาพที่ 3.1

ภาพที่ 3.1 ต้นกล้าไม้วงศ์ไม้ยางอายุ 1 เดือนที่เพาะจากผลที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิว

3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อเอ็กโทไมคอร์ไรซา

เก็บตัวอย่างดอกเห็ดน้ำหมากและเห็ดระโงกเหลืองจากตลาดสด บ้านหนองพะอง อำเภอชำนิ จังหวัดบุรีรัมย์ ดังแสดงในภาพที่ 3.2

ภาพที่ 3.2 เห็ดน้ำหมาก (*R. sanguinaria*) และเห็ดเอ็กโทไมคอร์ไรซาอื่นๆในตลาดสด

เตรียมหัวเชื้อเห็ดน้ำหมาก (*R. sanguinaria*) และเห็ดระโงกเหลือง (*A. javanica*) โดยใช้ส่วนของดอกเห็ดแก่และสปอร์ของเห็ด นำดินออกจากดอกเห็ดและทำความสะอาด ใช้เนื้อดอกเห็ด 20 กรัมปั่นต่อน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 200 มิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 3.3

ภาพที่ 3.3 หัวเชื้อเอ็กโทไมคอร์ไรซาจากดอกเห็ดน้ำหมาก (*R. sanguinaria*)
(A: นำดอกเห็ดที่ทำความสะอาดแล้วมาปั่นด้วยเครื่องปั่น, B: หัวเชื้อที่ได้จากดอกเห็ดบรรจุภายในบีกเกอร์เพื่อรอใส่เชื้อ)

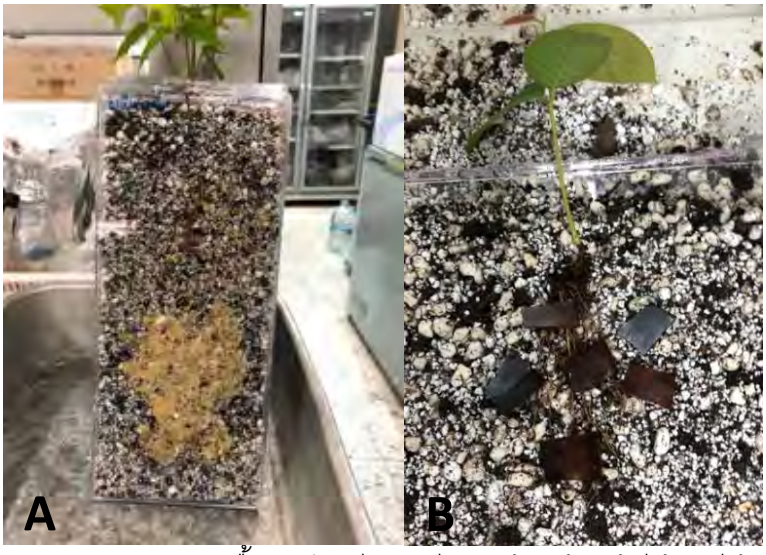
สำหรับเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) ใช้หัวเชื้อเส้นใยที่เจริญบนอาหาร Potato Dextrose Agar (ภาคผนวก ก) อายุ 3 สัปดาห์เป็นหัวเชื้อได้โดยตรง โดยความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 3.4 เส้นใยเห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) บนอาหาร Potato Dextrose Agar อายุ 3 สัปดาห์

3.3.3 การเติมหัวเชื้อราเอ็กโทไมคอร์ไรซาและการดูแลกล้าไม้

ทำการย้ายต้นกล้าจากข้อ 3.3.1 ที่มีอายุ 1 เดือน ลงในวัสดุปลูก เพอร์ไลท์:พีทมอสอัตราส่วน 3:1 ลงในกล่อง rhizobox ปริมาตร 16.7x32.5x2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร 1 ต้นต่อ 1 กล่อง โดยจัดรากของต้นกล้าให้อยู่แนบเพียงด้านเดียวของกล่องและอยู่ด้านบนของวัสดุปลูกเพื่อสะดวกต่อการสังเกตการพัฒนาการจากการถ่ายรูป

เติมหัวเชื้อราเอ็กโทไมคอร์ไรซาที่เตรียมใน ข้อ 3.3.2 ต้นละ 100 มิลลิลิตร สำหรับเห็ดเผาะหนังใช้เส้นใยที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยในอาหารเลี้ยงประมาณ 60-70 มิลลิเมตร จำนวนครึ่งจานเพาะเชื้อต่อต้น โดยการตัดวุ้นที่มีเส้นใยเจริญออกเป็นชิ้นเล็กๆวางบนรากต้นกล้าไม้วงศ์ไม้ยางดังแสดงในภาพที่ 3.5B



ภาพที่ 3.5 ลักษณะการเติมหัวเชื้อราเอ็กโทไมคอร์ไรซาให้กับต้นกล้าไม้วงศ์ไม้ยาง ในกล่อง rhizobox (A: หัวเชื้อที่ได้จากการปั่นดอกเห็ดกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ, B: หัวเชื้อหัวเชื้อเส้นใยที่เจริญบนอาหารเลี้ยง)

เมื่อเติมหัวเชื้อเอ็กโทไมคอร์ไรซาแล้วห่อกล่อง rhizobox ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วนำไปตั้งบริเวณเรือนต้นไม้ที่มีแสงส่องถึงแต่ไม่ถูกน้ำฝน โดยเอียงกล่องให้ด้านที่มีรากของต้นกล้าอยู่ด้านล่าง เพื่อลดโอกาสเกิดรากที่เจริญเข้าไปภายในวัสดุปลูก ดังแสดงในภาพที่ 3.6

ภาพที่ 3.6 ลักษณะต้นกล้าในกล่อง rhizobox ที่ผ่านการห่ออลูมิเนียมฟอยล์ จัดเรียงบริเวณเรือนต้นไม้ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

มีชุดการทดลองทั้งหมด 9 ชุดและต้นกล้ายางนา ตะเคียนและพะยอม 3 ชุดควบคุมไม่ใส่หัวเชื้อ โดยแต่ละชุดการทดลองมีกล้าไม้และหัวเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 กล้าไม้และหัวเชื้อเอ็กโทไมคอร์ไรซาของแต่ละชุดการทดลอง

	เห็ดเผาะหนัง	เห็ดระโงกเหลือง	เห็ดน้ำหมาก
ต้นกล้ายางนา	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3
ต้นกล้าตะเคียน	ชุดการทดลองที่ 4	ชุดการทดลองที่ 5	ชุดการทดลองที่ 6
ต้นกล้าพะยอม	ชุดการทดลองที่ 7	ชุดการทดลองที่ 8	ชุดการทดลองที่ 9

แต่ละชุดการทดลองและชุดควบคุมมี 3 ซ้ำ ดูแลต้นไม้โดยรดน้ำด้วยน้ำกรองอบฆ่าเชื้อ ให้ปุ๋ยน้ำไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมในระดับปานกลาง(ภาคผนวก ก) ทุก 2 เดือนเป็นเวลา 6 เดือน

3.3.4 ศึกษาการพัฒนาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา

ตรวจสอบการพัฒนาของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนัง เห็ดน้ำหมาก เห็ดระโงกเหลือง ในต้นกล้าไม้วงศ์ไม้ยางที่ทดสอบทุกเดือน เป็นเวลา 6 เดือน บันทึกผลโดยการถ่ายภาพจากกล้อง olympus omd em5 mark II + 12-40 mm lens f/2.8 และกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ นำกล่อง rhizobox แต่ละชุดการทดลองมาศึกษาและบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากทุกสัปดาห์ ตามรูปวิธาน A Manual of Concise Descriptions of North American Ectomycorrhizae ของ Goodman และคณะ (1996)

3.3.5 ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา

ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา เตรียมตัวอย่างด้วยการฝังรากในแม่พิมพ์ฟอยล์บรรจุ Cryoprotectant Tissue-Tek นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนแข็งตัว จากนั้นนำไปตัด section รากความหนา 20 ไมโครเมตร ด้วยเครื่อง freezing microtome เลือกใช้ตัวอย่างที่ตัดเหนือ apical tip ของรากที่ระยะ 100 ไมโครเมตรโดยประมาณ ย้อมตัวอย่างที่ได้ซึ่งติดกับ cover slit ด้วยสีย้อม methylene blue ภายใน Columbia jar เป็นเวลา 2 นาที ล้างตัวอย่างที่ผ่านการล้างสีย้อมด้วยน้ำกลั่น 1 นาทีและนำมาสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ compound light microscope

3.3.6 ตรวจสอบชนิดรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา

ทำการตรวจสอบรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธีการทางอณูชีวโมเลกุล เปรียบเทียบลำดับเบส rDNA ของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซากับหัวเชื้อที่ใช้ในการทดลองที่ตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) ตามวิธีของ Zhou, Miwa และ Hogetsu (1999) ดังนี้

3.3.6.1 การสกัด DNA จากดอกเห็ดและรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาด้วยวิธี CTAB

หั่นตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงใน 1.5 มิลลิลิตร microtube พร้อมกับเม็ด bead ใส่ในเครื่อง Microsmash เขย่าจนตัวอย่างละเอียด ล้างด้วย washing buffer ปั่นเหวี่ยงด้วย refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ดูด washing buffer ออก เติม CTAB extraction 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40–60 นาที เติม Chloroform/isoamyl alcohol 700 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ดูดสารละลายที่แยกชั้นด้านบนใส่ใน microtube ใหม่ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เติม Chloroform/isoamyl alcohol 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที อีกครั้ง ดูดสารละลายที่แยกชั้นด้านบน ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม isopropanol 500 ไมโครลิตร และบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนที่ด้านล่างของ microtube แล้วเติม 70% ethanol 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวทิ้งเหลือเพียงตะกอน ปล่อยให้ตะกอนแห้งสนิท เติม TE buffer 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลาย DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.6.2 การเพิ่มชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS)

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง ITS ของตัวอย่าง DNA ที่ได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรส ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ไพรเมอร์ ITS-1F (5’ CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3’) และไพรเมอร์ ITS4 (5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3’) ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 0.3 ไมโครลิตร สารละลาย DNA ที่สกัดได้ 3 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 11.4 ไมโครลิตรและ EmeraldAmp GT PCR master mix 15 ไมโครลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง TP600 Authorized thermal cycler โดยมีสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่ดังนี้

Initial denaturation	98 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Denaturation	98 องศาเซลเซียส	10 วินาที	38 รอบ
Annealing	51 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง ITS โดยวิธี electrophoresis บนวุ้น agarose 1.5% ที่เติม GelStar ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อวุ้น 100 มิลลิลิตร ในสารละลาย 1xTBE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที และใช้ชิ้นส่วน DNA ladder ขนาด 1,500 คู่เบส ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่เกิดขึ้นภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-transilluminator) และบันทึกภาพโดยใช้กล้องถ่ายรูปวุ้น (Gel-doc)

3.3.6.3 การตรวจสอบชนิดของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS

ส่งผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง ITS ที่ผ่านการตรวจสอบและให้ผลชัดเจนไปวิเคราะห์ที่บริษัท U2Bio กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสรุ่น ABI 3730XL DNA Analyzer แล้วนำลำดับเบสที่ได้ มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับเบสในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov)

บทที่ 4
ผลการดำเนินงาน

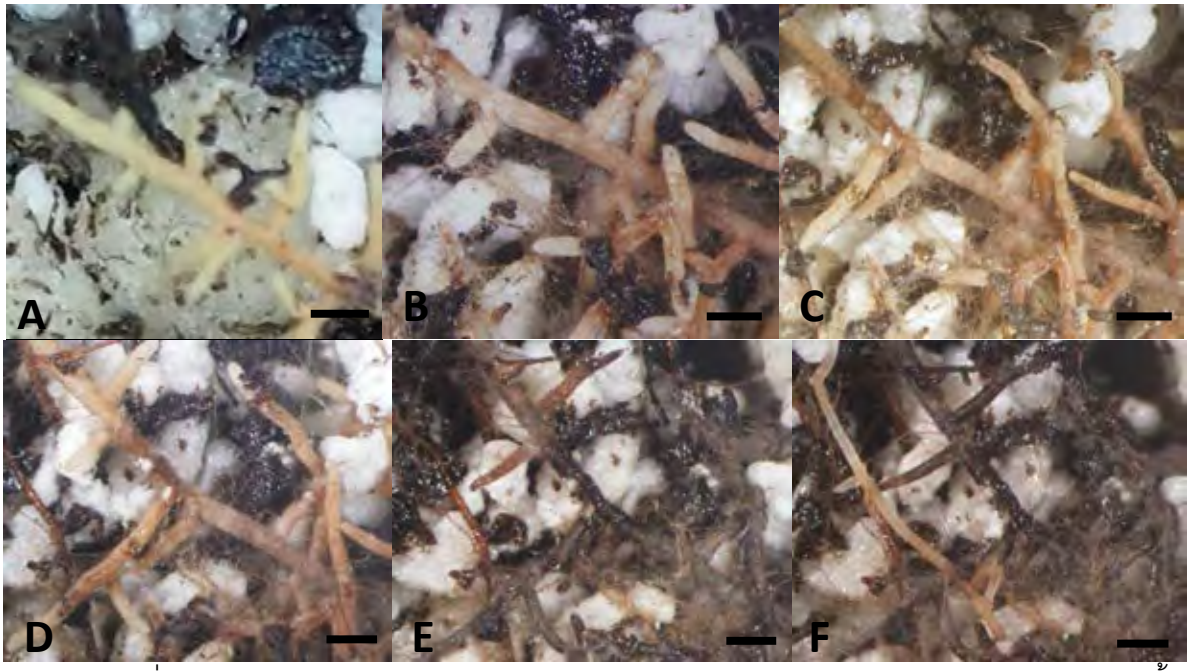
จากการทดลองใส่ราเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ เห็ดระโงกเหลือง และเห็ดน้ำหมากให้กับกล้าไม้วงศ์ไม้ยางได้แก่ ยางนา พะยอม และตะเคียนทอง สังเกตพบว่า ต้นกล้ายางนาสามารถสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซากับเห็ดเผาะหนังในเดือนที่ 2 และเห็ดน้ำหมากในเดือนที่ 4 แต่ไม่สามารถสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซากับเห็ดระโงกเหลืองได้ในระยะ 6 เดือน ต้นกล้าตะเคียนสามารถสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซากับเห็ดเผาะหนังในเดือนที่ 1 แต่ไม่สามารถสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซากับเห็ดระโงกเหลืองและเห็ดน้ำหมากได้ในระยะ 6 เดือน ต้นกล้าพะยอมสามารถสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซากับเห็ดเผาะหนังในเดือนที่ 2 แต่ไม่สามารถสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซากับเห็ดระโงกเหลืองและเห็ดน้ำหมาก ได้ในระยะ 6 เดือน และไม่พบการสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ทุกชนิดในชุดการทดลองควบคุม

4.1 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ยางนา

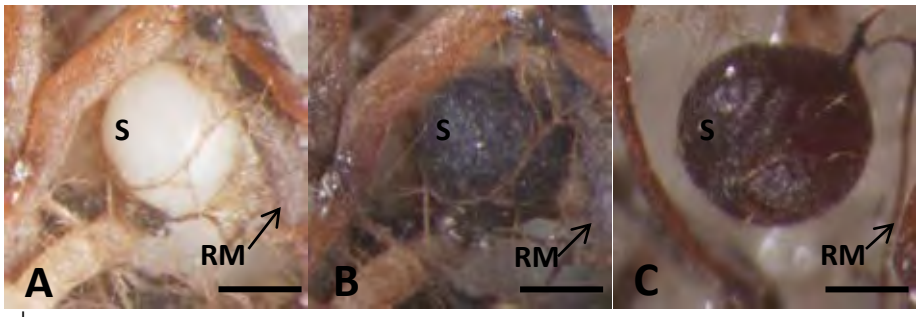
4.1.1 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังในกล้าไม้ยางนา

เริ่มพบการสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาระหว่างเห็ดเผาะหนังและยางนาครั้งแรกหลังจากการเติมเชื้อ 2 เดือน รวมระยะเวลาตั้งแต่เริ่มสร้างรากจนรากตายประมาณ 9-10 สัปดาห์ ดังแสดงในภาพที่ 4.1 รากเอ็กโทไมคอร์ไรซามีสีเหลืองอ่อนในระยะแรก เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มรากมีอายุมากขึ้น และเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อรากตายและเริ่มสลายตัว เส้นใยรารอบๆรากมีสีน้ำตาลอ่อน และหนาแน่นมากที่สุดบริเวณปลายราก มีปลายรากแบบ straight พื้นผิวของ mantle เป็นแบบ felty และความเป็นเงาแบบ shiny พบโครงสร้าง rhizomorph และ sclerotium ดังแสดงในภาพที่ 4.2 โดยโครงสร้าง sclerotium มีขนาดประมาณ 0.8-1.5 มิลลิเมตร เมื่อพัฒนาเต็มที่จะคงสภาพอยู่ในลักษณะเดิมแม้รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาและ rhizomorph สลายตัวไปแล้ว อย่างไรก็ตาม ไม่พบการงอกใหม่ของเส้นใยเห็ดเผาะหนังออกจาก sclerotium ในระยะ 6 เดือน รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังในกล้าไม้ยางนา มีรูปแบบสัณฐาน 3 แบบ คือ irregular, unbranched และ dichotomous ดังแสดงในภาพที่ 4.3A, 4.3B และ 4.3C ตามลำดับ

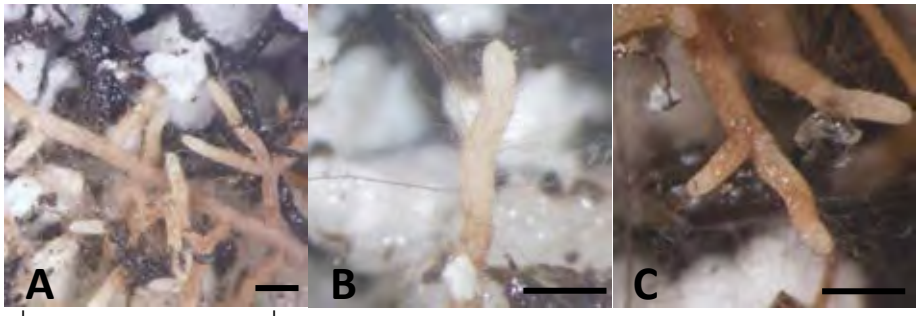
รากเอ็กโทไมคอร์ไรซามีเส้นผ่านศูนย์กลาง 300-350 ไมโครเมตร พบแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยสีน้ำตาล เรียงตัวกันแบบ plectenchyma (ดังแสดงในภาพที่ 4.4A) หนา 40-50 ไมโครเมตร มีเส้นใยฮาร์ติกเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้นหนา 15-30 ไมโครเมตร ดังแสดงในภาพที่ 4.4B



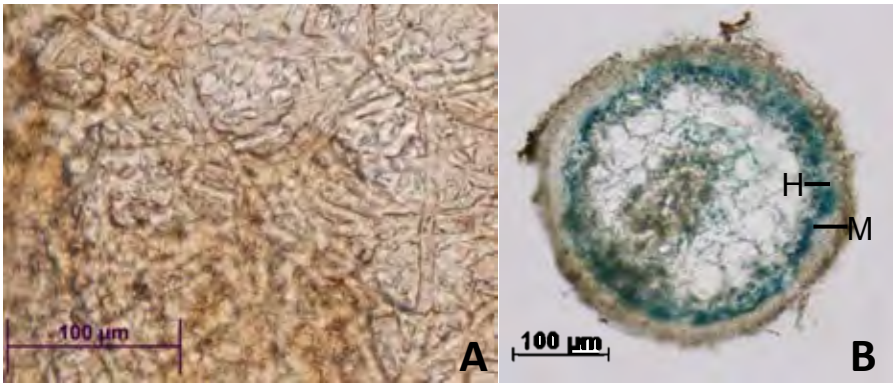
ภาพที่ 4.1 พัฒนาการของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากยางนา หลังจากการเติมเชื้อลงในกล่อง rhizobox (A: 9 สัปดาห์, B: 10 สัปดาห์, C: 11 สัปดาห์, D: 13 สัปดาห์, E: 15 สัปดาห์, F: 119 สัปดาห์, scale bar = 1 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 4.2 พัฒนาการของ sclerotium และ rhizomorph ของเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากยางนา หลังจากการเติมเชื้อลงในกล่อง rhizobox (A: 9 สัปดาห์, B: 13 สัปดาห์, C: 17 สัปดาห์, S: sclerotium, RM: rhizomorph, scale bar = 0.5 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 4.3 รูปแบบสัณฐานที่พบในรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากยางนา (A: irregular, B: unbranched, C: dichotomous, scale bar = 1 มิลลิเมตร)

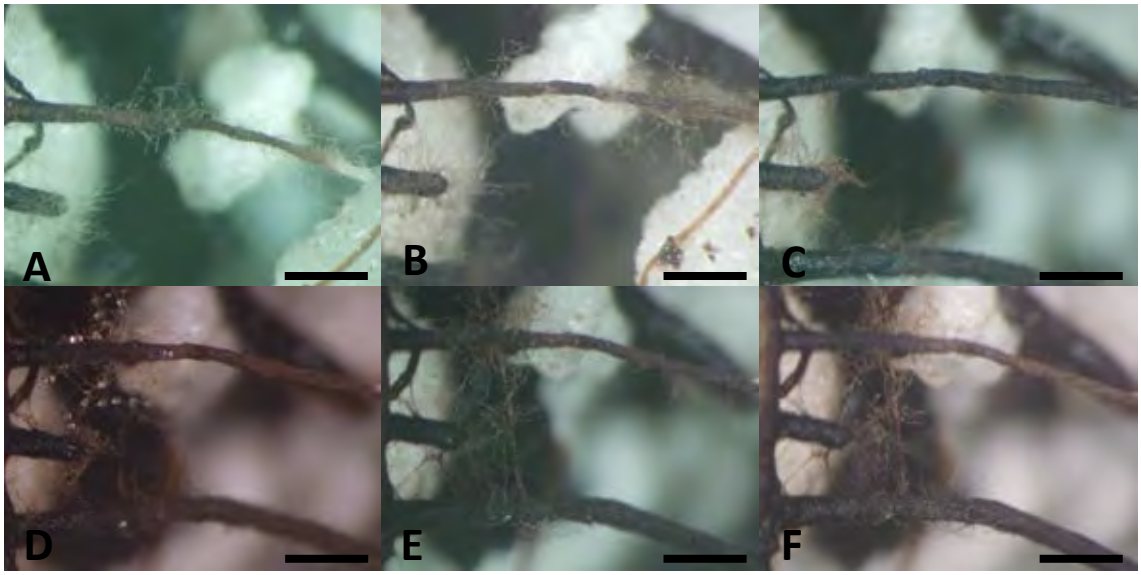


ภาพที่ 4.4 ลักษณะกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังในกล้าไม้ยางนา
(A: ลักษณะพื้นผิวของแผ่นแมนเทิล และ B: ภาพตัดขวาง M: แผ่นแมนเทิล, H: ใยฮาร์ติก)

4.1.2 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมาก ในกล้าไม้ยางนา

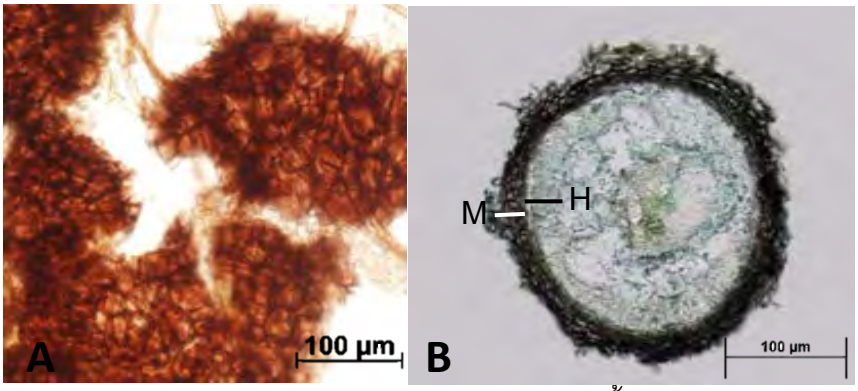
เริ่มพบการสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาระหว่างเห็ดน้ำหมากและยางนาครั้งแรกหลังจากการเติมเชื้อ 4 เดือน รวมระยะเวลาตั้งแต่เริ่มสร้างรากจนรากตายมากกว่า 15 สัปดาห์ ดังแสดงในภาพที่ 4.5 รากเอ็กโทไมคอร์ไรซามีสีขาวในระยะแรกและเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อรากมีอายุมากขึ้น เส้นใยรารอบๆเป็นสีขาวในระยะแรกและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อรากมีอายุมากขึ้น เส้นใยหนาแน่นมากที่สุดบริเวณปลายราก มีปลายแบบ straight หรือ club-shaped พื้นผิวของ mantle เป็นแบบ stringy และความเป็นเงาแบบ matte ไม่พบโครงสร้าง rhizomorph และ sclerotium รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมากในกล้าไม้พะยอม มีรูปแบบสัณฐาน 1 แบบ คือ unbranched ไม่พบการแตกกิ่ง ดังแสดงในภาพที่ 4.6

รากเอ็กโทไมคอร์ไรซามีเส้นผ่านศูนย์กลาง 250-320 ไมโครเมตร พบแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว พบโครงสร้าง clamp connection ชัดเจนทั้งในเส้นใยและแผ่นแมนเทิล แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยสีน้ำตาล เรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma (ดังแสดงในภาพที่ 4.7A) หนา 30-40 ไมโครเมตร มีเส้นใยฮาร์ติกเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้นหนา 30-40 ไมโครเมตร ดังแสดงในภาพที่ 4.7B



ภาพที่ 4.5 พัฒนาการของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมากกับรากยางนา หลังจากการเติมเชื้อลงในกล่อง rhizobox (A: 18 สัปดาห์, B: 19 สัปดาห์, C: 20 สัปดาห์, D: 22 สัปดาห์, E: 24 สัปดาห์, F: 26 สัปดาห์, scale bar = 1 มิลลิเมตร)

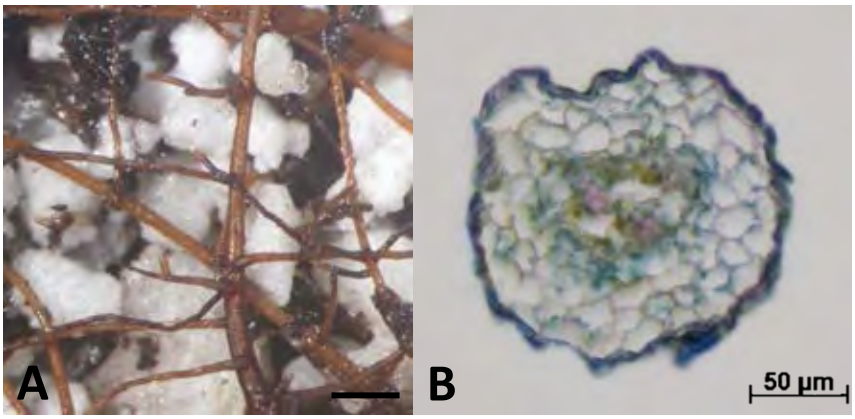
ภาพที่ 4.6 รูปแบบสัณฐานที่พบในรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมากกับรากยางนา (scale bar = 1 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 4.7 ลักษณะกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมากในกล้าไม้ยางนา (A: ภาพตัดขวาง และ B: ลักษณะพื้นผิวของแผ่นแมนเทิล M: แผ่นแมนเทิล, H: ใยฮาร์ติก)

4.1.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากกล้าไม้ยางนาชุดควบคุม

ไม่พบการสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ชุดควบคุม รากกล้าไม้ยางนา มีรากแขนงเรียวเล็กไม่มีขนราก เส้นผ่านศูนย์กลางราก 160-210 ไมโครเมตร เล็กกว่ารากเอ็กโทไมคอร์ไรซา 1-1.5 เท่า รากมีการแตกแขนงน้อย ผิวรากเรียบ รากอ่อนมีสีขาวโปร่งแสงและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อรากมีอายุมากขึ้น ไม่พบเส้นใยของราพันรอบปลายรากแขนง (ภาพที่ 4.8A) สำหรับลักษณะทางกายวิภาคของกล้าไม้ชุดควบคุมนั้น รากมีชั้นของเซลล์ผิวบาง ไม่พบแผ่นแมนเทิลและเส้นใยฮาร์-ติก (ภาพที่ 4.8B)



ภาพที่ 4.8 รากแขนงต้นกล้ายางนาในชุดควบคุม (A: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากแขนง B: ลักษณะทางกายวิภาคของรากแขนง scale bar = 1 มิลลิเมตร)

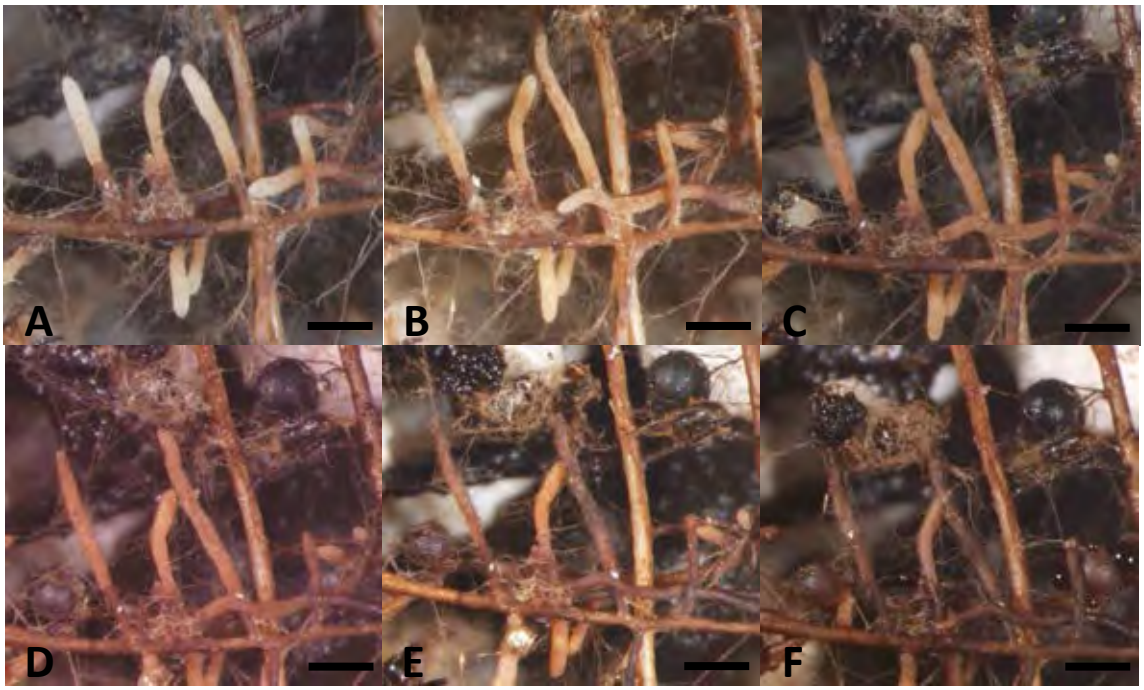
4.2 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ตะเคียน

4.2.1 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังในกล้าไม้ตะเคียน

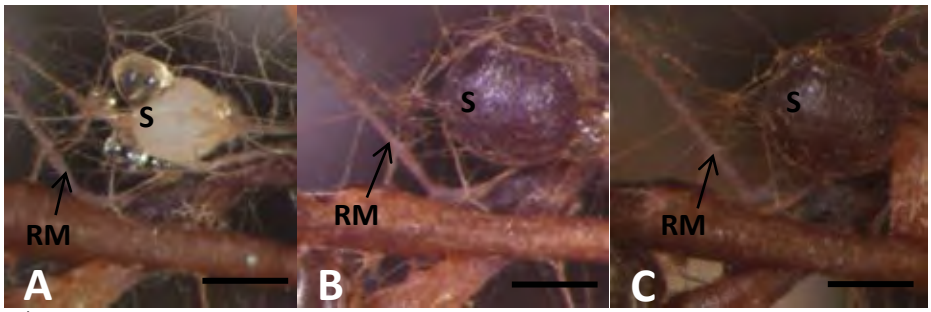
เริ่มพบการสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาระหว่างเห็ดเผาะหนังและยางนาครั้งแรกหลังจากการเติมเชื้อ 1 เดือน รวมระยะเวลาตั้งแต่เริ่มสร้างรากจนรากตายประมาณ 9-10 สัปดาห์ ดังแสดงในภาพที่ 4.9 รากเอ็กโทไมคอร์ไรซามีสีเหลืองอ่อนในระยะแรก เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มรากมีอายุมากขึ้น และเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อรากตายและเริ่มสลายตัว เส้นใยรารอบๆรากมีสีน้ำตาลอ่อน และหนาแน่นมากที่สุดบริเวณปลายราก มีปลายรากแบบ straight พื้นผิวของ mantle เป็นแบบ felty และความเป็นเงาแบบ shiny พบโครงสร้าง rhizomorph และ sclerotium ดังแสดงในภาพที่ 4.10 โดยโครงสร้าง sclerotium มีขนาดประมาณ 0.5-1.2 มิลลิเมตร เมื่อพัฒนาเต็มที่จะคงสภาพอยู่ในลักษณะเดิมแม้รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาและ rhizomorph สลายตัวไปแล้ว อย่างไรก็ตาม ไม่พบการงอกใหม่ของเส้นใยเห็ดเผาะหนังออกจาก sclerotium ในระยะ 6 เดือน รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ด

เผาะหนังในกล้าไม้ยางนา มีรูปแบบสัณฐาน 2 แบบ คือ unbranched และ monopodial pinnate ดังแสดงในภาพที่ 4.11A และ 4.11B

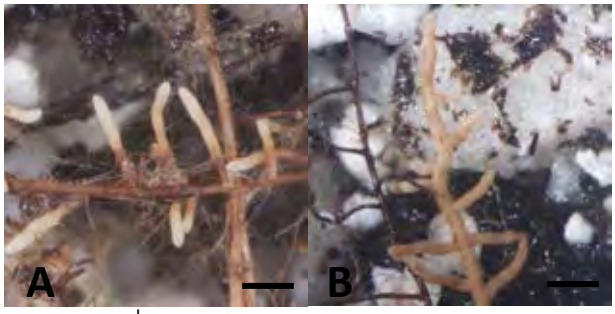
รากเอ็กโทไมคอร์ไรซามีเส้นผ่านศูนย์กลาง 300-350 ไมโครเมตร พบแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยสีน้ำตาล เรียงตัวกันแบบ plectenchyma (ดังแสดงในภาพที่ 4.12A) หนา 30-50 ไมโครเมตร มีเส้นใยฮาร์ติกเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวนอย่างน้อย 1 ชั้นหนา 30-50 ไมโครเมตร ดังแสดงในภาพที่ 4.12B



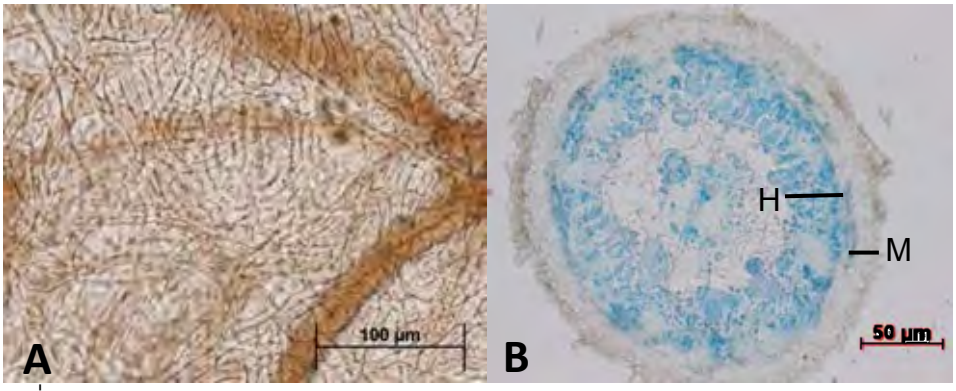
ภาพที่ 4.9 พัฒนาการของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากตะเคียน หลังจากการเติมเชื้อลงในกล่อง rhizobox (A: 5 สัปดาห์, B: 6 สัปดาห์, C: 7 สัปดาห์, D: 9 สัปดาห์, E: 11 สัปดาห์, F: 13 สัปดาห์, scale bar = 1 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 4.10 พัฒนาการของ sclerotium และ rhizomorph ของเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากตะเคียน หลังจากการเติมเชื้อลงในกล่อง rhizobox (A: 5 สัปดาห์, B: 9 สัปดาห์, C: 11 สัปดาห์, S: sclerotium, RM: rhizomorph, scale bar = 0.5 มิลลิเมตร)



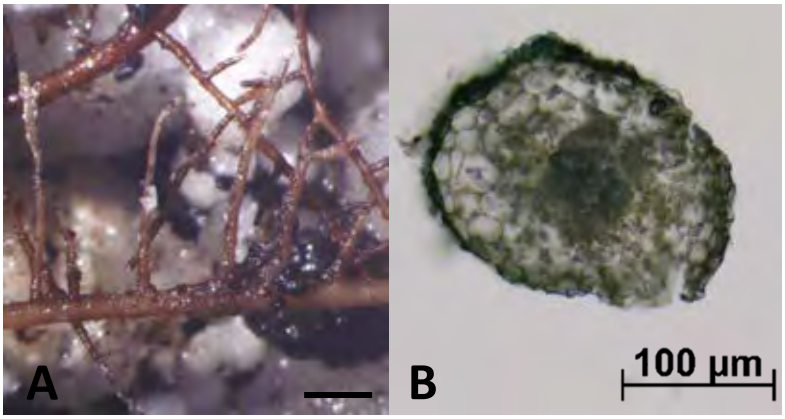
ภาพที่ 4.11 รูปแบบสัณฐานที่พบในรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากตะเคียน (A: unbranched, B: monopodial pinnate, scale bar = 1 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 4.12 ลักษณะกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังในกล้าไม้ตะเคียน (A: ภาพตัดขวาง และ B: ลักษณะพื้นผิวของแผ่นแมนเทิล M: แผ่นแมนเทิล, H: ใยฮาร์ติก)

4.2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากกล้าไม้ตะเคียนชุดควบคุม

ไม่พบการสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ชุดควบคุม รากแขนงเรียวเล็กไม่มีขนราก เส้นผ่านศูนย์กลางราก 120-170 ไมโครเมตร เล็กกว่ารากเอ็กโทไมคอร์ไรซา 1.25-2 เท่า รากมีการแตกแขนงน้อย ผิวรากเรียบ รากอ่อนมีสีขาวโปร่งแสงและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อรากมีอายุมากขึ้น ไม่พบเส้นใยของราพันรอบปลายรากแขนง (ภาพที่ 4.13A) สำหรับลักษณะทางกายวิภาคนั้น รากมีชั้นเซลล์ผิวบาง ไม่พบแผ่นแมนเทิลและเส้นใยฮาร์ติก (ภาพที่ 4.13B)



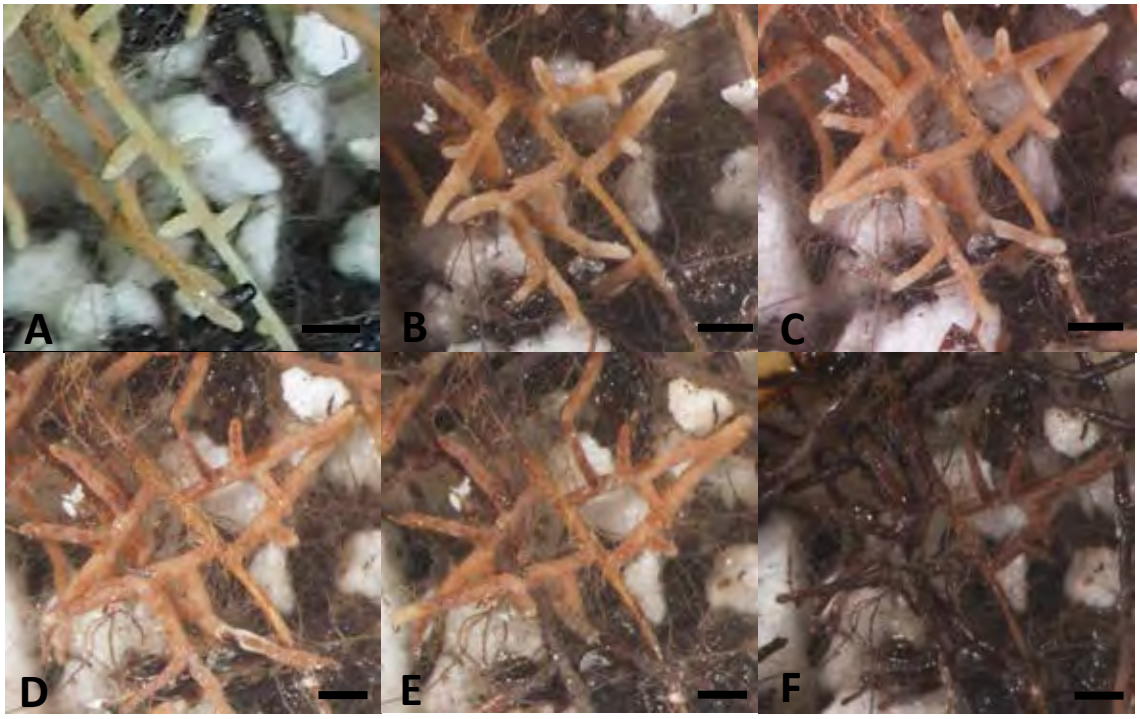
ภาพที่ 4.13 รากแขนงต้นกล้าตะเคียนในชุดควบคุม (A: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากแขนง B: ลักษณะทางกายวิภาคของรากแขนง scale bar = 1 มิลลิเมตร)

4.3 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในกล้าไม้พะยอม

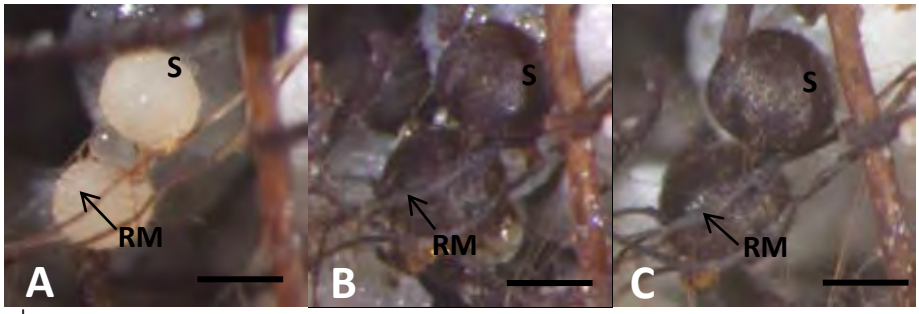
4.3.1 พัฒนาการ ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังในกล้าไม้พะยอม

เริ่มพบการสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาระหว่างเห็ดเผาะหนังและพะยอมครั้งแรกหลังจากการเติมเชื้อ 2 เดือน รวมระยะเวลาตั้งแต่เริ่มสร้างรากจนรากตายประมาณ 9-10 สัปดาห์ ดังแสดงในภาพที่ 4.14 รากเอ็กโทไมคอร์ไรซามีสีเหลืองอ่อนในระยะแรก เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มเมื่อรากมีอายุมากขึ้น และเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อรากตายและเริ่มสลายตัว เส้นใยรารอบๆรากมีสีน้ำตาลอ่อนและหนาแน่นมากที่สุดบริเวณปลายราก มีปลายรากแบบ straight พื้นผิวของ mantle เป็นแบบ felty และความเป็นเงาแบบ shiny พบโครงสร้าง rhizomorph และ sclerotium ดังแสดงในภาพที่ 4.15 โดยโครงสร้าง sclerotium มีขนาดประมาณ 0.8-1.5 มิลลิเมตร เมื่อพัฒนาเต็มที่จะคงสภาพอยู่ในลักษณะเดิมแม้รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาและ rhizomorph สลายตัวไปแล้ว อย่างไรก็ตาม ไม่พบการงอกใหม่ของเส้นใยเห็ดเผาะหนังออกจาก sclerotium ในระยะ 6 เดือน รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังในกล้าไม้พะยอม มีรูปแบบสัณฐาน 2 แบบ คือ monopodial pinnate และ irregular ดังแสดงในภาพที่ 4.16A และ 4.16B ตามลำดับ

รากเอ็กโทไมคอร์ไรซามีเส้นผ่านศูนย์กลาง 300-350 ไมโครเมตร พบแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยสีน้ำตาล เรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma (ดังแสดงในภาพที่ 4.17A) หนา 30-40 ไมโครเมตร มีเส้นใยฮาร์ติกเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวนอย่างน้อย 1 ชั้นหนา 45-60 ไมโครเมตร ดังแสดงในภาพที่ 4.17B

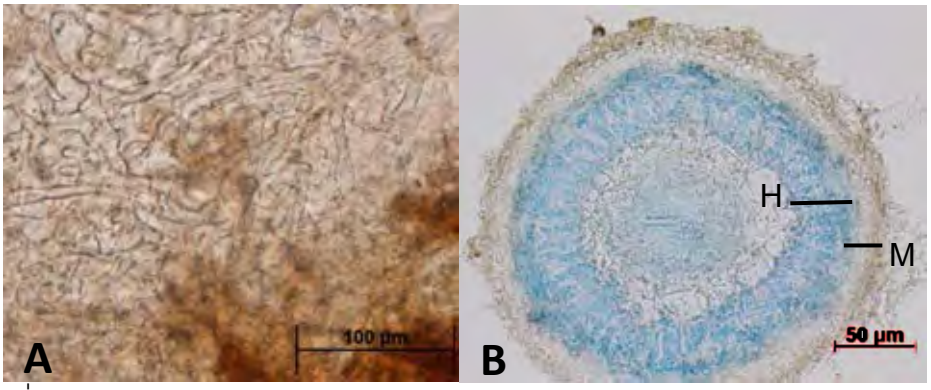


ภาพที่ 4.14 พัฒนาการของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากพะยอม หลังจากการเติมเชื้อลงในกล่อง rhizobox (A: 9 สัปดาห์, B: 10 สัปดาห์, C: 11 สัปดาห์, D: 13 สัปดาห์, E: 15 สัปดาห์, F: 17 สัปดาห์, scale bar = 1 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 4.15 พัฒนาการของ sclerotium และ rhizomorph ของเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากพะยอม หลังจากการเติมเชื้อลงในกล่อง rhizobox (A: 9 สัปดาห์, B: 13 สัปดาห์, C: 17 สัปดาห์, S: sclerotium, RM: rhizomorph, scale bar = 0.5 มิลลิเมตร)

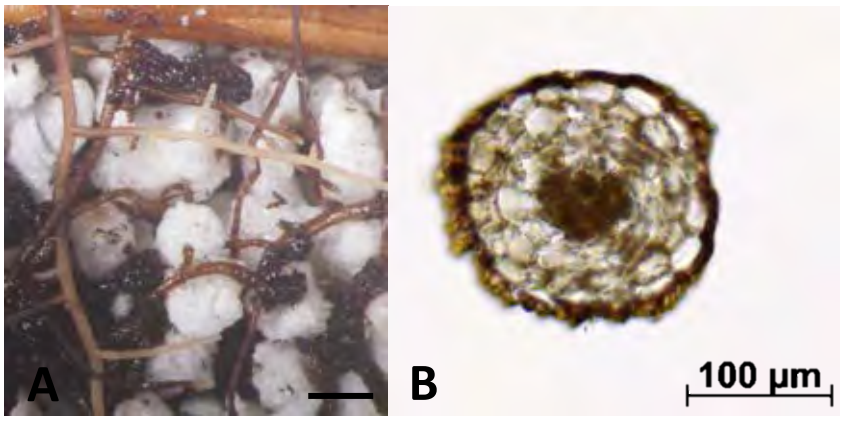
ภาพที่ 4.16 รูปแบบสัณฐานที่พบในรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับรากพะยอม (A: monopodial pinnate, B: irregular, scale bar = 1 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 4.17 ลักษณะกายวิภาคของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังในกล้าไม้พะยอม
(A: ภาพตัดขวาง และ B: ลักษณะพื้นผิวของแผ่นแมนเทิล M: แผ่นแมนเทิล, H: ใยฮาร์ติก)

4.3.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของรากกล้าไม้พะยอมชุดควบคุม

ไม่พบการสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ชุดควบคุม รากกล้าไม้พะยอม มีรากแขนงเรียวเล็กไม่มีขนราก เส้นผ่านศูนย์กลางราก 150-200 ไมโครเมตร เล็กกว่ารากเอ็กโทไมคอร์ไรซา 1.25-2 เท่า รากมีการแตกแขนงน้อย ผิวรากเรียบ รากมีสีขาวโปร่งแสงในระยะแรกและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อรากมีอายุมากขึ้น ไม่พบเส้นใยของราพันรอบปลายรากแขนง (ภาพที่ 4.18A) สำหรับลักษณะทางกายวิภาคนั้น รากมีชั้นเซลล์ผิวบาง ไม่พบแผ่นแมนเทิลและเส้นใยฮาร์ติก (ภาพที่ 4.18B)



ภาพที่ 4.18 รากแขนงของต้นกล้าพะยอมในชุดควบคุม
(A: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากแขนง, B: ลักษณะทางกายวิภาคของรากแขนง
scale bar = 1 มิลลิเมตร)

4.4 ตรวจสอบชนิดรากเอ็กโทไมคอร์ไรซา ด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล

จากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม Blastn ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ทำให้ทราบว่า หัวเชื้อเส้นใยเห็ดเผาะหนัง รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังของกล้าไม้ทุกชุดการทดลองรวมถึง sclerotium มีลำดับเบส ที่ใกล้เคียงกับ เห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) มากที่สุด ลำดับเบสของดอกเห็ดน้ำหมาก (หัวเชื้อสปอร์เห็ดน้ำหมาก) ใกล้เคียงกับ เห็ดน้ำหมาก (*R. sanguinaria*) มากที่สุด ในขณะที่รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมากกับยางนานั้นกลับมีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Tomentella* sp. มากที่สุด จึงสรุปได้ว่ารากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังที่เกิดขึ้นนั้นเป็นของเห็ดเผาะหนัง แต่รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมากที่เกิดขึ้นแท้จริงแล้วเป็นรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาของ รา *Tomentella* sp. (ภาคผนวก ข)

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจสอบชนิดของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS

ตัวอย่าง	ความคล้ายลำดับเบสของ Genbank		
	สปีชีส์ใน Genbank ที่ใกล้เคียงที่สุด	E-value	% identity
หัวเชื้อเส้นใยเห็ดเผาะหนัง	*Astraeus odoratus* (AJ629877)	0.0	100.0
รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้ยางนา	*Astraeus odoratus* (AJ629877)	0.0	94.25
Sclerotium เห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้ยางนา	*Astraeus odoratus* (AJ629877)	0.0	94.43
รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้ตะเคียน	*Astraeus odoratus* (AJ629877)	0.0	94.08
Sclerotium เห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้ตะเคียน	*Astraeus odoratus* (AJ629877)	0.0	97.00
รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้พะยอม	*Astraeus odoratus* (AJ629877)	0.0	93.18
Sclerotium เห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้พะยอม	*Astraeus odoratus* (AJ629877)	0.0	94.40
หัวเชื้อเห็ดน้ำหมาก	*Russula sanguinaria* (AB459514)	0.0	99.06
รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมากกับยางนา	*Tomentella sp.* (UDB025245)	0.0	96.00

บทที่ 5
อภิปรายผลการดำเนินงานและสรุปผล

ต้นกล้ายางนาสามารถสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซากับเห็ดเผาะหนังในเดือนที่ 2 และเห็ดน้ำหมากในเดือนที่ 4 ต้นกล้าตะเคียนสามารถสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซากับเห็ดเผาะหนังในเดือนที่ 1 แต่ไม่สามารถสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซากับเห็ดน้ำหมากได้ในระยะ 6 เดือน ต้นกล้าพะยอมสามารถสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซากับเห็ดเผาะหนังในเดือนที่ 2 แต่ไม่สามารถสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซากับเห็ดน้ำหมากได้ในระยะ 6 เดือน ต้นกล้าไม้วงศ์ไม้ยางทั้งสามชนิดไม่สามารถสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซากับเห็ดระโงกเหลืองได้ในระยะ 6 เดือน สันนิษฐานว่าอาหารเลี้ยง PDA ของหัวเชื้อเส้นใยเห็ดเผาะหนัง ช่วยกระตุ้นให้เส้นใยราเติบโตและสร้างรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาได้ดีกว่าหัวเชื้อสปอร์ที่ทำจากดอกเห็ดเอ็กโทไมคอร์ไรซา ดังที่ Islam and Ohga (2013) สรุปการทดลองว่า อาหารเลี้ยง PDA และ MMN ช่วยกระตุ้นให้เอ็กโทไมคอร์ไรซาสร้าง mycelium และรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาได้เร็วกว่าการใช้หัวเชื้อสปอร์จากดอกเห็ดหรือการใส่เส้นใยเอ็กโทไมคอร์ไรซาลงไปให้กับพืชอาศัยเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้รายงานของ Amend, Keeley และ Garbelotto (2009) กล่าวว่า ราเอ็กโทไมคอร์ไรซาสกุล *Russula* และ *Amanita* เป็น late-stage ectomycorrhizal fungi ซึ่งสร้างโครงสร้างเส้นใยใต้ดินขนาดใหญ่มีอายุยืน และต้องการธาตุอาหารสูง ทำให้มักเติบโตได้ดีในป่าที่เป็น climax community ที่ไม่ถูกรบกวน อาจเป็นผลทำให้ไม่เกิดการติดเชื้อในกล้าไม้วงศ์ไม้ยาง

พัฒนาการของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับต้นกล้าไม้ยางนา ตะเคียนและพะยอม ตั้งแต่การเริ่มสร้างรากจนรากตายอยู่ที่ประมาณ 8-9 สัปดาห์ ซึ่งไม่มีการรายงานมาก่อน ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังในกล้าไม้วงศ์ไม้ยางที่พบ ได้แก่ ปลายราก สีของรากเมื่ออ่อนและแก่ สีของเส้นใยรารอบๆรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเมื่ออ่อนและเมื่อแก่ พื้นผิวของแมนเทิลและความเป็นเงา เหมือนกับลักษณะสัณฐานวิทยาของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะฝ้าย (*Astraeus hygrometicus*) กับต้นสน *Pinus densiflora* ในรายงานของ Fangfuk และคณะ (2010)

พบรูปแบบสัณฐานของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้ยางนา 3 แบบ คือ unbranched, irregular และ dichotomous พบรูปแบบสัณฐานของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้ตะเคียน 2 แบบ คือ unbranched และ monopodial pinnate ในขณะที่รูปแบบสัณฐานของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะกับกล้าไม้พะยอม ที่พบ 2 แบบคือ monopodial pinnate และ irregular ตรงกับ รายงานของ อุทัยวรรณ แสงวณิช และคณะ (2559) ที่พบรูปแบบสัณฐาน 3 แบบ คือ unbranched, monopodial pinnate และ irregular นอกจากนี้พื้นผิวของแมนเทิลเป็นแบบ

pseudoparenchyma ตรงกับผลการศึกษา แตกต่างจากพื้นผิวแมนเทิลของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังในกล้าไม้ยางนากับกล้าไม้ตะเคียนซึ่งมีพื้นผิวแมนเทิลแบบ plectenchyma

รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาในชุดทดลองหัวเชื้อเห็ดน้ำหมากกับกล้าไม้ยางนานั้น มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้แก่ลักษณะของแผ่นแมนเทิล โครงสร้าง clamp connection และ exploration type ใกล้เคียงกับคำบรรยายรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาของรา *Tomentella* โดย Agerer (2006) และผลการตรวจสอบชนิดรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล ยืนยันว่าหัวเชื้อเส้นใยเห็ดเผาะหนังรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาและ sclerotium เห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้วงศ์ไม้ยางทุกชุดการทดลองคือ เห็ดเผาะหนัง (*A. odoratus*) หัวเชื้อเห็ดน้ำหมากที่ใช้คือ เห็ดน้ำหมาก (*R. sanguinaria*) แต่รากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมากกับกล้าไม้ยางนาเป็นรากที่เกิดจากราเอ็กโทไมคอร์ไรซาสกุล *Tomentella* ซึ่งสัณนิษฐานว่าการปนเปื้อนสปอร์ของ *Tomentella* ซึ่งอาจมาจากดอกเห็ดน้ำหมากที่ใช้เป็นหัวเชื้อ ดังนั้นการตรวจสอบชนิดรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาจึงจำเป็นต้องใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมกับวิธีทางอณูชีวโมเลกุล

อ้างอิง

ทนุวงศ์ แสงเทียน. 2534. *เอคโตไมคอร์ไรซาของไม้วงศ์ยาง (Dipterocarpus alatus Roxb.) และผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

วสันณ์ เพชรรัตน์, สมปอง เตชะโต และ อนุสรณ์ ทองวิเศษ. 2548. *การเจริญเติบโตของเส้นใยและการเกิดไมโครไรซ่าของเห็ดเผาะ (Astraeus spp.), การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางนาเพื่อศึกษาการเกิดไมโครไรซ่าของเห็ดเผาะ (Astraeus spp.)*. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อุทัยวรรณ แสงวณิช และคณะ. 2559. *รายงานการตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้วงศ์ยางบางชนิดที่มีเห็ดเผาะหนังสัมพันธ์อยู่กับรากแบบเอคโตไมคอร์ไรซา*. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล และคณะ. 2551. *ความหลากหลายของเห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย*. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนิวรรต เฉลิมพงษ์ และ ธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ. 2524. *การสำรวจเชื้อราไมคอร์ไรซาที่สัมพันธ์กับรากต้นไม้ในระบบนิเวศวิทยาป่าเต็งรังท้องที่ป่าสะแกราช*. กรุงเทพมหานคร: กองบำรุง กรมป่าไม้.

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

อภิชาติ รัตนวิระกุล. 2546. *สวนพฤกษศาสตร์ ตามพระราชเสาวนีย์ฯ* [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.dnp.go.th/Pattani_botany/ [2562, 16 กุมภาพันธ์]

Agerer, R. 1991. Characterization of ectomycorrhiza in J.R. Norris, D.J. Read and A.K. Varma (eds.). *Techniques for the study of mycorrhiza*. London: Academic Press pp. 25–73.

Agerer, R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological Progress*. 5: 67-107.

Amend, A., Keeley, S. and Garbelotto M. 2009. Forest age correlates with fine-scale spatial structure of Matsutake mycorrhizas. *Mycological Research*. 113: 541–551

Ashton, P.S. 2004. Dipterocarpaceae in Soepadmo, E., Saw, L. G. and Chung, R. C. K. (eds.), *Tree Flora of Sabah and Sarawak*, Volume 5. Kuala Lumpur, Malaysia: Government of Malaysia.

Béreau, M., Gazel, M. and Garbaye, J. 1997. Les symbioses mycorhiziennes des arbres de la forêt tropicale humide de Guyana française. *Canadian Journal of Botany* 75: 711–716.

Brearley, F.Q., Prajadinata, S., Kidd, P.S. and Proctor, J. 2004. Structure and floristics of an old secondary rain forest in Central Kalimantan, Indonesia, and a comparison with adjacent primary forest. *Forest Ecology Management* 195: 385–397.

Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. and Malajczuk, N. 1996. *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. ACIAR Monograph 32. Canberra: Pirie Printers.

Brundrett, M.C. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* 79: 473-495.

Chalermponge, A. 1995. Ectomycorrhizal fungi in tropical forest at Mae Klong watershed research station, Thong Pha Phum District, Kanchanaburi In Proceedings of the International Workshop on “The Changes of Tropical Forest Ecosystems by El Nino and Others”. Kanchanaburi: National research council of Thailand, pp. 298-300.

Christenhusz, M.J.M. and Byng, J.W. 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261: 201–217.

Dames, J.F., Straker, C.J. and Scholes, M.C. 1999. Ecological and anatomical characterization of some *Pinus patula* ectomycorrhizas from Mpumalanga, South Africa. *Mycorrhiza* 9: 9-24.

Ducousso, M. et al. 2004. The last common ancestor of Sarcolaenaceae and Asian dipterocarp trees was ectomycorrhizal before the India-Madagascar separation, about 88 million years ago. *Molecular Ecology* 13: 231–236.

Fangfuk, W. et al. 2010. In vitro mycorrhization of edible Astraeus mushrooms and their morphological characterization. *Mycoscience.* 51: 234–241

Gardner, S., Sidisunthorn, P. and Lai, E.M. 2011. *Heritage Trees of Penang*. Penang: Areca Books.

Goodman, D.M., Durall, D.M., Trofymow, J.A. and Berch, S.M. 1996. *A manual of concise descriptions of North American ectomycorrhizae including microscopic and molecular characterization.* Canada: Canadian Government Publishing.

Heijden, V.D., Marcel, G.A. and Sanders, I.R. 2002. *Mycorrhizal ecology*. Berlin: Springer-Verlag.

Henkel, T.W. 2003. Monodominance in the ectomycorrhizal *Dicymbe corymbosa* (Caesalpiniaceae) from Guyana. *Journal of Tropical Ecology*. 19: 417–437.

Islam, F. and Ohga, S. 2013. *Effects of Media Formulation on the Growth and Morphology of Ectomycorrhizae and Their Association with Host Plant*. [Online]. Available from: http://dx.doi.org/10.1155/2013/317903 [2018, October 16]

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.

Kettle, C.J. 2010. Ecological considerations for using dipterocarps for restoration of lowland rainforest in Southeast Asia. *Biodiversity Conservation* 19: 1137–1151.

Mcguire, K.L., Henkel, T.W., Granzow de la Cerda, I., Villa, G., Edmund, F. and Andrew, C. 2008. Dual mycorrhizal colonization of forest-dominating tropical trees and the mycorrhizal status of nondominant tree and liana species. *Mycorrhiza* 18: 217–222.

Miller, S.L., Koo, C.D. and Molina, R. 1991. Characterization of red alder ectomycorrhizae: a preface to monitoring belowground ecological responses. *Canadian Journal of Botany* 69: 516–531.

Newman, M.F., Burgess, P.F. and Whitmore, T.C. 1998. *Manuals of dipterocarps for foresters: Borneo Island medium and heavy hardwoods*. Edinburgh, UK: Royal Botanic Garden.

Nugroho, J.D., Mansur, I., Purwito, A. and Suhendang, E. 2010. Morphological characteristics of ectomycorrhizas on Merbau [*Intsia bijuga* (Colebr.) O. Kuntze]. *HAYATI Journal of Biosciences.* 17: 68-72.

Paoli, G.D., Curran, L.M. and Zak, D.R. 2006. Soil nutrients and beta diversity in the Bornean Dipterocarpaceae: Evidence for niche partitioning by tropical rain forest trees. *Journal of Ecology* 94: 157–170.

Pedersen, C.T. and Sylvia, D.M. 1996. Mycorrhiza: ecological implications of plant Interactions in K.G. Mukerdji (ed.), *Concepts in mycorrhizal research*. Netherlands: Kluwer academic publisher.

Peterson, R.L., Massicotte, H.B. and Melville, L.H. 2004. *Mycorrhizas; Anatomy and Cell Biology*. Ottawa: National Research Council of Canada.

Peh, K.S.H., Lewis, S. L. and Lloyd, J. 2011. Mechanisms of monodominance in diverse tropical tree-dominated systems. *Journal of Ecology* 99: 891–898.

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

Read, D.J. 1999. The ecophysiology of mycorrhizal symbioses with special reference to impacts upon plant fitness. *Physiological Plant Ecology* 133–151.

Shiva, M.P. and Jantan, I. 1998. Non-timber forest products from dipterocarps in S. Appanah, and J. M. Turnbull (eds.). *A review of dipterocarps: Taxonomy, ecology And cilviculture*. Bogor, Indonesia: Centre for international forestry research.

Smith, S.E. and Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. San Diego: Academic press.

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

Smits, W.T.M. 1992. Mycorrhizal studies in dipterocarp forest in Indonesia in D.J. Read, D.K. Lewis, A.H. Fitter and I.J. Alexander (eds.). *Mycorrhizas in Ecosystems*. Cambridge: CAB International, pp. 283-292.

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

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

Yuwa-Amornpitak, T., Vichitsoonthonkul, T., Tantichroen, M., Cheevadhanrak, S. and Ratchdawong, S. 2006. Diversity of ectomycorrhizal fungi on dipterocapaceae in Thailand. *Journal of Biological Sciences* 6: 1059-1064.

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

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและปุ๋ย

อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar

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

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

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 เจือจาง 10^{-2} ใช้ 1 มิลลิลิตร/น้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Mo 0.001 ppm
$CuSO_4.5H_2O$	15 มิลลิกรัม/น้ำ 100 มิลลิลิตร เจือจาง 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 ได้ธาตุ B 10 ppm
$ZnSO_4.7H_2O$	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

ภาคผนวก ข
การตรวจสอบชนิดราเอ็กโทไมคอร์ไรซา

ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของหัวเชื้อเส้นใยเห็ดเผาะหนัง

CATTACCGAATCGTGCAAGGAGCGTAAGACGGTCGGAGGAAAAACCTCGGGGGGGGTGTCTA
GTAGTATTTCGGAGTGCTGTCGCTGGCCTTTCGGCAATGTGCACGTCTCCGGAGTCCGATGG
GTGTGTATACACCCAACCCCCCCTCGGCCTCGGTCTCCTTCCGAACCTCTGAAGCTCCTGTA
CCTCTCTAACACCATTGTGCACCTTGTTGTAGGTCTCGTCGAGGGACCTATGTATTCCTTTTTAT
AAAGCTCTCTGCATGTATACAGAACGTTGTCTTTTGACAAACATGTCATATAAACATATATATAA
CTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATCGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTC
CGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAAATCTCAAATCCTAAGCTTTGCTTCGGTCGCCG
ACTCGGAGCGAGCTCGGACTTGGACTTTGGGAGTCTGCGGGCGACCCGACTTTGCTCGGGA
CGCCGGCTCTCCTCAAATGCATTAGCGGTGGGCTTCGAGCCTTTGCACGGCACGGCCTGTTC
GACGTCGTAGTGATCGTCGTGGGCTGGAAGTGCTTGGATCGACGTGTCTCATGCTTCCAACC
ATGTTGCCGCGCCGCGCCGGGGTTGTTAATCCCGGGGCCGGAAATTCTTTTTTAAGGCTGGA
CCTCAAATCAGGT

ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้ยางนา

CGGCCTCGGTCTCCTTCCGAACCTTTGAAGCTCCTGTACCTCTTTAACACCATTGTGCACCTTG
TTGTAGGTTTTGTCGAGGGACCTATGTATTCCTTTTTTATAAAGCTTTTTGCATGTATACAGAACG
TTGTTTTTTGACAAACATGTCATATAAACATATATATAACTTTCAGCAATGGATTTTTTGGCTCTC
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAATCGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCA
TTGAATTTTTGAACGCCCCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAT
TGAAATTTCAAATCCTAAGCTTTGCTTCGGTTGCCGACTTGGAGCGAGCTTGGACTTGGGCTTT
GGGAGTTTGCGGGCGGCCCGACTTTGCTCGGGACGCCGGCTTTCCTCAAAAGCATTAGCGG
TGGGGTTCGAGCCTTTGCCCGGCCCGGCCTGTTTGACGTTGTAGTGATTGTCGTGGGCTGGA
AGTGCTTGGATTGACGTGTTTCATGCTTCCAACCATGTTGCCGCGCC

ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของ Sclerotium เห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้ยางนา

CGGCAATGTGCACGTCTCCGGAGTCCGATGGGTGTGTATACACCCAACCCCCCCTCGGCCT
CGGTCTCCTTCCGAACCTCTGAAGCTCCTGTACCTCTCTAACACCATTGTGCACCTTGTTGTAG
GTCTCGTCGAGGGACCTATGTATTCCTTTTTATAAAGCTCTCTGCATGTATACAGAACGTTGTCT

TTTGACAAACATGTCATATAAACATATATATAACTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATC
GAGAAGAACGCAGCGAATCGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAAA
TCTCAAATCCTAAGCTTTGCTTCGGTCGCCGACTCGGAGCGAGCTCGGACTTGGACTTTGGG
AGTCTGCGGGCGACCCGACTTTGCTCGGGACGCCGGCTCTCCTCAAATGCATTAGCGGTGG
GCTTCGAGCCTTTGCACGGCACGGCCTGTTCGACGTCGTAGTGATCGTCGTGGGCTGGAAGT
GCTTGGATCGACGTGTCTCATGCTTCCAACCATGTTGCCGCGCC

ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้ตะเคียน

ACCCAACCCCCCCTTGGCCTTGGTCTCCTTCCGAACCTTTGAAGCTCCTGTACCTTTTTAACAC
CATTGTGCACCTTGTTGTAGGTTTTGTTGAGGGACCTAAGTATTCCTTTTTTATAAAACTTTTTGC
AAGTATACAGAACGTTGTTTTTTGACAAACAAGTCAAATAAACATATATATAACTTTCAGCAATG
GATTTTTTGGCTTTTGCATTGATGAAGAAAGCAAGGAATCGCGATAAGTAAAGGGAATTGCAGA
TTTTCCGTGAATCATTGAATTTTTGAACGCCCCTTGCGCTCCTTGGTAATTCGAGGAGCAAGCC
CGTTTGAGGGTCATTGAAATTTCAAATCCTAAACTTTGGTTCGGTTGCCGACTTGGAGGGAGGT
TGGACCTGGACCTTGGGAGTTTGCGGGGGACCCGGCTTTGCTCGGGACGCCGGCTTTCCTC
AAATGCCTTAGCGGTGGGGTTCGGGCCTTTGCCCGGCCCGGCCTGTTTGGCGTTGTAGGGG
TTGTCGGGGGAAGGAAGGGGTTGGATCCAAGTGTATCCTGGTTTCCACCATGGTGCCGCGCC
GCGCCGGGGTTGTTAATCCCGGGGCC

ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของ Sclerotium เห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้ตะเคียน

AGTCCGATGGGTGTGTATACACCCAACCCCCCCTCGGCCTCGGTCTCCTTCCGAACCTCTGA
AGCTCCTGTACCTCTCTAACACCATTGTGCACCTTGTTGTAGGTCTCGTCGAGGGACCTATGTA
TTCCTTTTTTATAAAGCTCTCTGCATGTATACAGAACGTTGTCTTTTGACAAACATGTCATATAAA
CATATATATAACTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATC
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCT
CCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAAATCTCAAATCCTAAGCTTTGCT
TCGGTCGCCGACTCGGAGCGAGCTCGGACTTGGACTTTGGGAGTCTGCGGGCGACCCGACT
TTGCTCGGGACGCCGGCTCTCCTCAAATGCATTAGCGGTGGGCTTCGAGCCTTTGCACGGCA
CGGCCTGTTCGACGTCGTAGTGATCGTCGCGGGCTGGAAGTGCTTGGATCGACGTGTCTCAT
GCTTCCAACCATGTGCCGCGCCGCGCCGGGG

ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้พะยอม

AAGCTCCTGTACCTCTCTAACACCATTGTGCACCTTGTTGTAGGTCTCGTCGAGGGACCTATGT
ATTCCTTTTTTATAAAGCTCTCTGCATGTATACAGAACGTTGTCTTTTGACAAACATGTCATATAA
ACATATATATAACTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATC
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCT
CCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAAATCTCAAATCCTAAGCTTTGCT
TCGGTCGCCGACTCGGAGCGAGCTCGGACTTGGACTTTGGGAGTCTGCGGGCGACCCGACT
TTGCTCGGGACGCCGGCTCTCCTCAAATGCATTAGCGGTGGGCTTCGAGCCTTTGCACGGCA
CGGCCTGTTCGACGTCGTAGTGATCGTCGCGGGCTGGAAGTGCTTGGATCGACGTGTCTCAT
GCTTCCAACCATGTGCCGCGCCGCGCCGGGGTTGTTAATCCCGGGGCCGGAACTCTTTTTTA
AGGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCA

ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของ Sclerotium เห็ดเผาะหนังกับกล้าไม้พะยอม

AAGCTCCTGTACCTCTCTAACACCATTGTGCACCTTGTTGTAGGTCTCGTCGAGGGACCTATGT
ATTCCTTTTTTATAAAGCTCTCTGCATGTATACAGAACGTTGTCTTTTGACAAACATGTCATATAA
ACATATATATAACTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATC
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCT
CCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATCGAAATCTCAAATCCTAAGCTTTGCT
TCGGTCGCCGACTCGGAGCGAGCTCGGACTTGGACTTTGGGAGTCTGCGGGCGACCCGACT
TTGCTCGGGACGCCGGCTCTCCTCAAATGCATTAGCGGTGGGCTTCGAGCCTTTGCACGGCA
CGGCCTGTTCGACGTCGTAGTGATCGTCGCGGGCTGGAAGTGCTTGGATCGACGTGTCTCAT
GCTTCCAACCATGTGCCGCGCCGCGCCGGGGTTGTTAATCCCGGGGCCGGAACTCTTTTTTA
AGGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCA

ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของหัวเชื้อเห็ดน้ำหมาก

TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTATAACCGAGGTGCTAGGG
CTGTCGCTGACCCTTCAAAGGGGTCGTGCACGCCCAAGTGCTCTCTCCCATCCATCTCACCC
CTTTGTGCATCACCGCGTGGATCACCTTTTTGGCTTGTTTCAAAGAGGTTGGTTCGCGTTTTTAT
ACACACCCCTTTATGTAAAGAATGTCTTTGCTTTTTGCAATAATTAAATACAACTTTCAACAACG
GATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCACAC
CCGTTTGAGTGTCGTGAACACATCCTCAACCTTCTTTTGGTTTTTTGACCAGGGAAGGCTTGGA
CTTTGGAGGCCATTTCATTGCTGGTATTCTTTTGAAGCCGGCTCCTCCTAAATGAATCAGTGGG

ACTCGCTTTGGTGATCCTCGACGTGATAAGTATTATTCTACGTCTTGGGTTTTCGCAGCACCTG
CTTCCAA

ลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ของรากเอ็กโทไมคอร์ไรซาเห็ดน้ำหมากกับยางนา

CGGAAGGATCATTACCGAACCGTCAACACGAGTTGTTGCTGGTCCTCATATGGGGGCATGTG
CACGCTCTGTTCACATATCCACTCACACCTGTGCACCCTCTGTAGTTCTGTGGTCTGGGGGGC
ATTGCCTTCCTGCCGTAGTTCTATGTCTTACACACACACACCGTGATAGAGTCTTATTGGATGT
ATGCCGCGTGTAACGCTATATAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACCTTGCGCCCTCTGGCTATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAACAC
CTCAACTCCTCATGGTTTTGCCATGGTGAGCTTGGACTTTGGGGGTTTTGCTGGCCTATGGTC
GGCTCCTCTGAAATGGATTGGCTCACCAGCGTCTGGTGGCTCATGGGTGTGATAACTATCTAC
GTCCATGGCTTTCCACCAGGTAACCCTCACCAACAGGG