ผลของหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *Russula* spp. ต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้รัง *Shorea siamensis* Miq.

นางสาวเชาวณี อ้นลำพูน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่เก็บรักษาในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECTS OF SPORE INOCULA OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI *Russula* spp. ON GROWTH STIMULATION OF *Shorea siamensis* Miq.

Miss Chaowanee Aunlumpoon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *Russula* spp. ต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้รัง *Shorea siamensis* Miq.
โดย	นางสาวเชาวณี อ้นลำพูน
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร)

เชาวณี อ้นลำพูน : ผลของหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *Russula* spp. ต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้รัง *Shorea siamensis* Miq. (EFFECTS OF SPORE INOCULA OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI *Russula* spp. ON GROWTH STIMULATION OF *Shorea siamensis* Miq.) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว, 104 หน้า.

ไม้วงศ์ไม้ยางเป็นไม้ที่มีความสำคัญและพบเป็นไม้เด่นในป่าประจำภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยเฉพาะประเทศไทย อีกทั้งเป็นไม้ที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศและมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประเมินผลของหัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง (*Russula rosea* Pers.) เห็ดตะไคลเขียว (*R. virescens* Fr.) และเห็ดถ่านเล็ก (*R. densifolia* (Secr.) Gill.) ที่มีผลต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้รัง (*Shorea siamensis* Miq.) โดยสปอร์ของดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด ที่เก็บรักษาในทรายและถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง แช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสปอร์ของดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด ไม่สามารถงอกได้และไม่เกิดการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้อายุ 6 เดือน หลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ทำการเก็บรักษา เมื่อทำการประเมินผลของหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด ต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของกล้าไม้รังอายุ 12 เดือน หลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด พบว่ากล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็กมีการเจริญทางด้านความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก มวลชีวภาพรวม และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ปริมาณธาตุอาหาร ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ของส่วนเหนือดินของกล้าไม้รังที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อจัดจำแนกชนิดของรากเอคโตไมคอร์ไรซา พบการปนเปื้อนของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Tomentella* spp. และ *Inocybe* sp. แต่ไม่พบราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิดที่ใช้เป็นหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาใส่ให้กับกล้าไม้รัง นอกจากนี้พบว่าอัตราการรอดตายของกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังน้ำลดเป็นเวลา 2 เดือน สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายของกล้าไม้รังเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา...2554.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

5272285023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS : ECTOMYCORRHIZA / SPORE INOCULUM / *Russula* / DIPTEROCARP

CHAOWANEE AUNLUMPOON : EFFECTS OF SPORE INOCULA OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI *Russula* spp. ON GROWTH STIMULATION OF *Shorea siamensis* Miq. ADVISOR : ASST.PROF. JITTRA PIAPUKIEW, Ph.D., 104 pp.

Trees of the family Dipterocarpaceae are the most important and dominant trees in the tropical forests of Southeast Asia as they play an important ecological role and are also important economically. In this study, an experiment was conducted to determine effects of spore inocula of ectomycorrhizal fungi, *Russula rosea* Pers., *Russula virescens* Fr.and *Russula densifolia* (Secr.) Gill. on growth stimulation of *Shorea siamensis* Miq. seedlings. Spores of the tested ectomycprrhizal fungi preserved in sand or in plastic bags at 4 ° C and room temperature was unable germination in sterile distilled water within 48 hours. The tested ectomycorrhizal spores could not germinate and form ectomycorrhizae with *S. siamensis* seedlings. Seedlings of *S. siamensis* were inoculated with spores of three ectomycorrhizal fungi and were grown in pots containing sterilized growing medium for 12 months. The results showed that the seedlings inoculated with spore inocula of *R. rosea*, *R. densifolia* and *R. virescens* had shoot height, stem diameter shoot and root dry weight total biomass and percentage of ectomycorrhizal colonization were significantly greater than non-inoculated seedlings. Inoculation with these ectomycorrhizal species had no significant effect of shoot N, P and K concentrations in the seedlings. The ectomycorrhizal roots of contaminant ectomycorrhizal fungi such as *Tomentella* spp. and *Inocybe* sp. were observed whereas ectomycorrhizal roots of the tested ectomycorrhizal fungi were not found. In addition, Survival rates of *S. siamensis* were greater for inoculated seedlings with spore concentration 10^7 spores per milliliter than non-inoculated seedlings at month 2 after the floods. The results suggest that inoculation with ectomycorrhizal fungi can stimulate the early growth and survival rates of *S. siamensis* seedlings.

Field of Study : ... Biotechnology..... Student's Signature .....
Academic Year : .2011..... Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุลวงไปได้ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นที่ช่วยทำให้การแก้ไข ปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นที่ช่วยทำให้การแก้ไข ปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ของหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง และทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ การสนับสนุน และกำลังใจที่ดีตลอดมา

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และญาติพี่น้องที่คอยให้ความช่วยเหลือคำแนะนำ การสนับสนุน แรงบันดาลใจ และกำลังใจที่ดีตลอดมา

โครงการนี้ได้รับเงินทุนวิจัยสนับสนุนจาก บัณฑิตวิทยาลัยและโครงการวิทยาเพื่อพื้นถิ่นตามแผนพัฒนาวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2551-2555) ที่ให้ทุนวิจัยสนับสนุนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

2.1 ไมคอร์ไรซา..... 5

2.2 เอคโตไมคอร์ไรซา..... 6

2.3 ประโยชน์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 12

2.3.1. กระตุ้นการเติบโตของพืช..... 12

2.3.2 เพิ่มความทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม..... 13

2.3.3 ป้องกันรากพืชจากจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช..... 13

2.3.4 อาหารของมนุษย์และสัตว์..... 13

2.4 ชนิดของหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 13

2.4.1 การใช้ดินเชื้อจากป่าธรรมชาติหรือสวนป่า..... 13

2.4.2 การใช้หัวเชื้อเส้นใย..... 14

2.4.3 การใช้หัวเชื้อสปอร์..... 14

2.5 ราเอคโตไมคอร์ไรซากับการปลูกป่าทดแทน..... 15

2.6 รัง..... 16

2.7 เห็ดแดง..... 18

2.8 เห็ดตะไคลเขียว..... 19

2.9 เห็ดถ่านเล็ก..... 21

บทที่ หน้า

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประเมินผลการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 22

3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย..... 24

3.1 สารเคมี..... 24

3.2 อุปกรณ์และครุภัณฑ์..... 25

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 27

3.3.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่างดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา..... 27

3.3.2 การทำหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 27

3.3.3 การทดสอบการเกิดไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รังเบื้องต้น..... 27

3.3.4 การทดสอบความอยู่รอดของสปอร์และความสามารถในการเกิดไมคอร์ไรซากับกล้าไม้..... 28

3.3.5 การทดสอบการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 31

3.3.6 การตรวจสอบชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากเอคโตไมคอร์ไรซาด้วยวิธีอณูชีววิทยา..... 33

3.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... 37

4 ผลการวิจัย..... 38

4.1 การตรวจสอบการเกิดไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รังเบื้องต้น..... 38

4.2 การมีชีวิตของสปอร์และความสามารถในการสร้างไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รัง..... 39

4.2.1 การทดสอบการงอกของสปอร์..... 39

4.2.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รัง..... 43

4.3 ผลการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา ครั้งที่ 1..... 46

4.3.1 ผลอัตราการเติบโตของกล้าไม้ และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราที่ราก..... 46

4.3.2 การจัดจำแนกรากเอคโตไมคอร์ไรซา..... 51

4.4 ผลการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา ครั้งที่ 2..... 53

5 วิจารณ์ผลการวิจัย..... 60

6 สรุปผลการวิจัย..... 67

รายการอ้างอิง..... 69

ภาคผนวก..... 78

หน้า

ภาคผนวก ก..... 79
ภาคผนวก ข..... 80
ภาคผนวก ค..... 83
ภาคผนวก ง..... 85
ภาคผนวก จ..... 87
ภาคผนวก ฉ..... 101
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 104

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 8

2.2 ชนิดพืชที่มีความสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 10

3.1 แสดง Buffer และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ..... 35

3.2 สาร ความเข้มข้น และปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอาร์เอฟแอลพี..... 35

4.1 จำนวนกล้าไม้รังที่รอดตายหลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา.....45

4.2 เปรียบเทียบการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้รังอายุ 12 เดือน ในชุดการทดลองต่าง ๆ... 48

4.3 เปรียบเทียบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากของกล้าไม้รังอายุ 12 เดือน ในชุดการทดลองต่าง ๆ 50

4.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาและชนิดของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบในชุดการทดลอง..... 52

4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสรากเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละลักษณะสัณฐานวิทยากับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ที่ตำแหน่ง ITS..... 53

4.6 เปรียบเทียบการเติบโตของกล้าไม้อายุ 3 เดือน หลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา และชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา 56

4.7 เปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตและอัตราการตายของกล้าไม้รังที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา..... 57

4.8 เปรียบเทียบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากของกล้าไม้รังหลังน้ำลดเป็นเวลา 2 เดือน..... 59

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ชนิดของราไมคอร์ไรซาตามลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา..... 5

2.2 ลักษณะกายวิภาคของรากเอคโตไมคอร์ไรซา..... 6

2.3 ลักษณะแผ่นแมนเทิล..... 7

2.4 รูปแบบการแตกแขนงของรากเอคโตไมคอร์ไรซา..... 7

2.5 ลักษณะพื้นผิวของรากเอคโตไมคอร์ไรซา..... 8

2.6 ลักษณะต้น ใบ และผลของรัง..... 17

2.7 ลักษณะของดอกเห็ดแดง..... 18

2.8 ลักษณะรูปร่างและลวดลายของสปอร์ดอกเห็ดแดง..... 19

2.9 ลักษณะของดอกเห็ดตะไคลเขียว..... 20

2.10 ลักษณะรูปร่างและลวดลายของสปอร์ดอกเห็ดตะไคลเขียว..... 20

2.11 ลักษณะของดอกเห็ดถ่านเล็ก..... 21

2.12 ลักษณะรูปร่างและลวดลายของสปอร์ดอกเห็ดถ่านเล็ก..... 22

3.1 สปอร์ที่แยกจากตะแกรงร่อนขนาด 850 ไมครอน และ 180 ไมครอน..... 27

3.2 ลักษณะของกล้าไม้รังในขวดแก้ว..... 28

3.3 การเก็บรักษาสปอร์..... 29

3.4 ลักษณะและการงอกของผลรัง..... 30

4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยารากเอคโตไมคอร์ไรซา 38

4.2 รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Hin*fI 39

4.3 ลักษณะสปอร์เห็ดแดงที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ 40

4.4 ลักษณะสปอร์เห็ดตะไคลเขียวที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ 41

4.5 ลักษณะสปอร์เห็ดถ่านเล็กที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ 42

4.6 กล้าไม้รังหลังอายุ 1 เดือน ที่ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดงที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ 43

4.7 กล้าไม้รังหลังอายุ 1 เดือน ที่ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดตะไคลเขียวที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ 44

4.8 กล้าไม้รังหลังอายุ 1 เดือน ที่ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดถ่านเล็กที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ 44

4.9 เปรียบเทียบการเติบโตของกล้าไม้รังอายุ 12 เดือน 48

4.10 การเติบโตทางความสูงของกล้าไม้รังอายุ 4 เดือน ถึง 12 เดือน ในชุดการทดลองต่าง ๆ.... 49

ภาพที่ หน้า

4.11 การเติบโตทางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากของกล้าไม้รังอายุ 4 เดือน ถึง 12 เดือน ในชุดการทดลองต่าง ๆ 49
4.12 ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม..... 50
4.13 ลักษณะสัณฐานวิทยารากเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 8 ลักษณะสัณฐานวิทยา 51
4.14 เปรียบเทียบการเจริญของกล้าไม้รังเมื่ออายุ 3 เดือน ในชุดการทดลองต่าง ๆ 55
4.15 ลักษณะของกล้าไม้รังหลังน้ำลดเป็นเวลา 1 เดือน 56
4.16 ต้นอ่อนของกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา 57
4.17 เปรียบเทียบต้นอ่อนที่ขึ้นใหม่ของกล้าไม้รังที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา หลังผ่านเหตุการณ์น้ำท่วมเป็นเวลา 2 เดือน..... 58
4.18 ลักษณะลำต้นส่วนใต้ดินของกล้าไม้รัง 58
4.19 ลักษณะสัณฐานวิทยารากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้รังที่พบหลังจากหลังน้ำลด เป็นเวลา 2 เดือน..... 59

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันป่าไม้ของประเทศไทยได้ถูกทำลายลงไปมาก ทำให้พื้นที่ป่าภายในประเทศลดลงอย่างรวดเร็ว จึงมีผลกระทบต่อปัญหาสิ่งแวดล้อม เช่น ภัยแล้ง อุทกภัย และวาตภัย เป็นต้น ดังนั้น การปลูกป่าเพื่อฟื้นฟูสภาพป่าที่เสื่อมโทรมในบริเวณที่เคยเป็นป่ามาก่อน (reforestation) หรือการปลูกป่าในบริเวณที่ไม่เคยเป็นป่ามาก่อน (aforestation) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มพื้นที่ป่าไม้ของประเทศ และเป็นการส่งเสริมการปลูกสร้างสวนป่าโดยใช้ไม้ประจำถิ่นของไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งไม้ในวงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae) ซึ่งเป็นไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและเป็นไม้เด่นที่พบในป่าเต็งรัง เป็นเรื่องที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง แต่เนื่องจากไม้ในวงศ์ไม้ยางมีอัตราการเติบโตช้า มักแคระแกรนและมีอัตราการรอดชีวิตต่ำเมื่อย้ายปลูก สาเหตุหนึ่งคือไม้ในวงศ์นี้ต้องการราเอคโตไมคอร์ไรซาช่วยเร่งการเจริญและช่วยให้ต้นกล้าอยู่รอดได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นการคัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมใส่ให้กับกล้าไม้วงศ์ไม้ยางจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะทำให้กล้าไม้นั้นมีการเติบโตดีและอัตราการรอดตายสูงเมื่อย้ายปลูก ซึ่งจะส่งผลให้การปลูกป่าไม้วงศ์ไม้ยางของไทยประสบความสำเร็จได้

เอคโตไมคอร์ไรซาเป็นการอยู่ร่วมกันระหว่างราและรากพืชชั้นสูง โดยที่รานั้นไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช การอยู่ร่วมกันนี้เป็นความสัมพันธ์ต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ (Kjøller, 2006) พืชได้รับน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตจากรา ส่วนราได้รับสารอาหารผ่านทางระบบราก เช่น แป้ง น้ำตาล โปรตีน กรดอะมิโน และวิตามิน เป็นต้น (อนิวรรต เฉลิมพงษ์, 2542) โดยราจะทำหน้าที่เหมือนเป็นรากฝอยให้แก่พืช เส้นใยที่อยู่ภายนอกและภายในรากจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมธาตุอาหารให้แก่พืช ทำให้พืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอยู่ที่รากมีอัตราการเติบโตสูงกว่าพืชที่ไม่มีราชนิดนี้ และลดอัตราการตายของกล้าไม้เมื่อย้ายปลูกลงแปลง (Smith และ Read, 1997) ราเอคโตไมคอร์ไรซาจะสร้างเส้นใยสานกันเป็นแผ่นแน่นหรือเป็นเยื่อหุ้มหนาปกคลุมผิวราก เรียกว่า แผ่นแมนเทิล (Mantle sheath) และแทงเส้นใยเข้าไปเจริญในช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิส (epidermis) กับเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ (cortex) แต่ไม่เจริญเข้าไปในเซลล์ดังกล่าวและมีเส้นใยสานกันเป็นร่างแห เรียก เส้นใยฮาร์ติก (Hartig net) (Mukerji และคณะ, 2000) ดังนั้นรากพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่จะมีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไป เช่น ไม่มีขนราก

อ้วนสั้น แตกแขนงเป็นจำนวนมาก มีสีต่าง ๆ เช่น สีดำ ขาว เทา น้ำตาล ขึ้นอยู่กับชนิดของรา ชนิดพืช รวมถึงปัจจัยสิ่งแวดล้อม

ราเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นราที่ส่วนใหญ่อยู่ใน Phylum Basidiomycota และบางส่วนใน Phylum Ascomycota พบว่ามีประมาณ 6,000 ชนิด (Harley และ Smith, 1983 ; Landeweert, 2005) ราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดสร้างดอกเห็ดที่นิยมนำมารับประทานและมีราคาแพง เช่น *Amanita* spp. *Boletus* spp. และ *Russula* spp. (สุนัดดา โยมญาติ, 2545) ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถเจริญอยู่ร่วมกับไม้หลายวงศ์ประมาณกว่า 2,000 ชนิด เช่น ไม้วงศ์ก่อ (Fagaceae) ไม้วงศ์วอลนัท (Jungrandaceae) ไม้วงศ์สนเขา (Pinaceae) ไม้วงศ์ยูคาลิปตัส (Myrtaceae) และไม้วงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae) (Brundrett และคณะ, 1996)

เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซามีความจำเพาะกับชนิดของพืชอาศัยในการกระตุ้นการเติบโตและการอยู่รอดของพืช ซึ่งราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดจะมีผลต่อพืชอาศัยแตกต่างกัน (Buschena และคณะ, 1992) ดังนั้นการคัดเลือกราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อใส่ให้กับพืชจึงเป็นเรื่องที่จำเป็น ชนิดของหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซามีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิด คือ การใช้ดินเชื้อ (soil inoculum) จากป่าธรรมชาติหรือสวนป่า การใช้หัวเชื้อเส้นใย (mycelial inoculum) และการใช้หัวเชื้อสปอร์ (spore inoculum) (Amores และคณะ, 1991) ชนิดของหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่นิยมใช้มากที่สุดคือ การใช้หัวเชื้อสปอร์ (Lu และคณะ, 1998) เนื่องจากสามารถเตรียมได้โดยไม่ต้องอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ เก็บไว้ได้นาน สามารถใช้กับราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้และต้นทุนต่ำกว่าการผลิตหัวเชื้อเส้นใย (Brundrett และคณะ, 2005) ข้อเสียของวิธีนี้คือ สปอร์ที่นำมาทำหัวเชื้อจะมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง โดยเฉพาะถ้าเป็นสปอร์ที่เก็บจากหลายพื้นที่และพืชอาศัยต่างกัน (จิตรตรา กาญจนประยุธ, 2539) มีรายงานวิจัยหลายรายงานพบว่า สปอร์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกได้หลายชนิดมีประสิทธิภาพใช้เป็นหัวเชื้อใส่ให้กับกล้าไม้หลายชนิดได้แก่ การศึกษาผลของหัวเชื้อสปอร์จาก *Pisolithus arhizus* และ *Scleroderma* sp. ต่อ *Shorea pinanga* และการศึกษาผลของหัวเชื้อสปอร์จาก *Melanogaster ambigugs Rhizopogon colossus* และ *R. subareolatus* ต่อต้น Douglas-fir พบว่าหัวเชื้อสปอร์จากราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถกระตุ้นการเติบโตและลดอัตราการตายของต้นกล้าได้ (Pera และคณะ, 1999; Turjaman และคณะ, 2005) และจากการศึกษาผลของหัวเชื้อสปอร์จาก *Scleroderma* ต่อการเติบโตของ *Eucalyptus globulus E. urophyll Pinus elliottii* และ *P. radiata* พบว่าหัวเชื้อสปอร์สามารถกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ดังกล่าวได้ (Chen และคณะ, 2006) นอกจากนี้จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของ

หัวเชื้อสปอร์และอายุการเก็บรักษาสปอร์เพื่อใช้ทำหัวเชื้อสปอร์ พบว่าในการทำหัวเชื้อสปอร์จาก *Scleroderma* เพื่อใส่ *E. globulus* และ *E. urophylla* ควรใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อสปอร์มากกว่าหรือเท่ากับ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และควรเก็บรักษาสปอร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้สามารถกระตุ้นการเติบโตและลดอัตราการตายของกล้าไม้ดังกล่าวได้ดี (Chen และคณะ, 2006)

เห็ดในสกุล *Russula* เช่น เห็ดแดง *Russula rosea* Pers. เห็ดตะไคลเขียว *R. virescens* Fr. และเห็ดถ่านเล็ก *R. densifolia* (Secr.) Gill เป็นต้น เป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบได้ทั่วไปบนพื้นดินในป่าผลัดใบ (อนงค์ จันทร์ศรีกุล และคณะ, 2551) และพบอาศัยอยู่ร่วมกับรากไม้ในวงศ์ไม้ยางหลายชนิด เช่น เต็ง รัง พลวง เหียง กราดและยางนา เป็นต้น ซึ่งเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และสามารถพบดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาในสกุล *Russula* เกิดขึ้น เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซาสกุล *Russula* ส่วนใหญ่มักสร้างดอกเห็ดรับประทานได้ และสามารถกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้วงศ์ไม้ยาง ดังนั้นราเอคโตไมคอร์ไรซาสกุลนี้จึงเหมาะสมที่จะนำมาทำหัวเชื้อใส่กับกล้าไม้วงศ์ไม้ยาง แต่เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดนี้มักไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ การใช้สปอร์เป็นหัวเชื้อใส่ให้กับกล้าไม้จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด ดังนั้นการประเมินผลของหัวเชื้อสปอร์จาก *Russula* spp. ที่มีผลต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้วงศ์ไม้ยางจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมสำหรับต้นกล้าที่ใช้ในการปลูกป่าไม้วงศ์ไม้ยาง ตลอดจนเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในเชิงการค้าต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาในสกุล *Russula* spp. ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้รัง

ขั้นตอนการวิจัย

1. การเก็บและเตรียมตัวอย่างดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา
2. การทำหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา
3. การทดสอบการเกิดไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รังเบื้องต้น
4. การทดสอบความอยู่รอดของสปอร์และความสามารถในการเกิดไมคอร์ไรซากับกล้าไม้
5. การทดสอบการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา
6. การตรวจสอบชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากเอคโตไมคอร์ไรซาด้วยวิธีอณูชีววิทยา
7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

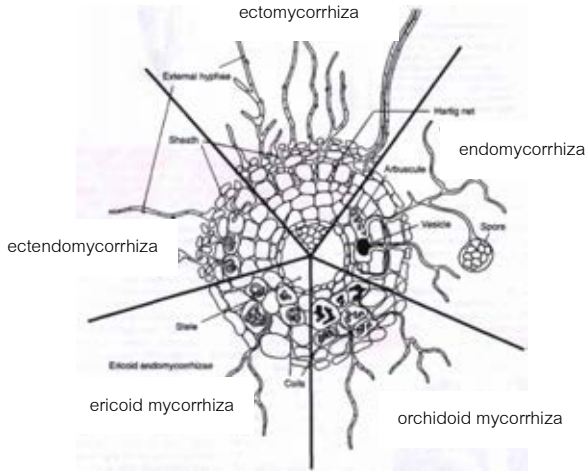
ได้หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในสกุล *Russula* ที่สามารถกระตุ้นการเติบโตของต้นกล้าไม้รัง ซึ่งจะส่งผลให้การปลูกป่าไม้วงศ์ไม้ยางของไทยประสบความสำเร็จได้ในอนาคต

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza)

ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) มาจากภาษากรีกว่า mike แปลว่าเชื้อรา รวมกับคำว่า rhiza แปลว่ารากา (Frank, 1885) ไมคอร์ไรซาจึงเป็นการอยู่ร่วมกันระหว่างราและรากพืชชั้นสูง โดยรานั้นไม่ใช่ราสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคในพืช ซึ่งการอยู่ร่วมกันเป็นความสัมพันธ์แบบต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ โดยพืชจะได้รับน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็น เช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ส่วนราจะได้รับสารอาหารจากพืช เช่น โปรตีน น้ำตาล และวิตามิน ผ่านทางระบบรากของพืช ทำให้พืชที่มีราไมคอร์ไรซาอยู่ที่รากมีอัตราการเจริญเติบโตและความสามารถในการทนทานต่อสภาวะต่าง ๆ เช่น ทนทานต่อสภาพพื้นที่ที่แห้งแล้ง ทนต่อความเป็นกรด-ด่างของดิน และทนทานต่อสภาพพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักได้ดีกว่าพืชที่ไม่มีราไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ด้วย (Boxman และ Roelofs, 1988; Lee และ Alexander, 1994; Rousseau และคณะ, 1994; Yazid และคณะ, 1994; Smith และ Read, 1997)

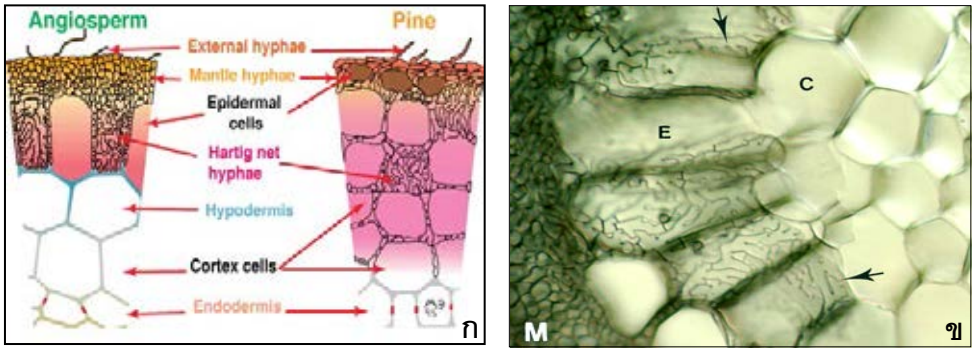
Harley และ Smith (1983) ได้ทำการจัดจำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซาตามลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาได้เป็น 7 กลุ่มคือ (1) ectomycorrhiza (2) endomycorrhiza (vesicular-arbuscular mycorrhiza) (3) ectendomycorrhiza (4) arbutoid mycorrhiza (5) monotropoid mycorrhiza (6) ericoid mycorrhiza และ (7) orchidoid mycorrhiza (ภาพ 2.1)



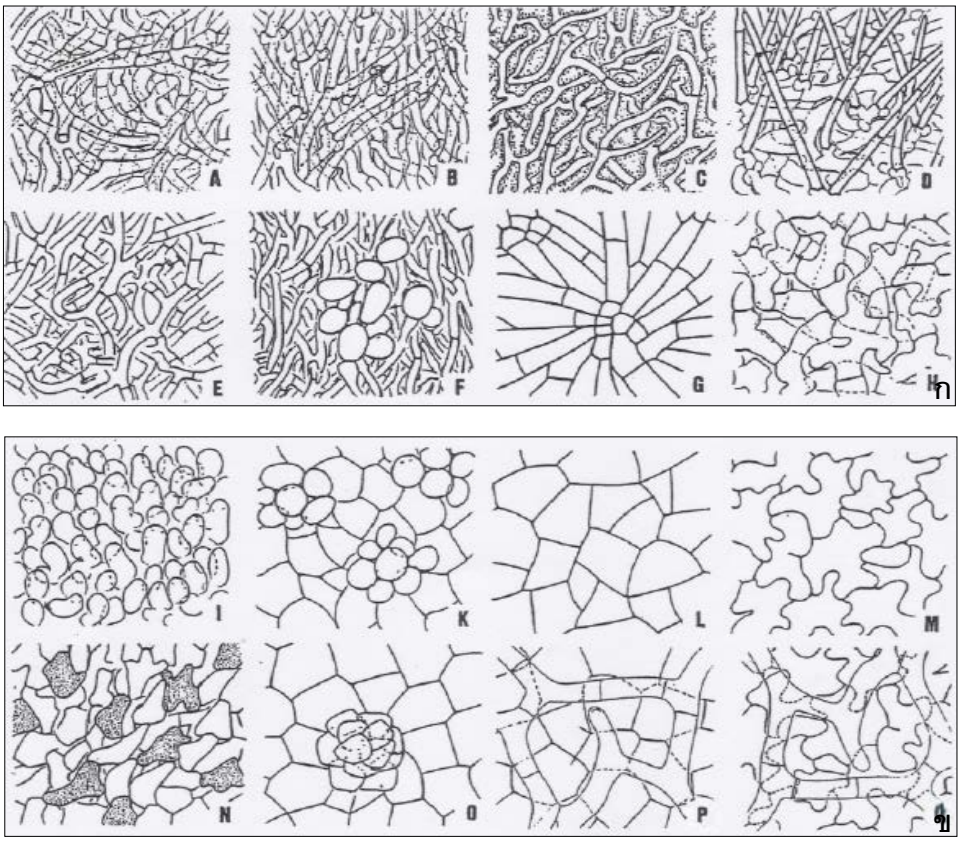
ภาพที่ 2.1 แสดงชนิดของราไมคอร์ไรซาตามลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา
ที่มา: http://www.world-of-fungi.org

2.2 เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza)

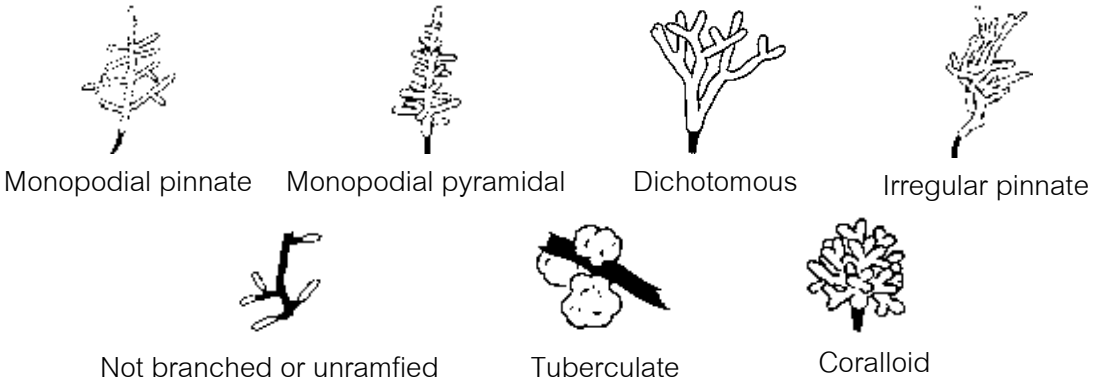
เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) เป็นไมคอร์ไรซาที่มีเส้นใยของราเจริญสานตัวกันเป็นแผ่นอัดแน่นหรือเป็นเยื่อหุ้มบริเวณปลายรากพืช เรียก แผ่นแมนเทิล (mantle sheath) และเส้นใยบางส่วนจะเจริญเข้าไปเจริญอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิส (epidermis) และเซลล์ชั้นเคอร์เท็กซ์ (cortex) แต่เส้นใยจะไม่เจริญเข้าไปอยู่ในเซลล์ดังกล่าว โดยเส้นใยจะสานกันเป็นร่างแห เรียก ใยฮาร์ติก (hartig net) (Mukerji และคณะ, 2000) (ภาพ 2.2) ดังนั้นรากพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่จะมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ไม่มีขนราก อ้วนสั้น แตกแขนงเป็นจำนวนมาก มีสีต่าง ๆ เช่น สีดำ ขาว เทา น้ำตาล ขึ้นอยู่กับชนิดของรา ชนิดพืช และรวมถึงปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ (Thomson และคณะ, 1990; Garbayee และคณะ, 1988; Nylund และ Wallander, 1989) ซึ่งลักษณะทางกายวิภาคของแผ่นแมนเทิลที่สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ plectenchymatous และ pseudoparenchymatous โดย plectenchymatous จะมีลักษณะของเส้นใยที่มีขอบเขตชัดเจนและเป็นเส้นตรง ส่วน pseudoparenchymatous เส้นใยจะมีขนาดสั้นถึงมีเส้นใยน้อยมากหรือแทบจะไม่มีเส้นใย และมีลักษณะของเส้นใยที่ถูกทำลายไม่มีขอบเขตของเส้นใยที่แน่ชัด (ภาพ 2.3) การแตกแขนงของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีรูปแบบการแตกแขนงที่เรียกว่า heterorhizy ซึ่งจะประกอบไปด้วยรากเอคโตไมคอร์ไรซาขนาดสั้นจำนวนมาก (ภาพ 2.4) รวมถึงพื้นผิวของรากเอคโตไมคอร์ไรซา (ภาพ 2.5) สามารถนำมาจัดจำแนกกลุ่มของรากเอคโตไมคอร์ไรซา (Agerer, 1991)



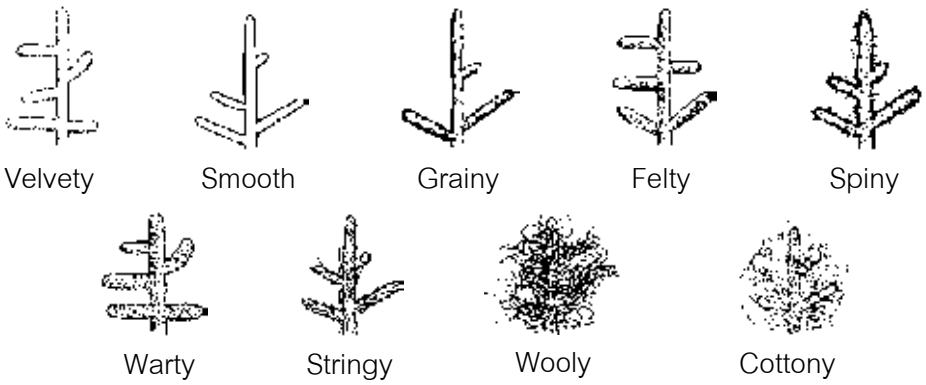
ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะกายวิภาคของรากเอคโตไมคอร์ไรซา ภาพ ก คือ ภาพตัดขวางของรากพืช ด้านซ้ายคือรากพืช Angiosperm ด้านขวาคือรากพืช Conifers ภาพ ข คือ ภาพตัดขวางของราก *Populus tremuloides* (M คือ mantle E คือ epidermis cell C คือ cortex ลูกศรชี้ คือ hartig net) ที่มา: http://mycorrhizas.info/ecm.html



ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะแผ่นแมนเทิล (ก) แผ่นแมนเทิลแบบ plectenchymatous (ข) แผ่นแมนเทิลแบบ pseudoparenchymatous ที่มา: Agerer (1991)



ภาพที่ 2.4 แสดงรูปแบบการแตกแขนงของรากเอคโตไมคอร์ไรซา ที่มา:http://www.pfc.cfs.nrcan.gc.ca/biodiversity/bcern/glossary/glossary_system-tips_e.html



ภาพที่ 2.5 แสดงลักษณะพื้นผิวของรากเอคโตไมคอร์ไรซา
ที่มา:http://www.pfc.cfs.nrcan.gc.ca/biodiversity/bcern/glossary/glossary_system-tips_e.htm

ราประมาณกว่า 6,000 ชนิดพบว่ามีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับรากพืช (Harley และ Smith, 1983 ; Landeweert, 2005) ส่วนใหญ่เป็นราใน Phylum Basidiomycota และส่วนน้อยใน Phylum Ascomycota (Trappe, 1962 ; Harley และ Smith, 1983) (ตารางที่ 2.1) ซึ่งเป็นรากลุ่มที่สร้างดอกเห็ดมีทั้งชนิดที่กินได้และชนิดที่กินไม่ได้ ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถเจริญอยู่ร่วมกับไม้หลายวงศ์ประมาณกว่า 2,000 ชนิด เช่น Fagaceae Jungrandaceae Pinaceae Myrtaceae และ Dipterocarpaceae (Brundrett และคณะ, 1996 ; Alexander และคณะ, 2005) (ตารางที่ 2.2)

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

Phylum	Family	Genera
Ascomycota	Balsamiceae	*Balsamia*
	Elaphomycetaceae	*Elaphomyces*
	Geneaceae	*Genabea, Genea*
	Pezizaceae	*Pachyphloeus*
	Tefeziaceae	*Choiromyces*
	Tuberaceae	*Tuber*

ตารางที่ 2.1 ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา (ต่อ)

Phylum	Family	Genera
Basidiomycota	Amanitaceae	*Amanita, Limacella*
	Astraeaceae	*Astraeus*
	Boletaceae	*Alpova, Astroboletus, Aureoboletus, Boletus, Bolettiellus, Buchwaldoboletus, Fuscoboletinus, Gyroporus, Heimiella, Leccinum, Pulveroboletus, Suillus, Truncocolumella, Xanthoconium*
	Canthraellaceae	*Cantharellus, Craterellus, Polyzellu*
	Chondrogastraceae	*Chodrogaster*
	Ramariaceae	*Ramaria*
	Entolomaceae	*Entoloma*
	Leucogastraceae	*Leucogaster, Leucophleps*
	Paxillaceae	*Neopaxillus, Paxillus*
	Cortinariaceae	*Astrosporina, Cortinarius, Dermocybe, Hymenogaster, Inocybe,*
	Corticiaceae	*Amphinema, Byssosporia, Piloderma*
	Gomphidiaceae	*Brauniellula, Chroogomphus, Gomphidius*
	Hygrophoraceae	*Hygrophorus*
	Hysterangiaceae	*Hysterangium*
	Octavianinaceae	*Octavianina, Sclerogaster*
	Scutigeraceae	*Albatrellus*
	Pisolithaceae	*Pisolithus*
	Russulaceae	*Lactarius, Russula*
	Elasmomycetaceae	*Elasmomyces*
	Sclerodermataceae	*Scleroderma*

ตารางที่ 2.1 ชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา (ต่อ)

Phylum	Family	Genera
	Strobilomycetaceae	*Strobilomyces*
	Thelephoraceae	*Boletopsis, Thelephera*
	Tricholomataceae	*Clitocybe, Cystoderma, Cantharellula, Laccaria, Leucopaxillus, Tricholoma*

ตารางที่ 2.2 ชนิดพืชที่มีความสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซา (Lakhanpal, 1999)

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

ตารางที่ 2.2 ชนิดพืชที่มีความสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซา (ต่อ)

Host	Ectomycorrhiza
Picea smithiana (Wall.) Boiss.	*Hygrophorus chrysodon* (Batsch ex Fr.) Fr.
	Hygrophorus pudorinus (Fr.) Fr.
	Lactarius deliciosus (Fr.) S.F. Gray
	Leucopaxillus amareus (A.& S. ex Fr.) Kuhn.
	Suillus sibricus (Singer) Singer
Pinus roxburghii Sarg.	*Amanita berkeleyi* (Hook. F.) Bas
	Amanita emilii Riel.
	Amanita gemmata (Fr.) Bert.
	Amanita vaginata (Bull. ex. Fr.) Vitt.
	Lactarius sanguifluus (Paulet ex Fr.) Fr.
Pinus wallichiana A.B. Jackson	*Clitocybe gibba* (Fr.) Kummer
	Laccaria amethystine (Bull. ex Merat) Murrill
	Laccaria laccata (Scop. ex. Fr.) Berk. & Br.
	Suillus granulates (Fr.) Kuntze
	Suillus placidus (Bonorden) Singer
	Suillus umbonatus Dick & Snell
Rhododendrom arboretum Smith	*Hygrophorus subalpinus* Smith
Quercus incana Roxb.	*Agaricus angustus* Fr.
	Amanita rubescens (Fr.) S.F. Gray
	Amanita umbonata Pomerleaus
	Boletus gertrudiae Peck
	Boletus vermiculosoides Smith & Thiers
	Collybia fusipes (Bull. Ex Fr.) Quel.
	Gomphus clavatus (Fr.) S. F. Gray
	Lactarius hygrophoroides Berk.& Curt.
	Lactarius piperatus (Scop.) Fr.

ตารางที่ 2.2 ชนิดพืชที่มีความสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซา (ต่อ)

Host	Ectomycorrhiza
	Lactarius piperatus (Scop.) Fr.
	Lactarius zonarius (Bull. ex St-Amans) Fr.
	Leucoagaricus rubrotinctus (Peck) Singer
	Phylloporus rhodoxanthus (Schw.) Bres.
	Leccinum luteum Smith, Thiers and Walting
	Russula brevipes Peck
	Russula lilacea Quel.
	Strobilomyces annulatus Corner
	Strobilomyces mollis Corner
Quercus semicarpifolia Smith	*Lepista nuda* (Bull.) Fr.

2.3 ประโยชน์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา

2.3.1. กระตุ้นการเติบโตของพืช

พืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ด้วยจะมีอัตราการเจริญสูงกว่าพืชที่ไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ด้วย เนื่องจากเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาจะทำหน้าที่เปรียบเสมือนรากฝอยที่แผ่กระจายไปทุกทิศทาง จึงสามารถดูดน้ำและแร่ธาตุจากแหล่งที่รากพืชไม่สามารถเจริญไปถึง ตลอดจนเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมธาตุอาหารและน้ำของรากพืช (Marx,1969; Smith and Read, 1997; Simard และคณะ, 2002) ตัวอย่างเช่น จากการศึกษาของ Duponnois และคณะ (2005) พบว่า *Pisolithus albus* IR100 *P. albus* COI024 และ *Scleroderma dictyosporum* IR109 สามารถเพิ่มอัตราการเติบโตและน้ำหนักแห้งของกล้าไม้ *Acacia holosericea* ได้ทั้งการปลูกในเรือนเพาะชำและการย้ายปลูกลงพื้นที่จริงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการศึกษาของ Sharma และคณะ (2008) ที่ใส่หัวเชื้อ *Cantharellus tropicalis* ให้กับกล้าไม้ *Dendrocalamus* พบว่า กล้าไม้ที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซามีขนาด ลำต้นและความสูงมากกว่ากล้าไม้ที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.3.2 เพิ่มความทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม

ราเอคโตไมคอร์ไรซาช่วยให้พืชมีความแข็งแรง ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ความแห้งแล้ง ความเป็นกรดหรือด่างของดิน โลหะหนัก และสารกัมมันตภาพรังสี เป็นต้น (Smith and Read, 1997; Simard และคณะ, 2002) โดยราเอคโตไมคอร์ไรซาจะช่วยป้องกันไม่ให้รากเสียน้ำมากจนเกินไปหรือรากแห้งตาย (Marx,1969) ตลอดจนช่วยปรับความเป็นกรดหรือด่างของดินให้เหมาะสมต่อการเจริญของพืช อีกทั้งราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถสร้างกรดอินทรีย์ที่จะช่วยปกป้องพืชจากความเป็นพิษของโลหะหนักในดิน และช่วยลดความเข้มข้นของโลหะหนักในเนื้อเยื่อพืช (Danielson, 1985; Jones และ Hutchinson, 1986)

2.3.3 ป้องกันรากพืชจากจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช

โดยรากพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ด้วยจะมีความสามารถในการป้องกันการเข้าทำลายรากของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ดีกว่ารากพืชที่ไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ กล่าวคือแผ่นแมนเทิลและใยฮาร์ติกจะทำหน้าที่เปรียบเสมือนเกราะป้องกันเชื้อโรคที่จะเข้ามาทำลายรากพืช (Marx,1969) ทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรคที่ระบบรากสูงขึ้น อีกทั้งราเอคโตไมคอร์ไรซายังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต่อต้านหรือยับยั้งราและแบคทีเรียชนิดอื่นได้ Tsantrizos และคณะ (1991) พบว่าสารปฏิชีวนะที่สกัดได้จากราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus tinctorius* สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และทำให้เส้นใยราสาเหตุโรคพืชสลายตัว

2.3.4 อาหารของมนุษย์และสัตว์

ราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิดสามารถสร้างดอกเห็ดที่นำมารับประทานได้ เช่น *Tuber aestivum Tricholoma matsutake* และ *Cortinellis shiitake* เป็นต้น ในประเทศที่นิยมนำมารับประทานและมีราคาแพงเช่น เห็ดแดง (*Russula rosea*) เห็ดถ่านเล็ก (*R. densifolia*) เห็ดตะไคลเขียว (*R. virescens*) และเห็ดเผาะ (*Astraeus* spp.) เป็นต้น อีกทั้งดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซายังเป็นอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็ก ตลอดจนเป็นที่อยู่และแหล่งอาหารของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด (Claridge และ May, 1994)

2.4 ชนิดของหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

2.4.1 การใช้ดินเชื้อจากป่าธรรมชาติหรือสวนป่า (soil inoculum)

การนำดินที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ในดินมาผสมเข้ากับดินที่ใช้ในการเพาะกล้าไม้ในอัตราส่วน 10-20 เปอร์เซ็นต์ หรือผสมกับน้ำเป็นสารแขวนลอยในอัตราส่วนดิน 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ใช้รดกล้าไม้ (Marx, 1980) ข้อดีของวิธีนี้ก็คือ ประหยัด เสียค่าใช้จ่ายน้อย และมีขั้นตอนการเตรียมไม่ยุ่งยาก แต่ข้อเสียคือ ดินมีน้ำหนักที่มากจึงไม่สะดวกในการขนย้ายเมื่อระยะทางไกล

ประกอบกับไม่ทราบถึงชนิดและจำนวนราเอคโตไมคอร์ไรซาที่จะเกิดขึ้น ตลอดจนเป็นการเสี่ยงต่อการนำศัตรูของพืชที่อาศัยในดินเข้าไประบาดในแปลงเพาะปลูก (Brundrett และคณะ, 1996)

2.4.2 การใช้หัวเชื้อเส้นใย (mycelial inoculum)

ทำได้โดยแยกและเลี้ยงเส้นใยจากดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา หรือแยกราเอคโตไมคอร์ไรซาจากรากพืช จากนั้นนำไปขยายเพิ่มปริมาณมากขึ้นโดยใช้ vermiculite ผสม peat moss และอาหารเหลว Modified Melin-Norkrans (MMN) เลี้ยงนานประมาณ 3-4 เดือน ก่อนจะทำการล้างอาหารออกแล้วนำไปผสมดินเพาะให้กับกล้าไม้ (Brundrett และคณะ, 1996; Marxและคณะ, 1989) ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ดีและมีประสิทธิภาพสูงได้ และหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ได้จะบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในแปลงเพาะปลูกได้ อีกทั้งสามารถเกิดเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากพืชได้เร็วกว่าการใช้หัวเชื้อสปอร์ แต่ข้อเสียคือราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดไม่สามารถเพาะเลี้ยงเส้นใยได้ ผลิตได้ในจำนวนไม่มาก และใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง และต้องการการเลี้ยงดูในสภาพที่ปลอดเชื้ออาจทำให้เกิดความยุ่งยากในขั้นตอนการผลิตและการขนส่ง (Parladé และคณะ,1996; Brundrett และคณะ, 2005; Chen และคณะ, 2006)

2.4.3 การใช้หัวเชื้อสปอร์ (spore inoculum)

เป็นชนิดหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่นิยมใช้มากที่สุด (Amores และคณะ, 1991; Lu และคณะ, 1998; Martin และคณะ, 2003) ทำได้โดยนำสปอร์จากดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาไปผสมกับน้ำเป็นสารแขวนลอยใช้รดต้นกล้า (Chen และคณะ, 2006; Turjaman และคณะ, 2011) หรือนำสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาคลุกกับเมล็ดพันธุ์ก่อนเพาะกล้า เนื่องจากสามารถเตรียมได้โดยไม่ต้องอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ เก็บไว้ได้นาน สะดวกในการขนย้าย วิธีการทำไม่ยุ่งยาก สามารถใช้กับราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ต้นทุนต่ำกว่าการผลิตหัวเชื้อเส้นใยและสามารถติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากพืชได้มากกว่าหัวเชื้อเส้นใย (Trappe, 1977; Marxและคณะ, 1989; Parladé และคณะ, 1996; Brundrett และคณะ, 2005; Turjaman และคณะ 2005) แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ ไม่สามารถคัดสายพันธุ์ที่ดีและมีประสิทธิภาพสูง มีการงอกที่ไม่สม่ำเสมอ และสปอร์ยังมีระยะพักตัว อีกทั้งสปอร์มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง โดยเฉพาะถ้าเป็นสปอร์ที่เก็บจากหลายพื้นที่และพืชอาศัยต่างกัน (จิตรตรา กาญจนประยุธ, 2539; Brundrett และคณะ, 1996)

2.5 ราเอคโตไมคอร์ไรซากับการปลูกป่าทดแทน

ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าราเอคโตไมคอร์ไรซามีความสำคัญต่อพืชในการกระตุ้นการเจริญเติบโต และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกล้าไม้เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเช่น ภาวะแห้งแล้ง ดินเค็มหรือเป็นกรด-ด่างมากเกินไป และการปนเปื้อนของโลหะหนัก เป็นต้น เนื่องจากปัจจุบันพื้นที่ป่าไม้ได้ลดลงเป็นจำนวนมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจากประชากรโลกเพิ่มมากขึ้น ทำให้ความต้องการอาหารและที่อยู่อาศัยเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจทำให้ระบบนิเวศของป่าบางพื้นที่เสียไปจนไม่สามารถรักษาสมดุลไว้ได้ ทำให้ประสบปัญหาภัยธรรมชาติต่าง ๆ มากมาย เช่น ภัยแล้ง อุทกภัย และดินถล่ม เป็นต้น ดังนั้นการปลูกป่าทดแทนป่าไม้ที่ถูกทำลายจึงเป็นเรื่องที่จำเป็นเร่งด่วน การนำราเอคโตไมคอร์ไรซามาประยุกต์ใช้ร่วมกับการปลูกป่าทดแทน (reforestation) และการปลูกป่าในบริเวณที่ไม่เคยเป็นป่ามาก่อน (aforestation) จึงได้รับความสนใจ อย่างไรก็ตามราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดจะมีความสัมพันธ์อย่างจำเพาะเจาะจงกับชนิดของพืช (Garbaye และคณะ, 1988; Nylund และ Wallander, 1989; Thomson และคณะ, 1990; Rincon และคณะ, 1999) ทำให้การคัดเลือกเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา ตลอดจนการพัฒนาหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมใส่ให้กับกล้าไม้ก่อนที่จะนำลงปลูกจึงเป็นเรื่องที่จำเป็น ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Rincon และคณะ (2007) ได้ศึกษาและประเมินหัวเชื้อเส้นใย *Amanita ovoidea Suillus collinitus* และหัวเชื้อสปอร์รา *Rhizopogon roseolus* กับกล้าไม้ *Pinus halepensis* พบว่า *S. collinitus* และ *R. roseolus* สามารถช่วยเพิ่มการเติบโตของกล้าไม้ในเรือนเพาะชำได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการย้ายปลูกลงพื้นที่จริงพบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถลดอัตราการตายของต้นกล้าหลังการย้ายปลูกได้อย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาของ *R. roseolus* มีอัตราการตายสูง แสดงให้เห็นว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถช่วยเพิ่มอัตราการเติบโตและลดอัตราการตายหลังการย้ายปลูกของต้นกล้าได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ความจำเพาะเจาะจงระหว่างราและพืช ตลอดจนพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่นำมาทำเป็นหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

สำหรับป่าไม้ในประเทศไทยพบว่าในปัจจุบันพื้นที่ป่าของประเทศไทยได้ถูกทำลายลงไปมาก โดยเฉพาะป่าไม้ในวงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae) ซึ่งไม้ในวงศ์ไม้ยางเป็นพรรณไม้ที่มีความสำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเป็นพรรณไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นไม้ที่นำมาใช้ในการก่อสร้างและทำเฟอร์นิเจอร์ต่าง ๆ (Lee และคณะ, 2008) อีกทั้งไม้ในวงศ์ไม้ยางยังเป็นไม้เด่นในป่าเต็งรัง (Dipterocarp forest) ไม้วงศ์ไม้ยาง ได้แก่ รัง (*Shorea siamensis*) เต็ง (*S. obtusa*) ยางนา *(Dipterocarpus alatus*) และตะเคียนทอง *(Hopea*

odorata) เป็นต้น (Turjaman และคณะ, 2011) แต่ไม้ในวงศ์ไม้ยางมีอัตราการเจริญเติบโตช้า มักแคระแกรนและมีอัตราการรอดชีวิตต่ำเมื่อย้ายปลูก ทำให้ไม้ในวงศ์นี้ต้องการราเอคโตไมคอร์ไรซาช่วยเร่งการเจริญและช่วยให้ต้นกล้าอยู่รอดได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ประกอบกับป่าเต็งรังเป็นป่าที่สามารถพบราเอคโตไมคอร์ไรซาใน Phylum Basidiomycota เป็นส่วนใหญ่ เห็นได้จากการสำรวจป่าเต็งรังในประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซียและศรีลังกาที่พบดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาในสกุล *Amanita Russula Boletus* และ *Scleroderma* เป็นจำนวนมาก (Becker, 1983; Sims และคณะ, 1997; Lee และคณะ, 2008) เช่นเดียวกับการสำรวจป่าเต็งรังในประเทศไทยโดย Yuwa-Amornpitak และคณะ (2006) พบดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาในวงศ์ Thelephoraceae Russulaceae Amanitaceae Cortinariaceae Sclerodermataceae Agaricaceae Pisolitaceae และ Boletaceae จำนวนมาก ดังนั้นการคัดเลือกและพัฒนาหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเพื่อใส่ให้กับกล้าไม้วงศ์ไม้ยางจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะทำให้ต้นกล้ามีการเจริญเติบโตดีและอัตราการรอดตายสูงเมื่อย้ายปลูก ซึ่งจะส่งผลให้การปลูกป่าไม้วงศ์ไม้ยางของไทยประสบความสำเร็จได้ ดังเช่นการศึกษาของ Turjaman และคณะ (2011) ที่ทำการใส่หัวเชื้อสปอร์ *Boletus* sp. *Scleroderma* sp. และ *Strobilomyces* sp. ให้กับกล้าไม้ *S. balangeran* พบว่าหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาดังกล่าว สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตทางความสูง น้ำหนัก และอัตราการอยู่รอดหลังจากการย้ายปลูกลงพื้นที่จริงเป็นเวลา 40 เดือน ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกล้าไม้ที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

2.6 รัง (*Shorea siamensis* Miq.)

อนุกรมวิธานของ *Shorea siamensis* Miq. (Ashton, 1988)

Kingdom Plantae

Division Tracheophyta

Class Magnoliopsida

Order Theales

Family Dipterocarpaceae

Genus *Shorea*

Species *Shorea siamensis*

รังหรือเปา (*Shorea siamensis* Miq.) จัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ สูงประมาณ 10-25 เมตร รูปทรงต้นเป็นทรงกลม เปลือกหุ้มลำต้น สีเทา เปลือกหนา มักแตกเป็นร่องลึกตามความยาวลำต้น เปลือกในสีน้ำตาลแดง เนื้อไม้สีน้ำตาลอมเหลือง เรือนยอด

ทรงกลมหรือรูปทรงเจดีย์ ค่อนข้างโปร่ง ใบเป็นชนิดเดี่ยว เรียงสลับบนกิ่งก้าน ใบรูปไข่แกมรูปขอบขนาน โคนใบหยักเว้าเป็นรูปหัวใจ ปลายใบค่อนข้างมน แผ่นใบหนา เกลี้ยง ใบอ่อนเมื่อแตกออกใหม่ ๆ มีสีแดง ดอกสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอม จะออกดอกหลังจากทิ้งใบ โดยออกตามปลายกิ่งเป็นช่อขนาดใหญ่ ประกอบด้วยดอกย่อย มีกลีบสีเหลืองอ่อน 5 กลีบ เรียงซ้อนกัน และเมื่อดอกรังร่วงจะติดผลรูปกระสวยขนาดเล็ก ผิวเกลี้ยง มีปีกสั้นผลละ 2 ปีก ปีกยาวรูปใบพายอีก 3 ปีก ยาวประมาณ 10-12 เซนติเมตร มีเส้นตามยาว 5-8 เส้น (ภาพที่ 2.6) ตามธรรมชาติพบได้ในป่าไม้ผลัดใบและป่าเต็งรังทั่วไป ออกดอกเป็นผลระหว่างเดือนตุลาคมถึงพฤกษภาคม ขยายพันธุ์นิยมใช้เมล็ดเพาะ การปลูกควรปลูกในที่โล่ง มีการระบายน้ำดี และดินเป็นดินลูกรัง สำหรับรังจัดเป็นไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากรังเป็นไม้เนื้อแข็งจึงนิยมนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในการก่อสร้างบ้านเรือน เช่น ทำเสา ไม้พื้น คาน และรอด เป็นต้น ตลอดจนทำเป็นเครื่องเรือนต่าง ๆ (กรมป่าไม้, 2545)

ภาพที่ 2.6 ลักษณะต้น ใบ และผลของรัง (*Shorea siamensis* Miq.)

2.7 เห็ดแดง (*Russula rosea* Pers.)

อนุกรมวิธานของ *Russula rosea* Pers. (Kirk และคณะ, 2008)

Kingdom Fungi

Phylum Basidiomycota

Class Agaricomycetes

Order Russulales

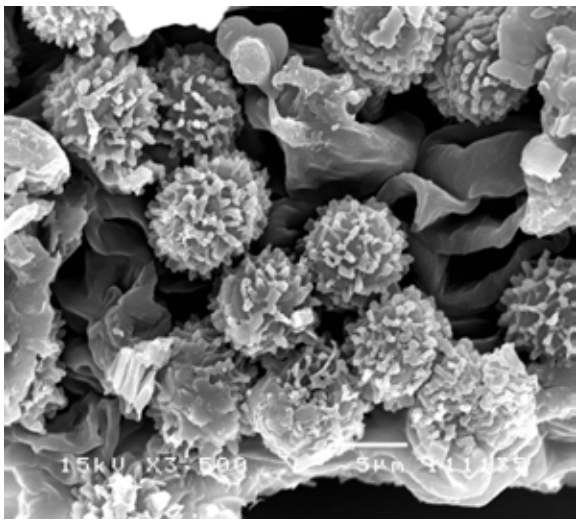
Family Russulaceae

Genus *Russula*

Species *Russula rosea*

ดอกเห็ดมีขนาดประมาณ 4-10 เซนติเมตร หมวกเห็ดนูน กลางดอกเป็นแอ่งเล็กน้อย ผิวของหมวกเห็ดเรียบและเป็นสีแดง กลางหมวกสีเข้มกว่า ขอบของหมวกเห็ดเรียบ ครีบสีขาวถึงครีม เรียงถี่ เกิดชิดก้าน เนื้อดอกหนา เปราะหักง่าย ก้านดอกสีขาวปนแดงอมชมพู รูปทรงกระบอก ผิวเรียบ เนื้อก้านแน่น (ภาพที่ 2.7) สปอร์ขนาดประมาณ 7-10 x 8-11 ไมโครเมตร รูปร่างค่อนข้างกลมและมีหนามเชื่อมกันเป็นร่างแห่ (ภาพที่ 2.8) สปอร์มีสีขาวถึงครีมบนกระดาษพิมพ์ มักพบดอกเห็ดในป่าผลัดใบ สามารถนำมารับประทานได้และมีราคาค่อนข้างแพง (Phillips, 2006)

ภาพที่ 2.7 (ก) ลักษณะของดอกเห็ดแดง *(Russula rosea* Pers.) (ข) ลักษณะครีบของเห็ดแดง



ภาพที่ 2.8 ภาพถ่ายลักษณะรูปร่างและลวดลายของสปอร์ดอกเห็ดแดง จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 3500 เท่า

2.8 **เห็ดตะไคลเขียว** (*Russula virescens* Fr.)

อนุกรมวิธานของ *Russula virescens* Fr. (Kirk และคณะ, 2008)

Kingdom Fungi

Phylum Basidiomycota

Class Agaricomycetes

Order Russulales

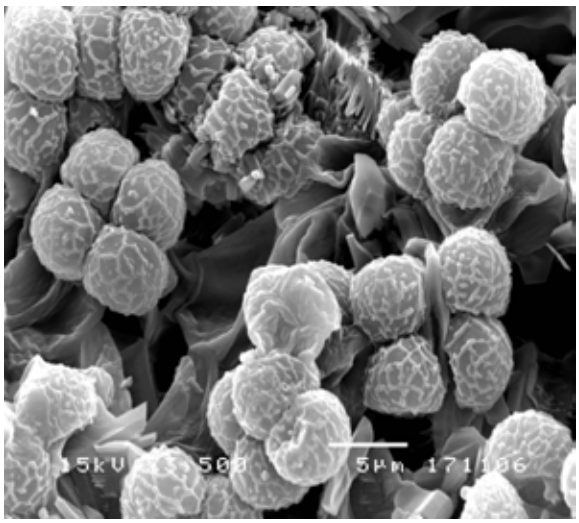
Family Russulaceae

Genus *Russula*

Species *Russula virescens*

ดอกเห็ดมีขนาด 3-12 เซนติเมตร ดอกอ่อนโค้งเป็นรูปทรงกลม มีสีเขียวออกเหลือง สีน้ำตาลเขียวหรือสีเขียวหม่น ผิวเรียบแล้วปริแตกเป็นเกล็ดเห็นเนื้อภายในเป็นสีขาว เมื่อดอกบาน ริมขอบจะโค้งงอลงแล้วยกขึ้นเมื่อบานเต็มที่ ริมขอบจะแตกเป็นร่อง ตรงกลางเว้าตื้น ครีบถี่ติดก้าน สีขาวหรือสีขาวนวล ก้านดอกเห็ดมีขนาดประมาณ 2-3 x 3-5 เซนติเมตร ก้านสีขาว รูปทรงกระบอก ผิวค่อนข้างเรียบ โคนก้านเรียวเล็กกว่าเล็กน้อย ดอกอ่อนก้านจะตัน (ภาพ 2.9) สปอร์ ขนาดประมาณ 7-8 ไมโครเมตร รูปทรงรี มีปุ่มและตาข่ายบางส่วน (ภาพที่ 2.10) สปอร์มีสีขาวบนกระดาษพิมพ์ มักพบดอกเห็ดในป่าผลัดใบและป่าสน สามารถนำมารับประทานได้และมีราคาค่อนข้างแพง (อนงค์ จันทร์ศรีกุล และคณะ, 2551; นิวัฒ เสนาะเมือง, 2553; Phillips, 2006)

ภาพที่ 2.9 (ก) ลักษณะของดอกเห็ดตะไคลเขียว *(Russula virescens* Fr.) (ข) ลักษณะครีบของเห็ดตะไคลเขียว



ภาพที่ 2.10 ภาพถ่ายลักษณะรูปร่างและลวดลายของสปอร์ดอกเห็ดตะไคลเขียว จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 3500 เท่า

2.9 เห็ดถ่านเล็ก (*Russula densifolia* (Secr.) Gill.)

อนุกรมวิธานของ *Russula densifolia* (Secr.) Gill. (Kirk และคณะ, 2008)

Kingdom Fungi

Phylum Basidiomycota

Class Agaricomycetes

Order Russulales

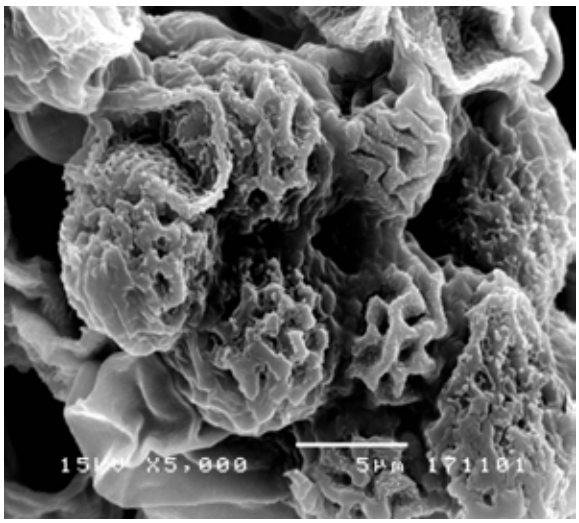
Family Russulaceae

Genus *Russula*

Species *Russula densifolia*

หมวกเห็ดมีขนาดกว้างประมาณ 2.7 เซนติเมตร มีลักษณะนูน กลางดอกเป็นแอ่งเล็กน้อย สีขาวออกน้ำตาลหม่นแล้วเปลี่ยนเป็นสีดำ ผิวของหมวกเห็ดเมื่อเปียกชื้นจะหนืดมือ ครีบสีขาว เมื่อช้ำจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงจนถึงดำ เรียงถี่ เกิดชิดก้าน ก้านดอกเห็ดสีขาวเมื่อช้ำจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงจนถึงดำ รูปทรงกระบอก ขนาดประมาณ 2-8 x 0.6-3 เซนติเมตร เนื้อของก้านดอกเห็ดจะแน่น สีขาว เมื่อช้ำจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงแล้วดำ (ภาพที่ 2.11) สปอร์ขนาดประมาณ 6-7 ไมโครเมตร รูปร่างกลม มีปุ่มเล็ก ๆ และเส้นละเอียดสานกันเป็นตาข่าย (ภาพที่ 2.12) สปอร์มีสีขาวบนกระดาษพิมพ์ มักพบดอกเห็ดในป่าผลัดใบและป่าสน สามารถนำมารับประทานได้และมีราคาค่อนข้างแพง (อนงค์ จันทร์ศรีกุล และคณะ, 2551; Phillips, 2006)

ภาพที่ 2.11 (ก) ลักษณะหมวกดอกเห็ดถ่านเล็ก *(Russula densifolia* (Secr.) Gill.) (ข) ลักษณะครีบดอกเห็ดถ่านเล็ก



ภาพที่ 2.12 ภาพถ่ายลักษณะรูปร่างและลวดลายของสปอร์ดอกเห็ดถ่านเล็ก จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 5000 เท่า

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประเมินผลการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

Chen และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาหัวเชื้อสปอร์รา *Scleroderma* spp. ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับ *Eucalyptus globulus* และ *E. urophylla* พบว่ากล้าไม้ที่ทำการใส่หัวเชื้อสปอร์รา *Scleroderma* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หรือ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ สามารถเพิ่มอัตราการเจริญทางด้านความสูงได้ถึง 46 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มน้ำหนักแห้งได้ถึง 42 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกล้าไม้ที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา นอกจากนี้พบว่าหัวเชื้อสปอร์รา *Scleroderma* ที่ทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 5 ปี ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้ผลการกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้เช่นเดียวกับหัวเชื้อสปอร์ที่ทำการเก็บใหม่

Sousa และคณะ (2011) ได้ศึกษาและประเมินหัวเชื้อรา *Suillus bovinus Pisolithus tinctorius Rhizopogon roseolus* และหัวเชื้อที่ผสมราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด กับกล้าไม้ที่ทำการเพาะในดินที่เก็บมาจากพื้นที่ที่มีการเกิดไฟป่าและไม่เกิดไฟป่า พบว่ากล้าไม้ที่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซามีอัตราการเจริญของกล้าไม้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งกล้าไม้ที่ทำการเพาะในดินที่เก็บมาจากพื้นที่ที่มีการเกิดไฟป่าและไม่เกิดไฟป่า โดยหัวเชื้อรา *R. roseolus* สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของกล้าไม้ได้ดีที่สุด และหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาทุกชนิดที่ใส่ให้กับกล้าไม้ที่เพาะในดินที่เกิดไฟป่ามีอัตราการเจริญของกล้าไม้มากกว่ากล้าไม้ที่เพาะในดินที่ไม่เกิดไฟป่า

Turjaman และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผลของหัวเชื้อสปอร์ *P. arhizus* และ *Scleroderma* sp. ต่อการเจริญของกล้าไม้ *S. pinanga* พบว่าหลังจากการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นเวลา 7 เดือน กล้าไม้มีการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากพืช 86 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการเจริญเติบโตของกล้าไม้ทางด้านความสูง ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก จำนวนใบ น้ำหนักสดและแห้งของลำต้น ตลอดจนอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าต้นกล้าที่ไม่ได้รับหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

Turjaman และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเปรียบเทียบกับหัวเชื้อเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดสปอร์และเส้นใยของ *P. arhizus* และ *Scleroderma* sp. ให้กับกล้าไม้ *S. seminis* พบว่าหลังจากการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้งสองชนิดเป็นเวลา 7 เดือน กล้าไม้ *S. seminis* ที่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์และเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซามีการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากพืช 61-65 เปอร์เซ็นต์ และ 35-37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Yazid และคณะ (1994) ได้ทำการใส่หัวเชื้อ *P. tinctorius* ให้กับกล้าไม้ *Hopea helferi* และ *H. odorata* พบว่ากล้าไม้ *H. helferi* และ *H. odorata* มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากพืชเฉลี่ย 80 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตทางความสูงของกล้าไม้ *H. helferi* และ *H. odorata* ได้ 82 เปอร์เซ็นต์ และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี

	เคมีภัณฑ์	บริษัทผู้ผลิต
3.1.1	Agarose	-
3.1.2	Agarose molecular biology grade	ISC Bio Evpress
3.1.3	Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	Merck, Germany
3.1.4	Ampicillin	T.P. Drug Laboratories
3.1.5	Ascorbic acid	Serva
3.1.6	Boric acid (H_3BO_3)	Merck, Germany
3.1.7	Calcium chloride ($CaCl_2$)	May and baker, England
3.1.8	Cetyltrimethylammonum bromide (CTAB)	Serva
3.1.9	Chloroform	Merck, Germany
3.1.10	Coper (II) sulphate ($CuSO_4$.5H2O)	May and baker, England
3.1.11	Disodium hydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4)	May and baker, England
3.1.12	EmeraldAmp GT PCR Master Mix	Takara
3.1.13	Ethanol	Merck, Germany
3.1.14	Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	Scharlau
3.1.15	Ferric Ethylenediaminetetraacetic acid	May and baker, England
3.1.16	Gel star	Lonza, USA
3.1.17	Isoamyl alcohol	Carbo Erba
3.1.18	Iso-propylthio-β-galactoside (IPTG)	Fermentas
3.1.19	Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	May and baker, England
3.1.20	Manganese chloride ($MnCl.4H_2O$)	May and baker, England
3.1.21	2-Mercaptoethanol	Sigma
3.1.22	*Pfu* DNA Polymerase	Fermentas
3.1.23	Potassium chloride (KCl)	Merck, Germany

3.1.24	QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
3.1.25	Restriction enzyme (*Hin*fI และ *Alu*I)	Fermentas
3.1.26	Silica gel	-
3.1.27	Sodium molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	May and baker, England
3.1.28	Sterile distilled water	-
3.1.29	StrataClone PCR Cloning Kit	Stratagene
3.1.30	10X Tris Boric acid Disodium Ethylenediamine Tetracetic Acid (10X TBE buffer)	-
3.1.31	1X Tris Boric acid Disodium Ethylenediamine Tetracetic Acid (10X TBE buffer)	-
3.1.32	0.5X Tris Boric acid Disodium Ethylenediamine Tetracetic Acid (10X TBE buffer)	-
3.1.33	Zinc sulphate ($ZnSO_4.7H_2O$)	May and baker, England
3.1.34	100 bp+1.5 Kb DNA lader	ISC Bio Express

3.2 อุปกรณ์และครุภัณฑ์

	ชนิด	**รุ่น**	**บริษัทผู้ผลิต**
3.2.1	กล้องจุลทรรศน์	CH30	Olympus, Japan
3.2.2	กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope	sz60	Olympus, Japan
3.2.3	กล้องถ่ายรูปเจล (Gel-Doc)	ECX-26.MX	Vilber Lourmat, France
3.2.4	เครื่องชั่งละเอียด	AG204	Mettler Toledo, Switzerland
3.2.5	เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Micro refrigerated centrifuge)	3700/Kubota	Kubota Corporation, Japan
3.2.6	เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycler)	TP 600	TAKARA
3.2.7	เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)	2000	Cyberscan
3.2.8	จานเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสติก (Plastic petridish)	-	Greiner bio-one Gmbh, Austria
3.2.9	ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow)	H1	Lab Service Ltd.

3.2.10	ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส	-	Sharp
3.2.11	ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส	SBC-20	SANYO
3.2.12	ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส	U570	New Brunswick Scientific
3.2.13	ตู้อบ (Oven)	UE600	Memmert
3.2.14	หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)	TC-459	TA CHANG
3.2.15	ไมโครปิเปตต์(Automatic adjustable micropipette) P2 (0.1-2 ไมโครลิตร) P10 (0.5-10 ไมโครลิตร) P20 (5-20 ไมโครลิตร) P200 (20-200ไมโครลิตร) P1000 (0.1-1 มิลลิลิตร)	-	Gilson
3.2.16	หลอดไมโครเซนติฟิวส์ (Micro centrifuge tube) ขนาด 2 มิลลิลิตร และขนาด 1.5 มิลลิลิตร	-	Axygen
3.2.17	หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร	-	Axygen
3.2.18	ปิเปตตทิป (pipette tip)	-	-
3.2.19	อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง	D1100	Labnet
3.2.20	อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Weter bath)	WB-710M	Optima
3.2.21	เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex Mixer)	VX-100	Labnet
3.2.22	ชุดตรวจสอบดีเอ็นเอสนามไฟฟ้า	Mupid-ex	Avance
3.2.23	ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	-	Termaks
3.2.24	เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต	TE-10E	UVP
3.2.25	ผลรัง (*Shorea siamensis* Miq.)	-	-
3.2.26	กระถางพลาสติก ถุงดำ ทราย พีทมอส เพอร์ไลท์	-	-

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่างดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างดอกเห็ดในสกุล *Russula* จำนวน 3 ชนิด คือ เห็ดแดง (*Russula rosea* Pers.) เห็ดตะไคลเขียว (*Russula virescens* Fr.) และเห็ดถ่านเล็ก (*Russula densifolia* (Secr.) Gill.) ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาตามที่อธิบายโดย Largent และ Thiers (1977) จากป่าเต็งรัง อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม และจากตลาดท้องถิ่น จ.ขอนแก่น จ.ชัยภูมิ และ จ. มหาสารคาม โดยเก็บดอกเห็ดที่บานเต็มที่และทำการตัดแยกชิ้นส่วนของหมวกเห็ดกับก้านเห็ด นำหมวกเห็ดผึ่งลมจนแห้งที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส) บรรจุหมวกเห็ดในถุงพลาสติกแบบซิปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนก้านเห็ดตัดเป็นชิ้นขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร ใส่ถุงพลาสติกแบบซิปที่บรรจุซิลิกาเจลเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

นำหมวกเห็ดแห้งจากข้อ 3.3.1 ปั่นให้ละเอียด ทำการแยกสปอร์โดยใช้ตะแกรงร่อนขนาด 850 ไมครอน และ 180 ไมครอน ตามลำดับ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วอบจนแห้ง จากนั้นนำสปอร์ที่แยกได้เก็บใส่ถุงพลาสติกแบบซิปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3.1)

ภาพที่ 3.1 แสดงสปอร์ของดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่แยกจากตะแกรงร่อน ภาพ ก คือ สปอร์เห็ดแดง ภาพ ข คือ สปอร์เห็ดตะไคลเขียว ภาพ ค คือ สปอร์เห็ดถ่านเล็ก

3.3.3 การทดสอบการเกิดไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รังเบื้องต้น

ทำการเพาะผลรังที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ใน Sodium Hypochlorite ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นย้ายลงในขวดแก้วขนาด 3,000 มิลลิลิตร ที่บรรจุส่วนผสมของเพอร์ไลท์ ทราย และพีทมอส ในอัตราส่วน 4:2:1 โดยปริมาตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จำนวน 2 ครั้ง ขวดละ 1 ต้น แสดงดังภาพ 3.2 นำสปอร์ของดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา

เห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ที่ทำการเก็บใหม่ทำสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อใส่ให้กับกล้าไม้ต้นละ 20 มิลลิลิตร ดูแลและใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในระดับปานกลางทุก 2 สัปดาห์ จนกล้าไม้อายุ 6 เดือน ทำการคัดแยกรากเอคโตไมคอร์ไรซาตามลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ นำรากเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละลักษณะสัณฐานวิทยาและดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่ใช้ทำเป็นหัวเชื้อสปอร์มาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Hin*fI เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ภาพที่ 3.2 ลักษณะของกล้าไม้รังในขวดแก้วขนาด 3000 มิลลิลิตร

3.3.4 การทดสอบความอยู่รอดของสปอร์และความสามารถในการเกิดไมคอร์ไรซากับกล้าไม้

นำสปอร์ของดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดจากข้อ 3.3.2 มาทำการเก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ (ภาพที่ 3.3) ตามชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ ก เก็บรักษาสปอร์ในถุงพลาสติกแบบซิป ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลองที่ ข เก็บรักษาสปอร์ในถุงพลาสติกแบบซิป ที่อุณหภูมิห้อง

ชุดการทดลองที่ ค เก็บรักษาสปอร์ในทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เป็นจำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชั่วโมง ในอัตราส่วน สปอร์ต่อทราย 1:3 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลองที่ ง เก็บรักษาสปอร์ในทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 3 ที่อุณหภูมิห้อง

ชุดการทดลองที่ จ สปอร์เก็บใหม่

ก

ข

ภาพที่ 3.3 ลักษณะของผงสปอร์ของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่เก็บด้วยวิธีต่าง ๆ ภาพ ก คือเก็บรักษาสปอร์ในถุงพลาสติกแบบซิป ภาพ ข คือเก็บรักษาสปอร์ในทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

ทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยเก็บสปอร์ของทุกชุดการทดลองเป็นเวลา 0 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ ทำการทดสอบการมีชีวิตของสปอร์และความสามารถในการสร้างไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รัง (*Shorea siamensis* Miq.) ดังนี้

3.3.4.1 **การทดสอบการมีชีวิตของสปอร์**

เปรียบเทียบการงอกของสปอร์ดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดที่เก็บรักษาด้วยวิธีแตกต่างกัน ตามชุดการทดลองข้างต้นเป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ โดยนำสปอร์ของดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิด ทำสารแขวนลอยสปอร์ในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการงอกของสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ตัวอย่าง

3.3.4.2 **การทดสอบความสามารถในการสร้างไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รัง**

นำสปอร์ของดอกเห็ดแต่ละชนิดที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ ที่เก็บไว้เป็นเวลา 0 และ 8 เดือน มาทำการทดสอบความสามารถในการสร้างไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รังดังนี้

3.3.4.2.1 **การเตรียมกล้าไม้รัง** นำผลรังที่เก็บจาก จ.ขอนแก่น ตัดปีกผลรังทิ้ง จากนั้นนำผลรังแช่น้ำประปาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง คัดผลที่ลอยน้ำและเสียทิ้งไป และล้างผลที่เหลือด้วยน้ำประปาให้สะอาด จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ใน Sodium Hypochlorite ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำผลรังที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว วางลงในตะกร้าที่ผ่านการเช็ดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ คลุมด้วยผ้าที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วอบจนแห้ง ดูแลและรดผลรังด้วยน้ำที่ปลอดเชื้อจนผลรังงอก (ภาพที่ 3.4)

ภาพที่ 3.4 ลักษณะและการงอกของผลรังก่อนการย้ายปลูกลงในวัสดุปลูก ภาพ ก คือ ลักษณะของผลรังก่อนตัดปีก ภาพ ข คือ การงอกของผลรัง

3.3.4.2.2 **การปลูกและการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา** เตรียมวัสดุปลูกโดยผสมเพอร์ไลท์ ทราย และพีทมอส ในอัตราส่วน 4:2:1 โดยปริมาตร (Chen และคณะ, 2006) นำวัสดุปลูกไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จำนวน 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยการเช็ดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ย้ายผลรังที่เตรียมจากข้อ 3.3.4.2.1 ใส่ขวดละ 5 ผล จากนั้นนำสปอร์ที่ทำการเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 8 เดือน จากชุดการทดลองต่าง ๆ ข้างต้นและสปอร์ของดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดที่เก็บมาใหม่ ทำสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ (Rincon และคณะ, 2007) ใส่ให้กับกล้าไม้ขวดละ 20 มิลลิลิตร ดูแลและใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในระดับปานกลางทุก 2 สัปดาห์ (ภาคผนวก ก) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น เป็นเวลา 6 เดือน จึงทำการตรวจสอบความสามารถของสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาในการเกิดไมคอร์ไรซาที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ โดยการหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (percent infection) ของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้ โดยตัดปลายรากออกเป็นชิ้น ความยาวชิ้นละ 2 เซนติเมตร นับจำนวนรากที่มีการติดเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซาและไม่มีการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Maghembe และ Redhead, 1984)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา} = \frac{\text{จำนวนรากที่มีการติดเชื้อของราเอคโตไมคอร์ไรซา} \times 100}{\text{จำนวนรากทั้งหมด}}$$

3.3.5 การทดสอบการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา

เปรียบเทียบการเติบโตของกล้าไม้ที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซากับชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยทดสอบการกระตุ้นของกล้าไม้ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา จำนวน 2 ครั้ง ดังนี้

ครั้งที่ 1 ทดสอบการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552

ครั้งที่ 2 ทดสอบการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2554

3.3.5.1 การทดสอบการกระตุ้นของกล้าไม้ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา ครั้งที่ 1

3.3.5.1.1 การเตรียมกล้าไม้ นำผลรังมาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2.1 จากนั้นนำเมล็ดรังที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเพาะลงถุงเพาะชำที่เช็ดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ที่บรรจุทรายผสมขุยมะพร้าวอัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เป็นจำนวน 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง ดูแลรดน้ำจนผลรังงอกเป็นต้นกล้าอายุ 2 เดือน

3.3.5.1.2 การปลูกและการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา เตรียมวัสดุปลูกและส่วนผสมของวัสดุปลูก ตลอดจนการนึ่งฆ่าเชื้อวัสดุปลูก มีวิธีทำตามดังข้อ 3.3.4.2.2 จากนั้นทำการย้ายกล้าไม้ที่มีอายุ 2 เดือน ลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว ที่บรรจุวัสดุปลูกที่เตรียมไว้ จากนั้นนำสปอร์ของดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดจากข้อ 3.3.2 ทำสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ (Rincon และคณะ, 2007) ใส่ให้กับกล้าไม้ต้นละ 30 มิลลิลิตร โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ ก ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง

ชุดการทดลองที่ ข ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดตะไคลเขียว

ชุดการทดลองที่ ค ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดถ่านเล็ก

ชุดการทดลองที่ ง ชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

ดูแลและใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในระดับปานกลางทุก 2 เดือน เป็นเวลา 12 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น

3.3.5.1.3 เก็บผลการทดลอง ทำการเปรียบเทียบอัตราการเติบโตของกล้าไม้ เมื่อกล้าไม้มีอายุ 12 เดือน หลังจากทำการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยมีการติดตามข้อมูลดังต่อไปนี้

3.3.5.1.3.1 ทำการวัดความสูงของลำต้น ตั้งแต่คอรากจนถึงปลายลำต้น โดยใช้ ไม้บรรทัดและวัดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (vernier caliper)

3.3.5.1.3.2 หามวลชีวภาพของส่วนเหนือดิน (ลำต้นและใบ) และใต้ดิน (ราก) โดยนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้ง

3.3.5.1.3.3 หาปริมาณธาตุอาหารไนโตเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมที่สะสมในส่วนของลำต้นและใบ โดยการนำส่วนเหนือดิน (ลำต้นและใบ) ไปอบจนแห้งและบดให้ละเอียด ทำการวิเคราะห์ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยส่งตรวจวิเคราะห์ที่โครงการพัฒนาวิชาการดิน ปุ๋ย และสิ่งแวดล้อม ภาควิชาปฐพี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3.5.1.3.4 หาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้ เช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2.2

3.3.5.2 **การทดสอบการกระตุ้นของกล้าไม้ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา ครั้งที่** 2

3.3.5.2.1 **การปลูกและการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา** ทำการเตรียมกล้าไม้ดังข้อ 3.3.5.1.1 จากนั้นย้ายต้นกล้าที่อายุ 2 เดือนลงในถุงเพาะชำขนาด 3X6 นิ้ว ที่บรรจุวัสดุปลูกดังข้อ 3.3.4.2.2 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำสปอร์ของดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดที่ทำการเก็บใหม่ ที่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการทำหัวเชื้อสปอร์ดังข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 ตามลำดับ ทำสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อใส่ให้กับกล้าไม้ต้นละ 10 มิลลิลิตร โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ ก ชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

ชุดการทดลองที่ ข ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดงความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ ค ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดตะไคลเขียวความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ ง ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดถ่านเล็กความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ จ ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดงความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ ฉ ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดตะไคลเขียวความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ ช ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดถ่านเล็กความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ดูแลและใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในระดับปานกลางทุก 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น

3.3.5.2.2 **เก็บผลการทดลอง** ทำการเปรียบเทียบอัตราการเติบโตของกล้าไม้ เมื่อกล้าไม้มีอายุ 4 เดือน และ 8 เดือน หลังจากทำการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา ตามลำดับ โดยมีการติดตามข้อมูลดังข้อ 3.3.5.1.3

3.3.6 การตรวจสอบชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากเอคโตไมคอร์ไรซาด้วยวิธีอณูชีววิทยา

ตรวจสอบลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบในแต่ละชุดการทดลอง เปรียบเทียบกับชนิดของดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่ใส่ในแต่ละชุดการทดลอง โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.3.6.1 การตรวจสอบลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซาตามลักษณะสัณฐานวิทยา

ทำการแยกรากเอคโตไมคอร์ไรซาในแต่ละชุดการทดลองตามวิธีของ Nara และคณะ (2003) โดยทำการย้ายกล้าไม้ออกจากวัสดุปลูก และล้างรากกล้าไม้ให้สะอาดปราศจากวัสดุปลูก จากนั้นตัดรากกล้าไม้ให้มีความยาว 1 ถึง 2 เซนติเมตร ทำการคัดแยกรากเอคโตไมคอร์ไรซาตามลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ตามวิธีของ Agerer (1991) โดยทำการจัดจำแนกรากเอคโตไมคอร์ไรซาตามลักษณะสัณฐานวิทยาได้แก่ รูปร่างลักษณะ โดยสังเกตจากสี ขนาด และลักษณะเส้นใยที่อยู่รอบ ๆ ราก ออกเป็นกลุ่มตามลักษณะที่พบ จากนั้นนำรากเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละลักษณะสัณฐานวิทยาทำแห้งด้วยซิลิกาเจล

3.3.6.2 การสกัดดีเอ็นเอจากรากเอคโตไมคอร์ไรซา

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากข้อ 3.3.6.1 ด้วยวิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ของ Zhou และคณะ (1999) โดยนำตัวอย่างรากเอคโตไมคอร์ไรซาใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง โดยใช้ความถี่ 20 เฮิรตซ์ เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลาย 2XCTAB (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลาย chloroform / isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ดูดน้ำส่วนใสปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน ทิ้งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.3.6.3 การสกัดดีเอ็นเอจากดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากก้านดอกเห็ดในข้อ 3.3.1 ด้วยวิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ของ Zhou และคณะ (1999) เช่นเดียวกับข้อ 3.3.6.2 โดยนำก้านดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาปริมาณ 20 ถึง 50 มิลลิกรัม บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง โดยใช้ความถี่ 30 เฮิรตซ์ เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับตัวอย่าง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน จากนั้นทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.6.2 โดยเริ่มจากเติมสารละลาย 2XCTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จนถึงการทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำตัวอย่างไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3.3.6.4 การเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS)

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ของตัวอย่างดีเอ็นเอรากเอคโต-ไมคอร์ไรซาและดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรส โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS 1F (5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3') (Gardes และ Bruns, 1993) และ ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White และคณะ, 1990) ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 5 ng ของ tamplate DNA 10X*Pfu* buffer with MgSO4* 2 mM dNTP Mix (*Pfu* DNA Polymerase Kit) และ 1 μM ของคู่ไพร์เมอร์ ใช้เครื่อง Authorized thermal cycler รุ่น TP600 (Takara) โดยมีสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรสดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	25 รอบ
Annealing	51 องศาเซลเซียส	1นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Gel star ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 100 มิลลิลิตร ในสารละลาย 1XTBE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตราฐานขนาด100 bp + 1.5 Kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น

ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Transilluminator) และบันทึกภาพโดยใช้กล้องถ่ายรูปเจล (Gel-Doc)

3.3.6.5 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำผลิตผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากข้อ 3.3.6.4 มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Hin*fI ที่มีตำแหน่งการตัดแสดงดังตารางที่ 3.1 โดยมีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 3.2 ใช้เครื่อง Authorized thermal cycler รุ่น TP600 (Takara) โดยทำการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องซาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Gel star ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 100 มิลลิลิตร ในสารละลาย 1XTBE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ เป็นเวลา 180 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตราฐานขนาด100 bp + 1.5 Kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Transilluminator) และบันทึกภาพโดยใช้กล้องถ่ายรูปเจล (Gel-Doc) ทำการคัดเลือกตัวอย่างที่มีขนาดของแถบดีเอ็นเอและรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกัน เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดง Buffer และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซน์	Burffer	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
*Alu*I	Tango	5'… AG↓CT …3'
		3'… TC↑GA …5'
*Hin*fI	R	5'… G↓ANTC …3'
		3'… CTNA↑G …5'

ตารางที่ 3.2 แสดงสาร ความเข้มข้น และปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอาร์เอฟแอลพี

สาร	ความเข้มข้น	ปริมาตร
Dw	-	3.5
เอนไซม์ตัดจำเพาะ	10 units/μl	0.5
10XBurffer	1X	1
PCR product		5

3.3.6.6 การโคลนหาลำดับเบสของชิ้นส่วน ITS

คัดเลือกตัวแทนของกลุ่มรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแตกต่างกัน มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามข้อ 3.3.6.4 จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดย QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) (ภาคผนวก ค) เชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิด StrataClone Vector Mix amp/kan (Stratagene) และถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน StrataClone SoloPack Competent Cells (Stratagene) ตามที่คู่มือแนะนำ (ภาคผนวก ค) ทำการเพิ่มจำนวนเซลล์เจ้าบ้าน StrataClone SoloPack Competent Cells และคัดเลือกโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (ภาคผนวก ง) ที่มีส่วนผสมของสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่าง ทำการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรส โดยมีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 5 ng ของ tamplate DNA EmeraldAmp GT PCR Master Mix (EmeraldAmp GT PCR Master Mix) และ 0.2 μM ของไพร์เมอร์ ITS1F และ ITS4 ใช้เครื่อง Authorized thermal cycler รุ่น TP600 (Takara) โดยมีสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรสดังนี้

Initial denaturation	98 องศาเซลเซียส	1	นาที	
Denaturation	98 องศาเซลเซียส	0.1	นาที	38 รอบ
Annealing	51 องศาเซลเซียส	0.30	นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1	นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5	นาที	
Hold	4 องศาเซลเซียส			

ตรวจสอบผลการโคลนหาลำดับเบสของชิ้นส่วน ITS โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Gel star ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 100 มิลลิลิตร ในสารละลาย 1XTBE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตราฐานขนาด100 bp + 1.5 Kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Transilluminator) และบันทึกภาพโดยใช้กล้องถ่ายรูปเจล (Gel-Doc) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง ส่งไปทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ไพร์เมอร์ T3 (5’ TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3’) และ T7 (5’ ATT AAC CCT

CAC TAA AGG GA 3') ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรสและนำลำดับเบสที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนและคล้ายคลึงของลำดับเบสกับฐานข้อมูลใน GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

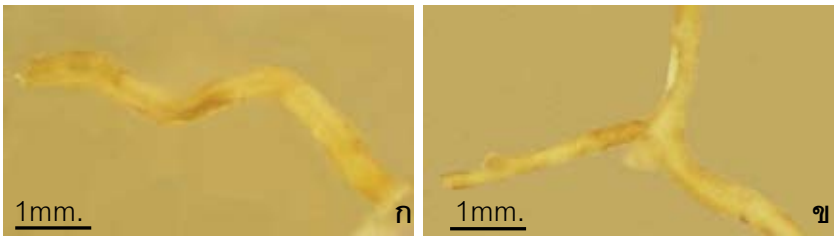
3.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบการงอกของสปอร์ การเปรียบเทียบการเติบโตของกล้าไม้ และการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้ จะถูกนำมาวิเคราะห์สถิติแบบ one-way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS

บทที่ 4
ผลการวิจัย

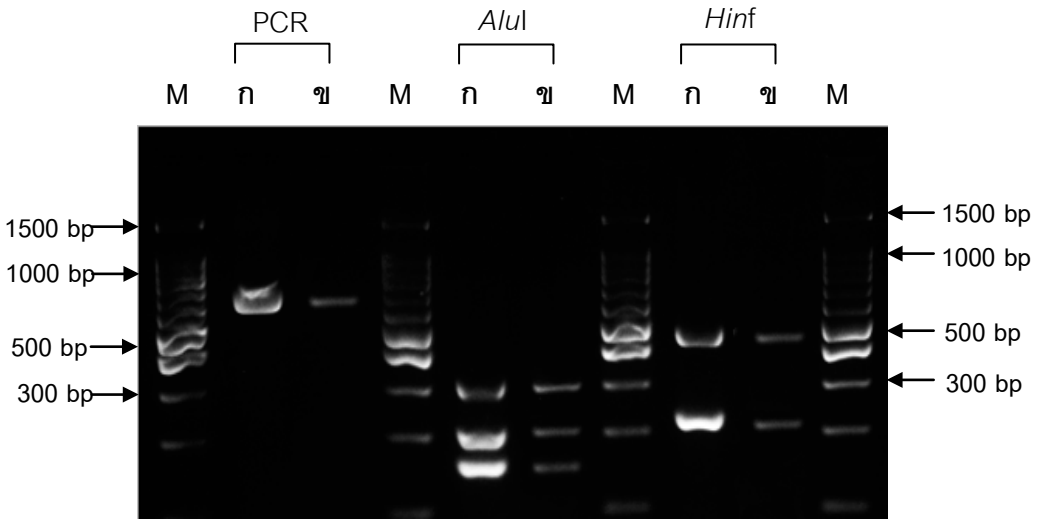
4.1 การตรวจสอบการเกิดไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รังเบื้องต้น

จากการนำสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ใส่ให้กับกล้าไม้รัง พบกล้าไม้รังที่ใส่สปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง และเห็ดตะไคลเขียว มีการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้ แต่ไม่พบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้รังที่ใส่สปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดถ่านเล็ก โดยลักษณะสัณฐานวิทยาของรากเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดงจะมีสีครีมอมเหลืองผิวเรียบมัน ไม่มีการแตกแขนง แสดงดังภาพ 4.1 ก และลักษณะสัณฐานวิทยาของรากเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดตะไคลเขียวจะมีสีครีมอมเหลืองเทา ผิวเรียบ และไม่มีการแตกแขนง แสดงดังภาพที่ 4.1 ข



ภาพที่ 4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยารากเอคโตไมคอร์ไรซา ภาพ ก คือ เห็ดแดง ภาพ ข คือ เห็ดตะไคลเขียว

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรากเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 2 ลักษณะ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของรากเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดงได้เพียงลักษณะเดียว เมื่อเปรียบเทียบผลเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอและผลการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่ง ITS ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดงกับดอกเห็ดแดง พบแถบดีเอ็นเอรากเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดงและดอกเห็ดแดงที่ตำแหน่ง ITS มีขนาด 700 bp เมื่อทำการตัดด้วยเอนไซมตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Hin*fI พบรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดงและดอกเห็ดแดงมีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหมือนกัน คือ การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ที่ 150 200 และ 300 bp ส่วนขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ที่ 200 และ 500 bp แสดงดังภาพที่ 4.2

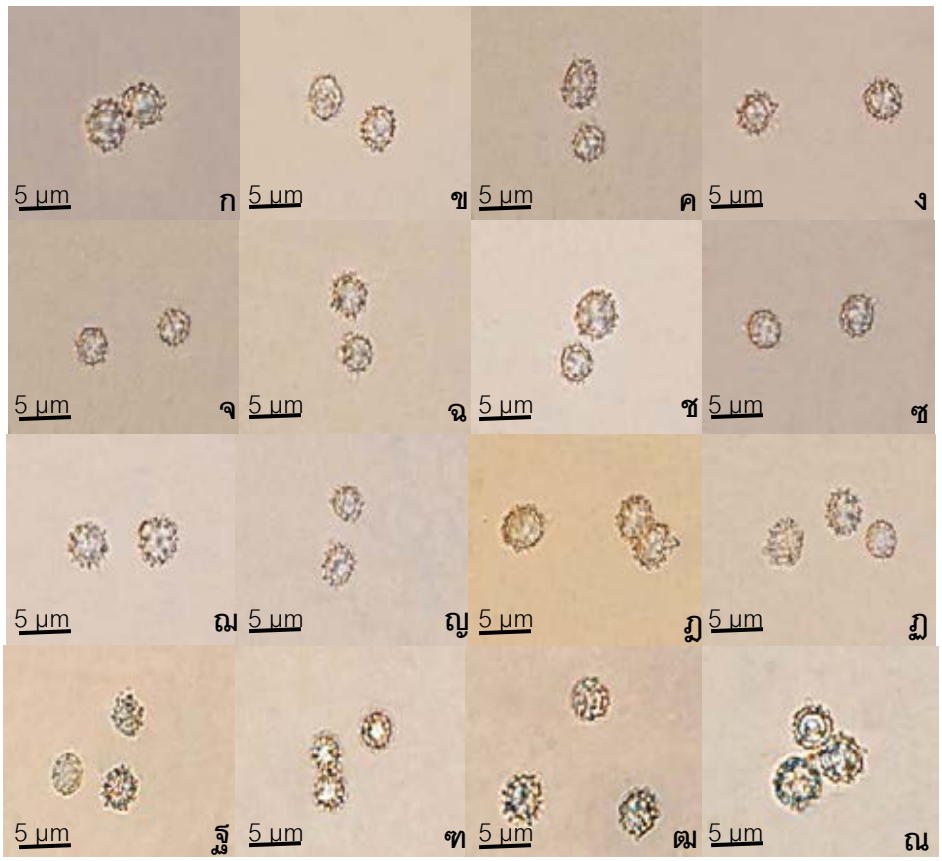


ภาพที่ 4.2 แถบดีเอ็นเอและรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Hin*fI ช่อง M คือ marker ช่อง ก คือ เห็ดแดง และช่อง ข คือรากเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง

4.2 การมีชีวิตของสปอร์และความสามารถในการสร้างไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รัง

4.2.1 การทดสอบการงอกของสปอร์

จากการนำสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ที่เก็บรักษาในทรายและถุงพลาสติกแบบซิบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ แช่ในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่า พบว่าสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ ไม่มีการงอกของสปอร์เกิดขึ้น แสดงดังภาพที่ 4.3 - 4.5



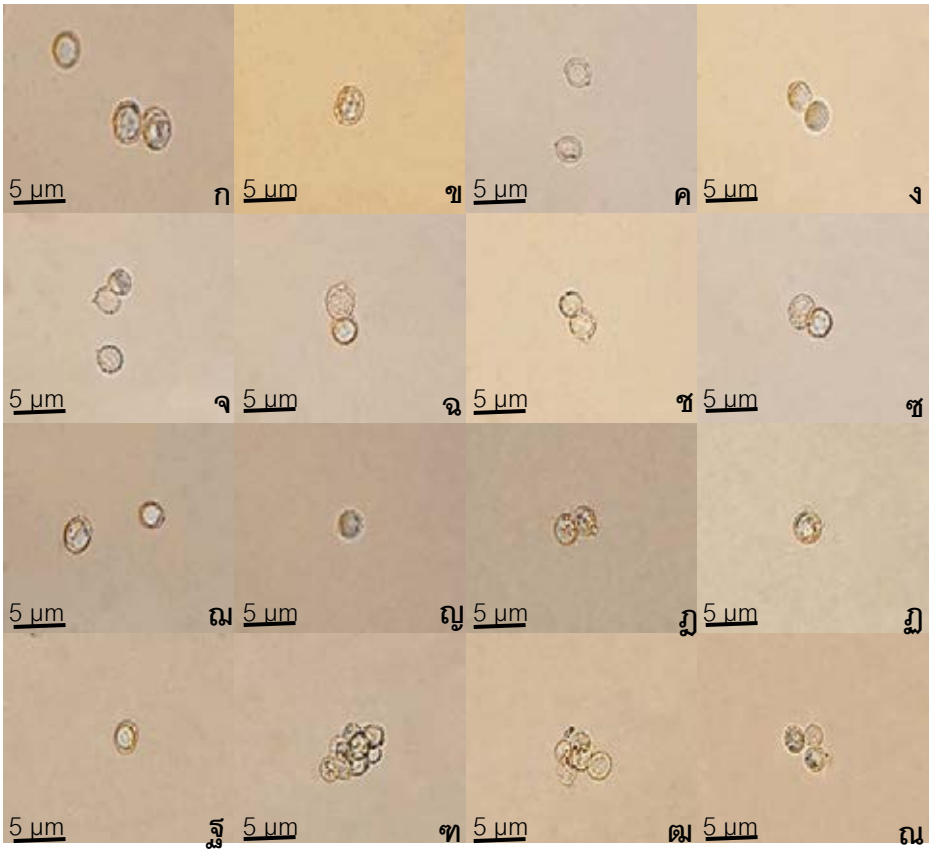
ภาพที่ 4.3 ลักษณะสปอร์เห็ดแดงที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ หลังจากแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ภาพ ก - ง คือสปอร์เก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ

ภาพ จ - ซ คือสปอร์เก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ

ภาพ ฌ - ฏ คือสปอร์เก็บรักษาในทรายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ

ภาพ ฐ - ณ คือสปอร์เก็บรักษาในทรายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ



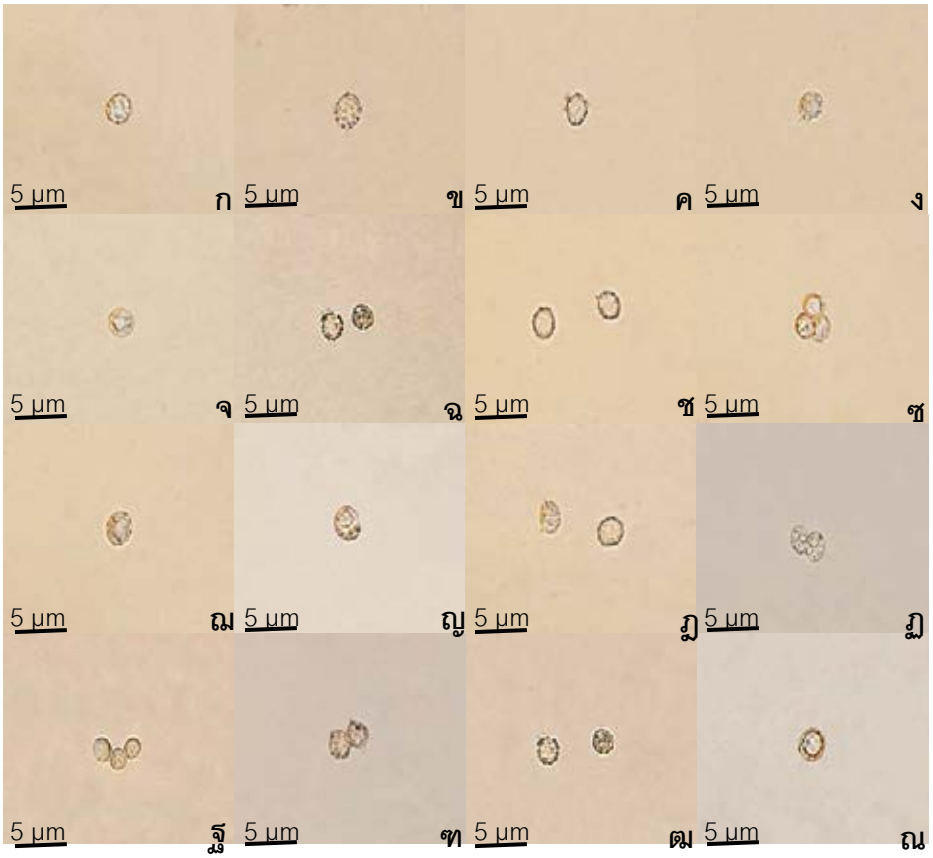
ภาพที่ 4.4 ลักษณะสปอร์เห็ดตะไคลเขียวที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ หลังจากแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ภาพ ก - ง คือสปอร์เก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ

ภาพ จ - ซ คือสปอร์เก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ

ภาพ ฌ - ฏ คือสปอร์เก็บรักษาในทรายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ

ภาพ ฐ - ณ คือสปอร์เก็บรักษาในทรายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ



ภาพที่ 4.5 ลักษณะสปอร์เห็ดถ่านเล็กที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ หลังจากแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ภาพ ก - ง คือสปอร์เก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ

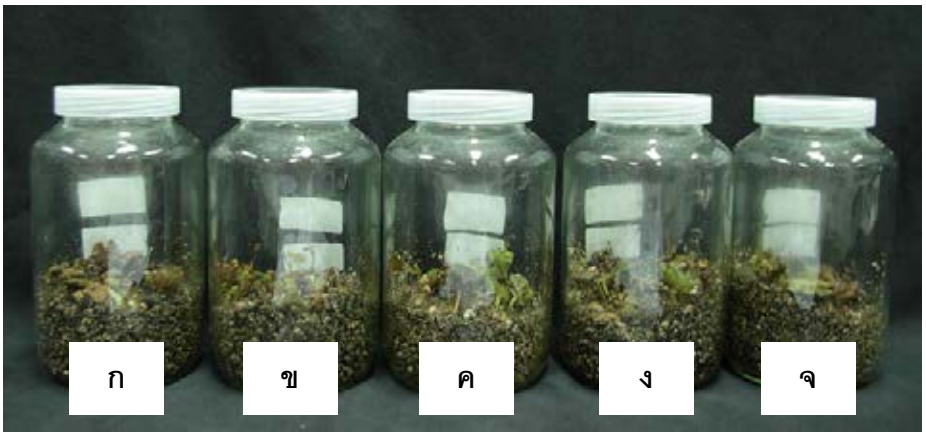
ภาพ จ - ซ คือสปอร์เก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ

ภาพ ฌ - ฏ คือสปอร์เก็บรักษาในทรายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ

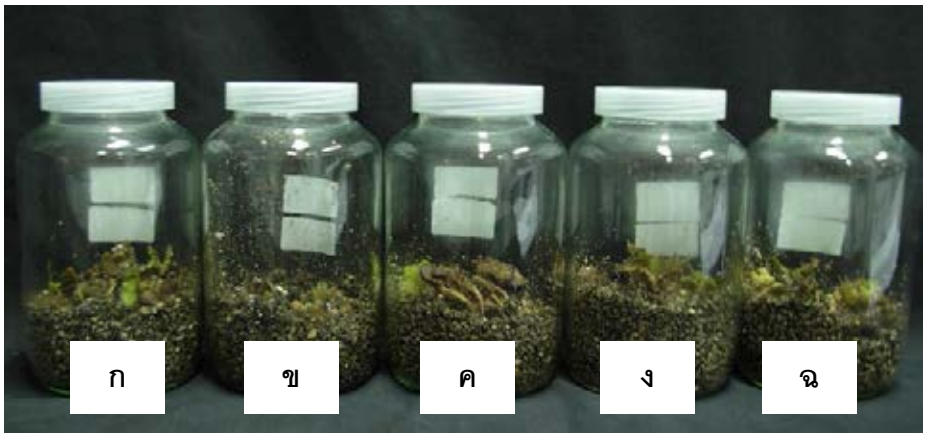
ภาพ ฐ - ณ คือสปอร์เก็บรักษาในทรายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน ตามลำดับ

4.2.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รัง

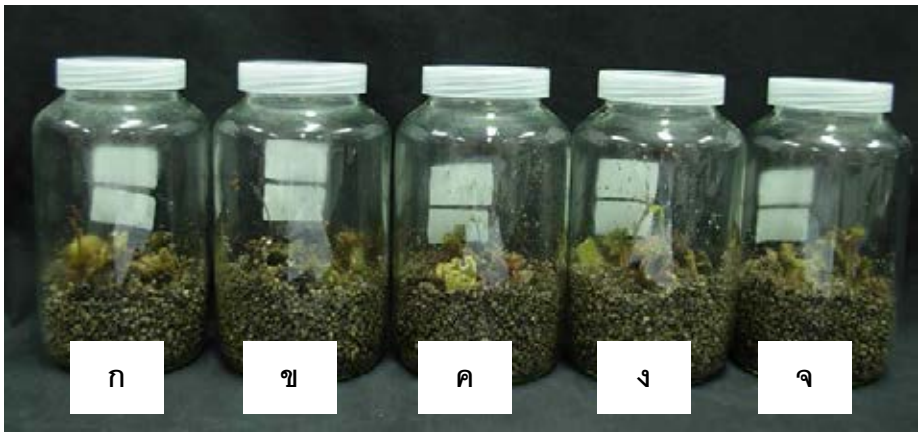
นำสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ที่เก็บใหม่ (7 วัน) และเก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ เป็นเวลา 8 เดือน พบว่าหลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 1 เดือน ผลรังเติบโตเป็นต้นกล้าทุกชุดการทดลอง แสดงดังภาพ 4.6 - 4.8 และหลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก เป็นเวลา 2 เดือน กล้าไม้รังเริ่มมีการตาย โดยกล้าไม้รังที่ตายไม่มีการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ราก และเมื่อกล้าไม้รังอายุ 6 เดือน พบกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดงเก็บรักษาในทรายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง คงมีชีวิตรอดชุดการทดลองละ 1 ต้น และกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดถ่านเล็กเก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิห้องคงมีชีวิตรอดอยู่ทั้งสิ้น 1 ต้น ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากนั้นนำกล้าไม้รังที่มีชีวิตรอดไปตรวจสอบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้รัง พบว่ากล้าไม้รังไม่มีการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้ นอกจากนี้รากกล้าไม้รังที่มีชีวิตรอดยังมีการแตกแขนงค่อนข้างน้อย



ภาพที่ 4.6 กล้าไม้อายุ 1 เดือน หลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเห็ดแดงที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ ภาพ ก คือสปอร์เก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภาพ ข คือสปอร์เก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิห้อง ภาพ ค คือสปอร์เก็บรักษาในทรายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภาพ ง คือสปอร์เก็บรักษาในทรายที่อุณหภูมิห้อง ภาพ จ คือสปอร์เก็บใหม่ (7 วัน)



ภาพที่ 4.7 กล้าไม้อายุ 1 เดือน หลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเห็ดตะไคลเขียวที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ ภาพ ก คือสปอร์เก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภาพ ข คือสปอร์เก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิห้อง ภาพ ค คือสปอร์เก็บรักษาในทรายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภาพ ง คือสปอร์เก็บรักษาในทรายที่อุณหภูมิห้อง ภาพ จ คือสปอร์เก็บใหม่ (7 วัน)



ภาพที่ 4.8 กล้าไม้อายุ 1 เดือน หลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเห็ดถ่านเล็กที่เก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ ภาพ ก คือสปอร์เก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภาพ ข คือสปอร์เก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิห้อง ภาพ ค คือสปอร์เก็บรักษาในทรายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภาพ ง คือสปอร์เก็บรักษาในทรายที่อุณหภูมิห้อง ภาพ จ คือสปอร์เก็บใหม่ (7 วัน)

ตารางที่ 4.1 จำนวนกล้าไม้รังที่รอดตายหลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก เป็นเวลา 6 เดือน

ชนิดหัวเชื้อสปอร์	วิธีการเก็บรักษา	จำนวนต้นกล้า (ต้น)
เห็ดแดง	ถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	0
	ถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิห้อง	1
	ทรายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	1
	ทรายที่อุณหภูมิห้อง	0
	เก็บใหม่ (7วัน)	0
เห็ดตะไคลเขียว	ถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	0
	ถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิห้อง	0
	ทรายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	0
	ทรายที่อุณหภูมิห้อง	0
	เก็บใหม่ (7วัน)	0
เห็ดถ่านเล็ก	ถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	0
	ถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิห้อง	0
	ทรายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	0
	ทรายที่อุณหภูมิห้อง	1
	เก็บใหม่ (7วัน)	0

4.3 ผลการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา ครั้งที่ 1

4.3.1 ผลอัตราการเติบโตของกล้าไม้ และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราที่ราก

ทำการวัดการเติบโตทางด้านความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน และมวลชีวภาพรวม ของกล้าไม้รังอายุ 12 เดือน หลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และกล้าไม้รังที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2 และลักษณะกล้าไม้รังเมื่ออายุ 12 เดือน แสดงดังภาพที่ 4.9

จากตารางที่ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตทางด้านความสูงของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด กับชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา พบว่าความสูงของกล้าไม้รังในชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซามีความสูงมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดงมีความสูงมากกว่ากล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีความสูงเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 44.44 รองลงมาคือกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก มีความสูงเพิ่มขึ้นร้อยละ 25.83 และ 20.02 ตามลำดับ และกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซามีการเติบโตทางด้านความสูงมากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตมไคอร์ไรซาตั้งแต่อายุ 4 เดือน ดังแสดงในภาพ 4.10

เมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากของชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากของกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง และเห็ดตะไคลเขียว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง และเห็ดตะไคลเขียว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากของกล้าไม้รังเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 41.60 และ 23.84 ตามลำดับ ในขณะที่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดถ่านเล็กมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากเพิ่มขึ้น ร้อยละ 18.73 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา นอกจากนี้การเติบโตทางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากของกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซามากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาตั้งแต่อายุ 4 เดือน ดังแสดงในภาพ 4.11

เมื่อเปรียบเทียบมวลชีวภาพส่วนเหนือดินชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อสปอร์เอคโตไมคอร์ไรซา กับชุดการควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์เอคโตไมคอร์ไรซา พบว่ามวลชีวภาพส่วนเหนือดินและมวลชีวภาพรวมของกล้าไม้รังที่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์เอคโตไมคอร์ไรซาทุกชุดการทดลองแตกต่างกับชุดการควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกล้าไม้รังที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก มีมวลชีวภาพส่วนเหนือดินเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 85.51 64.64 และ 52.73 ตามลำดับ และกล้าไม้รังที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดตะไคลเขียว เห็ดแดง และเห็ดถ่านเล็กมีมวลชีวภาพรวมเพิ่มขึ้นร้อยละ 66.78 65.30 และ 31.39 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบมวลชีวภาพส่วนใต้ดินชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซากับชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา พบว่ามีเพียงกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดงและเห็ดตะไคลเขียวที่แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดตะไคลเขียว และเห็ดแดง มีมวลชีวภาพส่วนใต้ดินเพิ่มขึ้นร้อยละ 65.80 และ 59.19 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ากล้าไม้รังที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์เห็ดแดงและเห็ดตะไคลเขียวสามารถเพิ่มมวลชีวภาพส่วนเหนือดิน มวลชีวภาพส่วนใต้ดินและมวลชีวภาพรวมดีกว่ากล้าไม้รังที่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดถ่านเล็กอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.2

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมของส่วนเหนือดินของกล้าไม้รัง พบว่าชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก กับชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงดังภาพ 4.12

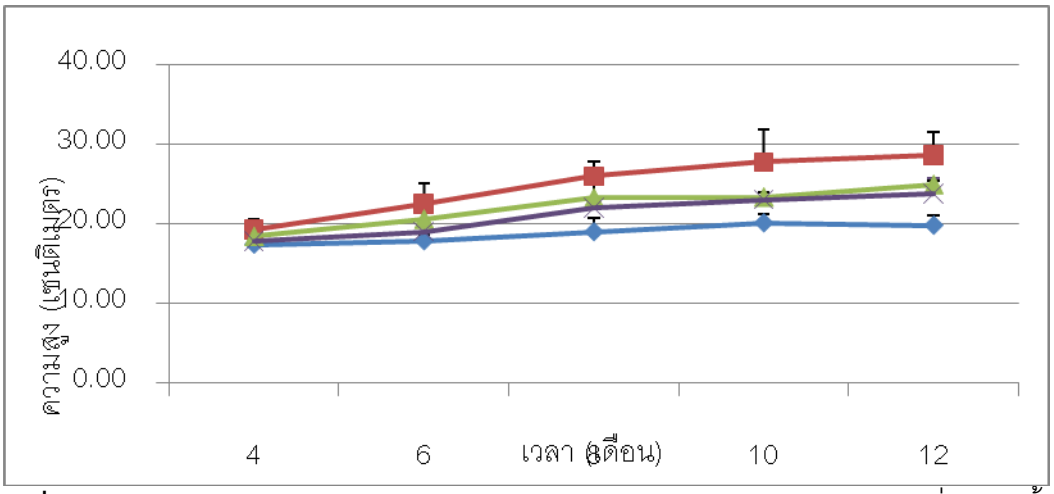
การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้รังชุดที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา และชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา พบว่ากล้าไม้ที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง และเห็ดตะไคลเขียวมีการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้รังคิดเป็นร้อยละ 80 ตามลำดับ รองลงมาคือกล้าไม้ที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดถ่านเล็กคิดเป็นร้อยละ 78 ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบการเติบโตของกล้าไม้อายุ 12 เดือน หลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดต่าง ๆ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

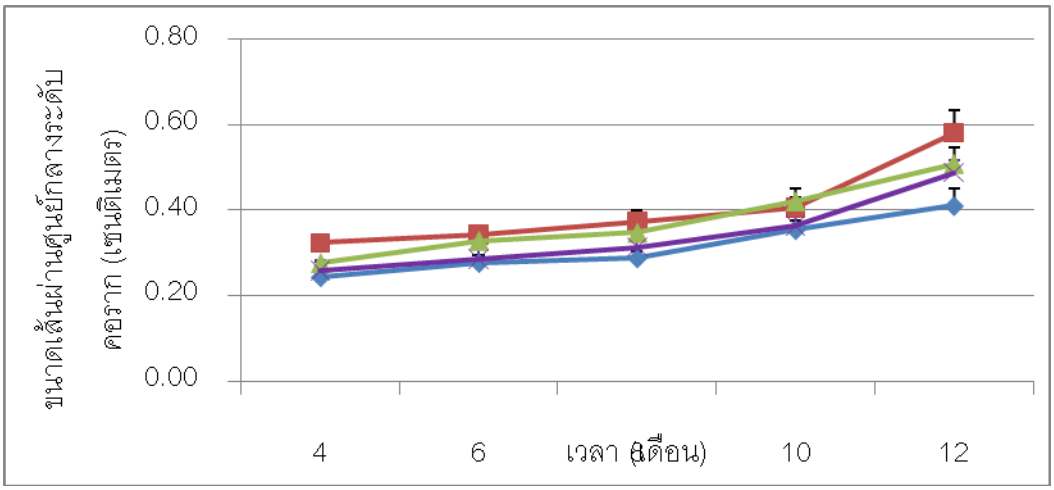
ชุดการทดลอง	ความสูง (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก (ซม.)	มวลชีวภาพ (กรัม)		
			เหนือดิน	ใต้ดิน	รวม
แดง	28.57±2.99a	0.58±0.05a	23.83±3.20a	68.18±10.16a	92.01±12.71a
ตะไคลเขียว	24.89±0.45b	0.51±0.04ab	21.82±1.13ab	71.01±10.42a	92.83±11.47a
ถ่านเล็ก	23.74±1.94b	0.49±0.03bc	19.61±1.76b	53.39±2.27b	73.00±2.62b
ควบคุม	19.78±1.30c	0.41±0.04c	12.83±1.50c	42.83±5.32b	55.66±5.05c

เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวตั้ง ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) หมายเหตุ ชุดการทดลองควบคุมคือชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

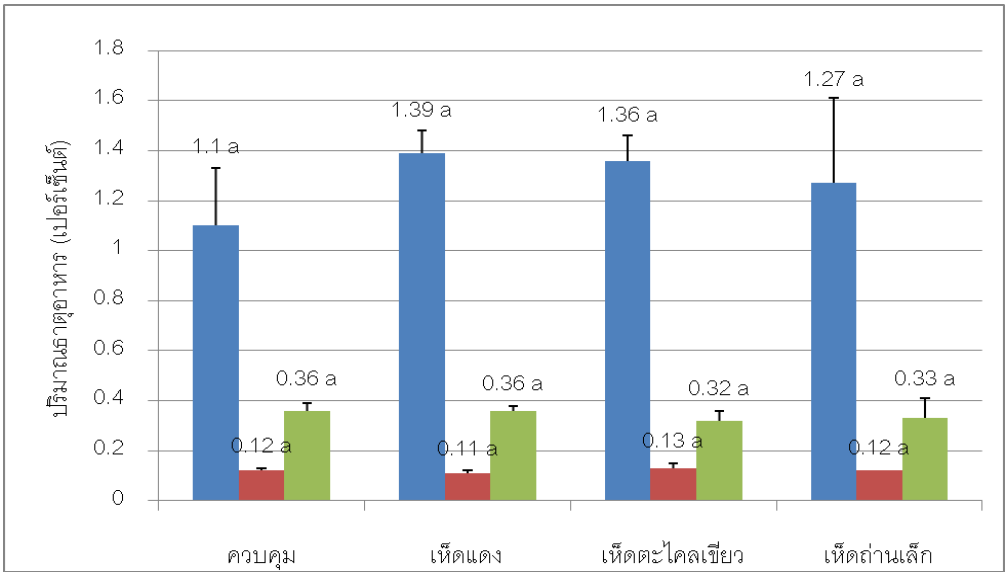
ภาพที่ 4.9 เปรียบเทียบการเติบโตของกล้าไม้รังอายุ 12 เดือน ภาพ ก ข ค คือกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก และภาพ ง คือ กล้าไม้รังชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา ตามลำดับ



ภาพที่ 4.10 แสดงการเติบโตทางความสูงของกล้าไม้รังอายุ 4 เดือน ถึง 12 เดือน ที่ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง [■] เห็ดตะไคลเขียว [▲] เห็ดถ่านเล็ก [X] และชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา [◆]



ภาพที่ 4.11 แสดงการเติบโตทางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากของกล้าไม้รังอายุ 4 เดือน ถึง 12 เดือน ที่ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง[■] เห็ดตะไคลเขียว [▲] เห็ดถ่านเล็ก [X] และชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา [◆]



ภาพที่ 4.12 แสดงปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน [■] ฟอสฟอรัส [■] และโพแทสเซียม [■] ส่วนลำต้นและใบของกล้าไม้รังอายุ 12 เดือน ที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโต-ไมคอร์ไรซา

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากของกล้าไม้รังอายุ 12 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดต่าง ๆ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

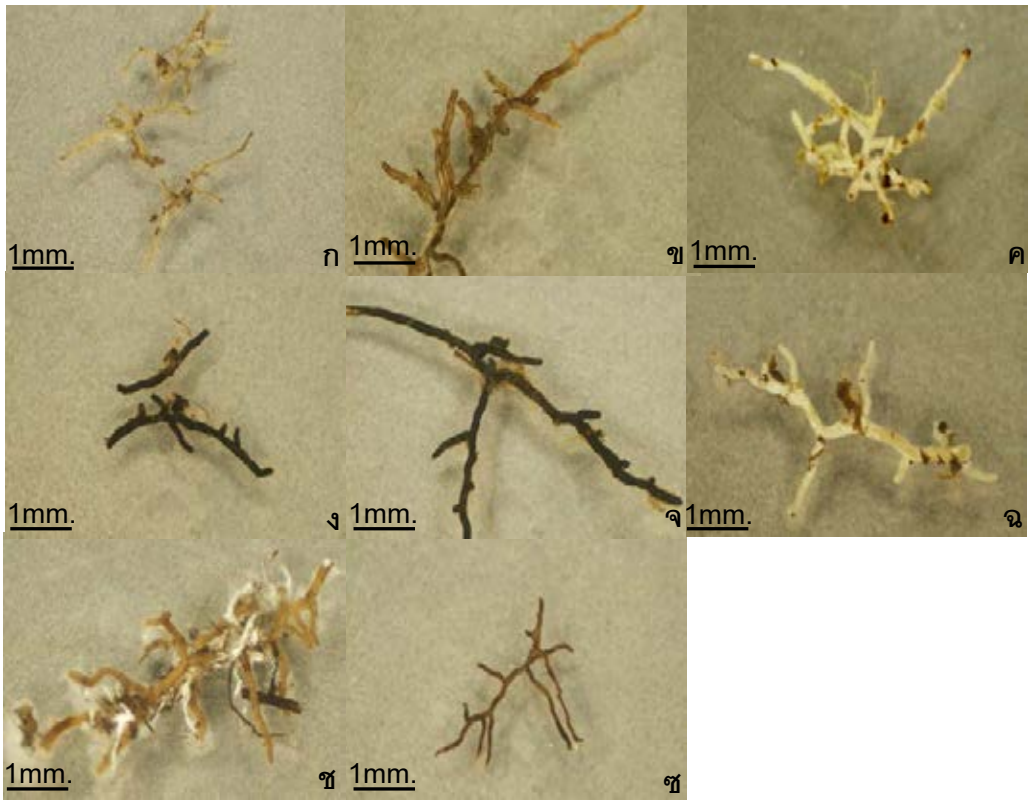
ชุดการทดลอง	**การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ราก (เปอร์เซ็นต์)**
แดง	80±4.08 a
ตะไคลเขียว	78±11.81 a
ถ่านเล็ก	80±9.37 a
ควบคุม	29±1.65 b

เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวตั้ง ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) หมายเหตุ ชุดการทดลองควบคุมคือชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

4.3.2 การจัดจำแนกรากเอคโตไมคอร์ไรซา

ผลการจัดจำแนกรากเอคโตไมคอร์ไรซาตามลักษณะสัณฐานวิทยา พบรากเอคโตไมคอร์ไรซาทั้งสิ้น 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน ซึ่งรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบทั้งหมดมีโครงสร้างแผ่นแมนเทิลแบบ plectenchymatous โดยรากเอคโตไมคอร์ไรซาลักษณะสัณฐานวิทยา ก ข ค และ ช มีการแตกแขนงแบบ irregular pinnate และลักษณะสัณฐานวิทยา ง จ ฉ และ ซ มีการแตกแขนงแบบ monopodial pinnate แสดงดังภาพที่ 4.13 และตารางที่ 4.4

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของรากเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank สามารถทำการจัดจำแนกรากเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 8 ลักษณะสัณฐานวิทยา ได้ทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ *Tomentella* sp.1 *Tomentella* sp.2 *Tomentella* sp.3 *Tomentella* sp.4 *Tomentella* sp.5 และ *Inocybe* sp. แสดงดังตารางที่ 4.5



ภาพที่ 4.13 ลักษณะสัณฐานวิทยารากเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 8 ลักษณะสัณฐานวิทยา ภาพ ก-ซ คือลักษณะสัณฐานวิทยา ก-ซ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาและชนิดของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบในชุดการทดลอง

ลักษณะสัณฐานวิทยา	ลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซา
ก	รากสีเหลืองไข่ ผิวเรียบ มีการแตกกิ่งแบบ Irregular pinnate และโครงสร้างแผ่นแมนเทิลแบบ plectenchymatous
ข	รากสีเหลืองไข่อมน้ำตาลเข้ม ผิวเรียบ มีการแตกกิ่งแบบ Irregular pinnate และโครงสร้างแผ่นแมนเทิลแบบ plectenchymatous
ค	รากสีขาวอมเหลืองเปลือกไข่ ผิวเรียบ มีการแตกกิ่งแบบ Irregular pinnate และโครงสร้างแผ่นแมนเทิลแบบ plectenchymatous
ง	รากมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ผิวมีเส้นใยเส้นสั้น ๆ ปกคลุมบางมัน มีการแตกกิ่งแบบ Monopodial pinnate และโครงสร้างแผ่นแมนเทิลแบบ plectenchymatous
จ	รากมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ผิวเรียบ มัน มีการแตกกิ่งแบบ Monopodial pinnate และโครงสร้างแผ่นแมนเทิลแบบ plectenchymatous
ฉ	รากสีขาวอมเหลืองเปลือกไข่ไก่ ผิวเรียบมัน มัน มีการแตกกิ่งแบบ Monopodial pinnate และโครงสร้างแผ่นแมนเทิลแบบ plectenchymatous
ช	รากมีสีเหลืองเปลือกไข่อมน้ำตาล ผิวรากมีเส้นใยสีขาวพันรอบราก มีการแตกกิ่งแบบ Irregular pinnate และโครงสร้างแผ่นแมนเทิลแบบ plectenchymatous
ซ	รากมีสีเทาอมเหลืองเปลือกไข่ไก่ ผิวเรียบมัน มีการแตกกิ่งแบบ Monopodial pinnate และโครงสร้างแผ่นแมนเทิลแบบ plectenchymatous

ตารางที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสรากเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละลักษณะสัณฐานวิทยากับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ที่ตำแหน่ง ITS

ลักษณะสัณฐานวิทยา	ชนิด	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน
ก	*Tomentella* sp. (AM412297)	100
ข	*Tomentella* sp. (AM412297)	99
ค	*Tomentella* sp. (AM412297)	97
ง	*Tomentella* sp. (JF2735479)	94
จ	*Tomentella* sp. (U83467)	89
ฉ	*Tomentella* sp. (AM412297)	90
ช	*Tomentella* sp. (UDB00347)	92
ซ	*Inocybe* sp. (GQ893019)	95

4.4 ผลการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา ครั้งที่ 2

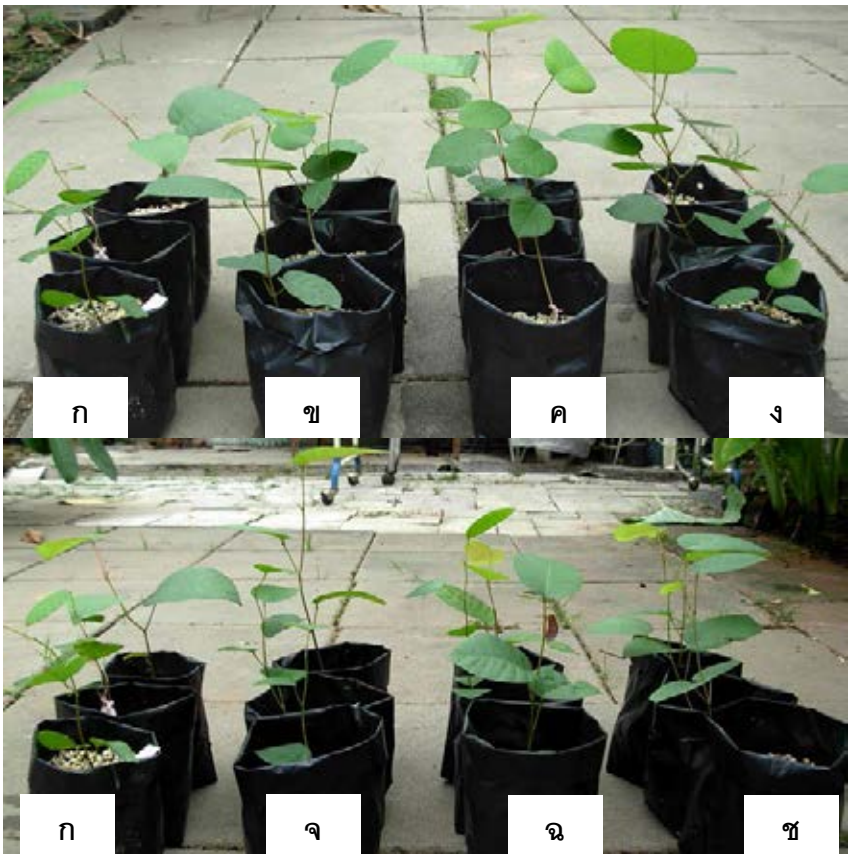
จากการประเมินผลของหัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง เห็นตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่มีผลต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้รัง เมื่อทำการเปรียบเทียบการเติบโตทางด้านความสูงและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากของกล้าไม้รังอายุ 3 เดือน ชุดการทดลองที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7 และลักษณะกล้าไม้รังเมื่ออายุ 3 เดือน แสดงดังภาพที่ 4.15 จากตารางที่ 4.6 พบว่าการเติบโตทางด้านความสูงและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากชุดที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็นตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา แสดงดังภาพที่ 4.14

เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ประสบปัญหาน้ำท่วมพื้นที่การทดลองระหว่างวันที่ 20 ตุลาคม 2554 ถึง วันที่ 24 พฤศจิกายน 2554 ทำให้กล้าไม้รังที่มีอายุ 4 เดือน หลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็นตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จมน้ำเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อน้ำลดพบต้นกล้ารังมีอาการส่วนเหนือดินแห้งและเป็นสีน้ำตาล แสดงดังภาพที่ 4.15 ซึ่งหลังจากน้ำลดเป็นเวลา 1 เดือน พบกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดงความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และกล้าไม้รังที่ใส่หัว

เชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดตะไคลเขียวความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีการเกิดต้นอ่อนขึ้นใหม่ชุดการทดลองละ 1 ต้น แสดงดังภาพที่ 4.16 และหลังจากน้ำลดเป็นเวลา 2 เดือน ทำการเปรียบเทียบอัตราการรอดตาย (การเกิดต้นอ่อนขึ้นใหม่และระยะพักตัว) ของกล้าไม้รังที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา พบว่ากล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซามีอัตราการรอดตาย โดยมีการเกิดต้นอ่อนขึ้นใหม่ และระยะพักตัวแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.7

จากตารางที่ 4.8 พบกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดงความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนขึ้นใหม่สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนขึ้นใหม่คิดเป็นร้อยละ 26.55 และกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดถ่านเล็กความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรมีเปอร์เซ็นต์การแตกต้นอ่อนขึ้นใหม่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่กล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดตะไคลเขียวความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนขึ้นใหม่น้อยที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนขึ้นใหม่คิดเป็นร้อยละ 5 และไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกล้าไม้ที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา แสดงดังภาพที่ 4.17 นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของกล้าไม้รังในระยะพักตัวกับลักษณะกล้าไม้รังที่ตาย พบว่าลำต้นส่วนใต้ดินของกล้าไม้รังในระยะพักตัวจะแข็ง มีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลปานกลางและเมื่อผ่าตามยาวลำต้นส่วนใต้ดินภายในจะมีสีขาว ในขณะที่ลำต้นส่วนใต้ดินของกล้าไม้รังที่ตายจะนิ่ม มีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำและเมื่อผ่าตามยาวลำต้นส่วนใต้ดินของกล้าไม้รังที่ตายภายในจะมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ แสดงดังภาพที่ 4.18

เมื่อเปรียบเทียบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้รังหลังน้ำลดเป็นเวลา 2 เดือน พบกล้าไม้ที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซามีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.8 ซึ่งกล้าไม้รังชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดตะไคลเขียวความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 67 รองลงมาคือกล้าไม้รังชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดงความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่คิดเป็นร้อยละ 60 โดยรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบทุกชุดการทดลองจะมีสีดำ เส้นใยปกคลุมบริเวณผิวรากบางส่วน มีการแตกแขนงแบบ monopodial pinnate ซึ่งพบเพียงลักษณะสัณฐานวิทยาเดียว แสดงดังภาพที่ 4.19



ภาพที่ 4.14 เปรียบเทียบการเติบโตของกล้าไม้รังเมื่ออายุ 3 เดือน ที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา และชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

ภาพ ก คือชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

ภาพ ข คือกล้าไม้รังใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดงความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ภาพ ค คือกล้าไม้รังใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดตะไคลเขียวความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ภาพ ง คือกล้าไม้รังใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดถ่านเล็กความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ภาพ จ คือกล้าไม้รังใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดงความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ภาพ ฉ คือกล้าไม้รังใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดตะไคลเขียวความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

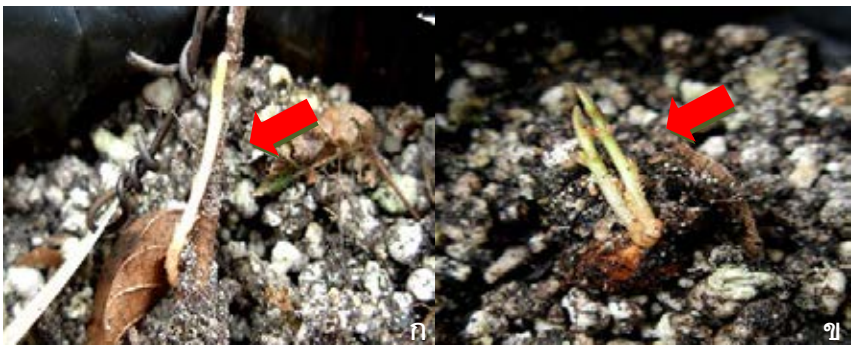
ภาพ ช คือกล้าไม้รังใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดถ่านเล็กความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบการเติบโตของกล้าไม้อายุ 3 เดือน หลังใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา และชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้น (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	ความสูง (ซม.)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก (ซม.)
ควบคุม	-	11.80±1.4 a	0.235±0.024 a
แดง	10^5	13.30±0.7a	0.232±0.020 a
ตะไคลเขียว	10^5	13.10±1.2a	0.244±0.008 a
ถ่านเล็ก	10^5	11.80±1.5a	0.251±0.007 a
แดง	10^7	13.20±1.0 a	0.254±0.027a
ตะไคลเขียว	10^7	12.70±1.0 a	0.235±0.022 a
ถ่านเล็ก	10^7	12.27±0.7 a	0.234±0.035 a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวตั้ง ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) หมายเหตุ ชุดการทดลองควบคุม คือชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

ภาพที่ 4.15 ลักษณะของกล้าไม้รังหลังน้ำลดเป็นเวลา 1 เดือน



ภาพที่ 4.16 ต้นอ่อนของกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา ภาพ ก และ ข คือหัวเชื้อสปอร์เห็ดแดงและเห็ดตะไคลเขียว ความเข้มข้น 10^7 และ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ลูกศรชี้ คือ ต้นอ่อน

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตและอัตราการตายของกล้าไม้รังที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้น (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)		
		เกิดต้นอ่อนขึ้นใหม่	ระยะพักตัว	รวม
ควบคุม	-	6.40±0.24 cd	74.44±0.96 ab	80.83±0.72 c
แดง	10^5	14.12±3.62 bc	68.36±1.67 bc	82.52±2.22 c
ตะไคลเขียว	10^5	15.35±5.53 b	74.47±5.81 ab	89.82±0.31 b
ถ่านเล็ก	10^5	21.67±7.64 ab	60.00±10.00 cd	81.67±2.89 c
แดง	10^7	26.55±6.67 a	55.78±10.44 d	82.33±3.97 c
ตะไคลเขียว	10^7	5.00±0.00 d	82.81±2.43 a	87.81±2.43 b
ถ่านเล็ก	10^7	19.30±3.04 ab	75.44±3.04 ab	94.73±0.01 a

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวตั้ง ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) หมายเหตุ ชุดการทดลองควบคุม คือชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

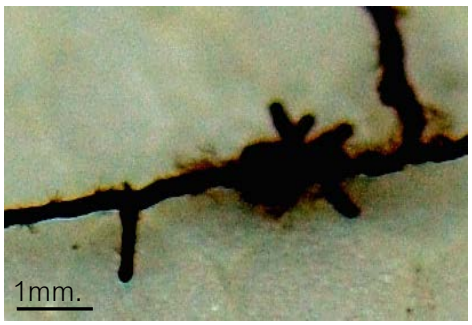
ภาพที่ 4.17 เปรียบเทียบต้นอ่อนที่ขึ้นใหม่ของกล้าไม้รังที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา หลังผ่านเหตุการณ์น้ำท่วมเป็นเวลา 2 เดือน ภาพ ก คือชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา ภาพ ข ค และ ง คือกล้าไม้รังใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็กความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และภาพ จ ฉ และ ช คือกล้าไม้รังใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็กความเข้มข้นความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ภาพที่ 4.18 ลักษณะลำต้นส่วนใต้ดินของกล้าไม้รัง ภาพ ก คือลำต้นส่วนใต้ดินของกล้าไม้รังระยะพักตัว และภาพ ข คือลำต้นส่วนใต้ดินของกล้าไม้รังที่ตาย

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากของกล้าไม้รังหลังน้ำลดเป็นเวลา 2 เดือน

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้น (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ราก (เปอร์เซ็นต์)
ควบคุม	-	35±4.33 c
แดง	10^5	60±17.32 ab
ตะไคลเขียว	10^5	47±19.44 abc
ถ่านเล็ก	10^5	42.13±4.01 c
แดง	10^7	60±10.77 ab
ตะไคลเขียว	10^7	67±0.00 a
ถ่านเล็ก	10^7	36±2.73 c

เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวตั้ง ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) หมายเหตุ ชุดการทดลองควบคุมคือชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา



ภาพที่ 4.19 ลักษณะสัณฐานวิทยารากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้รังที่พบหลังจากหลังน้ำลดเป็นเวลา 2 เดือน

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการวิจัย

ไม้ในวงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae) เป็นไม้เด่นประจำภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย เป็นต้น (Lee และคณะ, 2008) ไม้ในวงศ์นี้เป็นไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ และปัจจุบันมีปริมาณลดลงเป็นจำนวนมากเนื่องจากประชากรและความต้องการใช้ไม้เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการปลูกป่าไม้ในวงศ์นี้ทดแทนไม้ที่ถูกตัดจึงเป็นเรื่องที่สำคัญและจำเป็นอย่างเร่งด่วน การใช้ราเอคโตไมคอร์ไรซาในการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ในวงศ์นี้เป็นเรื่องจำเป็นที่จะทำให้การปลูกป่าไม้วงศ์นี้ประสบผลสำเร็จ งานวิจัยนี้ได้สนใจศึกษาความสามารถของราเอคโตไมคอร์ไรซาในสกุล *Russula* 3 ชนิด ได้แก่ เห็ดแดง (*Russula rosea*) เห็ดตะไคลเขียว (*R. virescens*) และเห็ดถ่านเล็ก (*R. densifolia*) ในการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้รัง (*Shorea siamensis*) ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิดนี้สร้างดอกเห็ดที่สามารถรับประทานได้และมีราคาแพง การใช้ราเอคโตไมคอร์ไรซาเหล่านี้เป็นหัวเชื้อใส่ให้กับกล้าไม้วงศ์ไม้ยางจะทำให้ได้ป่าไม้วงศ์ไม้ยางเพิ่มขึ้นและยังได้ดอกเห็ดไว้รับประทาน เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิดนี้ มักไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การใช้หัวเชื้อสปอร์จึงเป็นวิธีการเหมาะสมที่สุด นอกจากนี้หัวเชื้อสปอร์เป็นหัวเชื้อที่สามารถทำได้ง่าย ขนย้ายสะดวก มีราคาไม่แพง และพบว่าหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้และการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากพืชได้ดีกว่าหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดเส้นใย (Rincon และคณะ, 2001; Martin และคณะ, 2003; Brundrett และคณะ, 2005) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการประเมินผลของหัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ที่มีผลต่อการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้รัง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมสำหรับต้นกล้าที่ใช้ในการปลูกป่าไม้วงศ์ไม้ยาง ตลอดจนเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในเชิงการค้าต่อไปในอนาคต

เมื่อตรวจสอบการเกิดไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รังเบื้องต้น พบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง และเห็ดตะไคลเขียว โดยรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะรากสีครีม ผิวเรียบ และไม่มีการแตกกิ่ง เช่นเดียวกับลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซา *R. sanguinea* ตามรายงานของ Dunabeitia และคณะ (1996) ที่รายงานว่ารากเอคโตไมคอร์ไรซาของ *R. sanguinea* มีสีครีม ผิวเรียบมัน และไม่มีการแตกแขนง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Taylor และ Alexander (1989) ที่

รายงานว่าลักษณะรากเอคโตไมคอร์ไรซาในสกุล *Russula* จะมีความแตกต่างกันที่ลักษณะรูปแบบการแตกกิ่ง และลักษณะรูปแบบโครงสร้างแผ่นแมนเทิล ดังเช่นรายงานของ Cuvelier (1991) ที่รายงานว่ารากเอคโตไมคอร์ไรซา *R. ochroleuca* มีสีครีม และผิวเรียบมัน แต่มีการแตกกิ่งแบบ coralloid และแผ่นแมนเทิลแบบ pseudoparenchymatous ดังนั้นจึงสามารถจำแนกชนิดของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบในกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เป็นรากเอคโตไมคอร์ไรซาของเห็ดแดงจริง ประกอบกับผลรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Hinf*I เปรียบเทียบระหว่างรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบกับดอกเห็ดแดง พบว่ารูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหมือนกัน นอกจากนี้การไม่พบการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดถ่านเล็ก อาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมในภาชนะปลูกไม่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์หรือการเข้าไปในรากและเกิดเอคโตไมคอร์ไรซาขึ้นของราเอคโตไมคอร์ไรซา อีกทั้งการไม่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดตะไคลเขียวอาจเป็นเพราะรากเอคโตไมคอร์ไรซาในกลุ่มของพืชวงศ์ไม้ยางนั้นมีขนาดเล็กมา และใช้เพียงปลายรากเท่านั้น ทำให้ปริมาณดีเอ็นเออาจจะมีปริมาณไม่เพียงพอ

การทดสอบความอยู่รอดของสปอร์และความสามารถในการเกิดไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รัง โดยการนำสปอร์ของเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ทำการเก็บรักษาในทรายและถุงพลาสติกแบบซิปที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน 3 6 และ 8 เดือน เมื่อนำสปอร์มาทดสอบการงอกของสปอร์โดยแช่ในน้ำกลั่นปราศเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสปอร์ของเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ไม่มีการงอกของสปอร์เกิดขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสปอร์ของเห็ดในสกุล *Russula* มีความสามารถในการงอกต่ำ ประกอบกับจะต้องอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมคือมีพืชที่อาศัยอยู่ร่วมได้จึงจะเกิดการงอกของสปอร์เกิดขึ้น (Nara, 2008) นอกจากนี้พบว่าสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซาหลายชนิดจะถูกกระตุ้นจากสารที่ซึมออกมาจากรากพืช (root exudate) ทำให้สปอร์เกิดการงอกและสามารถเข้าครอบครองรากพืชได้ root exudate จะมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของราและชนิดของพืช อีกทั้งความเข้มข้นของ root exudate ที่แตกต่างกันยังมีผลต่อความสามารถในการงอกของสปอร์ราไมคอร์ไรซาที่แตกต่างกัน รวมถึงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ pH ปริมาณออกซิเจน และสารอาหาร ยังมีผลต่อการงอกของสปอร์ราไมคอร์ไรซาอีกด้วย (สมจิตร อยู่เป็นสุข, 2552; Melin และคณะ, 1954; Fries, 1989) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Heinemann และ Gaie (1979) ที่ทำการทดสอบการงอกของสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาในสกุล *Russula* พบว่า สปอร์ *R. versicolor* ที่แช่ในอาหาร

เลี้ยงเชื้อ Melin-Norkrans (MN) โดยไม่มีกล้าไม้อยู่ด้วยจะไม่เกิดการงอกของสปอร์รา แต่ถ้าทำการใส่กล้าไม้ลงในอาหาร MN การงอกของสปอร์เกิดขึ้น เช่นเดียวกับงานของ Ishida และคณะ (2008) ที่ทำการศึกษาการงอกของสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดต่าง ๆ โดยการนำแผ่นฟิล์มที่มีสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาไปติดบริเวณรากกล้าไม้ และบริเวณที่ไม่มีรากกล้าไม้ ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าสปอร์ของ *Russulla sororia* ที่อยู่บนแผ่นฟิล์มที่ไม่มีรากกล้าไม้ติดอยู่จะไม่มีการงอกของสปอร์เกิดขึ้น ในขณะที่สปอร์ของ *R. sororia* ที่อยู่บนแผ่นฟิล์มที่ติดกับรากกล้าไม้มีการงอกของสปอร์เกิดขึ้น

เมื่อนำสปอร์ที่ทำการเก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน และ 8 เดือน มาทดสอบกับกล้าไม้รังที่เพิ่งงอก พบว่ากล้าไม้รังส่วนใหญ่ในทุกชุดการทดลองมักเติบโตมาได้ระยะหนึ่ง (ประมาณ 1 เดือน) แล้วตาย ทั้งนี้เนื่องมาจากการปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเติบโตของพืชในภาชนะที่เป็นขวดไม่ดี โดยพบปริมาณน้ำขังอยู่ในภาชนะปลูกมากส่งผลให้รากของกล้าไม้เน่า เละตายในที่สุด ส่วนกล้าไม้รังที่รอดพบว่าไม่มีการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากอาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมในภาชนะปลูกไม่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์หรือช่วงเวลาที่สปอร์งอกกับระยะเวลาที่รากพืชแตกรากใหม่ไม่สัมพันธ์กันจึงทำให้ราไม่สามารถเข้าไปในรากและเกิดเอคโตไมคอร์ไรซาขึ้นได้ มีรายงานวิจัยว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาจะสามารถเข้าไปอาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชที่แตกใหม่ได้ง่ายกว่ารากพืชที่มีอายุมาก (Chu-Chou และ Grace, 1982; Bellei และคณะ, 1992; Chen และคณะ, 2007)

เมื่อทำการประเมินผลของการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาในสกุล *Russula* ทั้ง 3 ชนิด พบว่ากล้าไม้รังที่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิดสามารถกระตุ้นการเติบโตทางความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน-ใต้ดิน และมวลชีวภาพรวม ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกล้าไม้รังที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยกล้าไม้รังที่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดงมีการเติบโตทางความสูง และเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก และมวลชีวภาพส่วนเหนือดินได้ดีที่สุด รองลงมาคือกล้าไม้รังที่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็กตามลำดับ ในขณะที่มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน และมวลชีวภาพรวม พบว่ากล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดตะไคลเขียวมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ กล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง และเห็ดถ่านเล็ก ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Dalong และคณะ (2011) ที่ทำการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Cenococcum geophilum*, *Rhizopogon roseolus* และ *R. densifolia* ให้กับกล้าไม้ *Pinus densiflora* พบว่าหลังการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นเวลา 8 เดือน กล้าไม้ที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซามีอัตราการเติบโตทางความสูง ขนาดเส้น

ผ่านศูนย์กลางระดับคอราก และมวลชีวภาพมากกว่ากล้าไม้ *P. densiflora* ที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Turjaman และคณะ (2005) ที่ทำการศึกษาผลของหัวเชื้อสปอร์ *Pisolithus arhizus* และ *Scleroderma* sp. ต่อการเติบโตของกล้าไม้ *Shorea pinanga* พบว่าหลังจากการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นเวลา 7 เดือน กล้าไม้มีการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากพืช 86 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการเติบโตของกล้าไม้ทางความสูง ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางระดับ คอราก จำนวนใบ น้ำหนักสดและแห้งของลำต้น ตลอดจนอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าต้นกล้าที่ไม่ได้รับหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถเพิ่มอัตราการเติบโตของกล้าไม้ได้ ซึ่งราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดมีความสามารถในการเพิ่มอัตราการเติบโตของพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซาจะมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดพืชที่เข้าไปอาศัยร่วมด้วยแตกต่างกัน (Garbaye และคณะ, 1988; Nylund และ Wallander, 1989; Thomson และคณะ, 1990; Rincon และคณะ, 1999) แต่เมื่อตรวจสอบชนิดของรากเอคโตไมคอร์ไรซาเมื่อต้นกล้ามีอายุได้ 12 เดือน ไม่พบรากของราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้งสามชนิด พบรากเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น (ตารางที่ 4.5) โดยเฉพาะอย่างยิ่งราเอคโตไมคอร์ไรซาในวงศ์ Thelephoraceae สกุล *Tomentella* แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของราเอคโตไมคอร์ไรซาดังกล่าว การปนเปื้อนอาจมาจาก เมล็ดรัง น้ำ ลม หรือแมลง และอาจปนเปื้อนมาจากดอกเห็ดที่ใช้ทดลองทั้งสามชนิด ดังนั้นเมื่อนำดอกเห็ดมาทำหัวเชื้อสปอร์จึงทำให้สปอร์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่นปนเปื้อนมา จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ปนเปื้อนกล้าไม้ในเรือนเพาะชำส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Thelephoraceae สอดคล้องกับผลการวิจัยของ วรณิสร์ กลิ่นทอง (2553) ที่พบราเอคโตไมคอร์ไรซาสกุล *Tomentella* ปนเปื้อนรากของกล้าไม้ยางนาที่มีการใส่เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ *Astraeus* spp. เช่นกัน Sirikantaramas และคณะ (2003), Yuwa-Amornpitak และคณะ (2006) และ Yomyart (2008) ได้ศึกษาชุมชนราเอคโตไมคอร์ไรซาใต้ดินของป่าเต็งรังพบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาในวงศ์ Thelephoraceae เป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เด่นที่อาศัยอยู่กับรากไม้วงศ์ไม้ยาง ข้อมูลดังกล่าวนี้ไม่สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการสำรวจดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาบนดิน ซึ่งราเอคโตไมคอร์ไรซาในสกุลนี้มักจะไม่ค่อยพบดอกเห็ดบนดิน ในขณะที่ในการสำรวจดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาบนดินพบสกุล *Russula* พบเป็นสกุลเด่นแต่ใต้ดินพบรากเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดนี้น้อยมากหรืออาจพบมากในช่วงระยะเวลาสั้นโดยเฉพาะในช่วงที่มีการแตกแขนงของรากใหม่ในช่วงต้นฤดูฝน จากผลการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้รังที่มีการใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซาของเห็ดสกุล *Russula* ทั้งสามชนิดดีกว่ากล้าไม้รังที่ไม่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซาแม้ว่าจะไม่พบราก

เอคโตไมคอร์ไรซาทั้งสามชนิดอาจเป็นไปได้ว่าในช่วงการเติบโตของกล้าไม้ระหว่างอายุ 4-6 เดือน แรกหลังการใส่หัวเชื้อสปอร์ ราเอคโตไมคอร์ไรซา *Russula* ทั้งสามชนิดกับราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ปนเปื้อนมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้หลังจากนั้นราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ปนเปื้อนสามารถที่จะปรับตัวเข้าครอบครองรากของกล้าไม้รังได้ดีกว่าราเอคโตไมคอร์ไรซา *Russula* ทั้งสามชนิด จนกระทั่งเข้าแทนที่ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ทดสอบได้ทั้งหมด จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบรากเอคโตไมคอร์ไรซาของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ทดสอบ นอกจากนี้ Jakucs และ Eros-Honti (2008) พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาในวงศ์ Thelephoraceae มีความสามารถอยู่ร่วมกับกล้าไม้ในสกุล *Shorea* ได้เป็นอย่างดี

เมื่อทำการวิเคราะห์ธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ของกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก กับกล้าไม้รังที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกล้าไม้รังที่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด และกล้าไม้ที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา อาจเนื่องมาจากกล้าไม้ที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ร่วมด้วยจะสามารถดูดซึมธาตุอาหารได้มากและนำไปใช้ในการเติบโตได้ดีกว่ากล้าไม้ที่ไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ร่วมด้วย แต่ปริมาณธาตุอาหารที่มีสะสมอยู่ในลำต้นส่วนเหนือดินของกล้าไม้ที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโต-ไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกัน หรืออาจเนื่องมาจากปริมาณธาตุอาหารที่สะสมในพืชจะมีมีปริมาณแร่ธาตุอาหารที่สะสมต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดพืช อายุ และสภาวะแวดล้อม เป็นต้น โดยทั่วไปพืชจะมีปริมาณแร่ธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ที่สะสมอยู่ในพืชคิดเป็นร้อยละ 0.2-0.4 0.2-0.5 0.2-3.5 ตามลำดับ (*ศรีสม สุวรรณวงศ์*, 2544) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณธาตุอาหารทั้ง 3 ชนิดที่พบสะสมอยู่ภายในลำต้นส่วนเหนือดินของกล้าไม้รังที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 นอกจากนี้กล้าไม้รังที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาอาจได้รับปริมาณธาตุอาหารที่เพียงพอทำให้ราเอคโตไมคอร์ไรซาไม่จำเป็นต้องปลดปล่อยธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมให้แก่พืช แต่จะทำหน้าที่เก็บสะสมธาตุอาหารดังกล่าวไว้บริเวณแผ่นแมนเทิล และใยฮาร์ติก (Harley, 1978; Colpaert และคณะ, 1996) เช่นเดียวกับงานของ Turjaman และคณะ (2006) ที่ทำการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *P. arhizus* และ *S. columnare* ให้กับกล้าไม้ *Shorea seminis* เมื่อทำการวิเคราะห์ธาตุอาหารไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ของลำต้นส่วนเหนือดินของกล้าไม้ที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาดังกล่าว พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณธาตุอาหารระหว่างกล้าไม้ที่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาและกล้าไม้ที่ไม่ใส่หัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่อย่างใด และจากผลการทดลอง

ของ Lee และ Lim (1989) พบว่ากล้าไม้ในวงศ์ไม้ยางที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซาและปลูกในพื้นที่ที่มีธาตุฟอฟอรัสในดินต่ำ จะมีปริมาณฟอสฟอรัสที่สะสมอยู่ในใบสูงกว่ากล้าไม้ที่ไม่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซา

สำหรับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้รัง พบว่ากล้าไม้รังที่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซามีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกล้าไม้รังที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดงมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากพืชมากที่สุด รองลงมาคือเห็ดถ่านเล็กและเห็ดตะไคลเขียว ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากพืชที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่อัตราการเติบโตทางความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก และมวลชีวภาพของกล้าไม้รังที่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติ เป็นผลเนื่องมาจากราเอคโตไมคอร์ไรซามีความสามารถต่อพืชที่อาศัยอยู่ร่วมด้วยที่แตกต่างกันตามชนิดของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา (Garbaye และคณะ, 1988; Nylund และ Wallander, 1989; Thomson และคณะ, 1990; Rincon และคณะ, 1999) ตัวอย่างเช่นการศึกษาของ Chen และคณะ (2006) ที่ทำการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma* spp. ให้กับกล้าไม้ *Eucalyptus globulus* พบว่ากล้าไม้ *E. globulus* ที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *S. areolatum* มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากพืช 50-100 เปอร์เซ็นต์ *S. flavidum* มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากพืช 1-25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อัตราการเติบโตทางความสูง และมวลชีวภาพของกล้าไม้ที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *S. flavidum* สูงกว่ากล้าไม้ที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *S. areolatum* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองผลการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา *Russula* ทั้ง 3 ชนิดครั้งที่ 2 ประสบกับปัญหาน้ำท่วมทำให้ต้นกล้าไม้รังจมน้ำและไม่สามารถเก็บผลการเติบโตของกล้าไม้ได้แต่หลังจากน้ำลดเป็นเวลา 2 เดือน พบกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก มีอัตราการรอดตายมากกว่ากล้าไม้รังที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเป็นเพราะกล้าไม้ที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ร่วม จะมีรากที่มีขนาดใหญ่และแตกแขนงเป็นจำนวนมาก (Agerer, 1991) อีกทั้ง Dalong และคณะ (2011) พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถทำให้ระบบรากของกล้าไม้ดีขึ้นและยังสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ทำให้กล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก สามารถเจริญกลับมาเป็นต้นใหม่หลังน้ำลดได้ดีกว่ากล้าไม้รังที่ไม่มี

การใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sharma และคณะ (2008) ที่พบว่าพืชที่มีการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากจะมีรากที่ยาวกว่าพืชที่ไม่มีการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ราก อีกทั้งในสภาวะแห้งแล้งต้นกล้าไม้ที่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาจะมีการเติบโตทางด้านความสูง และเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับรายงานของ Rincon และคณะ (2007) ที่พบว่ากล้าไม้สนที่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซามีอัตราการรอดตายสูงกว่ากล้าไม้สนที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเมื่อย้ายลงปลูกบริเวณดินที่เป็นด่าง แห้งแล้ง และมีธาตุอาหารต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถเพิ่มอัตราการเติบโตของกล้าไม้รัง ลดอัตรากการตายของกล้าไม้รังในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ และเป็นแนวทางในการใช้ราเอคโตไมคอร์ไรซาในการกระตุ้นการเติบโตของกล้าไม้ในวงศ์ไม้ยางทำให้การปลูกป่าไม้วงศ์ไม้ยางประสบความสำเร็จในอนาคต

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจสอบการเกิดไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รังเบื้องต้น สามารถทำการจัดจำแนกชนิดของรากเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง โดยรากเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดงจะมีลักษณะรากสีครีม ผิวเรียบมัน และไม่มีการแตกกิ่ง เนื่องจากเมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP พบว่ารากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบในกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดงมีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหมือนกับเห็ดแดง

จากการทดสอบความอยู่รอดของสปอร์และความสามารถในการเกิดไมคอร์ไรซากับกล้าไม้รัง พบว่าสปอร์ของดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็กที่ทำการเก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ หลังแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไม่มีการงอกของสปอร์เกิดขึ้น และเมื่อนำสปอร์ที่ทำการเก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน และ 8 เดือน มาทดสอบกับกล้าไม้รังที่เพิ่งงอก พบว่ากล้าไม้รังที่รอดชีวิตทั้งหมดไม่มีการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ราก ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเติบโตของกล้าไม้รังและการงอกของสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด

จากการประเมินผลของหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด พบว่ากล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด มีการเติบโตทางด้านความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน-ใต้ดิน และมวลชีวภาพรวม อีกทั้งเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากสูงกว่ากล้าไม้รังชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมของกล้าไม้รังที่ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากนั้นทำการจัดจำแนกชนิดของรากเอคโตไมคอร์ไรซาตามลักษณะสัณฐานวิทยาสามารถจัดจำแนกได้ทั้งสิ้น 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน และเมื่อนำลำดับเบสของรากเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank สามารถทำการจัดจำแนกรากเอคโตไมคอร์ไรซาได้ทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ *Tomentella* sp.1 *Tomentella* sp.2 *Tomentella* sp.3 *Tomentella* sp.4 *Tomentella* sp.5 และ *Inocybe* sp.

หลังจากน้ำลดเป็นเวลา 2 เดือน พบกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากล้าไม้รังที่ไม่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดตะไคลเขียว

ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากสูงที่สุด รองลงมาคือกล้าไม้รังที่ใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดงความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการจัดจำแนกรากเอคโตไมคอร์ไรซาตามลักษณะสัณฐานวิทยาพบรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะรากสีดำ เส้นใยปกคลุมบริเวณผิวรากบางส่วน มีการแตกแขนงแบบ monopodial pinnate เพียงลักษณะสัณฐานวิทยาเดียว

ดังนั้นผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของกล้าไม้รังได้และลดอัตราการตายของกล้าไม้รังในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยครั้งนี้ประสบปัญหาการปนเปื้อนของราเอคโตไมคอร์ไรซาในธรรมชาติ ทำให้ไม่สามารถหาลักษณะของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่ต้องการได้ อีกทั้งไม่สามารถทำการประเมินผลของหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็กได้ ดังนั้นการทดลองครั้งต่อไปจะต้องทำการเก็บตัวอย่างกล้าไม้ทุกเดือน เพื่อทำการหาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่ต้องการและเพื่อเป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนของราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ตลอดจนต้องควบคุมบริเวณพื้นที่ทำการทดลองให้สะอาดและอยู่ในพื้นที่ปิด แต่ต้องมีอากาศถ่ายเทได้สะดวก

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมป่าไม้. 2542. ไม้ยางนาและไม้วงศ์ไม้ยาง เล่ม 3: นานาสาระเกี่ยวกับไม้ในวงศ์ยาง. กรุงเทพมหานคร: กรมป่าไม้

จิตรตรา กาญจนประยุธ. 2539. การปรับปรุงการเจริญของกล้าสน *Pinus kesiya* โดยใช้ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่แยกจากเห็ดเผาะ (*Astraeus hygrometricus*) และเห็ดตับเต่าดำ (*Boletus edulis*). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นิวัฒ เสนาะเมือง. 2553. เห็ดป่าเมืองไทย: ความหลากหลายและการใช้ประโยชน์. กรุงเทพมหานคร: ยูนิเวอร์แซล กราฟฟิค แอนด์ เทรดดิ้ง

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

ศรีสม สุวรรณวงศ์. 2544. การวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุนัดดา โยมญาติ. 2545. ผลของราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซาและราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. สายพันธุ์คัดต่อการกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้ยูคาลิปตัส *Eucalyptus camaldulensis*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมจิตร อยู่เป็นสุข. 2552. ราวิทยา. เชียงใหม่: พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์

อนงค์ จันทร์ศรีกุล, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์ และอุทัยวรรณ แสงวณิช. 2551. ความหลากหลายของเห็ดราขนาดใหญ่ของประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อนิวรรต เฉลิมพงษ์. 2542. เห็ดไทย. กรุงเทพมหานคร: สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย

ภาษาอังกฤษ

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

Alexander I., and Lee S. S. 2005. Mycorrhizas and ecosystems processes in tropical rain forest: implications for diversity. In: Burslem, M. A., Pinard, D. F. R. P., and Hartley, S. E., eds, Biotic interactions in the tropics: their role in the maintenance of species diversity. pp 165–203. New York: Cambridge University Press.

Amores, E. M., Valdes, M., and Quintos, M. 1991. Seeding growth and ectomycorrhizal colonization of *Pinus patula* and *P. radiate* inoculated with spores of *Helvella lacunose*, *Russula brevipes* or *Lycoperdon perlatum*. New Forests 4: 237-245.

Ashton, P. *Shorea siamensis*. [Online]. 1988. Avaiable from: http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/32307/0[2012, March7]

Becker, P. 1983. Mycorrhizas of *Shorea* (Dipterocarpaceae) seedlings in a lowland Malaysian rainforest. Malaysian Forester 46: 146-170.

Bellei, M. M., Garbaye, J., and Gil, M. 1992. Mycorrhizal succession in young *Eucalyptus viminalis* plantations in Santa Catarina (south Brazil). Forest Ecology and Management 54: 205–213.

Boxman, A. W., and Roelofs J. G. M. 1988. Some effects of nitrate versus ammonium nutrition on the fluxes of *Pinus sylvestris* seedlings. Effects of mycorrhizal infection. Canadian Journal of Botany 66: 1091–1097.

Buschena, C. A., Doudrick, R. L., and Anderson, N. A. 1992. Persistence of *Laccaria* spp. A ectomycorrhizal symbiots of container-grown black spruce. Canadian Journal of Forest Research 22: 1883-1887.

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

Brundrett, M., Malajczuk, N., Mingqin, G., Daping, X., Snelling, S., and Dell, B. 2005. Nursery inoculation of Eucalyptus seeding in Western Australia and Southern China using spore and mycelial inoculum of diverse ectomycorrhizal fungi from different climatic regions. Forest Ecology and Management 209: 193-205.

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

Chen, Y. L., Kang, L. H., Malajczuk, N., and Dell, B. 2006. Selecting ectomycorrhizal fungi for inoculating plantations in South China: effect of *Scleroderma* on colonization and growth of exotic *Eucalyptus globulus*, *E. urophylla, Pinus elliottii,* and *P. radiata*. Mycorrhiza 16: 251–259.

Chen, Y. L., Kang, L. H., and Dell, B. 2006. Inoculation of *Eucalyptus urophylla* with spores of Scleroderma in a nursery in south China: Comparison of field soil and potting mix. Forest Ecology and Management 222: 439–449.

Chen, Y. L., Liu, S., and Dell, B. 2007. Mycorrhizal status of Eucalyptus plantations in south China and implications for management. Mycorrhiza 17: 527–535.

Chu-Chou, M., and Grace, L. J. 1982. Mycorrhizal fungi of Eucalyptus in the north island of New Zealand. Soil Biology and Biochemistry 14: 133–137.

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

Colpaert, J. V., Van, L. A., and Van. A. J. A. 1996. Carbon and nitrogen allocation in ectomycorrhizal and non mycorrhizal *Pinus sylvestris* L. seedlings, Tree Physiology 16: 787–793.

Cuvelier, J. J. 1991. Characterization of birch ectomycorrhizae (II): *Laccaria amethystea* and *Russula ochroleuca*. Journal of Botany 124: 195-203.

Dalong, M., Luhe, W., Guoting, Y., Liqiang, M., and Chun, L. 2011. Growth response of *Pinus densiflora* seedlings inoculated with three indigenous ectomycorrhizal fungi in combination. Brazilian Journal of Microbiology 42: 1197-1203.

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

Duñabeitia, M. K., Hormilla, S., Salcedo, I., and Peña, J. I. 1996. Ectomycorrhizae synthesized between *Pinus radiata* and eight fungi associated with *Pinus* spp. Mycologi 88: 897-908.

Duponnois, R., Founoune, H., Masse, D., and Pontanier, R. 2005. Inoculation of *Acacia holosericea* with ectomycorrhizal fungi in a semiarid site in Senegal: growth response and influences on the mycorrhizal soil infectivity after 2 years plantation. Forest Ecology and Management 207: 351–362.

Frank, A. B., 1885. Uber die auf Wurzelymbiose beruhende Ernahrung Gewisser Baume durch unterirdische Pilze. Berichte der Deutschen Botanischen Gessellschaft 3: 128-145.

Fries, N. 1989. The influence of tree roots on spore germination of ectomycorrhizal fungi. Agriculture, Ecosystems and Environment 28: 139-144.

Garbaye, J., Delwaulle, J. C., and Diangana, D. 1988. Growth response of eucalypts in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. Forest Ecology and Management 24: 15 1-157.

Gardes, M., and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes. Application to the identification of mycorrhizae and rust. Molecular Ecology 2:113-118.

Harley, J. L. 1978. Nutrient absorption by ectomycorrhizae. Physiologie Vegetale 16: 533-545.

Harley, J. L., and Smith, S. E. 1983. Mycorrhizal Symbiosis New York: Academis Press.

Heinemann, P., and Gaie, W. 1979. Germination of *Russula* spores. Transactions of the British Mycological Society 72: 506-507.

Ishida, T. A., Nara, K., Tanaka, M., Kinoshita, A., and Hogetsu, T. 2008. Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. New Phytologist 180: 491–500.

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

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

Kjøller, R. 2006. Disproportionate abundance between ectomycorrhizal root tips and their associated mycelia. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology 58:214–224.

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

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

Landeweert, R., Leeflang, P., Smit, E., and Kuyper, T. 2005. Diversity of an ectomycorrhizal fungal community studied by a root tip and total soil DNA approach. Mycorrhiza 15: 1–6.

Largent, D. L., and Thiers, H. D. 1977. How to identify mushrooms to genus II: Field Identification of genera. California. Mod River Press, Inc.

Lee, S. S., and Lim, K. L. 1989. Mycorrhizal infection and foliar phorphorus content of seedlings of tree Dipterocarps species growing in a selectively logged forest and forest plantation. Plant and Soil 117: 237-241.

Lee, S. S., and Alexander, I. J. 1994. The response of two dipterocarp species to nutrient additions and ectomycorrhizal infection. Plant and Soil 163: 299-306.

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

Lu, X. Malajczuk, N., and Dell, B. 1998. Mycorrhiza formation and growth of *Eucalyptus globulus* seedlings inocululated with spores of various ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza. 8: 81-86.

Maghembe, J. A., and Redhead, J. F. 1984. Growth and ectomycorrhizal development of *Pinus Caribaea* seeding inoculated with basidiospores of *Scleroderma Dictyosporum* in fertilized nursery soil in Tanzania. Forest Ecology and Management 8: 221-228.

Marx, D. H. 1969. The influence of ectotropic mycorrhiza fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59: 153-163.

Marx, D. H. 1980. Ectomycorrhizal fungi inoculation: a tool for improving forestation practices. In P. Mikola, eds, Tropical Mycorrhizal Research. Oxford: Oxford Press.

Marx, D. H., Cordell, C. E., Maul, S. B., and Ruehle, J. L. 1989. Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorius* in bare-root and container seedling nurseries. I. Efficacy of various vegetative inoculation formulations. New Forests 3: 45-56.

Martin, T. P., Harris, J. R., Eaton, G. K., and Miller, O. K. 2003. The efficacy of ectomycorrhizal colonization of pin and scarlet oak in nursery production. Journal of Environmental Horticulture 21: 45–50.

Melin, E., and Das, V .S R. 1985. Influence of root-metabolites on the growth of tree mycorrhizal fungi. Physiologia Plantarum 7: 851-858.

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

Mukerji, K. G., Chamola, B. P., and Singh, J. 2000. Mycorrhizal Biology. New York: Kluwer Academic.

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

Nara, K. 2009. Spores of ectomycorrhizal fungi: ecological strategies for germination and dormancy. New Phytologist 181: 245-248.

Nylund, J. E., and Wallander, H. 1989. Effects of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semi-hydroponic cultivation system. New Phytologist 112: 389-398.

Palacio, S., Escudero, A., Montserrat-Martí, G., Maestro, M., Milla, R., and Albert, M. J. 2007. Plants living on gypsum: beyond the specialist model. Annali di Botanica 99: 333-343.

Parladé, J., Pera, J., and Alvarez, I. F. 1996. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 6 :237–245

Pera, J., Alvarez, I. F., Rincon, A., and Parlade, J. 1999. Field performance in northern Spain of Douglas-fir seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 9: 77-84.

Phillips, R. 2006. Mushroom. London: Pan Macmillan.

Rincon, A., Alvarez, I. F., and Pera, J. 1999. Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinea* in northeastern Spain. Mycorrhiza 8: 271–276.

Rincon, A., Felipe, M. R. D., and Fernandez-Pascual, M. 2007. Inoculation of *Pinus halepensis* Mill. With selected ectomycorrhizal fungi improves seedling establishment 2 years after planting in a degraded gypsum soil. Mycorrhiza 18: 23-32.

Rousseau, J. V. D., Sylvia, D. M., and Fox, A. J. 1994. Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. New Phytologist 128: 639–644.

Sharma, R., Rajak, R. C., and Pandey, A. K. 2008. Growth response of Dendrocalamus seedlings by inoculation with ectomycorrhizal fungi. Middle-East Journal of Scientific Research 3: 200-206.

Simard, S. W., Jones, M. D., and Durral, D. M. 2002. Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. Mycorrhizal ecology 157: 33-74.

Sims, K. P., Watling, R., de la Cruz, R., and Jeffries, P. 1997. Ectomycorrhizal fungi of the Philippine: a preliminary survey and notes on the geographic biodiversity of the Sclerodermatales. Biodiversity Conservation 6: 45-48.

Sirikantaramas, S., *et al*. 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal fungi associated with Dipterocarpaceae. Tropics 13: 69—77.

Smith, S. E., and Read, D. J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. San Diego: Academic Press.

Sousa, N. R., Franco, A. R., Ramos M. A., Oliveira, R. S., and Castro, P. M. L. 2011. Reforestation of burned stands: The effect of ectomycorrhizal fungi on *Pinus pinaster* establishment. Soil Biology and Biochemistry 43: 2115-2120.

Taylor, A. F. S., and Alexander, I. J. 1989. Ectomycorrhizal synthesis with an isolate of *Russula aeruginea*. Mycological Research 92: 103-107.

Tata, H., Noordwijk, M. V., Summerbell, R., and Werger, M. J. A. 2010. Limited response to nursery-stage mycorrhiza inoculation of *Shorea* seedlings planted in rubber agroforest in Jambi, Indonesia. New Forests 39: 51–74.

Thomson, J., Matthes-Sears, U., and Peterson, R. L. 1990. Effects of seed provenance and mycorrhizal fungi on early seedling growth in *Picea mariana*. Canadian Journal of Forest Research 20: 1739-1745.

Trappe, J. M. 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. Botanical Review 28: 538-606.

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

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

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

Turjaman, M., Tamai, Y., Segah, H., Limin, S. H., Osaki, M., and Tawaraya, K. 2006. Increase in early growth and nutrient uptake of *Shorea seminsi* seedlings

inoculated with two ectomycorrhizal fungi. Journal of Tropical Forest Science 18: 243-249.

Turjaman, M., *et al*. 2011. Ectomycorrhizal fungi promote growth of *Shorea balangeran* in degraded peat swamp forests. Wetlands Ecol Manage 19: 331–339.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelf, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J., eds, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego: California.

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

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

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

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

สูตรปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในระดับปานกลาง

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 กรัม/ น้ำ 100 มิลลิลิตร ทำ dilution 10^{-2} ใช้ 1 มิลลิลิตร/ น้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Mo 0.001 ppm
H_3BO_3	15 กรัม/ น้ำ 100 มิลลิลิตร ทำ dilution 10^{-1} ใช้ 1 มิลลิลิตร/ น้ำ 1 ลิตร ได้ธาตุ Cu 0.006 ppm
$ZnSO_4.7H_2O$	44 กรัม/ 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

1. สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ

1.1 Tris-Cl pH 8

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย**	
Tris base	121	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย Tris base ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้น (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 0.5 M EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย**	
EDTA	186.10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย EDTA ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย NaOH ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้น ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.3 Washing buffer

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย 200 มิลลิลิตร**	
PVP (Polyvinylpyrrolidone)	2	กรัม
Ascorbic acid	1.76	กรัม
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	4	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Autoclaved water) จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4 2X CTAB lysis buffer

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย 200 มิลลิลิตร**	
CTAB	4	กรัม
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	8	มิลลิลิตร
NaCl	16.36	กรัม
2-mercaptoethanol	1	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.5 Choloroform/isoamyl alcohol (24:1 V/v)

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย 200 มิลลิลิตร**	
Choloroform	192	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร

1.6 Tris-EDTA buffer (TE buffer)

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย**	
1 M Tris-Cl; pH 7.4, 7.5 หรือ 8	10	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA; pH 8.0	2	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากันนำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้น ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. สารเคมีในการทำพีซีอาร์และอิเล็คโตรโฟรีซิส

2.1 10X Tris-boric acid EDTA (10X TBE)

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย 500 มิลลิลิตร**	
Tris (hydroxymethyl) amino methane	54	กรัม
EDTA	4.65	กรัม
Boric acid	27.50	กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Autoclaved water) จนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.2 1.5% Agarose gel (w/w)

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย**	
Agarose	1.5	กรัม
1X TBE	100	มิลลิลิตร
Gel star	1	ไมโครลิตร

2.3 3% Agarose gel (w/w)

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย**	
Agarose	3.6	กรัม
1X TBE	120	มิลลิลิตร
Gel star	1.2	ไมโครลิตร

ภาคผนวก ค

1. อาหารเลี้ยงเชื้อในการโคลน

1.1 LB agar

สารเคมี	ปริมาตรสารละลาย	
NaCl	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
Agarose	20	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย 5 N NaOH ให้เท่ากับ 7 นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้น ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรอง ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

1.2 LB broth

สารเคมี	ปริมาตรสารละลาย	
NaCl	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย 5 N NaOH ให้เท่ากับ 7 นำไปฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้น ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารเคมีในการโคลน

2.1 X-gal

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย**	
X-gal	100	มิลลิกรัม
N,N Dimethyl formamide	5	มิลลิลิตร

2.2 IPTG (Iso-propylthio-β-galactoside)

สารเคมี	**ปริมาตรสารละลาย**	
IPTG	2	มิลลิกรัม
น้ำกลั้น	8	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

1. QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)

เติมสารละลายบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 5 ไมโคลิตรต่อ 1 ไมโคลิตร ของผลิตผลพีซีอาร์ลงในหลอดไมโครเซนติ-ฟิวส์ที่บรรจุผลิตผลพีซีอาร์แล้วผสมให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายบัฟเฟอร์ PB และผลิตผลพีซีอาร์ลงใน spin colum ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำ spin colum ออกจากหลอดรองรับ เทของเหลวในหลอดรองรับทิ้ง ใส่ spin colum ลงในหลอดรองรับ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโคลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำ spin colum ออกจากหลอดรองรับ เทของเหลวในหลอดรองรับทิ้ง ใส่ spin colum ลงในหลอดรองรับ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำ spin colum ออกจากหลอดรองรับ ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโคลิตร ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้ผลิตผลพีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ตกลงไปอยู่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำ spin colum ออกจากหลอดไมโครเซน-ติฟิวส์ ปิดฝาหลอดไมโครเซนติฟิวส์

2. StrataClone PCR Cloning Kit (Stratagene)

เตรียมส่วนประกอบในปฏิกิริยา Ligation ซึ่งประกอบด้วย Strata Cloning Buffer 1.5 ไมโคลิตร ผลิตผล พีซีอาร์ 1 ไมโคลิตร และ Strata Vector Mix amp/kan 0.5 ไมโคลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติมผลิตผลพีซีอาร์ 2 ไมโคลิตร ลงในหลอดที่บรรจุ Strata Clone Solo Pack competent cell ที่ละลายแล้วปริมาตร 25 ไมโคลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ บ่มทิ้งไว้บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติม LB broth 125 ไมโคลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปเขย่า 225-250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ถ่าย พลาสมิดเข้าไปแล้วปริมาตร 120 ไมโคลิตร มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีมาเพิ่มจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง ทำการแตะโคโลนีที่ทำการเพิ่มจำนวนแล้วมาละลายในน้ำกลั่นที่ผ่าน

การฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 ไมโคลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วนำมาวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ดูดเอาส่วนใสข้างบนปริมาตร 30 ไมโคลิตร ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ ตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรส

ภาคผนวก จ

ภาคผนวก จ ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Oneway-ANOVA ของความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน มวลชีวภาพรวมและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้รังอายุ 12 เดือน หลังใส่หัวเชื้อสปอร์

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความสูง	Between Groups	117.852	3	39.284	10.789	.003
	Within Groups	29.129	8	3.641		
	Total	146.981	11			
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก	Between Groups	.045	3	.015	8.549	.007
	Within Groups	.014	8	.002		
	Total	.058	11			
มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน	Between Groups	205.623	3	68.541	16.262	.001
	Within Groups	33.718	8	4.215		
	Total	239.341	11			
มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน	Between Groups	1564.311	3	521.437	8.508	.007
	Within Groups	490.288	8	61.286		
	Total	2054.599	11			
มวลชีวภาพรวม	Between Groups	2819.166	3	939.722	11.543	.003
	Within Groups	651.289	8	81.411		
	Total	3470.456	11			
เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา	Between Groups	5597.917	3	1865.972	29.772	.000
	Within Groups	501.405	8	62.676		
	Total	6099.322	11			

ภาคผนวก จ ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของความสูงกล้าไม้รังเมื่ออายุ 12 เดือน ที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

ความสูง

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1.00	3	19.7800		
4.00	3		23.7400	
3.00	3		24.8900	
2.00	3			28.5667
Sig.		1.000	.482	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ภาคผนวก จ ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากของกล้าไม้รังเมื่ออายุ 12 เดือน ที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1.00	3	.41067		
4.00	3	.48833	.48833	
3.00	3		.50900	.50900
2.00	3			.58167
Sig.		.052	.560	.065

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ภาคผนวก จ ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของมวลชีวภาพส่วนเหนือดินของกล้าไม้รังเมื่ออายุ 12 เดือน ที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาและชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1.00	3	12.8367		
4.00	3		19.6100	
3.00	3		21.8200	21.8200
2.00	3			23.8300
Sig.		1.000	.224	.265

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ภาคผนวก จ ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของมวลชีวภาพส่วนใต้ดินของกล้าไม้รังเมื่ออายุ 12 เดือน ที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1.00	3	42.8267	
4.00	3	53.3933	
2.00	3		68.1800
3.00	3		71.0100
Sig.		.137	.670

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ภาคผนวก จ ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของมวลชีวภาพรวมของกล้าไม้รังเมื่ออายุ 12 เดือน ที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

มวลชีวภาพรวม

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1. 00	3	55.6600		
4.00	3		73.0000	
2.00	3			92.0100
3.00	3			92.8300
Sig.		1.000	1.000	.914

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ภาคผนวก จ ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าไม้รังเมื่ออายุ 12 เดือน ที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1.00	3	29.1600	
3.00	3		77.5300
2. 00	3		79.5500
4.00	3		79.9067
Sig.		1.000	.733

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ภาคผนวก จ ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติ โดยวิธี Oneway-ANOVA ของปริมาณธาตุอาหาร ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียส ของกล้าไม้รังเมื่ออายุ 12 เดือน ที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ไนโตรเจน	Between Groups	.048	3	.016	.719	.568
	Within Groups	.179	8	.022		
	Total	.227	11			
ฟอสฟอรัส	Between Groups	.000	3	.000	1.296	.341
	Within Groups	.001	8	.000		
	Total	.001	11			
โพแทสเซียม	Between Groups	.003	3	.001	.478	.707
	Within Groups	.016	8	.002		
	Total	.019	11			

ภาคผนวก จ ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติ โดยวิธี Oneway-ANOVA ของความสูง และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอรากของกล้าไม้รังเมื่ออายุ 3 เดือนที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ที่ความเข้มข้น 10^7 และ 10^5 และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความสูง	Between Groups	9.258	6	1.543	1.236	.346
	Within Groups	17.473	14	1.248		
	Total	26.732	20			
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง	Between Groups	.001	6	.000	.489	.806
ระดับคอราก	Within Groups	.007	14	.001		
	Total	.009	20			

ภาคผนวก จ ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติ โดยวิธี Oneway-ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การแตกต้นอ่อนขึ้นใหม่ ระยะพักตัว อัตราการรอดตาย (รวม) และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโต-ไมคอร์ไรซาที่รากของกล้าไม้รังที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ที่ความเข้มข้น 10^7 และ 10^5 และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซาหลังน้ำลดเป็นเวลา 2 เดือน

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนขึ้นใหม่	Between Groups	1108.865	6	184.811	8.302	.001
	Within Groups	311.651	14	22.261		
	Total	1420.516	20			
เปอร์เซ็นต์การพักตัว	Between Groups	1614.187	6	269.031	7.198	.001
	Within Groups	523.260	14	37.376		
	Total	2137.448	20			
อัตราการรอดตาย (รวม)	Between Groups	493.503	6	82.250	16.208	.000
	Within Groups	71.047	14	5.075		
	Total	564.550	20			
เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ราก	Between Groups	2870.397	6	478.399	4.006	.015
	Within Groups	1671.888	14	119.421		
	Total	4542.284	20			

ภาคผนวก จ ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของเปอร์เซ็นต์การแตกต้นอ่อนขึ้นใหม่ของกล้าไม้รังที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ที่ความเข้มข้น 10^{7} และ 10^{5} และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

เปอร์เซ็นต์การแตกต้นอ่อนขึ้นใหม่

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
5.00	3	5.0000			
7.00	3	6.3900	6.3900		
1.00	3		14.1533	14.1533	
2.00	3			15.3500	
6.00	3			19.2967	19.2967
3.00	3			21.6667	21.6667
4.00	3				26.5500
Sig.		.724	.063	.092	.095

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ภาคผนวก จ ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของเปอร์เซ็นต์การพักตัวของกล้าไม้รังที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็ก ที่ความเข้มข้น 10^7 และ 10^5 และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

เปอร์เซ็นต์การพักตัว

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
4.00	3	55.77667			
3.00	3	60.00000	60.00000		
1.00	3		68.36333	68.36333	
7.00	3			74.44333	74.44333
2.00	3			74.47333	74.47333
6.00	3			75.43667	75.43667
5.00	3				82.80667
Sig.		.412	.116	.212	.144

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ภาคผนวก จ ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของอัตราการรอดตาย (รวม) ของกล้าไม้รังที่ได้รับหัวเชื้อสปอร์เห็ดแดง เห็ดตะไคลเขียว และเห็ดถ่านเล็กที่ความเข้มข้น 10^7 และ 10^5 และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อสปอร์ราเอคโตไมคอร์ไรซา

อัตราการรอดตาย (รวม)

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1	3	80.8333		
4	3	81.6667		
5	3	82.3267		
2	3	82.5167		
6	3		87.8067	
3	3		89.8233	
7	3			94.7333
Sig.		.413	.291	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ภาคผนวก จ ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้รังหลังน้ำลดเป็นเวลา 2 เดือน

เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1	3	35.0000		
7	3	36.4300		
4	3	42.1267	42.1267	
3	3	47.3800	47.3800	47.3800
2	3		60.0000	60.0000
5	3		60.0833	60.0833
6	3			66.6700
Sig.		.221	.083	.065

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ภาคผนวก ฉ

Tomentella sp.1

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTGTCAACATGAGCTGTTGCTGGTC
CCTCCAAGTGGGGGGGCATGTGCACGCTCTGTTTACATATCCATTAACACCTGTGCACC
CTTGGTGGTTCTGCAGTAAAGGGGGGGGGCCTGTGTCTCCCCTCTGTGGTTCCACATCA
TTACACACACTCTGTAACAAAGTTTTGTTGAATGCCCTTTGCGTTTAACGCAATACAGTAC
AACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCC
TTGGCTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAATACCTCAACTCTCATGCTTTG
CCATGATGAGCTTGGAATTTTGGGGGTTTTGCTGGCCTGTGGTCAGCTCCTCTCAAATGA
ATCAGCTTGCCAGTGTTTGGTGACATCATGGGTGTGATAAATATCTACATCTGTGGTTGCC
TGCCAGATGACATCCAGCAATGGAGGTTCACTGGGGCTTATAAGTGTCTCTCCTCAGCG
AGGACAGCATTTTGAAGTTTGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGA

Tomentella sp.2

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAATTGTCAAACCTGGGTTGTTGCTGGT
CCTCAAATGGGGTCATGTGCACGCTCTGTTTACACATCCACTCACACCTGTGCACCCTCT
GTAGTTCTACGGTCTGGGGGACACCGTCTTCCTTCTGTAGCGCTGCGCCCTTACACATA
CGCTGTAACAAAGTCTTGTGGAATGTGTGCCGCGTTTAACGCAATACAATACAACTTTCA
GCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGCTATT
CCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAACACCTCAACTCTCATGGTTCGCCGTGAT
GAGCTTGGACTCTGGAGGTTTTGCTGGTCTCTGGTCAGCTCCTCTCAAATAAATCAGCTC
GCCAGTATCGGGTGGCGTCGTGGGTGTGATAACTATTTACGCTCAGAGCCGTCCACCAG
GTAACCTCCAGCGATGGAGGTTTGCTGGGGCTCACAAACGTCTCTCTTCAGCAGGGACA
GCTTTTTGAACGTTCGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA

Tomentella sp.3

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAACCGTCAACACGAGTTGTTGCTGGT
CCTCATATGGGGGCATGTGCACGCTCTGTTCACATATCCACTCACACCTGTGCACCCTCT
GTAGTTCTGTGGTCTGGGGGGCATTGCCTTCCTGCCGTAGTTCTATGTCTTACACACACA
CACACCGTGATAGAGTCTTATTGGATGTATGCCGCGTGTAACGCTATATAATACAACTTTC
AGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTCTGGCTA
TTCCGGAGGGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAACACCTCAACTCCTCATGGTTTTGCCAT
GGTGAGCTTGGACTTTGGGGGTTTTGCTGGCCTATGGTCGGCTCCTCTGAAATGGATTG
GCTCACCAGCGTCTGGTGGCTCATGGGTGTGATAACTATCTACGTCCATGGCTTTCCAC
CAGGTAACCCTCACCAACAGGGGTTCGCTGGAGCTTATAGACGTCCCCCTCCGTGAGG
ACAGCTCTTTGAATGTTTGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC
AATAAGCGGA

Tomentella sp.4

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTGTTAACACGAGCTGTTGCTGGTC
CCCAATCAGGGGCATGTGCACGCTCTGTTTACACATCCACTTACACCTGTGCACCCTTG
GTAGCTCCATGGTAAAGGGGGGGGGACTCTGTCCCTCTCCCCACTGTGGTTCTACATTA
CTACACACACTCTGTAATAAAGTTTCATGGAATGCACTTCGCGTTTAACGCAATACAATAC
AACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCC
TTGGCTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAACACCTCAACTCTCATGCTTT
GTCATGACGAGCTTGGACTTTTGGGGGTTTTGCTGGCCCTGTGGTCAGCTCCTCTCAAAT
GAATCAGCTTGCCAGTGTTCGGTGGCATTGTGGGTGTGATAAGTATCTACATCTGCAGTG
GTCGCCGGGTAACGTCCAGCAATGGAGGTTCGCTGGGGCTTACAGACGTCCCCCCTCA
GTGAGGACAGCATTTTGAAGTTCGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAG
CATATCAATAAGTTAATGA

Tomentella sp.5

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAACCGTCAAACGTGGGTTGTTGCTGG
CCCTCGAATGGGGGCATGTGCACGCTCTGTTTACACATCCACTTCACACCTGTGCACCC
TCTGTAGTTCTATGGTCCGGGGGGTCCCACCCTCCTCCCGTAGCTCTACTTTTTTACATAC
GCTCTGTAACGATGTCTTGTGGAATGCTTTATGCGTTTAACGCGATACAATACAACTTTCA
GCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTCGGCTAT
TCCTTGGGGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAACACCTCAACTCTCATGGCTTGCCGTGAA
GAGCTTGGACTCTGGGGGTCTGCTGGCTGTTTGGTCAGCTCCCCTCAAATGAATCAGCT
TTCCAGTGTTTGGTGGCATCACGGGTGTGATAACTATCTACGCTTGTGGTGGTCTGCCAG
GTAACCTTCATCGCTGGGGGTTCGCTGGAGCTTACAAATGTCTCTCCTCGGCGGAGACA
GCTTTTGAACGTTCGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT
AAGTTGA

Incocybe sp.

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATAAACTTGAACAGGCTGTTTGCTGG
CTCATTAAGAAGAGCATGTGCACGCTTGTCATCTTTATTTGTCCACTGTGCACAACTTGTA
GATCTGGAACGGTTTCTGAAATTTTCTTTTCGATTGAGGACTGCTGTGGCTTTAGCAAAAG
GTCCAGCTTTGTTGCCTTGCATCTTTCAGATCTATGTTTTCACAATCTCTGAATGTGATTTA
GAATGGTTAAAGCAAATAATAATAATAATAATATTATAACAACTTTCAGCAACGGATCTCTT
GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATTTTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTATTCTGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTATCATAAAAGTTCTCAACCACATTGATTTTAATGTGGATTGGATGTGGGGGT
ATTTGTTTGCAGGCTTTCTTTTTTTTTAAGTCCAGCTCCCCTAAATATATAGTAGTGTCTGAA
GCAGACCCACTACAGATGTGATAACTATCTACATCATAGTAGTATACACTGCACGATATT
GCTTCAAATCATTTTTTATCATTTTGACCAATTTGATCTCAAATCAGGTAGGGACTACCCGC
TGACTTTAAGCATATCATAACGGGGGGGA

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเชาวณี อ้นลำพูน เกิดเมื่อวันที่ 23 พฤศจิกายน 2529 ที่จังหวัดขอนแก่น สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ สาขา พันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2551

การเสนอผลงาน

Aunlumpoon, A., and Piapukiew, J. 2011. Effects of spore inocula of ectomycorrhizal fungi *Russula* spp. on growth stimulation of *Shorea siamensis* Miq. In Proceeding of The 23rd Annual Meeting of the Thai Society of biotechnology.