# รายงานการวิจัย

## การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้วงศ์ยางบางชนิดที่มีเห็ดเผาะหนังสัมพันธ์อยู่กับรากแบบเอคโตไมคอร์ไรซา

## Growth Responses of Some Dipterocarpaceae Seedlings Having *Astraeus odoratus* Associated with Roots as Ectomycorrhiza


**คณะผู้วิจัย**

**ผศ.ดร. อุทัยวรรณ แสงวณิช[1], รศ.ดร. มณฑล จำเริญพฤกษ์[2], นายเจษฎา วงค์พรหม[3], อ.ดร. เยาวภา อร่ามศิริรุจิเวทย์[4], นายบารมี สกลรักษ์[1] และ อ.ดร. ธารรัตน์ แก้วกระจ่าง[1]**

[1] ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[2] ภาควิชาวนวัฒนวิทยา คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[3] สถานีวิจัยวนศาสตร์พังงา คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[4] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



**ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประเภทโครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-ญี่ปุ่น)**

**พ.ศ. 2559**

# กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้วงศ์ยางบางชนิดที่มีเห็ดเผาะหนังสัมพันธ์อยู่กับรากแบบเอคโตไมคอร์ไรซา" ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประเภทโครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-ญี่ปุ่น) ประจำปีงบประมาณ 2555-2556 (2 ปี) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ ตลอดระยะเวลาของการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่อนุญาตและอำนวยความสะดวกในการให้ใช้เรือนเพาะชำกล้าไม้ที่ผนังประกอบด้วยตาข่ายละเอียดป้องกันแมลง ซึ่งก่อให้เกิดผลดียิ่งต่อการทดลอง

คณะผู้วิจัย

**การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้วงศ์ยางบางชนิดที่มีเห็ดเผาะหนังสัมพันธ์อยู่กับรากแบบเอคโตไมคอร์ไรซา**

**Growth Responses of Some Dipterocarpaceae Seedlings Having *Astraeus odoratus* Associated with Roots as Ectomycorrhiza**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2555-2556 จำนวนเงิน 1,000,000 บาท
ระยะเวลาทำวิจัย 2 ปี

ผศ.ดร. อุทัยวรรณ แสงวณิช[1], รศ.ดร. มณฑล จำเริญพฤกษ์[2], นายเจษฎา วงค์พรหม[3],
อ.ดร. เยาวภา อร่ามศิริรุจิเวทย์[4], นายบารมี สกลรักษ์[1] และ อ.ดร. ธารรัตน์ แก้วกระจ่าง[1]
Asst. Prof. Uthaiwan Sangwanit[1], Assoc. Prof. Monton Jamroenprucksa[2],
Mr. Jetsada Wongprom[3], Dr. Yaovapa Aramsirirujiwet[4], Mr. Baramee Sakolrak[1], and
Dr. Tharnrat Kaewgrajang[1]

## บทคัดย่อ

การวิจัยเรื่องนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้พลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.) และกล้าไม้พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) ต่อการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง โดยได้ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังให้แก่กล้าไม้พลวงและพะยอมที่ขึ้นอยู่ในดินที่รมควันฆ่าเชื้อแล้ว และวางอยู่ในเรือนเพาะชำกล้าไม้ที่ผนังประกอบด้วยตาข่ายละเอียดป้องกันแมลง ด้วยวิธีการ 3 วิธี คือ ปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยสปอร์ 25 มล./ต้น ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยบริสุทธิ์ 25 มล./ต้น และไม่ปลูกเชื้อ มีการวางแผนการทดลองแบบ 3x2 Split Plot in Completely Randomized Design โดยมีวิธีการปลูกเชื้อเป็น main plot และกล้าไม้ 2 ชนิด เป็น sub plot แต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ และแต่ละซ้ำมีกล้าไม้ 4 ต้น

เมื่อกล้าไม้มีอายุครบ 8 เดือน กล้าไม้ที่ปลูกเชื้อมีรากเอคโตไมคอร์ไรซาเกิดขึ้นในปริมาณร้อยละ 30-60 ของรากทั้งหมด แต่กล้าไม้ที่ไม่ได้ปลูกเชื้อไม่พบเลย โดยรูปร่างของรากเอคโตไมคอร์ไรซามี 2 แบบ พบ rhizomorph และ sclerotium เกิดขึ้นเล็กน้อย เมื่อตรวจชนิดราที่อยู่ร่วมกับรากด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1F และ ITS4 พบว่าเป็นเห็ดเผาะหนังที่ใช้ในการปลูกเชื้อ จากการวิเคราะห์ข้อมูลการเติบโตทางสถิติ พบว่าวิธีการปลูกเชื้อและชนิดของกล้าไม้ ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก ความสูง น้ำหนักแห้งส่วนยอด ส่วนราก และน้ำหนักแห้งรวมของกล้าไม้ แต่มีปฏิสัมพันธ์เกิดขึ้นระหว่างวิธีการปลูกเชื้อและชนิดของกล้าไม้ ซึ่งส่งผลให้เส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก และความสูง น้ำหนักแห้งส่วนราก และน้ำหนักแห้งรวมของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อดีกว่ากล้าไม้พลวงที่ปลูกเชื้อ ส่วนปริมาณธาตุอาหารในกล้าไม้นั้น พบว่าวิธีการปลูกเชื้อทำให้ธาตุ N ในกล้าไม้ที่ปลูกเชื้อสูงกว่ากล้าไม้ที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ส่วนธาตุ C, P, K มีปริมาณเท่ากัน และชนิดของกล้าไม้มีผลต่อปริมาณธาตุอาหารในต้น โดยกล้าไม้พะยอมมีธาตุ C, N และ P สูงกว่ากล้าไม้พลวง แต่มีธาตุ K น้อยกว่า

การทดลองที่ 2 การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกในวัสดุปลูก 2 สูตรต่อการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง โดยได้ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังให้แก่กล้าไม้ที่วางอยู่ในเรือนเพาะชำกล้าไม้ที่ผนังประกอบด้วยตาข่ายละเอียดป้องกันแมลง ด้วยวิธีการปลูกเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และใช้วัสดุปลูกที่ไม่รมควัน

ฆ่าเชื้อ 2 สูตร คือ สูตร 1 Peat:Vermiculite:Sand = 1:9:0 และสูตร 2 Peat:Vermiculite:Sand = 2:7:1 (โดยปริมาตร) มีการวางแผนการทดลองแบบ 3x2 Split Plot in Completely Randomized Design โดยมีวิธีการปลูกเชื้อเป็น main plot และวัสดุปลูกเป็น sub plot แต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ และแต่ละซ้ำมีกล้าไม้ 4 ต้น

เมื่อกล้าไม้พะยอมมีอายุครบ 8 เดือน พบรากเอคโตไมคอร์ไรซาเกิดขึ้นในกล้าไม้พะยอมทั้งที่ปลูกเชื้อและไม่ปลูกเชื้อ โดยมีรูปร่างของรากทั้งหมด 3 แบบ แต่พวกที่ปลูกเชื้อพบปริมาณรากเอคโตไมคอร์ไรซาในอัตราร้อยละที่มากกว่าพวกที่ไม่ปลูกเชื้อ พบ rhizomorph และ sclerotium เป็นจำนวนมาก โดยวัสดุปลูกที่ต่างกันไม่มีผลต่อปริมาณรากเอคโตไมคอร์ไรซา เมื่อนำเส้นใยเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกจากรากเอคโตไมคอร์ไรซาและเม็ด sclerotium และรากเอคโตไมคอร์ไรซาไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1F และ ITS4 พบว่าชนิดของราที่อยู่ร่วมกับรากคือเห็ดเผาะหนัง จากการวิเคราะห์ข้อมูลการเติบโตทางสถิติพบว่า วิธีการปลูกเชื้อไม่ทำให้การเติบโตทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก ความสูง น้ำแห้งส่วนยอดและน้ำหนักแห้งรวมของกล้าไม้แตกต่างกัน แต่ทำให้น้ำหนักแห้งส่วนรากและปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน โดยพบว่า กล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์มีน้ำหนักแห้งส่วนรากมากกว่ากล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยบริสุทธิ์และกล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อ ส่วนธาตุ C, N, P และ K ในกล้าไม้ที่ปลูกเชื้อมีปริมาณมากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อ แต่กล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์และเส้นใยบริสุทธิ์มีปริมาณธาตุอาหารดังกล่าวไม่แตกต่างกัน สำหรับวัสดุปลูก 2 สูตร ไม่ทำให้กล้าไม้มีการเติบโตที่แตกต่างกันในด้านใดเลย ดังนั้นการผลิตกล้าไม้ให้มีเห็ดเผาะหนังเป็นเอคโตไมคอร์ไรซา จึงสามารถเลือกใช้วิธีการปลูกเชื้อด้วยสปอร์หรือด้วยเส้นใยบริสุทธิ์และวัสดุปลูกสูตรใดสูตรหนึ่งใน 2 สูตรนี้ก็ได้

**คำสำคัญ:** การเติบโต กล้าไม้ วงศ์ยาง วิธีการปลูกเชื้อ เห็ดเผาะ เอคโตไมคอร์ไรซา

*[1] ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทร 0-2579-0176*
*[2] ภาควิชาวนวัฒนวิทยา คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทร 0-2579-0171*
*[3] สถานีวิจัยวนศาสตร์พังงา คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทร 0-7659-3601*
*[4] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทร 0-2562-5555*

## ABSTRACT

This research was divided into 2 experiments. Experiment I: Growth responses of *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb. and *Shorea roxburghii* G. Don seedlings inoculated with *Astraeus odoratus*. The two seedling species were grown in fumigated soil and placed in a nursery with fine screen walls to protect insects. They were inoculated using one of the three methods; (1) spore suspension 25 ml/seedling, (2) hyphal suspension 25 ml/seedling and (3) non-inoculated or control. The experiment was designed in 3x2 Split Plot in Completely Randomized Design which having 3 inoculation methods as main plots and 2 seedling species as subplots. In a treatment, there were 3 replications and a replication had four seedlings.

When the seedlings were 8 months old, the inoculated seedlings formed ectomycorrhizal roots at 30-60% of the total roots but the controls had none. There were two morphotypes of ectomycorrhizal roots with a few rhizomorphs and sclerotia. It was found out by molecular techniques using ITS1F and ITS4 primers that the fungal mycelia associated with all ectomycorrhizal morphotypes were *Astraeus odoratus*, the mushroom species that had been used for inoculation. Statistical analyses of the seedlings' growth data revealed that the inoculation methods and seedling species had no effect on diameter at root collar, height, shoot dry weight, root dry weight and total dry weight of the seedlings. However, there were interactions between inoculation methods and seedling species. The interactions caused the inoculated *S. roxburghii* seedlings to have higher diameter at root collar, height, root dry weight and total dry weight than the inoculated *D. tuberculatus* seedlings. For the amount of nutrients in the seedlings, the inoculation methods caused higher N in the inoculated seedlings than the controls but no different amounts of C, P and K. The seedling species also showed differences in nutrient contents which were *S. roxburghii* had higher C, N and P and lower K than *D. tuberculatus*.

Experiment II: Growth responses of *Shorea roxburghii* seedlings grown in two formulae of planting medium to the inoculation with *Astraeus odoratus*. The seedlings were grown in 2 formulae of non-sterilized planting medium; Formula I, Peat:Vermiculite:Sand = 1:9:0 and Formula II, Peat:Vermiculite:Sand = 2:7:1 (V:V:V) and placed in a nursery with fine screen walls to protect insects. They were inoculated using one of the three methods as in Experiment I. The experiment was designed in 3x2 Split Plot in Completely Randomized Design which having 3 inoculation methods as main plots and 2 planting medium formulae as subplots. In a treatment, there were 3 replications and a replication had 4 seedlings.

When the seedlings were 8 months old, both the inoculated and control seedlings formed ectomycorrhizal roots. The ectomycorrhizal roots were 3 morphotypes in total. However, the inoculated seedlings had more percentages of ectomycorrhizal roots than the controls. Many rhizomorphs and sclerotia were also found on the roots. Different planting medium formulae had no effect on the amount of ectomycorrhizal roots. The analyses of pure fungal mycelia isolated from ectomycorrhizal roots and sclerotia and the ectomycorrhizal roots by molecular techniques using ITS1F and ITS4 primers resulted that all the fungal mycelia associated with the roots were *A. odoratus*. Statistical analyses of seedlings' growth data revealed that the inoculation methods had no effect on diameter at root collar, height, shoot dry weight and total dry weight. However, they affected root dry weight and nutrient amounts in the seedlings. The inoculated seedlings with spore suspension had higher root dry weight than those inoculated with hyphal suspension and the controls. The inoculated seedlings had higher amounts of C, N, P and K than the controls. However, inoculation with spore suspension and hyphal suspension had no difference on the seedling's nutrients. Two formulae of planting medium had no effect in all the seedling's growth parameters. Therefore, the ectomycorrhizal seedlings associated with of *A. odoratus* can be produced using either spore suspension or hyphal suspension inoculation method and any one of the two planting medium formulae.

**Key words:** growth, seedling, Dipterocarpaceae, inoculation method, *Astraeus* spp., ectomycorrhiza

[1] *Department of Forest Biology, Faculty of Forestry, Kasetsart University, Tel. 0-2579-0176*
[2] *Department of Silviculture, Faculty of Forestry, Kasetsart University, Tel. 0-2579-0171*
[3] *Phang Nga Forestry Research Station, Faculty of Forestry, Kasetsart University, Tel. 0-7659-3601*
[4] *Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Tel. 0-2562-5555*

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | II |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | IV |
| สารบัญ | VI |
| สารบัญตาราง | VIII |
| สารบัญภาพ | IX |
| **บทที่ 1 บทนำ** | 1-2 |
| ความเป็นมาและความสำคัญ | 1 |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย | 2 |
| ขอบเขตการวิจัย | 2 |
| สมมติฐานการวิจัย | 2 |
| **บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** | 3-8 |
| พรรณไม้วงศ์ยางของไทย | 3 |
| เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) | 3 |
| งานวิจัยไม้วงศ์ยางกับราเอคโตไมคอร์ไรซา | 4 |
| การปลูกเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาให้กับพืช | 7 |
| ชนิดของเห็ดเผาะในประเทศไทย | 8 |
| **บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย** | 11-25 |
| การเก็บรวบรวมดอกเห็ดเผาะและการตรวจเพื่อยืนยันชนิด | 11 |
| การเพิ่มปริมาณเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดเผาะหนังเพื่อใช้เป็นเชื้อสำหรับปลูกให้แก่กล้าไม้วงศ์ยาง | 13 |
| วิธีการเพาะเมล็ดไม้ | 13 |
| การตรวจรากที่เพิ่งงอกออกมาจากเมล็ดก่อนการปลูกเชื้อเห็ดเผาะ | 15 |
| วิธีการปลูกเชื้อเห็ดเผาะให้แก่กล้าไม้ | 16 |
| การวางแผนการทดลอง | 18 |
| การวัดการเติบโตของกล้าไม้ | 21 |
| การตรวจรากของกล้าไม้ที่ได้รับการปลูกราเอคโตไมคอร์ไรซา | 22 |
| การนับเปอร์เซ็นต์เข้าอยู่อาศัยของราเอคโตไมคอร์ไรซา | 24 |
| การแยกราที่อยู่ร่วมกับรากเอคโตไมคอร์ไรซา และเม็ด sclerotium ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) | 24 |
| การชั่งหาน้ำหนักแห้งของกล้าไม้ | 25 |

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารของกล้าไม้ 25
การวิเคราะห์ข้อมูลการเติบโตของกล้าไม้ 25

**บทที่ 4 ผลการวิจัย** 26-54

การทดลองที่ 1 การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้พลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.) และกล้าไม้พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) ต่อการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง 26

- ลักษณะสัณฐานและกายวิภาคของราก 26
- ชนิดและเปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซา 31
- การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้ 33

การทดลองที่ 2 การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกในวัสดุปลูก 2 สูตรต่อการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง 39

- ลักษณะสัณฐานและกายวิภาคของราก 39
- ชนิดและเปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซา 45
- การแยกราที่อยู่ร่วมกับรากเอคโตไมคอร์ไรซาและเม็ด sclerotium ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) 50
- การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้ 51

**บทที่ 5 วิจารณ์ผลการวิจัย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ** 55-59

วิจารณ์ผลการวิจัย 55

สรุปผลการวิจัย 57

ข้อเสนอแนะ 59

**เอกสารอ้างอิง** 60

**ภาคผนวก** 63

**ประวัติผู้วิจัย** 65

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2-1 | ข้อดีและข้อเสียของวิธีการปลูกราไมคอร์ไรซาให้แก่กล้าไม้ | 8 |
| 4-1 | ชนิดราที่อยู่ร่วมกับรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พลวงและพะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการ 2 วิธี | 32 |
| 4-2 | การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าพะยอมและพลวงที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี ด้วย Two-way ANOVA | 33 |
| 4-3 | การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอรากและความสูงของการทดลองที่ 1 ด้วย Two-way ANOVA | 34 |
| 4-4 | การวิเคราะห์ความแปรนปรวนน้ำหนักแห้งส่วนยอด น้ำหนักแห้งส่วนราก และน้ำหนักแห้งรวมของการทดลองที่ 1 ด้วย Two-way ANOVA | 36 |
| 4-5 | การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณธาตุอาหารในพืชของการทดลองที่ 1 ด้วย Two-way ANOVA | 38 |
| 4-6 | ชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่กับรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน และอยู่ในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน 2 สูตร | 47 |
| 4-7 | การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี ด้วย Two-way ANOVA | 49 |
| 4-8 | การเปรียบเทียบค่า pH, อินทรียวัตถุ (organic matter) และปริมาณธาตุอาหารต่าง ๆ ของวัสดุปลูก 2 สูตร ด้วย Student's t-test | 51 |
| 4-9 | ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก ความสูงของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี และปลูกในวัสดุปลูกแตกต่างกัน 2 สูตร โดยใช้ Two-way ANOVA | 52 |
| 4-10 | ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักแห้งส่วนยอด น้ำหนักแห้งส่วนราก และน้ำหนักแห้งรวมของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี และปลูกในวัสดุปลูกแตกต่างกัน 2 สูตร โดยใช้ Two-way ANOVA | 52 |
| 4-11 | ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณธาตุอาหารในกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี และปลูกในวัสดุปลูกแตกต่างกัน 2 สูตร โดยใช้ Two-way ANOVA | 53 |

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 3-1 | เห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus*): (A) ดอกอ่อน (B) ดอกอ่อนและดอกแก่ | 11 |
| 3-2 | (A) ภาพตัดตามขวางของเปลือกนอก (exoperidium) ที่หุ้มดอกเห็ดเผาะ (B) ผนังด้านในของเปลือกนอกที่มีการเรียงตัวคล้ายเซลล์พาเรนไคมา (pseudoparenchymatous cell) | 11 |
| 3-3 | ขั้นตอนการเพาะเมล็ดไม้วงศ์ยาง: A. แช่เมล็ดไม้ในน้ำประปา 24 ชั่วโมง B. นำเมล็ดไม้ใส่ลงในถุงพลาสติกใสที่รัดปากถุงอย่างหลวม ๆ C. เพาะเมล็ดในกระบะทราย และ D. นำกระบะทรายใส่ในถุงพลาสติกดำที่รัดปากถุงอย่างหลวม ๆ | 14 |
| 3-4 | รากพะยอมที่ไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ (A) รากแขนงที่งอกออกมาจากรากแก้ว (B) ภาพตัดตามขวางของราก | 15 |
| 3-5 | รากพลวงที่ไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ (A) รากแก้วที่งอกออกมาจากเมล็ด (B) ภาพตัดตามขวางของราก | 15 |
| 3-6 | ขั้นตอนการเตรียมสารแขวนลอยเส้นใย (hyphal suspension) ของเห็ดเผาะหนัง (A) ขูดเส้นใยออกจากกระดาษแก้ว (B) นำเส้นใยผสมกับน้ำใส่ลงในถ้วยของเครื่องปั่น และ (C) ปั่นเส้นใยเป็นเวลา 1 นาที | 16 |
| 3-7 | (A) จุ่มรากของเมล็ดไม้ลงใน hyphal suspension (B) นำไปปลูกในดินรมควันฆ่าเชื้อแล้วใส่ hyphal suspension ปริมาณ 25 มิลลิลิตร/ต้น ลงไปใกล้ๆ กับราก | 17 |
| 3-8 | ขั้นตอนการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเห็ดเผาะหนัง (A) แกะเปลือกนอกที่หุ้มดอกเห็ดทิ้ง (B) นำส่วนของสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยเปลือกในไปปั่นให้เป็นผงละเอียด และ (C) นำผงสปอร์ผสมกับน้ำแล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 1 นาที | 17 |
| 3-9 | (A) จุ่มรากของเมล็ดไม้ลงใน spore suspension (B) นำไปปลูกในดินรมควันฆ่าเชื้อแล้วใส่ spore suspension ปริมาณ 25 มิลลิลิตร/ต้น ลงไปใกล้ๆ กับราก | 18 |
| 3-10 | แผนผังการวางกล้าไม้ในการทดลองที่ 1 (C= control, H= hyphal suspension inoculation, S= spore suspension inoculation) | 19 |
| 3-11 | แผนผังการวางกล้าไม้ในการทดลองที่ 2 (C= control, H= hyphal suspension inoculation, S= spore suspension inoculation) | 20 |
| 3-12 | (A) ลักษณะของเรือนเพาะชำกล้าไม้ที่มีผนังเป็นตาข่ายละเอียด และ (B) การวางกล้าไม้บนโต๊ะที่ขาโต๊ะมีปูนขาวโรยเพื่อป้องกันแมลง | 21 |
| 3-13 | บริเวณลำต้นระดับผิวดินที่ทำเครื่องหมายด้วยปากกาหมึกน้ำมันสีขาว เป็นจุดที่ใช้วัดการเติบโตของกล้าไม้: (A) พะยอม (B) พลวง | 21 |
| 3-14 | การวัดการเติบโตของกล้าไม้จากจุดที่ทำเครื่องหมาย (A) เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น และ (B) ความสูงของกล้าไม้ | 22 |
| 4-1 | ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่ไม่มีเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พลวง (C= cortex, E= epidermis) | 26 |

| | | |
|---|---|---|
| 4-2 | ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่ไม่มีเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอม (C= cortex, E= epidermis) | 27 |
| 4-3 | ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พลวงที่ปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยเส้นใยบริสุทธิ์และสปอร์เห็ดเผาะหนัง (H= Hartig net, M= mantle) | 28 |
| 4-4 | ลักษณะสัณฐาน (A) เม็ด sclerotium และ rhizomorph (B) และลักษณะทางกายวิภาค (C) ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาของ กล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเห็ดเผาะหนัง (C= cortex, H= Hartig net, M= mantle, R= rhizomorph, S= sclerotium) | 29 |
| 4-5 | ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาแบบที่ 1 ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนัง (C= cortex, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle) | 30 |
| 4-6 | ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาแบบที่ 2 ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนัง (C= cortex, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle) | 30 |
| 4-7 | เปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของราเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี | 33 |
| 4-8 | ผลการวิเคราะห์การเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการปลูกเชื้อและชนิดกล้าไม้ซึ่งทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางที่คอรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ | 35 |
| 4-9 | ผลการวิเคราะห์การเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการปลูกเชื้อและชนิดกล้าไม้ซึ่งทำให้ความสูงของกล้าไม้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ | 35 |
| 4-10 | ผลการวิเคราะห์การเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการปลูกเชื้อและชนิดกล้าไม้ซึ่งส่งทำให้น้ำแห้งส่วนรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ | 37 |
| 4-11 | ผลการวิเคราะห์การเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการปลูกเชื้อและชนิดกล้าไม้ ซึ่งทำให้น้ำแห้งรวม แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ | 37 |
| 4-12 | ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนของกล้าไม้ที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี โดยใช้ Tukey's test | 38 |
| 4-13 | ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่ไม่มีเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอม (C= cortex, E= epidermis) | 39 |
| 4-14 | ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาแบบที่ 1 ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 1 (C= cortex, Cl= clamp conection, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle, S= sclerotium) | 40 |
| 4-15 | ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาแบบที่ 1 ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 1 (C= cortex, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle, R= rhizomorph) | 41 |
| 4-16 | ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาแบบที่ 2 ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 1 | 42 |

(C= cortex, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle, R= rhizomorph, S= sclerotium)
4-17 ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ไม่ปลูกเชื้อ และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 1 (C= cortex, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle, R= rhizomorph) 43
4-18 ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 2 (C= cortex, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle, R= rhizomorph) 44
4-19 ลักษณะสัณฐาน (A-B) และลักษณะทางกายวิภาค (C) ของรากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 2 (C= cortex, Cl= clamp conection, M= mantle, R= rhizomorph, S= sclerotium) 45
4-20 เปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี 49
4-21 (1) จุดที่มีวงกลมสีแดงล้อมรอบ คือ เส้นใยของเราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เจริญออกมาจากผิวราก และ (C) เชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ปนเปื้อน (contaminant) (2) การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยราที่แยกได้จากรากเอคโตไมคอร์ไรซา 50
4-22 การเติบโตของเส้นใยราที่แยกได้จากเม็ด sclerotium ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 14 50
4-23 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งส่วนรากของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี โดยใช้ Tukey’s test 53
4-24 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณธาตุอาหารของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี โดยใช้ Tukey’s test (A) ปริมาณคาร์บอน (%) (B) ปริมาณไนโตรเจน (%) (C) ปริมาณฟอสฟอรัส (%) (D) ปริมาณโพแทสเซียม (%) 54

# บทที่ 1

# บทนำ

**ความเป็นมาและความสำคัญ**

ในช่วงระยะเวลาประมาณเกือบครึ่งศตวรรษที่ผ่านมา พื้นที่ป่าไม้ของประเทศไทยถูกบุกรุกทำลายอย่างต่อเนื่อง จากที่เคยมีอยู่ประมาณ 50% ของพื้นที่ประเทศในปี พ.ศ. 2506 ลดลงเหลือเพียงประมาณ 30% ของพื้นที่ประเทศในปี พ.ศ. 2549 (กรมป่าไม้, 2550) โดยมีสาเหตุหลักมาจากการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของจำนวนประชากร ทำให้เกิดความต้องการนำที่ดินป่าไม้มาใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ การสูญเสียพื้นที่ป่าไม้ก่อให้เกิดความเสียหายแก่สภาพแวดล้อมทางธรรมชาติอย่างมาก และส่งผลกระทบต่อความเป็นอยู่ของคนไทย ดังเช่น การเกิดอุทกภัยและดินถล่มในภาคใต้ของประเทศเมื่อปลายปี พ.ศ. 2532 เหตุการณ์อันเศร้าสลดนี้เป็นสาเหตุของการประกาศยกเลิกสัมปทานป่าไม้ทั่วประเทศของรัฐบาลที่ยังคงอยู่จนถึงปัจจุบัน จากนั้นมารัฐบาลได้พยายามฟื้นฟูทรัพยากรป่าไม้ของชาติ โดยการรณรงค์อย่างกว้างขวางให้ประชาชนช่วยกันรักษาป่าไม้และช่วยกันปลูกป่า อีกทั้งสนับสนุนให้กรมป่าไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง รัฐวิสาหกิจต่างๆ และเอกชนทุกภาคส่วน ดำเนินโครงการปลูกป่าขนาดใหญ่ในรูปแบบต่าง ๆ รวมทั้งการให้ความรู้แก่ประชาชนในเรื่องการอนุรักษ์ทรัพยากรป่าไม้ด้วย ซึ่งประสบความสำเร็จมากพอสมควร แต่ก็ยังไม่เพียงพอที่จะเพิ่มพื้นที่ป่าไม้ให้ได้ถึงร้อยละ 40 ของพื้นที่ประเทศตามนโยบายป่าไม้ของชาติที่กำหนดขึ้นในปี พ.ศ. 2528

นับตั้งแต่การยกเลิกสัมปทานป่าไม้เป็นต้นมา ประเทศไทยต้องนำเข้าไม้ท่อนและไม้แปรรูปเป็นจำนวนมากและมีมูลค่าสูงยิ่ง โดยตามสถิติป่าไม้ ปี พ.ศ. 2541-2550 ชนิดไม้นำเข้าที่มีปริมาตรและมูลค่าสูงจัดอยู่ในสิบลำดับแรก คือ สน ยาง สัก กระบาก ตะเคียน ประดู่ มะค่า โอ๊ก เต็งและรัง และดาร์กเรดเมอแรนติและเมอแรนติบูเคา แต่เมื่อรวมชนิดไม้วงศ์ยางที่นำเข้าไว้ด้วยกัน อันได้แก่ ยาง กระบาก ตะเคียน เต็งและรัง พบว่าปริมาตรไม้วงศ์ยางมีการนำเข้าสูงที่สุดคือ 288,838 ลบ.ม./ปี และมีมูลค่า 1,849 ล้านบาท/ปี ในขณะที่การส่งออกไม้วงศ์ยาง คือ ยาง และ เต็งและรัง มีมูลค่าเพียง 128 ล้านบาท/ปี (ศูนย์วิจัยป่าไม้, 2552) ซึ่งต่ำกว่าการนำเข้าถึง 14 เท่า เป็นการแสดงให้เห็นว่าความต้องการใช้ไม้วงศ์ยางภายในประเทศมีสูงมาก ดังนั้นโครงการปลูกป่าที่จะเกิดขึ้นต่อไปในอนาคตจึงควรวางแผนปลูกไม้วงศ์ยางให้มีพื้นที่เพิ่มมากขึ้นอย่างเร่งด่วน เพราะไม้วงศ์ยางเป็นไม้โตช้า การปลูกตั้งแต่วันนี้กว่าจะถึงเวลาตัดฟันเพื่อนำมาใช้งานได้ ต้องใช้เวลาประมาณไม่น้อยกว่า 30 ปี จึงจะได้เส้นรอบวงของลำต้นที่ความสูงเพียงอก 100 เซนติเมตร ในขณะนี้ยังไม่มีการรวบรวมข้อมูลพื้นที่สวนป่าไม้วงศ์ยางของทั้งประเทศ มีเฉพาะพื้นที่สวนป่ายางนาซึ่งมีอยู่ประมาณ 13,000 ไร่ (สำนักพระราชวัง, 2550) หรือคิดเป็น 8% ของพื้นที่ป่าไม้ของประเทศ ซึ่งจัดว่าน้อยมาก การปลูกสร้างสวนป่าไม้วงศ์ยางให้ประสบความสำเร็จนอกจากการเลือกพื้นที่ปลูกและทราบวิธีการปลูกแล้ว การใช้กล้าไม้ที่แข็งแรง เติบโตเร็ว และมีอัตราการรอดตายสูง เนื่องจากผลของการมีราหรือเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ร่วมกับราก เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง (บุญชุบ, 2542)

**วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

1) เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อเห็ดเผาะให้แก่กล้าไม้วงศ์ยาง และก่อให้เกิดความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากของกล้าไม้

2) เพื่อศึกษาการตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้วงศ์ยาง ที่มีเห็ดเผาะหนังเป็นเอคโตไมคอร์ไรซา ภายใต้สภาพเรือนเพาะชำ

**ขอบเขตการวิจัย**

การวิจัยเรื่องนี้ต้องการผลิตกล้าไม้วงศ์ยางจำนวนมาก ให้มีเห็ดซึ่งรับประทานได้มาอยู่ร่วมกับรากแบบเอคโตไมคอร์ซา เพื่อนำไปใช้ปลูกสร้างสวนป่า โดยมีการศึกษาทั้งในห้องปฏิบัติการและเรือนเพาะชำกล้าไม้ ผลการวิจัยนี้เมื่อนำไปเผยแพร่ จะช่วยให้นักป่าไม้หรือผู้ผลิตกล้าไม้ขาย สามารถผลิตกล้าไม้ให้มีเห็ดเผาะเป็นเอคโตไมคอร์ไรซาได้ และคาดหวังว่าเมื่อนำกล้าไม้เหล่านี้ไปปลูกสร้างเป็นสวนป่าจะมีเห็ดเผาะเกิดขึ้นบนพื้นป่า ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ทั้งต่อกล้าไม้ ระบบนิเวศ และชาวบ้านที่เก็บหาเห็ดไปรับประทานและจำหน่ายเพื่อสร้างรายได้ ผู้ผลิตกล้าไม้ที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถมีรายได้เพิ่มขึ้นจากการขายกล้าไม้ เพราะกล้าไม้เป็นที่ต้องการของทั้งภาครัฐและเอกชน

**สมมติฐานการวิจัย**

1) กล้าไม้ที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากจะมีการเติบโตรวดเร็ว แข็งแรงและมีอัตราการรอดตายสูง
2) กล้าไม้ที่มีเอคโตคอร์ไรซาสามารถผลิตได้โดยใช้วิธีการที่ง่ายและสะดวกในการปฏิบัติการ

# บทที่ 2
# แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## พรรณไม้วงศ์ยางของไทย

ไม้วงศ์ยางของไทย ประกอบด้วยพรรณไม้จำนวน 8 สกุล 65 ชนิด แยกเป็น สกุลไม้กระบาก 3 ชนิด สกุลไม้เคี่ยม 1 ชนิด สกุลไม้ยาง 16 ชนิด สกุลไม้ตะเคียน 13 ชนิด สกุลไม้ตะเคียนชันตาแมว 1 ชนิด สกุลไม้ไข่เขียว 1 ชนิด สกุลไม้เต็ง พะยอม และสยา 22 ชนิด สกุลไม้พันจำ 8 ชนิด พรรณไม้ทั้งหมดนี้ส่วนใหญ่ขึ้นตามป่าดิบชื้น ป่าดิบแล้ง และป่าเบญจพรรณตามภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วประเทศ มีเพียง 6 ชนิดเท่านั้นที่พบว่าขึ้นในป่าเต็งรัง คือ ยางกราด ยางเหียง ยางพลวง เต็ง พะยอม และรัง (จำลอง และชวลิต, 2542)

ประชาชนชาวไทยนำพรรณไม้วงศ์ยางมาใช้ประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อมมากที่สุดวงศ์หนึ่ง เพราะเป็นวงศ์ที่ประกอบไปด้วยพันธุ์ไม้ที่มีคุณสมบัติเฉพาะ มีความหลากหลายตรงกับความต้องการใช้ในรูปแบบต่างๆ กันไป ทั้งในด้านเป็นวัตถุดิบของโรงงานอุตสาหกรรม ด้านการเกษตร ด้านการก่อสร้าง ตั้งแต่ที่ต้องรองรับน้ำหนักมาก ๆ จนถึงเครื่องเรือน และทำเครื่องมือทางด้านการคมนาคม เช่น ตัวถังรถยนต์ เรือขุด เป็นต้น พรรณไม้วงศ์ยางเป็นสังคมพืชที่เอื้ออำนวยต่อการรักษาสภาพแวดล้อม เพราะมีความลดหลั่นในเชิงความสูงและความกว้างของเรือนยอด จึงช่วยปกป้องความร้อนความหนาว สามารถควบคุมแสงแดดและการคายหรือการระเหยของน้ำจากผิวดินได้เป็นอย่างดี เอื้ออำนวยให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหารพืช นอกจากนี้บนพื้นดินภายใต้ร่มเงายังเป็นที่เกิดของเห็ดที่ประชาชนนำมาบริโภคได้หลายชนิดตามฤดูกาล พรรณไม้วงศ์ยางสามารถกระจายแพร่พันธุ์ตามสภาพภูมิประเทศได้อย่างกว้างขวาง ทั้งในที่ชื้นที่น้ำท่วมขังไปจนถึงที่แห้งแล้งจัดที่สภาพดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ จึงกล่าวได้ว่าพรรณไม้วงศ์ไม้ยางมีความเกี่ยวข้องกับชีวิตของคนไทยมาแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน และจะยิ่งมีความสำคัญและผูกพันยิ่งๆ ขึ้นต่อไปในอนาคต

## เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza)

คำว่า “เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza)” หมายถึง การอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันระหว่างรากพืชชั้นสูงที่มีชีวิตและรา ซึ่งราส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม เห็ด (Class Basidiomycetes) โดยพืชส่งอาหารที่ปรุงขึ้นจากการสังเคราะห์แสงผ่านรากไปให้แก่รา ส่วนเส้นใยของราช่วยดูดน้ำและธาตุอาหารจากดินส่งผ่านรากไปให้พืช และพืชนำไปใช้ในการสังเคราะห์แสง ความสัมพันธ์นี้ทำให้ต่างฝ่ายต่างเติบโตดีขึ้น นอกจากนี้ราที่อยู่รอบๆรากยังช่วยปกป้องรากจากเชื้อโรคพืช และช่วยให้พืชทนต่อความแห้งแล้งได้มากขึ้น จึงมีอัตราการรอดตายสูงเมื่อพืชขึ้นอยู่ในที่ที่ไม่เหมาะสมต่อการเติบโต เส้นใยของราเมื่อโตเต็มที่และได้รับความชื้น จะสร้างดอกเห็ดขึ้นมาบนพื้นดินหรือบางชนิดฝังอยู่ใต้ดินก็มี เห็ดเหล่านี้มีชื่อเรียกว่าเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาหรือราเอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhizal mushroom or ectomycorrhizal fungus) ส่วนรากพืชที่มีเส้นใยของราเจริญพันอยู่ อันทำให้สีของรากเปลี่ยนไปจากปกติ มีขนาดใหญ่และแตกแขนงเพิ่มขึ้นเรียกว่ารากเอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhizal root) (อุทัยวรรณ, 2537; Brundrett *et al*., 1996)

เห็ดหลายชนิดที่ขึ้นอยู่บนดินภายใต้ร่มเงาของพรรณไม้วงศ์ยาง เป็นเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา และบางชนิดรับประทานได้ เช่น เห็ดระโงกเหลือง เห็ดน้ำผึ้ง เห็ดหาด เห็ดไคลหลังเขียว เห็ดน้ำหมาก และเห็ดเผาะ (อนิวรรต และ ธีรวัฒน์, 2524; 2525) การปลูกพรรณไม้วงศ์ยางในพื้นที่ที่ป่าไม้ถูกทำลายมาเป็นระยะเวลายาวนาน หรือภายหลังจากเปลี่ยนแปลงที่ดินไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น จนกระทั่งเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาสูญหายไปจากดิน ทำให้พรรณไม้วงศ์ยางมีการเติบโตช้าและมีอัตราการรอดตายต่ำ ดังนั้นการปลูกพรรณไม้วงศ์ยางให้ประสบความสำเร็จในพื้นที่ดังกล่าว จึงควรใช้กล้าไม้ที่มีเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดที่เหมาะสมและรับประทานได้มาสัมพันธ์อยู่กับราก เพื่อให้เกิดประโยชน์ทั้งต่อทั้งกล้าไม้และคน การค้นคว้าวิจัยให้ทราบชนิดของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาและวิธีการปลูกเชื้อให้แก่กล้าไม้ เป็นงานวิจัยที่สำคัญและควรสนับสนุนให้มีการดำเนินการเป็นลำดับต้น ๆ (บุญชุบ, 2542)

**งานวิจัยไม้วงศ์ยางกับราเอคโตไมคอร์ไรซา**

ความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซาในไม้วงศ์ยางพบครั้งแรกในปี ค.ศ 1920 (Smits, 1992) และ Peterson *et al*. (2004) กล่าวว่า พรรณไม้วงศ์ยางทุกชนิดมีความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซา ดังการศึกษาของ Singh (1966) ที่พบความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซาในไม้วงศ์ยาง ได้แก่ *Anisoptera laevis, Balanocarpus hemii, Dipterocarpus oblongifolius, D. sublamellatus, Dryobalanops aromatica, Hopea furruginea, Shorea curtisii, S. leprosula, S. macroptera, S. ovalis, S. pauciflora* และ *Vatica papuana* ในประเทศศรีลังกา Alwis and Abeynayake (1980) พบว่าไม้วงศ์ยาง 5 ชนิด มีความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซา ได้แก่ *S. affinis, D. zeylanicus, D. hispidus, Cotylelobium scarbriusculum* และ *H. jucunda* ในประเทศฟิลิปปินส์ Pollisco (1991) พบว่าไม้วงศ์ยาง ได้แก่ *A. thurifera D. gracilis D. grandiflorus H. foxworthyi S. contorta S. paosapis S. almon S. polysperma S. quiso* และ *Parshorea malanonn* มีความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซา ส่วนในประเทศอินโดนีเซีย Hadi *et al*. (1991) ได้รายงานว่าไม้วงศ์ยาง สกุล *Shorea* เป็นส่วนใหญ่ และสกุลอื่น ๆ ได้แก่ *Dipterocarpus*, *Hopea* และ *Vatica* มีความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซา

Shyun *et al*. (1994) รายงานผลการศึกษาเบื้องต้นของอัตราการรอดตายและการแข่งขันกันของรา *Pisolithus tinctorius* 2 สายพันธุ์ คือ Pt441 จากประเทศบราซิล และ Ptmsn จากประเทศไทย โดยการปลูกราลงในกล้าไม้ยางนาและ *Shorea glauca* จากนั้นย้ายปลูกในพื้นที่ป่าที่กำลังฟื้นตัวและพื้นที่ที่ผ่านการทำไม้แล้วในประเทศมาเลเซีย ผลการศึกษาพบว่า หลังจากย้ายปลูกกล้าไม้เป็นเวลา 6 เดือน รา *P. tinctorius* สายพันธุ์ Ptmsn ที่ปลูกลงในกล้าไม้ยางนามีอัตราการรอดตายไม่ดีนัก และถูกราไมคอร์ไรซาชนิดอื่นที่มีอยู่ตามธรรมชาติในพื้นที่ป่าที่กำลังฟื้นตัวเจริญเติบโตปกคลุม ส่วนราสายพันธุ์ Ptmsn และ Pt441 ที่ปลูกลงในกล้าไม้ *S. glauca* มีอัตราการรอดตายต่ำมาก และถูกปกคลุมด้วยราไมคอร์ไรซาที่มีอยู่ตามธรรมชาติในพื้นที่ที่ทำไม้ไปแล้ว

Yazid *et al*. (1994) ได้ศึกษาพบว่าการเติบโตของกล้าไม้วงศ์ยาง 2 ชนิด คือ *Hopea odorata* และ *H. helferi* ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราบริสุทธิ์ของ *P. tinctorius* ที่แยกเชื้อจาก *Eucalyptus citriodora* ประเทศบราซิลและส่งมายังประเทศมาเลเซีย การดูดฟอสฟอรัสของกล้าไม้ที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาดีกว่ากล้าไม้ที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ผลของการศึกษาในกล้าไม้ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นไปในทางเดียวกับการศึกษาพันธุ์ไม้ส่วนใหญ่ในเขตอบอุ่น และ *P. tinctorius* มีความเฉพาะเจาะจงต่ำกับพืชอาศัย

Turjaman *et al*. (2005) ได้ทดลองศึกษาผลของราเอคโตไมคอร์ไรซาต่อการเติบโตของกล้าไม้ *Shorea pinanga* ที่ปลูกด้วยสปอร์ของรา *P. arhizus* และ *Scleroderma* sp. โดยใช้ดิน peat ที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้เวลา 7 เดือน พบว่ามีรากเอคโตไมคอร์ไรซาเกิดมากถึง 86% และทำให้ความสูงของยอด เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น จำนวนใบ น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของยอดและอัตราการรอดตายดีกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อรา การทดลองนี้ได้มีคำแนะนำว่าควรปลูกราเอคโตไมคอร์ไรซาให้แก่ *S. pinanga* เพราะช่วยเพิ่มการเติบโตของกล้าไม้ชนิดนี้ในระยะเริ่มต้น และช่วยส่งให้เกิดการฟื้นฟูของป่าเต็งรังที่ถูกทำลาย

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

ทนุวงศ์ (2534) ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ดที่ขึ้นอยู่บริเวณใต้ต้นยางนา บริเวณสถานีฝึกนิสิตวนศาสตร์วังน้ำเขียว อำเภอปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา พบดอกเห็ดจำนวน 9 ชนิดที่คาดว่ามีความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซากับรากไม้ยางนา เห็ดส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Russula* และในป่าธรรมชาติรากของยางนาที่มีความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซามี 3 รูปแบบ คือ รูปแบบที่ 1 รากมีสีน้ำตาลปนดำ ผิวเรียบ แตกแขนงแบบ monopodial-pinnate รูปแบบที่ 2 รากมีสีเหลือง ผิวเรียบ แตกแขนงแบบ irregular-pinnate และรูปแบบที่ 3 รากมีสีขาวปนเหลืองอ่อน ผิวหยาบ และแตกแขนงแบบ monopodial-pinnate จากการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาด้วยวิธี pure culture ectomycorrhizal synthesis พบว่าเห็ด *A. hygrometricus* (Pers.) Morg., *Cenococcum geophilum* Fr. และ *P. tinctorius* (Pers.) Coker & Couch สามารถก่อให้เกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาได้ สำหรับการเติบโตของกล้าไม้ยางนาที่มีและไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากในสภาพเรือนเพาะชำ ได้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 ปลูกราเอคโตไมคอร์ไรซาให้กับกล้าไม้ด้วยดินเชื้อที่ได้จากบริเวณใต้ต้นยางนาในป่าธรรมชาติ และการทดลองที่ 2 ใช้ดินสีดานึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ดอกเห็ด 1 ใน 3 ชนิด ได้แก่ เห็ดตะไคล (*Russula aeruginea* Lindbl.) เห็ดน้ำแป้ง (*R. albida* Peck.) และเห็ดน้ำหมาก (*R. sanguinea* Fr.) โดยทั้งสองการทดลองมีกล้าไม้ที่ปลูกอยู่ในดินสีดานึ่งฆ่าเชื้อเป็นกล้าไม้เปรียบเทียบ พบว่ากล้าไม้ยางนาที่ปลูกในดินเชื้อ มีการเติบโตมากกว่ากล้าไม้ที่ปลูกในดินสีดานึ่งฆ่าเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกล้าไม้ยางนาที่ปลูกในดินสีดานึ่งฆ่าเชื้อที่ใส่ดอกเห็ดตะไคลมีการเติบโตมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ กล้าไม้ที่ปลูกในดินสีดานึ่งฆ่าเชื้อที่ใส่ดอกเห็ดน้ำหมาก ดอกเห็ดน้ำแป้ง และไม่ใส่ดอกเห็ดชนิดใดเลย ตามลำดับ

ชนะ และคณะ (2542) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปุ๋ยและราเอคโตไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้ยางนาและตะเคียนทอง (*H. odorata*) พบว่าขุยมะพร้าวใส่ปุ๋ย osmocote และขุยมะพร้าวผสมดินเชื้อไมคอร์ไรซาและใส่ปุ๋ย osmocote เป็นวัสดุปลูกที่มีความเหมาะสมสำหรับการเพาะชำกล้าไม้วงศ์ยางทั้งสองชนิดในเรือนเพาะชำ และมีความเป็นไปได้ว่าดินเชื้อไมคอร์ไรซาและใส่ปุ๋ย osmocote มีความสัมพันธ์ทางด้านบวกต่อการเติบโตของกล้าไม้ยางนาและตะเคียนทอง

จินตนา และศิริภา (2545) ได้สำรวจความหลากหลายของราเอคโตไมคอร์ไรซาในสวนป่าไม้วงศ์ยาง พบว่ามีเห็ดที่คาดว่ามีความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซากับไม้ยางนา 7 ชนิด ได้แก่ *Amanita hemibupha* subsp. *javanica, A. princes*, *Russula lepida, Scleroderma aereolatum, S. neosaccadia, Clavulina* sp. และ *Lactarius* sp.

สุภาณี (2545) ได้จำแนกชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาในไม้ยางนาจำนวน 26 ตัวอย่างด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะ (ML5-ML6) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ mitochondrial large subunit ribosomal DNA (mt LrDNA) แล้วนำไปหาลำดับเบสเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับราเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีอยู่ในฐานข้อมูล พบว่าเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Thelephoraceae ได้แก่ *Tomentella* spp. รองลงมาคือ ราในวงศ์ Sclerodermataceae ได้แก่ *Scleroderma* spp. ส่วนราที่พบในบางพื้นที่ ได้แก่ วงศ์ Russulaceae, Cortinariaceae, Tricholomataceae และ Boletaceae ซึ่ง ได้แก่ *Tylopilus* sp. และ *Leccinum* sp.

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

Yuwa-Amornpitak *et al*. (2006) ศึกษาความหลากหลายของราเอคโตไมคอร์ไรซาของไม้วงศ์ยางในประเทศไทย โดยเพิ่มปริมาณ ribosomal DNA ส่วนที่เรียกว่า internal transcribed spacer (ITS) แล้วนำไปหาลำดับเบสเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา พบว่ารากไม้ยางนาที่นำมาทำการศึกษามีความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซากับรา 3 ชนิด คือ *Amanita virosa*, *Pisolithus* sp. และ *Tomentella* sp.

ธารรัตน์ (2551) ได้ศึกษาการเติบโตและการใช้น้ำของกล้าไม้ยางนา ที่ปลูกเชื้อและไม่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus* C. Phosri, R. Watling, M.P. Martín & A.J.S. Whalley) โดยปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยสปอร์ 10, 25, 50 มล./ต้น เส้นใยบริสุทธิ์ 25 มล./ต้น และไม่ปลูกเชื้อ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อกล้าไม้อายุ 7 เดือน กล้าไม้ที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังบางต้นมีดอกเห็ดเผาะหนังเกิดบนดินภายในถุง และเมื่อกล้าไม้อายุ 8 เดือน กล้าไม้ที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังมีรากเอคโตไมคอร์ไรซาเกิดขึ้นอย่างชัดเจน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 58-68 เปอร์เซ็นต์ และมีการเติบโตที่เพิ่มขึ้นทางด้านความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางคอราก และน้ำหนักแห้งส่วนรากมากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเติบโตที่เพิ่มขึ้นด้านอื่นๆ ไม่แตกต่างกัน วิธีการปลูกเชื้อเพิ่มการเติบโตให้แก่กล้าไม้ไม่แตกต่างกัน จึงสามารถเลือกใช้วิธีใดก็ได้ แต่ถ้าจะปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยสปอร์ควรใช้ 25 มล./ต้น เพราะทำให้กล้าไม้มีการเติบโตเพิ่มขึ้นทางด้านต่างๆ มากที่สุดเป็นส่วนใหญ่ สำหรับการใช้น้ำของกล้าไม้ยางนา 5 ทรีทเมนต์ พบว่ามีปริมาณการใช้น้ำและค่าชักนำการเปิดปากใบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษานี้ได้แนะนำว่าควรมีการผลิต

กล้าไม้ยางนาที่มีเห็ดเผาะหนังเป็นเอคโตไมคอร์ไรซา เพื่อใช้สำหรับปลูกสร้างสวนป่ายางนาที่มีการเติบโตดี และอาจมีเห็ดเผาะหนังเกิดขึ้นบนพื้นสวนป่าด้วย

**การปลูกเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาให้กับพืช**

โดยปกติแล้วในพื้นที่ป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ จะมีราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ที่รากพืชเสมอ แต่เมื่อสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติถูกทำลาย ราเอคโตไมคอร์ไรซาก็ถูกทำลายและลดน้อยลงด้วย ดังนั้นการนำกล้าไม้ไปปลูกในพื้นที่ป่าเสื่อมโทรมจึงควรปลูกราไมคอร์ไรซาให้กับกล้าไม้เพื่อเร่งการเติบโตของกล้าไม้ก่อนนำไปปลูก สำหรับวิธีการปลูกราไมคอร์ไรซาให้กับกล้าไม้ที่นิยมใช้กันมี 4 วิธี ดังต่อไปนี้ (อุทัยวรรณ, 2537; Brundett *et al*., 1996)

1. การใช้ดินเชื้อ (soil inoculum) เป็นวิธีการที่ใช้กันมานานแต่ให้ผลดี ทำโดยขุดดินที่มีไมคอร์ไรซาจากในป่าธรรมชาติหรือสวนป่ามาผสมกับดินหรือวัสดุสำหรับปลูก ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1-50 เปอร์เซ็นต์

2. การใช้กล้าไม้ที่มีไมคอร์ไรซาอยู่แล้ว (ectomycorrhizal seedling) ทำโดยนำกล้าไม้ที่มีไมคอร์ไรซาอยู่แล้วมาปลูกห่างกัน 1-2 เมตร ในแปลงปลูก จากนั้นจึงนำกล้าไม้ที่ไม่มีไมคอร์ไรซามาปลูกรอบๆ กล้าไม้ที่มีไมคอร์ไรซานั้น ในระยะห่างประมาณ 10 เซนติเมตร เมื่อกล้าไม้ที่นำมาปลูกใหม่มีราไมคอร์ไรซาเจริญดีแล้วก็ย้ายไปปลูกในสถานที่อื่นต่อไป โดยเหลือกล้าไม้บางส่วนที่มีไมคอร์ไรซาไว้ในแปลง สำหรับปลูกเชื้อราไมคอร์ไรซาให้แก่กล้าไม้ในรุ่นต่อๆ ไป

3. การใช้ดอกเห็ดและสปอร์ (fruiting body and spore inoculum) ทำโดยใช้ดอกเห็ดมาสับเป็นชิ้นขนาดเล็ก หรือใช้สปอร์ผสมกับดินที่ใช้ปลูกกล้าไม้ หรืออาจนำสปอร์ผสมกับน้ำให้มีความหนาแน่นของสปอร์ในระดับต่างๆ แล้วนำไปรดให้กล้าไม้ สปอร์อาจถูกทำให้แห้ง แล้วคลุกกับเมล็ดพืชก่อนนำเมล็ดไปเพาะ หรืออาจใช้สปอร์ที่อัดเป็นเม็ดใส่ลงในถุงเพาะกล้าไม้ก็ได้

4. การใช้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture inoculum) การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของราไมคอร์ไรซา สามารถทำได้ 2 วิธี คือ โดยการแยกเส้นใยออกจากรากที่มีไมคอร์ไรซาของต้นไม้ ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และโดยการแยกเส้นใยราจากดอกเห็ดที่เป็นไมคอร์ไรซาและทราบชนิดแล้ว โดยนำชิ้นส่วนของดอกเห็ดไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วขยายเพิ่มปริมาณ จากนั้นจึงนำเส้นใยบริสุทธิ์ไปปลูกให้กับกล้าไม้ต่อไป

การปลูกเชื้อไมคอร์ไรซาแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ซึ่งได้สรุปและแสดงในตารางที่ 2-1

**ตารางที่ 2-1** ข้อดีและข้อเสียของวิธีการปลูกราไมคอร์ไรซาให้แก่กล้าไม้

| วิธีการปลูกเชื้อ | ข้อดี | ข้อเสีย |
|---|---|---|
| การใช้ดินเชื้อ | - ทำง่ายและไม่ยุ่งยากซับซ้อน<br>- เสียค่าใช้จ่ายน้อย<br>- เชื้อราสามารถปรับตัวได้ดีต่อสภาวะแวดล้อมของพื้นที่ที่นำกล้าไม้ไปปลูก<br>- ในดินอาจมีเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้ | - เสี่ยงต่อการมีเชื้อสาเหตุโรคพืชหรือวัชพืชติดมากับดิน<br>- ไม่สามารถระบุชนิดและจำนวนชนิดของราที่อยู่ในดิน<br>- ดินมีน้ำหนักมาก ทำให้ขนย้ายระยะไกลไม่สะดวก |
| การใช้กล้าไม้ที่มีไมคอร์ไรซาอยู่แล้ว | - ทำง่ายและไม่ยุ่งยากซับซ้อน<br>- เก็บรักษาได้นาน และนำมาใช้เวลาใดก็ได้ | - เสี่ยงต่อการที่กล้าไม้จะติดโรคจากในแปลงที่ใช้ปลูกเชื้อ |
| การใช้ดอกเห็ดและสปอร์ | - ทำได้ง่าย สะดวกต่อการปฏิบัติมากที่สุด<br>- เสียค่าใช้จ่ายน้อย<br>- ไม่ต้องใช้อุปกรณ์และขั้นตอนที่ยุ่งยาก | - บางฤดูกาลเก็บหาดอกเห็ดยาก<br>- สปอร์อาจงอกช้าและความมีชีวิตไม่ยืนยาว<br>- การปลูกเชื้อด้วยดอกเห็ดไม่สามารถเก็บไว้ได้นานเหมือนสปอร์ |
| การใช้เชื้อบริสุทธิ์ | - สามารถเลือกชนิดและจำนวนราที่ต้องการปลูกเชื้อได้<br>- เก็บรักษาได้นาน และสามารถนำมาใช้เวลาใดก็ได้<br>- สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ดีที่เหมาะสมกับกล้าไม้แต่ละชนิด<br>- ได้หัวเชื้อที่ปราศจากสิ่งเจือปน | - มีวิธีการที่ยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายสูง<br>- ใช้เวลานานในการเตรียมหัวเชื้อ<br>- ต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการปฏิบัติ<br>- ราบางชนิดไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ |

**ชนิดของเห็ดเผาะในประเทศไทย**

เห็ดเผาะเป็นเห็ดที่ผู้นิยมเห็ดป่าชื่นชอบ เนื่องจากมีรสชาติอร่อย สามารถนำมาปรุงเป็นอาหารได้หลายอย่าง เห็ดเผาะมีราคาสูงในท้องตลาด คือ ประมาณ 300-400 บาท/ก.ก. นอกจากการซื้อขายในรูปของเห็ดสดแล้ว ยังมีผู้นำไปบรรจุกระป๋องจำหน่ายโดยดองในน้ำเกลือด้วย ราคากระป๋องละ 250 บาท แต่ยังหาซื้อยาก เนื่องจากปริมาณดอกเห็ดมีจำนวนจำกัด ต้องเก็บหาจากป่าในช่วงต้นฤดูฝนเท่านั้น

แต่เดิมนักวิทยาได้ระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ดเผาะในประเทศไทยเป็นชนิดเดียวคือ *Astraeus hygrometricus* (อนงค์ และคณะ, 2551) ต่อมานักวิทยาหลายท่านรวมถึงผู้เก็บหาเห็ดเผาะมา

รับประทานได้สังเกตเห็นความแตกต่างของลักษณะภายนอกของดอกเห็ด และรสชาติความอร่อย นักวิชาการเห็ด (Phosri *et al*., 2004; Petcharat, 2005; Phosri *et al*., 2007) จึงเก็บดอกเห็ดจากหลายๆ แห่ง ซึ่งส่วนใหญ่เก็บจากป่าเต็งรังในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ นำไปศึกษาลักษณะภายนอกที่มองด้วยตาเปล่า และลักษณะภายในดอกที่ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Compound Microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ทาง phylogenetic ของตัวอย่างเห็ดเผาะโดยการวิเคราะห์ ITS rDNA region ด้วย ผลจากการศึกษาพบว่าเห็ดเผาะในประเทศไทยมีทั้งหมด 4 ชนิด โดยเป็นชนิดใหม่ของโลก 3 ชนิด คือ เห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus* C. Phosri, R. Watling, M.P. Martín & A.J.S. Whalley sp. nov.), *A. asiaticus* C. Phosri, M. P. Martín, & Watling, sp. nov. และเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* sp. nov.) คำอธิบายเห็ด 4 ชนิดมีดังนี้

1. เห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus* C. Phosri, R. Watling, M.P. Martín & A.J.S. Whalley sp. nov.) มีชื่อพ้อง (synonym) คือ *A. thailandicus* V. Petcharat ดอกเห็ดมีรูปร่างเป็นก้อนกลมหรือกลมแบน (depressed globose) ฝังอยู่ใต้ดินแล้วจึงค่อย ๆ โผล่พ้นดิน ไม่มีก้าน ดอกเห็ดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเมื่อบานไม่เกิน 65 มิลลิเมตร ผิวแข็งและเรียบโดยมีเศษดินติดอยู่เล็กน้อย เมื่อแก่ผนังนี้จะแตกออกเป็นรูปดาว มีเส้นใยราหรือ rhizomorph สีน้ำตาลปนแดงบริเวณด้านล่างของดอก ดอกเห็ดสดมีกลิ่นแรงคล้ายกลิ่นดินชื้น ๆ ผนังชั้นนอก (exoperidium) สีน้ำตาลปนเหลืองอ่อนมีหลายชั้น หนาไม่เกิน 1 ม.ม. เมื่อแก่จะแตกออกเป็นแฉกที่ค่อนข้างกว้าง คล้ายรูปดาว 3-9 แฉก เมื่อมีความชื้น และหุบเข้าเมื่อแห้ง ผิวด้านในของผนังชั้นนอกแตกออกเป็นสะเก็ด หรือบางครั้งเรียบ ผนังชั้นใน (endoperidium) รูปร่างค่อนข้างกลม กว้าง 13-25 มิลลิเมตร สีน้ำตาลอ่อนหรือสีดำปนม่วง กลีบา (gleba) สีน้ำตาลปนม่วงถึงสีดำปนม่วง ไม่มี columella มี capillitium เป็นเส้นยาวแตกแขนง ใสไม่มีสี ไม่มีผนังกั้นตามขวาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-6.25 ไมโครเมตร สปอร์ รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5-15.2 ไมโครเมตร สีน้ำตาลปนม่วงหรือสีดำปนม่วง ผิวสปอร์เป็นปุ่มปมประกอบด้วยเส้นใย ที่บริเวณปลายมารวมติดกันมีลักษณะคล้ายหนามยาว 1.04-1.66 ไมโครเมตร โดยมีความหนาแน่นปานกลาง (Phosri *et al*., 2004)

2. *Astraeus asiaticus* C. Phosri, M. P. Martín, & Watling, sp. nov. ลักษณะดอกเห็ดรูปร่างเป็นก้อนกลมหรือกลมแบน (depressed globose) ฝังอยู่ใต้ดินแล้วจึงค่อย ๆ โผล่พ้นดิน ไม่มีก้าน ขนาด 18.7-29.7 มิลลิเมตร เมื่อแก่ผนังชั้นนอกจะแตกออกคล้ายรูปดาว ดอกอ่อนมักปกคลุมแบบบางๆ ด้วยชั้นของเส้นใยสีขาว ผิวมักมีเศษดินติดอยู่ ดอกเห็ดสดมีกลิ่นเล็กน้อย ผนังชั้นนอก (exoperidium) สีขาวหนา ประกอบด้วยหลายชั้น (มีขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร เมื่อแห้ง) แข็ง ผิวมีลักษณะขรุขระเป็นเม็ดเล็กๆ เมื่อแก่ผนังจะแตกออกเป็นแฉกค่อนข้างแคบ จำนวน 5-12 แฉก เมื่อชื้นแฉกจะบานออกและจะม้วนเข้าเมื่อแห้ง ผนังชั้นใน (endoperidium) หนา มีสีขาวแล้วกลายเป็นสีเทาควันบุหรี่ สีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลแก่ จะแตกออกเป็นสะเก็ดเมื่อแก่ Endoperidium ไม่มีก้าน รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13-24 มิลลิเมตร สีขาวถึงสีเทาควันบุหรี่ กลีบา (gleba) เมื่อดอกอ่อนมีสีขาวและเมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแก่ปนม่วง ไม่มี columella มี capillitium เป็นเส้นยาวแตกแขนง พันกันไปมา ใสไม่มีสี ไม่มีผนังกั้นตามขวาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางค่อนข้างแคบประมาณ 2.5-7.5 ไมโครเมตร ผนังบางหรือหนา มี clamp connection สปอร์ รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.75-15.2 ไมโครเมตร ผิวสปอร์เป็นปุ่มปม สีน้ำตาลปนม่วงหรือสีดำปนม่วง ประกอบเส้นใยแคบๆ ปลายเรียว รวมกันอย่างหนาแน่น มีลักษณะคล้ายหนามยาว 0.9-1.45 ไมโครเมตร

3. *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morg. มีลักษณะของดอกเห็ดที่คล้ายคลึงกับ *Astraeus asiaticus* แตกต่างกันเฉพาะสีของกลีบา (gleba) คือมีสีน้ำตาลไหม้ สีน้ำตาล สีน้ำตาลเหมือนลูกอินทะผาลัม สีน้ำตาลแดง หรือสีน้ำตาลปนดำและผนังชั้นนอก (outer peridium) เรียบ และสิ่งสำคัญยิ่งอีกประการหนึ่งที่ใช้บอกความแตกต่างคือ ขนาดสปอร์ของ *A. hygrometricus* ที่เล็กกว่า *A. asiaticus* คือมีขนาดอยู่ระหว่าง (5.18) 7.5-12 (13.89) ไมโครเมตร การใช้รูปร่างของสปอร์ภายใต้ SEM ก็ไม่สามารถบอกความแตกต่างของเห็ดเผาะ 2 ชนิดดังกล่าวนี้ได้

4. เห็ดเผาะสิรินธร (*Astraeus sirindhorniae* sp. nov.) ลักษณะดอกเห็ด รูปร่างเป็นก้อนกลมหรือกลมแบน (depressed globose) ไม่มีก้าน ขนาด 24.5-55.8 มิลลิเมตร ดอกปกคลุมด้วยเส้นใยสีน้ำตาลอ่อน เมื่อแก่จะแตกออกคล้ายรูปดาว มี 6-8 แฉก มีขนาด 40-100 มิลลิเมตร ดอกเห็ดสดมีกลิ่นแรง ผนังชั้นนอก (exoperidium) เมื่อแก่สีน้ำตาล หนา 3-5 มิลลิเมตร ประกอบด้วยหลายชั้น แข็ง ผนังชั้นใน (endoperidium) หนา มีสีขาวแล้วกลายเป็นสีน้ำตาลเข้ม จะแตกออกเป็นสะเก็ด ไม่มีก้าน รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18-32 มิลลิเมตร สีขาวถึงสีเทาควันบุหรี่ กลีบา (gleba) เมื่อดอกอ่อนมีสีขาวและเมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแก่ปนม่วง ไม่มี columella ไม่มี clamp connection ที่ exoperidium สปอร์ รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-11 ไมโครเมตร ผิวสปอร์เป็นปุ่มปม สีน้ำตาลเข้ม ประกอบด้วยเส้นใยแคบๆ ปลายเรียว รวมกันอย่างหนาแน่น (Phosri *et al.*, 2014)

Petcharat (2005) ได้รายงานว่า *A. hygrometricus* มีชื่อภาษาไทยว่า เห็ดเผาะฝ้าย เห็ดกระเบื้องหรือเห็ดฝ้าย (cottony mushroom) ส่วน *A. thailandicus* ซึ่งเป็นชื่อพ้องของ *A. odoratus* มีชื่อภาษาไทยว่าเห็ดเผาะหนังหรือเห็ดหนัง (skinny mushroom) เห็ดเผาะทั้งสองชนิดเหมาะในการรับประทานเมื่อเป็นดอกอ่อน และราคาของเห็ดเผาะหนังในท้องตลาดสูงกว่าเห็ดเผาะฝ้าย เพราะมีคุณภาพและรสชาติดีกว่า

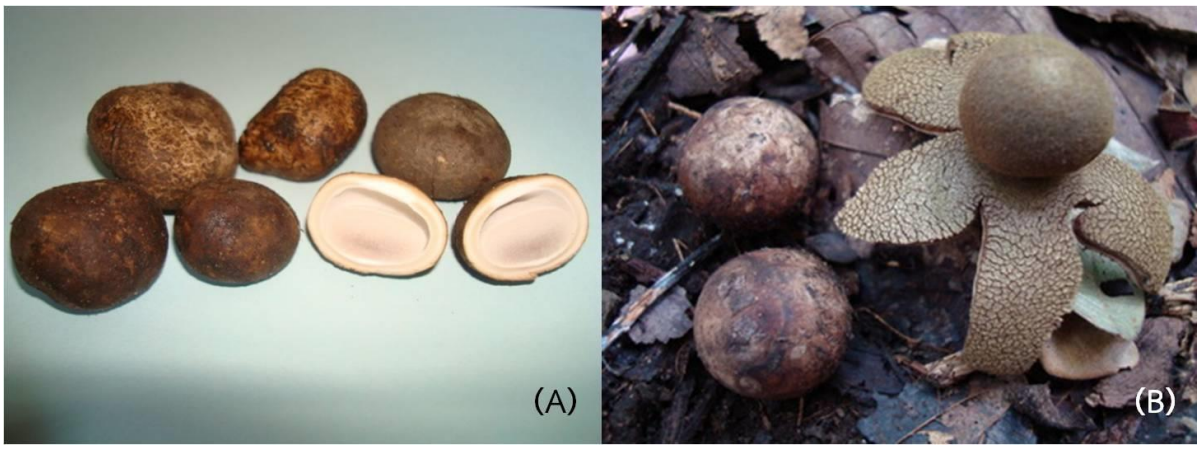
ในประเทศญี่ปุ่นมีการเก็บเห็ดสกุล *Astraeus* มารับประทานในบางท้องที่ จากการศึกษาของ Fangfuk *et al*. (2010a) พบว่า *A. hygromeyricus* สามารถเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาได้กับ *Pinus densiflora* แต่ *A. odoratus* ที่นำไปจากประเทศไทยไม่สามารถเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซากับ *P. densiflora* และเมื่อ Fangfuk *et al*. (2010b) ทำการศึกษาความหลากชนิดของเห็ดสกุล *Astraeus* ที่มีอยู่ในประเทศญี่ปุ่น โดยการหาลำดับ nucleotide ของ rDNA ITS region และเปรียบเทียบกับ *Astraeus* จากหลายๆ แหล่งทั่วโลก พบว่าเห็ด *Astraeus* ของญี่ปุ่นมีอยู่ 2 ชนิด คือ *Astraeus hygrometricus* var. *koreanus* V.J. Stanêk และ *Astraeus* group II ซึ่งยังไม่สามารถระบุชนิดได้ ความแตกต่างของ *Astraeus* 2 ชนิดนี้สามารถบอกได้จากลักษณะของดอกเห็ด ขนาดและรูปร่างของสปอร์ทั้งจากภายใต้กล้องจุลทรรศน์และ SEM และเห็ดที่เคยระบุชื่อว่าเป็น *A. hygrometricus* ของญี่ปุ่นมาตั้งแต่เดิมนั้นคือ เห็ด *Astraeus* group II

สำหรับชนิดของ *Astraeus* ที่มีอยู่ในประเทศอื่นๆ อีกมีดังนี้ จาก North America ได้แก่ *A. hygrometricus* North American group และ *A. pteridis* จากยุโรป ได้แก่ *A. hygrometricus* Mediterranean group และ *A. hygrometricus* French group ความหลากหลายของชนิดเห็ดเผาะนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมทางด้านอนุกรมวิธานอีก

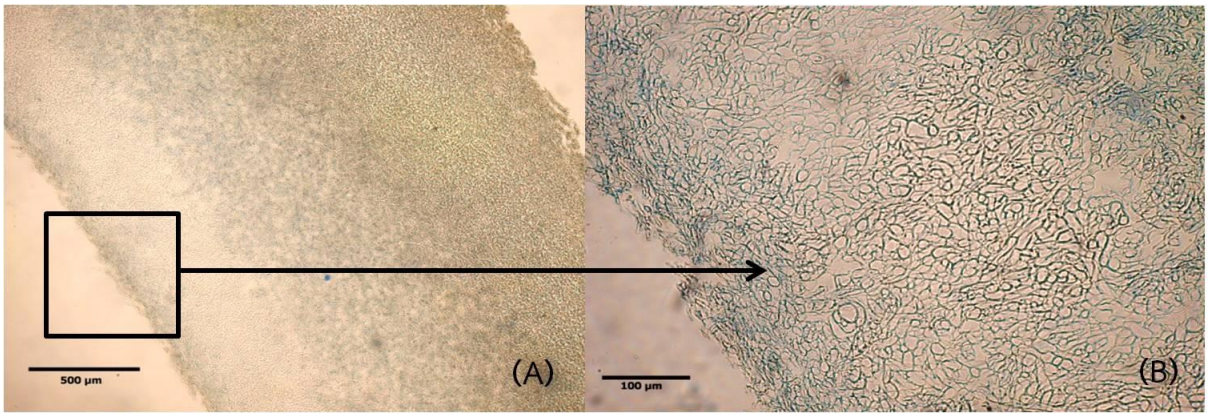
# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 1. การเก็บรวบรวมดอกเห็ดเผาะและการตรวจเพื่อยืนยันชนิด

ได้เก็บดอกเห็ดเผาะจากป่าเต็งรังผสมสนเขา ในบริเวณป่าสนบ้านวัดจันทร์ขององค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ (อ.อ.ป.) ตั้งอยู่ที่ อ. กัลยาณิวัฒนา จ. เชียงใหม่ ทำการตรวจลักษณะสัณฐานของดอกเห็ดทั้งที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (macroscopic features) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic features) ซึ่งได้ผลว่าเป็นเห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus*) ซึ่งมีลักษณะเหมือนรายงานของ Phosri *et. al.* (2004) ดังแสดงในภาพที่ 3-1 ชั้น exoperidium หนา 0.6-0.8 มิลลิเมตร มีผิวด้านในที่ประกอบด้วยเซลล์ผนังบางรูปร่างคล้ายเซลล์พาเรนไคมา เรียกว่า pseudoparenchymatous cell ที่มีขนาดต่างๆ กัน (ภาพที่ 3-2) โดยเซลล์เหล่านี้จะมีผนังหนาขึ้นเมื่อแก่ (Petcharat, 2005)




**ภาพที่ 3-1** เห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus*): (A) ดอกอ่อน (B) ดอกอ่อนและดอกแก่




**ภาพที่ 3-2** (A) ภาพตัดตามขวางของเปลือกนอก (exoperidium) ที่หุ้มดอกเห็ดเผาะ (B) ผนังด้านในของเปลือกนอกที่มีการเรียงตัวคล้ายเซลล์พาเรนไคมา (pseudoparenchymatous cell)

จากนั้นได้นำดอกเห็ดตัวอย่างเดียวกันนี้ ไปตรวจด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยการสกัด DNA ออกมาแล้วจึงนำ DNA ที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ ExTaq DNA polymerase และใช้ Primer AoR-AoF ซึ่งเป็น primer ที่ทางคณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการตรวจสอบชนิดของเห็ดเผาะหนัง (Ao=*A. odoratus*) โดยเฉพาะ ผลที่ได้ยืนยันเช่นเดียวกับการวินิจฉัยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่าเป็น เห็ดเผาะหนัง

*วิธีการสกัด DNA มีดังนี้*

1. ใช้แอลกอฮอล์ 70% เช็ดทำความสะอาดผิวด้านนอกของดอกเห็ด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาผ่าออกเป็นสองซีก ใช้ forceps ปลายแหลมคีบเอาส่วนผนังชั้นในออกมาประมาณ 3-4 ชิ้น เก็บลงในหลอด Eppendorf เติม lysis buffer 400 µl [ 100mM Tris-HCl pH8.0, 100mM sodium EDTA pH8.0, 100mM sodium phosphate pH8.0, 1.5M NaCl, และ 1% CTAB] ตามด้วย 3µl ของ proteinaseK (10mg/ml) บดชิ้นเห็ดให้ละเอียด จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 30 นาที

2. เติม 20% SDS 45µl บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และกลับหลอดไปมาทุกๆ 15-20 นาที

3. ปั่นเหวี่ยงที่ 7000 rpm, 4°C เป็นเวลา 10 นาที

4. ย้ายสารละลายส่วนใสใส่ลงในหลอดใหม่ (บันทึกปริมาตรไว้ด้วย)

5. เติม lysis buffer 135 µlและ 20% SDS 15 µl ลงในตะกอน จากนั้นปั่นด้วย Vortex นาน 10 วินาที

6. บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที

7. ปั่นเหวี่ยงที่ 7000 rpm อุณหภมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

8. ย้ายสารละลายส่วนใสใส่รวมกับหลอดในขั้นตอนที่ 4 (บันทึกปริมาตรไว้ด้วย)

9. เติม Chloroform/Isoamyl alcohol (24:1, v/v) ลงในสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 8 ในอัตราส่วนที่เท่ากัน

10. ปั่นเหวี่ยงที่ 6500 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

11. เก็บสารละลายส่วนบนใสในหลอดใหม่ (บันทึกปริมาตรไว้ด้วย)

12. ตกตะกอน DNA ด้วย Isopropanol (cold) ปริมาตร 0.6 เท่า ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือข้ามคืน

13. ปั่นเหวี่ยงที่ 11,600 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาทีจากนั้นรินส่วนใสทิ้ง

14. ล้าง DNA pellet ด้วย 70% cold ethanol ปริมาตร 100 µl จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 11,600 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที รินส่วนใสทิ้ง

15. ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที

16. ละลาย DNA ด้วย TE sterile ปริมาตร 20 µlเก็บ DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20ºC เพื่อใช้ในการทำ PCR ต่อไปและวัดความเข้มข้นของ DNA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm หรือ run ใน agarose gel

*วิธีการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR และใช้ Primer AoR-AoF*

PCR mixture ประกอบด้วย (ปริมาตรรวม 50 µl)

| | | |
|---|---|---|
| DNA ตัวอย่าง | 1 | µl |
| 10x Tag buffer | 5 | µl |
| dNTP | 4 | µl |
| Ex Tag DNA pol. | 0.5 | µl |
| Ao R (10 pmol/µl) | 1 | µl |
| Ao F (10 pmol/µl) | 1 | µl |
| sterile deionized water | 37.5 | µl |

PCR cycles (program ITS)

| | | | |
|---|---|---|---|
| 94 °C | 5 | min | |
| 94 °C | 30 | sec | 30 cycles |
| 55 °C | 45 | sec | |
| 72 °C | 2 | min | |
| 72 °C | 1 | min | |
| 4 °C | forever | | |

นำดอกเห็ดเผาะหนังไปทำการแยกเชื้อเพื่อให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์เจริญอยู่บนอาหารวุ้น Potato Dextrose Agar (PDA) สำหรับตัวอย่างดอกเห็ดที่เหลือได้นำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม แล้วเก็บใส่กล่อง วางไว้ในอุณหภูมิห้อง เพื่อนำสปอร์ที่อยู่ภายในดอกเห็ดไปผสมน้ำ ใช้เป็นเชื้อสำหรับปลูกให้แก่กล้าไม้วงศ์ยางต่อไป

**2. การเพิ่มปริมาณเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดเผาะหนังเพื่อใช้เป็นเชื้อสำหรับปลูกให้แก่กล้าไม้วงศ์ยาง**

ได้ทำการเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์บนกระดาษแก้ว (cellophane) ที่ปูทับผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งบรรจุอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ PDA เนื่องจากผลการศึกษาในปีที่ 1 พบว่าเส้นใยของเห็ดเผาะที่แยกออกมาจากดอกเห็ดใหม่ๆ หรือแยกได้เป็นครั้งแรก สามารถเติบโตบน PDA ได้ดีกว่าบนอาหาร Modified Melin Norkrans (MMN) ในระยะเวลาที่เท่ากัน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ยประมาณ 40 มม. ในระยะเวลา 30 วัน อีกทั้งอาหาร PDA นั้น เตรียมง่ายและสะดวกต่อการปฏิบัติงาน

**3. วิธีการเพาะเมล็ดไม้**

ได้นำผลหรือเมล็ดไม้วงศ์ยางจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb.) พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) ตะเคียนทอง (*Hopea odorata* Roxb.) พลวง (*Dipterocarpus*

*tuberculatus* Roxb.) และไข่เขียว (*Parashorea stellata* Kurz.) อย่างละ 100 เมล็ดมาเพาะด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

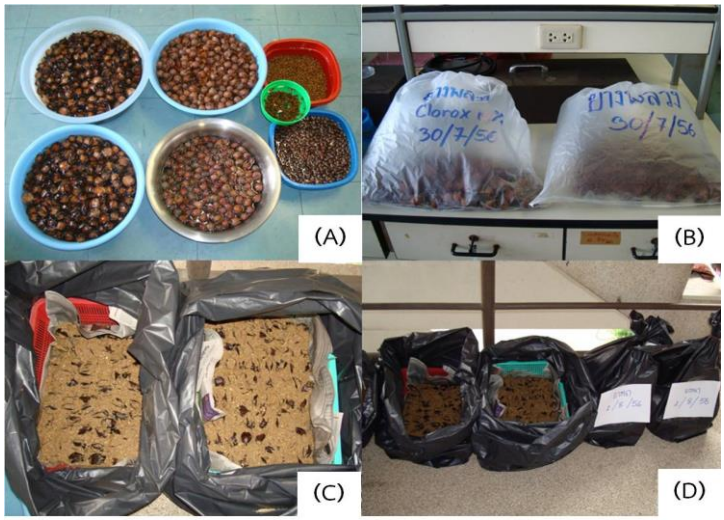
3.1 นำเมล็ดไปล้างด้วยน้ำประปาหลายๆ ครั้ง เพื่อให้เศษดินและสิ่งสกปรกอื่นๆ หลุดออกไปจนหมด แช่น้ำไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3-3A) แล้วรินน้ำทิ้ง

3.2 แบ่งเมล็ดไม้ที่แช่น้ำแล้วออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละเท่าๆ กัน

กลุ่มที่ 1 แช่ในสารละลาย Clorox 10% เป็นเวลา 10 นาที ล้าง Clorox ออกด้วยน้ำประปาในลักษณะน้ำไหล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2 แช่ในน้ำประปาในลักษณะน้ำไหล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.3 นำเมล็ดไม้ทั้งหมดขึ้นจากน้ำ โดยเมล็ดในแต่ละกลุ่มจะถูกแบ่งครึ่งอีกครั้งหนึ่ง ครึ่งแรกใส่ลงในถุงพลาสติกใส รัดปากถุงหลวมๆ เพื่อให้มีอากาศถ่ายเท (ภาพที่ 3-3B) แล้วนำไปใส่ในถุงพลาสติกดำอีกชั้นหนึ่ง ส่วนครึ่งที่สอง ฝังเมล็ดให้เรียงกันเป็นแถวในกระบะทรายที่ผ่านการรมควันฆ่าเชื้อแล้ว (ภาพที่ 3-3C) จากนั้นจึงนำกระบะทรายไปใส่ในถุงพลาสติกดำ รัดปากถุงพลาสติกดำของทั้งสองวิธีอย่างหลวม ๆ (ภาพที่ 3-3D)

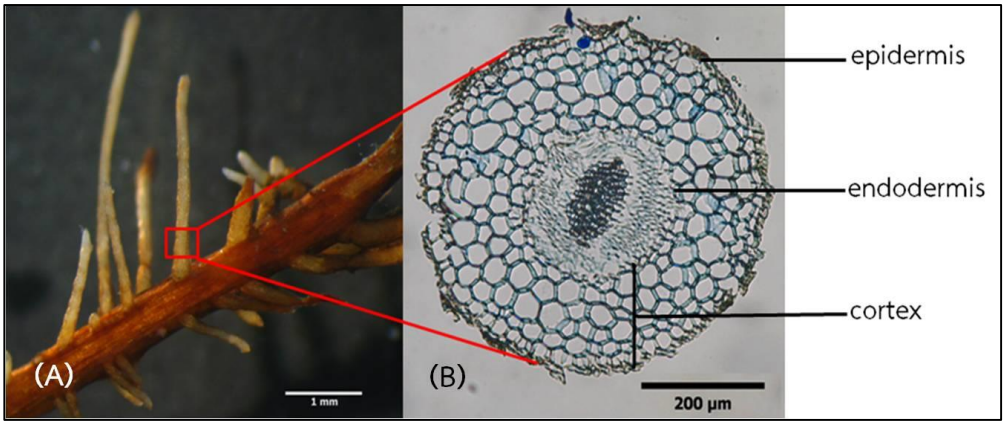



**ภาพที่ 3-3** ขั้นตอนการเพาะเมล็ดไม้วงศ์ยาง: A. แช่เมล็ดไม้ในน้ำประปา 24 ชั่วโมง B. นำเมล็ดไม้ใส่ลงในถุงพลาสติกใสที่รัดปากถุงอย่างหลวมๆ C. เพาะเมล็ดในกระบะทราย และ D. นำกระบะทรายใส่ในถุงพลาสติกดำที่รัดปากถุงอย่างหลวม ๆ

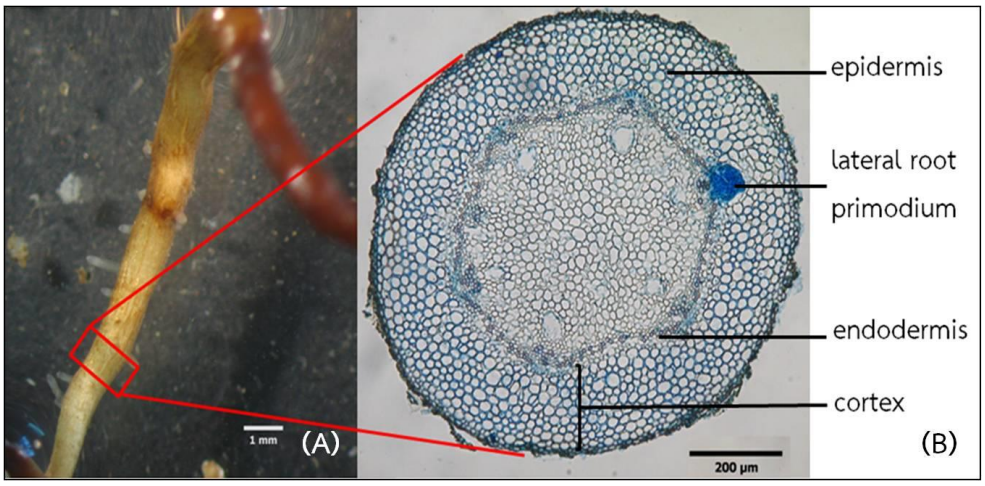
จากการสังเกตเมื่อผ่านไป 2-3 วัน เมล็ดที่ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย Clorox 10% และที่ไม่ฆ่าเชื้อที่ผิว มีเส้นใยและสปอร์ของราที่จัดเป็นพวก saprophyte ขึ้นบนเมล็ดบางเมล็ด และการเพาะเมล็ดแบบใส่ไว้ในถุงพลาสติกและแบบฝังในทรายที่ผ่านการรมควันฆ่าเชื้อแล้ว ให้ผลไม่แตกต่างกัน กล่าวคือ เมล็ดตะเคียนทองและเมล็ดยางนาไม่งอกเลย เมล็ดไข่เขียวรวมกันทั้ง 2 วิธี งอกเพียง 4 เมล็ด เมล็ดพลวง รวมกันทั้ง 2 วิธี งอกจำนวน 50 เมล็ด ส่วนเมล็ดพะยอมมีการงอกมากถึง 60 เมล็ด จึงทำให้มีเมล็ดไม้เพียง 2 ชนิด ที่งอกรากเพียงพอสำหรับใช้ในการวิจัยขั้นต่อไป การงอกในอัตราที่ต่ำของเมล็ดไม้วงศ์ยางนี้ เนื่องจากเมื่อเก็บเมล็ดมาแล้วไม่ได้เพาะในทันที ตามปกติแล้วเมล็ดไม้วงศ์ยางมีความมีชีวิตเพียง 10-15 วัน ภายหลังจากโปรยเมล็ด

**4. การตรวจรากที่เพิ่งงอกออกมาจากเมล็ดก่อนการปลูกเชื้อเห็ดเผาะ**

สุ่มรากพะยอมและพลวงที่เพิ่งงอกออกมาจากเมล็ด ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร มาตัดตามขวาง (cross section) ด้วยเครื่อง freezing microtome ให้เป็นแผ่นบางประมาณ 20 ไมโครเมตร ย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue แล้วนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope พบว่ารากพะยอมและพลวง ไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญอยู่เลย (ภาพที่ 3-4 และภาพที่ 3-5)




**ภาพที่ 3-4** รากพะยอมที่ไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ (A) รากแขนงที่งอกออกมาจากรากแก้ว (B) ภาพตัดตามขวางของราก

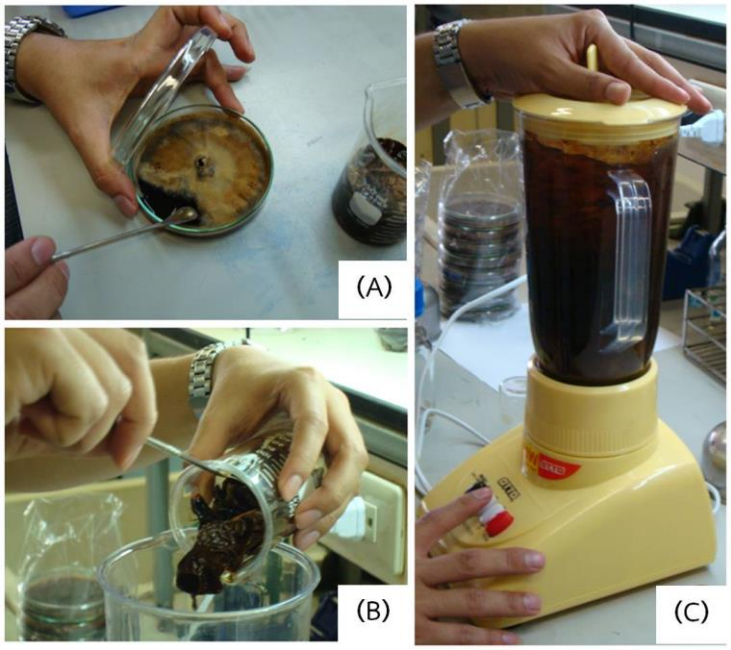



**ภาพที่ 3-5** รากพลวงที่ไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ (A) รากแก้วที่งอกออกมาจากเมล็ด (B) ภาพตัดตามขวางของราก

**5. วิธีการปลูกเชื้อเห็ดเผาะให้แก่กล้าไม้**

มี 3 วิธี ดังต่อไปนี้

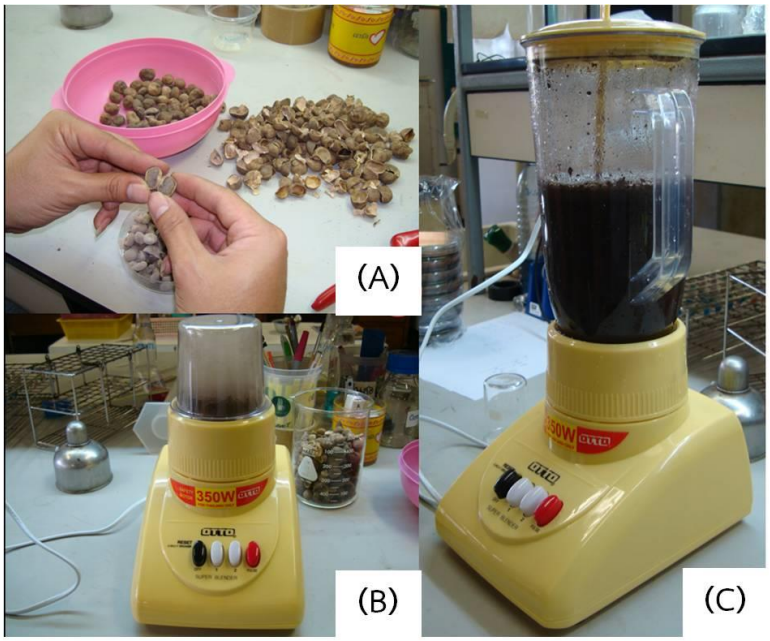
5.1 การปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยเส้นใย (hyphal suspension) นำเส้นใยบริสุทธิ์ อายุประมาณ 30 วัน ที่ขูดออกมาจากกระดาษแก้วผสมกับน้ำ โดยใช้ เส้นใย : น้ำ = 1 : 3 (V : V) ใส่ในถ้วยของเครื่องปั่น (blender) ปั่นเป็นเวลา 1 นาที (ภาพที่ 3-6) ได้สารแขวนลอยเส้นใย (hyphal suspension) ซึ่งเมื่อนำไปหาความเข้มข้น โดยการนับจำนวนเส้นใยที่หักเป็นชิ้นสั้นๆ ลอยอยู่ในน้ำ พบว่ามีความเข้มข้น 148.3 X $10^6$ ชิ้น/ml ทำการปลูกเชื้อโดยจุ่มรากของเมล็ดไม้ที่เพิ่งงอกลงใน hyphal suspension เพียงครู่เดียวก่อน แล้วจึงนำไปปลูกในวัสดุปลูก ตามด้วยการใส่ hyphal suspension ลงไปใกล้ๆ กับรากให้มากที่สุดในปริมาณ 25 มิลลิลิตร/ต้น (ภาพที่ 3-7)



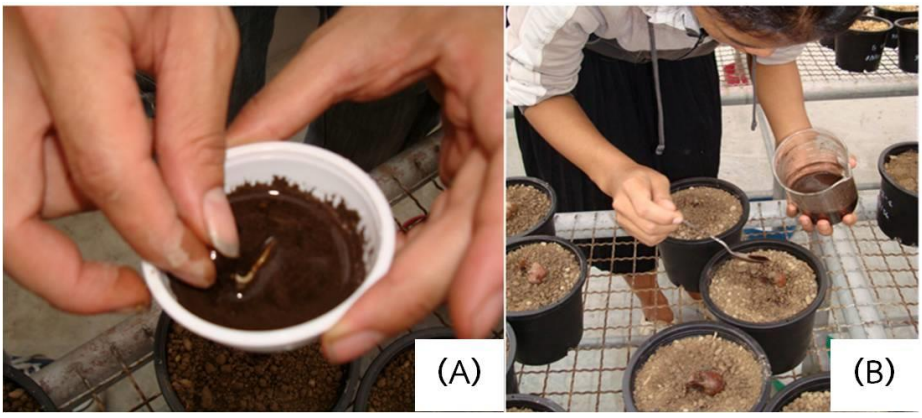

**ภาพที่ 3-6** ขั้นตอนการเตรียมสารแขวนลอยเส้นใย (hyphal suspension) ของเห็ดเผาะหนัง (A) ขูดเส้นใยออกจากกระดาษแก้ว (B) นำเส้นใยผสมกับน้ำใส่ลงในถ้วยของเครื่องปั่น และ (C) ปั่นเส้นใยเป็นเวลา 1 นาที

**ภาพที่ 3-7** (A) จุ่มรากของเมล็ดไม้ลงใน hyphal suspension (B) นำไปปลูกในวัสดุปลูก แล้วใส่ hyphal suspension ปริมาณ 25 มิลลิลิตร/ต้น ลงไปใกล้ๆ กับราก

5.2 การปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) นำดอกเห็ดเผาะหนังมาแกะเปลือกนอกทิ้งไป เก็บส่วนของสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยเปลือกในไว้ นำไปปั่นให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) โดยใช้ สปอร์ : น้ำ = 1 : 9 (V:V) ใส่ในเครื่องปั่น ปั่นเป็นเวลา 1 นาที ได้ spore suspension ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 158 X $10^6$ spores /ml (ภาพที่ 3-8) ทำการปลูกเชื้อ โดยนำรากของเมล็ดไม้ที่เพิ่งงอกจุ่มลงใน spore suspension เพียงครู่เดียวก่อน จากนั้นจึงนำไปปลูกในวัสดุปลูก ตามด้วยการใส่ spore suspension ลงไปให้ใกล้กับรากมากที่สุด ในปริมาณ 25 มิลลิลิตร/ต้น (ภาพที่ 3-9)




**ภาพที่ 3-8** ขั้นตอนการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเห็ดเผาะหนัง (A) แกะเปลือกนอกที่หุ้มดอกเห็ดทิ้ง (B) นำส่วนของสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยเปลือกในไปปั่นให้เป็นผงละเอียด และ (C) นำผงสปอร์ผสมกับน้ำแล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 1 นาที




**ภาพที่ 3-9** (A) จุ่มรากของเมล็ดไม้ลงใน spore suspension (B) นำไปปลูกในวัสดุปลูก แล้วใส่ spore suspension ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ลงไปใกล้ๆ กับราก

5.3 ไม่ปลูกเชื้อเห็ด สำหรับใช้เป็นทรีตเมนท์ควบคุม (control) โดยนำรากของเมล็ดไม้ที่เพิ่งงอกจุ่มลงในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วก่อน จากนั้นนำไปปลูกในวัสดุปลูกตามด้วยการใส่น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปให้ใกล้ๆ กับรากมากที่สุด ในปริมาณเท่ากับ 25 มิลลิลิตร/ต้น

**6. การวางแผนการทดลอง**

การวิจัยครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง คือ

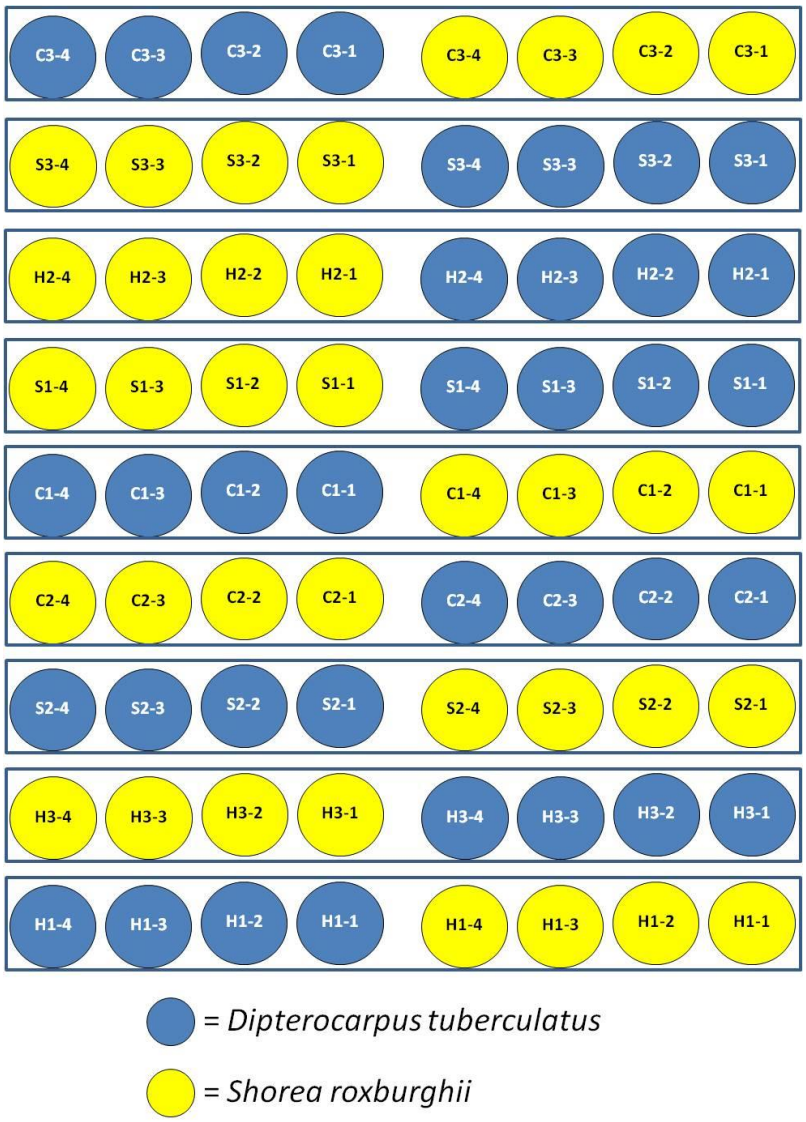
**6.1 การทดลองที่ 1: การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้พลวง (*D. tuberculatus* Roxb.) และกล้าไม้พะยอม (*S. roxburghii* G. Don) ต่อการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการ 3 วิธี**

ใช้วัสดุปลูกเป็นดินที่รมควันฆ่าเชื้อด้วย methyl bromide แล้ว โดยเป็นดินที่ขุดในระดับความลึก 0-10 ซม. จากสถานีวิจัยวนศาสตร์พังงา อ. ตะกั่วป่า จ. พังงา ดินนี้มีปริมาณธาตุอาหารส่วนใหญ่ต่ำ ดังแสดงในตารางผนวกที่ 1 ได้วางแผนการทดลองแบบ 3x2 Split plot in Completely Randomized Design โดยมีวิธีการปลูกเชื้อ 3 วิธี (ข้อ 5.1, 5.2, 5.3) เป็น main plot และกล้าไม้วงศ์ยาง 2 ชนิด คือ ตะเคียนทองและพลวง เป็น sub plot แต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ และแต่ละซ้ำมีกล้าไม้ 4 ต้น ดังนั้นจึงมีกล้าไม้แต่ละชนิดจำนวน 36 ต้น และมีกล้าไม้รวมกันทั้งหมด 72 ต้น

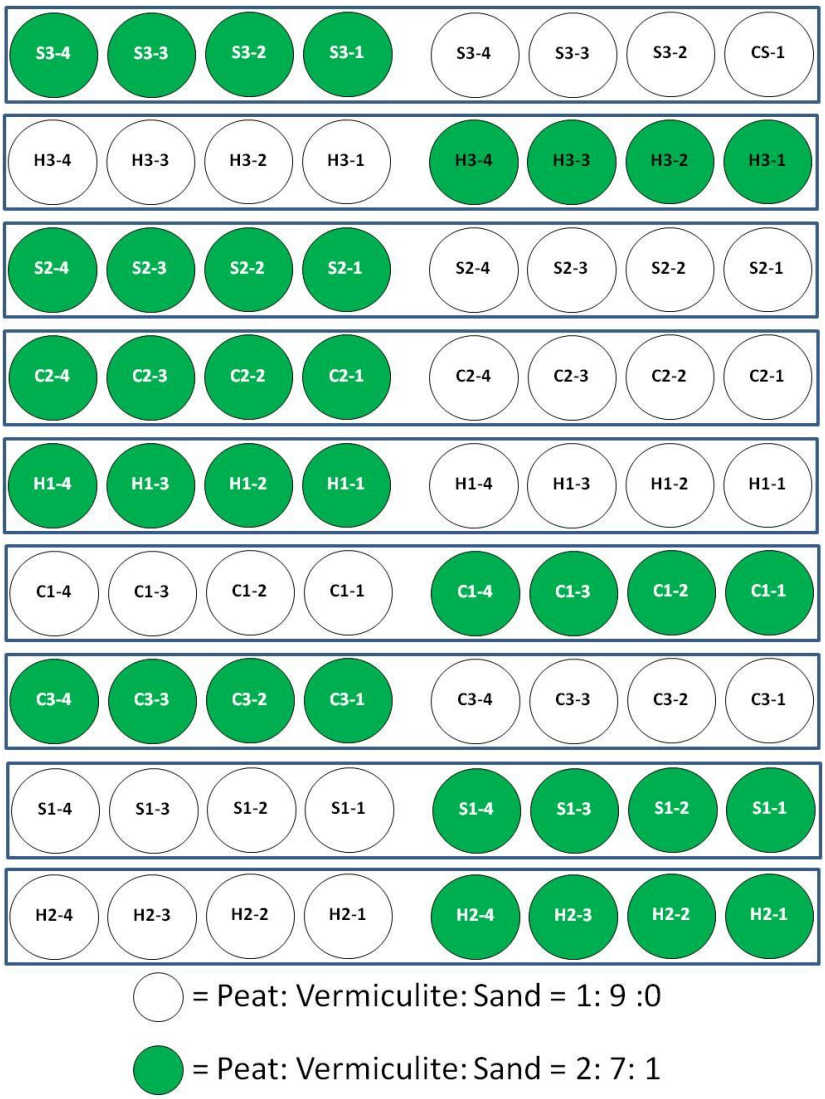
**6.2 การทดลองที่ 2: การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกในวัสดุปลูก (Planting medium) 2 สูตร ต่อการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการ 3 วิธี**

ได้วางแผนการทดลองแบบ 3x2 Split plot in Completely Randomized Design โดยมีวิธีการปลูกเชื้อ 3 วิธี (ข้อ 5.1, 5.2, 5.3) เป็น main plot และวัสดุปลูกที่ไม่รมควันฆ่าเชื้อที่มีส่วนประกอบแตกต่างกัน 2 สูตร คือ Peat:Vermiculite:Sand = 1:9:0 และ Peat: Vermiculite:Sand = 2:7:1 (V:V:V) เป็น sub plot โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ และแต่ละซ้ำมีกล้าไม้ 4 ต้น ดังนั้นจึงมีกล้าไม้พะยอมที่ปลูกในวัสดุปลูกแต่ละสูตรจำนวน 36 ต้น รวมเป็นกล้าไม้พะยอมทั้งหมด 72 ต้น สำหรับวัสดุปลูกทั้ง 2 สูตร ได้ส่งไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารที่ห้องปฏิบัติการดินป่าไม้ ภาควิชาวนวัฒนวิทยา คณะวนศาสตร์

แผนผังการวางกล้าไม้ของการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 แสดงไว้ในภาพที่ 3-10 และภาพที่ 3-11 ตามลำดับ



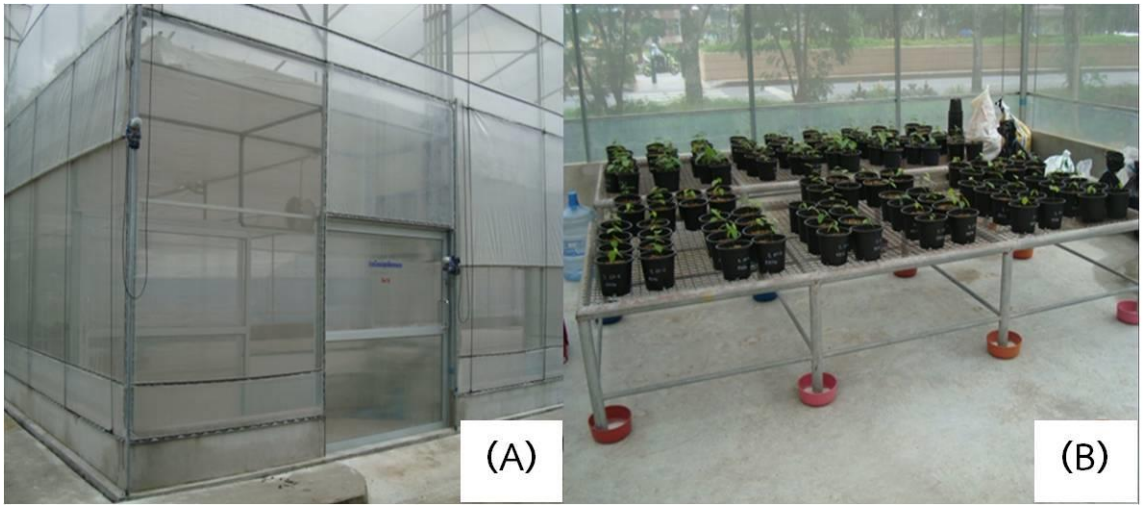

**ภาพที่ 3-10** แผนผังการวางกล้าไม้ในการทดลองที่ 1 (C = control, H = hyphal suspension inoculation, S = spore suspension inoculation)




**ภาพที่ 3-11** แผนผังการวางกล้าไม้ในการทดลองที่ 2 (C = control, H = hyphal suspension inoculation, S = spore suspension inoculation)

การทดลองทั้งสองการทดลองได้กระทำภายในเรือนเพาะชำกล้าไม้ที่ผนังประกอบด้วยตาข่ายละเอียดป้องกันแมลง ของภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยวางกล้าไม้ของแต่ละการทดลองแยกกันการทดลองละโต๊ะ ได้ทำการโรยปูนขาวรอบขาโต๊ะที่ใช้วางกล้าไม้ เพื่อป้องกันแมลงด้วย (ภาพที่ 3-12)

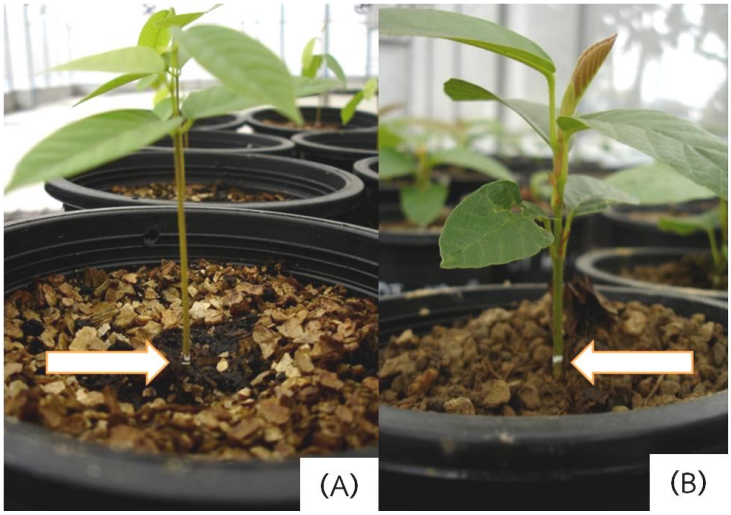
สำหรับน้ำที่ใช้รดกล้าไม้เป็นน้ำดื่มที่ผลิตจำหน่ายแบบอุตสาหกรรม โดยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่อาจมากับน้ำ และรดน้ำในปริมาณเท่ากันทุกต้น/วัน



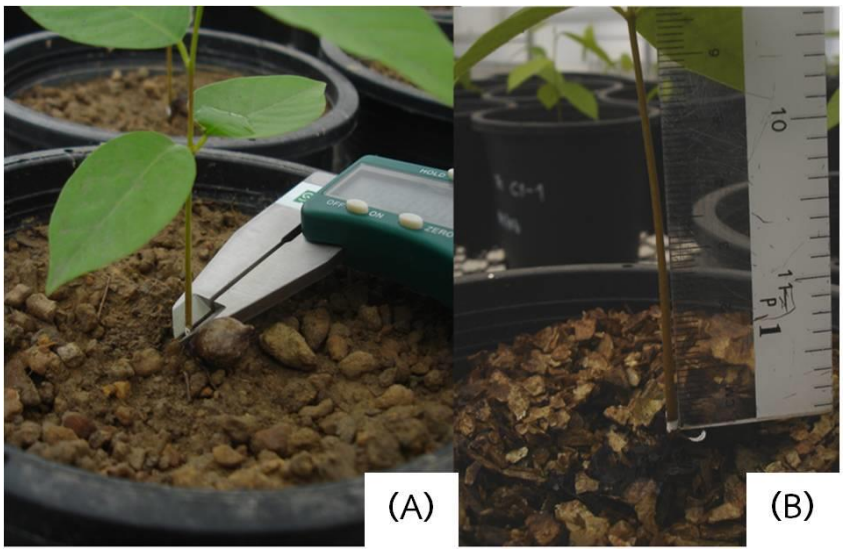

**ภาพที่ 3-12** (A) ลักษณะของเรือนเพาะชำกล้าไม้ที่มีผนังเป็นตาข่ายละเอียด และ (B) การวางกล้าไม้บนโต๊ะที่ขาโต๊ะมีปูนขาวโรยเพื่อป้องกันแมลง

## 7. การวัดการเติบโตของกล้าไม้

ทำการวัดการเติบโตทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางและความสูงครั้งแรกเมื่อกล้าไม้อายุครบ 1 เดือน โดยทำเครื่องหมายไว้ที่ลำต้นของกล้าไม้ในระดับผิวดินด้วยปากกาหมึกน้ำมันสีขาว (ภาพที่ 3-13) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ใช้เป็นจุดในการวัดการเติบโตทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางของกล้าไม้ และเป็นจุดเริ่มต้นของการวัดความสูงไปทางปลายยอดของทุกเดือน (ภาพที่ 3-14) จากนั้นวัดการเติบโตเดือนละ 1 ครั้ง จนกล้าไม้มีอายุครบ 8 เดือน




**ภาพที่ 3-13** บริเวณลำต้นระดับผิวดินที่ทำเครื่องหมายด้วยปากกาหมึกน้ำมันสีขาว เป็นจุดที่ใช้วัดการเติบโตของกล้าไม้: (A) พะยอม (B) พลวง




**ภาพที่ 3-14** การวัดการเติบโตของกล้าไม้จากจุดที่ทำเครื่องหมาย (A) เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น และ (B) ความสูงของกล้าไม้

## 8. การตรวจรากของกล้าไม้ที่ได้รับการปลูกราเอคโตไมคอร์ไรซา

8.1 การตรวจลักษณะทางสัณฐานและกายวิภาคของราก

เมื่อกล้าไม้อายุครบ 8 เดือน ได้สุ่มกล้าไม้ทรีทเมนต์ละ 3 ต้น โดยสุ่ม 1 ต้นจาก 1 ซ้ำ ดังนั้นการทดลองที่ 1 จึงสุ่มกล้าไม้แต่ละชนิดจำนวน 9 ต้น รวมกล้าไม้ทั้งหมด 18 ต้น ส่วนการทดลองที่ 2 ได้สุ่มกล้าไม้ที่ปลูกในวัสดุปลูกแต่ละสูตรจำนวน 9 ต้น รวมกล้าไม้ทั้งหมด 18 ต้น จากนั้นได้เก็บตัวอย่างรากของกล้าไม้เหล่านี้โดยใช้ soil core ขนาด 2 ซม. X 15 ซม. เจาะลงไปในดินบริเวณใกล้โคนต้น 3 soil cores/ต้น แล้วนำรากที่ปนอยู่ในดินไปล้างน้ำจนสะอาดด้วยความระมัดระวังและอย่าให้รากขาด นำรากที่ล้างสะอาดแล้วไปตรวจลักษณะสัณฐานของรากด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด dissecting microscope อธิบายและถ่ายรูปรากที่ไม่มีและมีเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละแบบ (morphotype) แล้วจึงนำปลายรากไปตัดตามขวางให้มีความบาง 12-15 ไมโครเมตร ด้วยเครื่อง freezing microtome เพื่อตรวจลักษณะทางกายวิภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope พร้อมทั้งถ่ายรูป

8.2 การระบุชนิดราที่อยู่ร่วมกับรากเอคโตไมคอร์ไรซาด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

ดำเนินการตามวิธีที่มีชื่อเรียกว่า การระบุชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาโดยตรงด้วยเทคนิค PCR (Direct identification of ectomycorrhiza by PCR technique) ตาม Iotti & Zambonelli (2006) ดังต่อไปนี้

8.2.1 หลังจากที่ทำความสะอาดรากเอคโตไมคอร์ไรซาด้วยน้ำ ได้ใช้พู่กันเขี่ยเศษดินบนผิวรากออกภายใต้กล้องสองตา แล้วจึงใช้ปากคีบคีบปลายรากเอคโตไมคอร์ไรซาแบบละ 2 ปลายราก/ซ้ำ/ทรีทเมนต์ไปสกัด DNA โดยนำปลายรากใส่ในหลอด PCR ที่บรรจุสารละลาย (PCR mixture) 25 µl ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้

Dream Tag Green PCR Master Mix 12.5 µl

| | |
|---|---|
| น้ำกลั่น | 7.0 µl |
| BSA | 2.0 µl |
| DMSO | 1.5 µl |
| ไพรเมอร์ ITS1F (forward) | 1.0 µl |
| ไพรเมอร์ ITS4 (reverse) | 1.0 µl |

8.2.2 นำหลอด PCR ที่มีปลายรากและส่วนผสมข้างต้นใส่เครื่อง Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (amplified) ดังนี้

วงจรที่ 1 94 °C 5 นาที (initial denaturation )

วงจรที่ 2 94 °C 1 นาที (denaturation )
55 °C 1 นาที (annealing )
72 °C 2 นาที (extension )
} 35 รอบ

วงจรที่ 3 72 °C 10 นาที )

วงจรที่ 4 4 °C

เมื่อครบจำนวนรอบของปฏิกริยา PCR ที่กำหนดได้นำ PCR product ไปตรวจวิเคราะห์ขนาดของชิ้น DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis

8.2.3 ชั่ง agarose gel 0.8 g ผสมกับ 0.5 X TBE buffer 100 µl นำมาหลอมให้ละลายด้วยความร้อน แล้วเทลงใน gel apparatus เมื่อเจลแข็งตัว นำมาใส่ใน electrophoresis chamber เท 0.5 X TBE buffer ลงให้ท่วมแผ่นเจล นำ PCR Product 5 µl ผสมกับ 6X loading dye 1 µl ใส่ในหลุมเจล แล้วนำไปเข้าเครื่อง electrophoresis ที่ 100 V เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย ethidiumbromide (0.1 µg/ml) นาน 10 นาที แล้วล้างน้ำเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจดูเจลด้วยเครื่อง UV transilluminator เทียบเคียงแถบ DNA ที่ปรากฏกับ DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder, Invitrogen ) บันทึกภาพด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

8.2.4 นำ PCR product ที่มีชิ้น DNA ขนาดที่ต้องการมาทำให้บริสุทธ์ (purify) โดยเติมส่วนผสมของ Fast AP และ Exo I 3 µl จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ดังนี้

วงจรที่ 1 94 °C 5 นาที (initial denaturation )

วงจรที่ 2 94 °C 1 นาที (denaturation )

55 °C 1 นาที (annealing )

8.2.5 นำ PCR product ที่มีชิ้น DNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Marcogen (Marcogen Korea) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรวจสอบแล้วไปเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆ ในฐานข้อมูล ได้แก่ UNITE, DDBJ และ GenBank โดยใช้โปรแกรม

BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดจำแนกชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซา ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

**9. การนับเปอร์เซ็นต์เข้าอยู่อาศัยของราเอคโตไมคอร์ไรซา**

ตัดรากที่ล้างทำความสะอาดแล้วเป็นท่อนยาวประมาณ 1 ซม. วางให้กระจายอย่างสม่ำเสมอในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำอยู่เล็กน้อย และที่ก้นจานเลี้ยงเชื้อมีช่องตารางสี่เหลี่ยมขีดไว้เต็มพื้นที่ โดย 1 ช่องมีขนาด 1 ตร.ซม. นับจำนวนรากที่มีและไม่มีเอคโตไมคอร์ไรซาที่พาดอยู่บนเส้นทั้งตามขวางและตามยาวของตาราง จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซา (Brundrett *et al.*, 1996)

**10. การแยกราที่อยู่ร่วมกับรากเอคโตไมคอร์ไรซา และเม็ด sclerotium ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture)**

นำรากเอคโตไมคอร์ไรซาและเม็ด sclerotium ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกในวัสดุปลูกสูตร 2 (Peat : Vermiculite : Sand = 2 : 7 : 1) และปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยสารแขวนลอยสปอร์ ตัวอย่างที่ PM2S1-4 มาทำการแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ดังนี้

10.1 ใช้ forceps คีบปลายรากเอคโตไมคอร์ไรซาจำนวน 20 ราก และเม็ด sclerotium จำนวน 20-30 เม็ด ภายใต้กล้อง dissecting microscope ใส่ลงในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

10.2 ทำความสะอาดผิวของรากเอคโตไมคอร์ไรซา และเม็ด sclerotium โดยดัดแปลงวิธีการของ Lee *et al.* (2008) คือ ย้ายรากเอคโตไมคอร์ไรซาซึ่งมีความยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร และเม็ด sclerotium จากน้ำกลั่นไปแช่ใน sodium hyperchlorite เข้มข้น 1% ปริมาณ 500 µl ที่บรรจุใน Eppendorf ขนาด 1.5 ml ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,400 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที โดยรากและเม็ด sclerotium ยังคงรูปร่างเช่นเดิม จากนั้นดูดสารละลาย sodium hyperchlorite ออก เติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 500 µl เพื่อล้างรากและเม็ด sclerotium เขย่า แล้วดูดน้ำกลั่นออก จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปล้างอีก ทำซ้ำเช่นนี้รวมกันทั้งหมด 10 ครั้ง

10.3 นำรากเอคโตไมคอร์ไรซาและเม็ด sclerotium ที่ทำความสะอาดผิวเรียบร้อยแล้ว วางบนกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อซับน้ำกลั่นให้แห้ง จากนั้นใช้ forceps ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว คีบรากเอคโตไมคอร์ไรซาและเม็ด sclerotium ไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

10.4 ตรวจดูลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำเส้นใยบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากเอคโตไมคอร์ไรซาและเม็ด sclerotium ไปสกัดดีเอ็นเอ เพื่อระบุชนิดราด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล โดยใช้ PrepMan Ultra Reagent Kit ดังวิธีการต่อไปนี้

10.4.1 ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดชิ้นวุ้นขอบโคโลนี ขนาด 1 X 1 เซนติเมตร ใส่ใน Eppendorf ซึ่งบรรจุสารละลาย PrepMan Ultra Reagent 50 µl

10.4.2 บดชิ้นวุ้นให้ละเอียดด้วย pestle จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง Vortex 10-30 วินาที เพื่อให้ผสมเข้ากัน

10.4.3 นำหลอด Eppendorf ไปบ่มใน Block heater ที่ 100 $^{O}$C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที

10.4.4 ดูดส่วนใส (supernatant) ใส่ในหลอด Eppendrof หลอดใหม่ แล้วนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ต่อไป

10.4.5 ทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยการดูดสารละลาย DNA 2 µl ใส่ในหลอด PCR ที่บรรจุสารละลาย PCR mixture จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โดยส่วนผสมของ PCR mixture เหมือนกับข้อ 8.2.1 สำหรับอุณหภูมิและเวลาการเพิ่มปริมาณ DNA เช่นเดียวกันกับข้อ 8.2.2

10.4.6 ตรวจวิเคราะห์ขนาดของชิ้น DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วนำ PCR product มาทำให้ DNA บริสุทธิ์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีการข้อ 8.2.3, 8.2.4 และ 8.2.5 ตามลำดับ

**หมายเหตุ**
- น้ำกลั่น กระดาษกรอง Eppendorf และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 120 $^{O}$C เป็นเวลา 20 นาที
- จานเลี้ยงเชื้อ ได้ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง hot air oven ที่อุณหภูมิ 160-180 $^{O}$C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

## 11. การชั่งหาน้ำหนักแห้งของกล้าไม้

ล้างรากทั้งหมดของกล้าไม้ให้สะอาดปราศจากดินและเศษซากอื่นๆ อย่างระมัดระวังไม่ให้รากขาด จากนั้นตัดแยกส่วนยอดและส่วนของรากออกจากกัน แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ จากนั้นชั่งน้ำหนักแห้งส่วนยอดที่อยู่เหนือดินและน้ำหนักแห้งส่วนรากของกล้าไม้แต่ละต้น

## 12. การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารของกล้าไม้

ส่งตัวอย่างแห้งของกล้าไม้ทั้งหมดไปวิเคราะห์ธาตุอาหารพืชที่ห้องปฏิบัติการดินป่าไม้ ภาควิชาวนวัฒนวิทยา คณะวนศาสตร์ โดยการวิเคราะห์ธาตุคาร์บอนและไนโตรเจนในเนื้อเยื่อพืชใช้วิธีการ dry combustion method (Jackson, 1965) ส่วนฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมใช้วิธีการของ Jackson (1958)

## 13. การวิเคราะห์ข้อมูลการเติบโตของกล้าไม้

นำค่าเฉลี่ยการเติบโตที่เพิ่มขึ้น ได้แก่ ความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางคอราก เปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซา น้ำหนักแห้งส่วนยอด น้ำหนักแห้งส่วนราก และน้ำหนักแห้งรวม และปริมาณธาตุอาหารพืช ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Two-Way Analysis of Variance ถ้ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Tukey's Test ($P$<0.05)

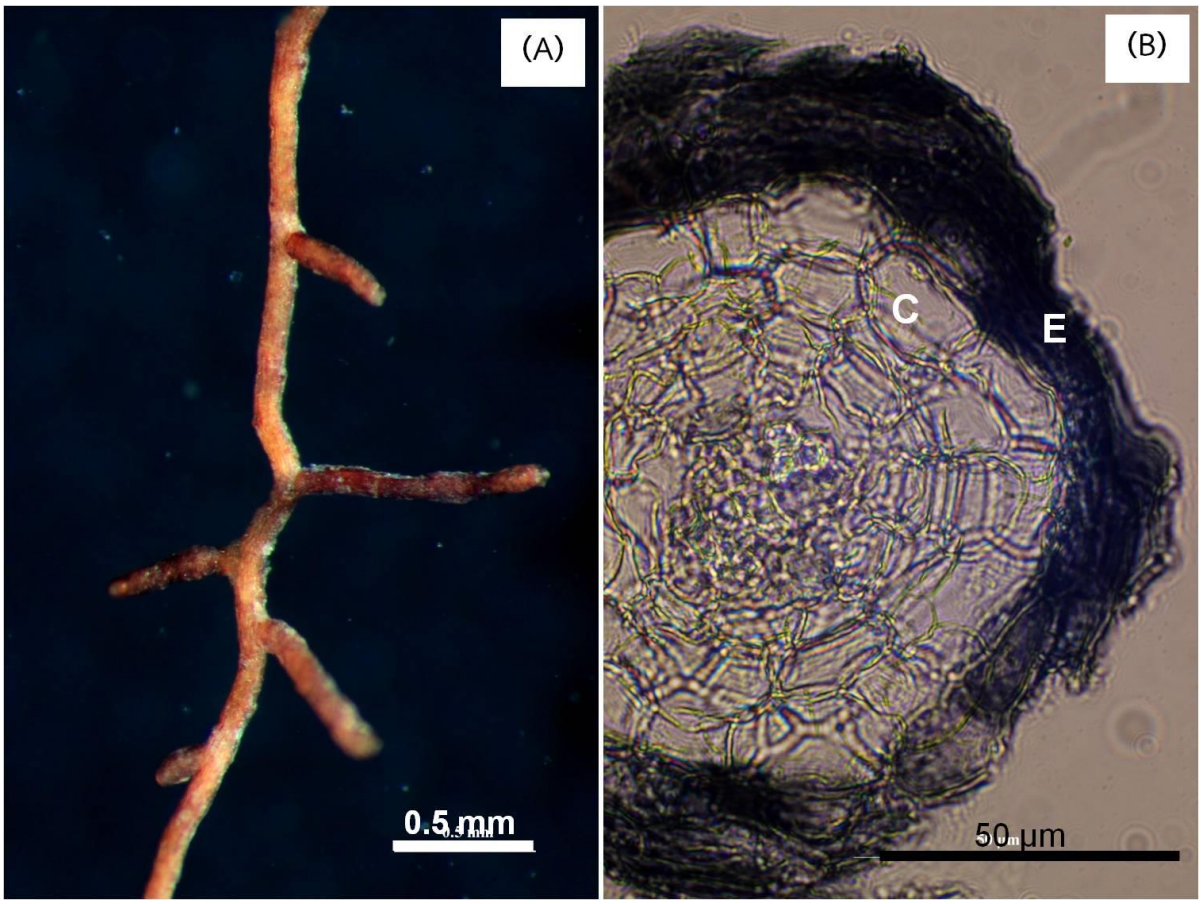
# บทที่ 4
# ผลการวิจัย

**การทดลองที่ 1 การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้พลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.) และกล้าไม้พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) ต่อการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง**

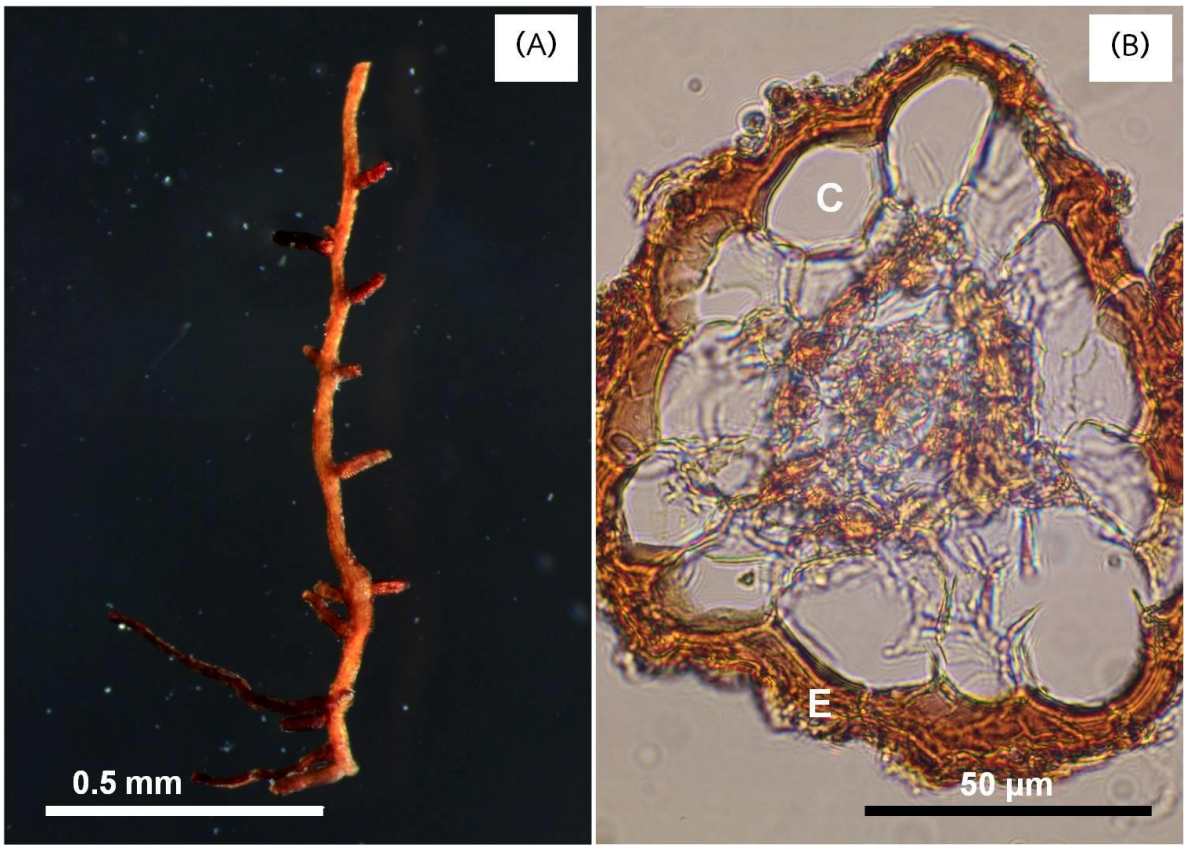
**1. ลักษณะสัณฐานและกายวิภาคของราก**

**1.1 รากที่ไม่มีเอคโตไมคอร์ไรซา**

กล้าไม้พลวงและพะยอมที่ไม่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังมีลักษณะทางสัญฐานเหมือนกัน กล่าวคือ รากแขนงเรียวเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางรากเล็กกว่ารากเอคโตไมคอร์ไรซา 1-1.5 เท่า รากมีการแตกแขนงน้อยมาก ผิวรากเรียบ สีน้ำตาลอ่อนและไม่มีเส้นใยของราพันอยู่รอบนอกของปลายรากแขนง (ภาพที่ 4-1A และ 4-2A) สำหรับลักษณะทางกายวิภาครากที่ไม่มีเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ทั้งสองชนิดนั้น รากมีชั้นของเซลล์ผิวที่มีผนังหนา ไม่พบแผ่นแมนเทิลและเส้นใยฮาร์ติกเน็ท (ภาพที่ 4-1B และ 4-2B)



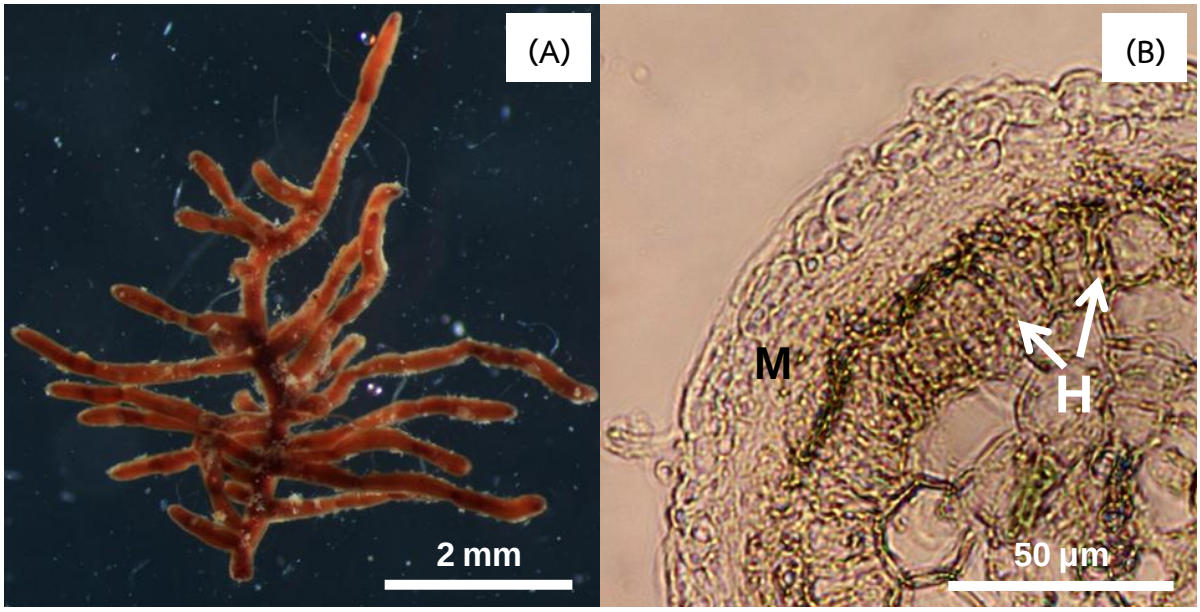

**ภาพที่ 4-1** ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่ไม่มีเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พลวง (C= cortex, E= epidermis)




**ภาพที่ 4-2** ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่ไม่มีเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอม (C= cortex, E= epidermis)

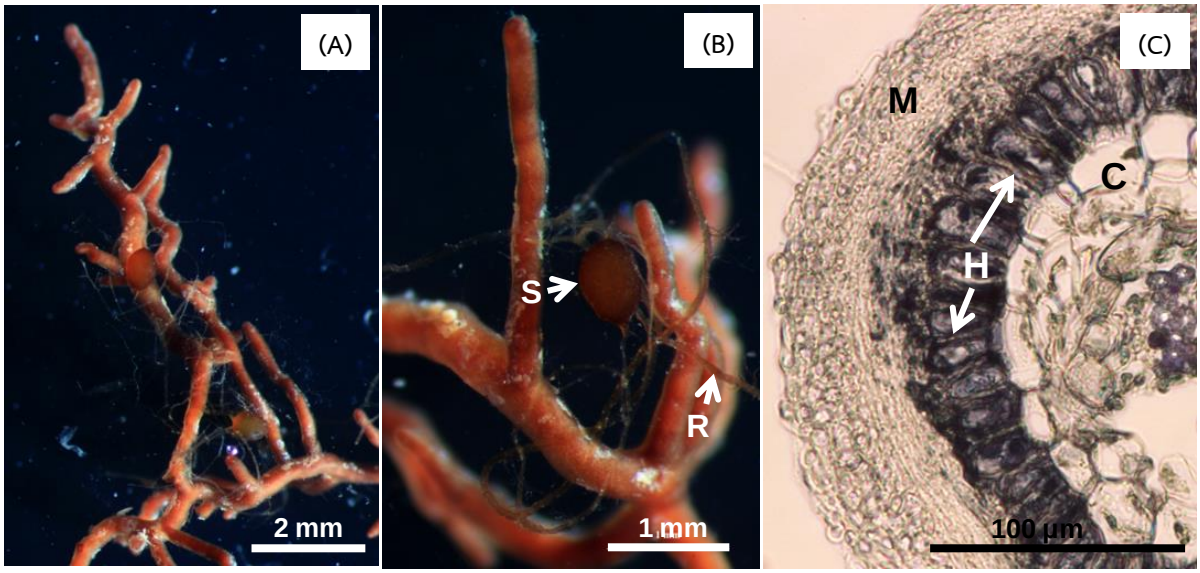
**1.2 รากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซา**

รากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พลวงที่ปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยเส้นใยบริสุทธิ์และสปอร์เห็ดเผาะหนังมีลักษณะทางสัณฐาน 1 แบบ คือ รากแตกแขนงแบบ irregular pinnate สีครีมถึงสีน้ำตาลอ่อน ผิวเรียบและมัน พบ rhizomorph สีน้ำตาลอ่อนพันรอบราก และ sclerotium เจริญเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 4-3A) ส่วนลักษณะทางกายวิภาคของรากพบว่า มีแผ่นแมนเทิลเจริญอยู่ล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยใสไม่มีสีเรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma หนา 20-30 ไมโครเมตร และมีเส้นใยฮาร์ติกเน็ท ซึ่งเป็นเส้นใยผนังบางเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้น (ภาพที่ 4-3B)




**ภาพที่ 4-3** ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พลวงที่ปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยเส้นใยบริสุทธิ์และสปอร์เห็ดเผาะหนัง (H= Hartig net, M= mantle)

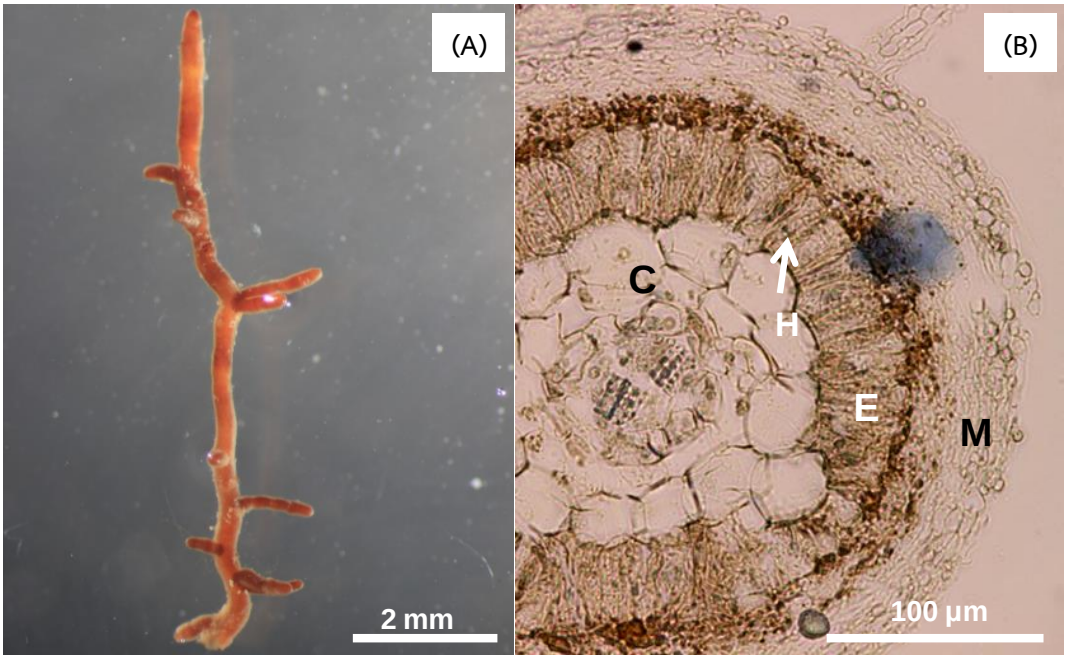
สำหรับรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดเผาะหนังมีลักษณะทางสัณฐาน 1 แบบ คือ รากแตกแขนงแบบ irregular pinnate สีน้ำตาลปนส้มถึงสีน้ำตาลเข้ม ผิวเรียบมีความมัน พบ rhizomorph สีน้ำตาลอ่อน เจริญพันรอบราก (ภาพที่ 4-4A) และมี sclerotium สีน้ำตาลเข้มหรือน้ำตาลปนดำ รูปทรงรี ผิวเรียบเป็นมัน เกิดปนกับรากจำนวนมาก (ภาพที่ 4-4B) ส่วนลักษณะทางกายวิภาคของรากพบว่า มีแผ่นแมนเทิลเจริญอยู่ล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยใสไม่มีสีเรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma หนา 50-70 ไมโครเมตร ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นนอกหนา 20-30 ไมโครเมตร ประกอบด้วยเซลล์ขนาดใหญ่ เรียงตัวอย่างหลวม ๆ ส่วนชั้นในหนา 10-20 ไมโครเมตร ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็ก เรียงตัวติดกันแน่น มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิวจำนวน 1 ชั้น (ภาพที่ 4-4C)



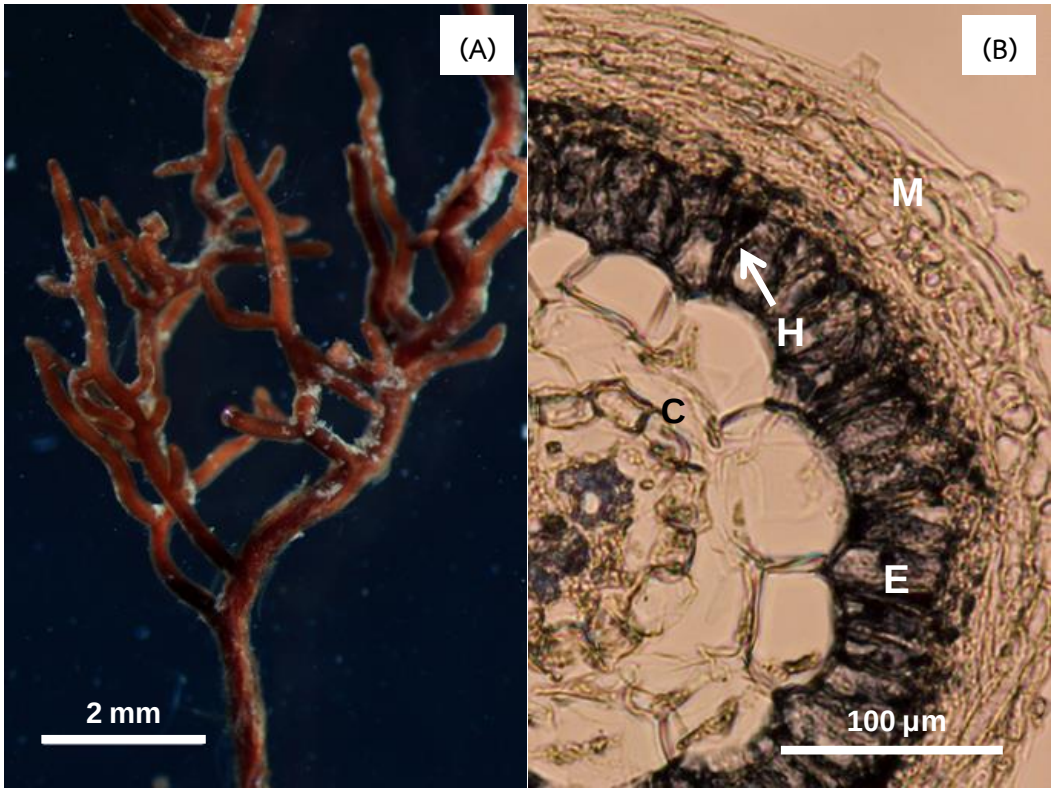

**ภาพที่ 4-4** ลักษณะสัณฐาน (A) เม็ด sclerotium และ rhizomorph (B) และลักษณะทางกายวิภาค (C) ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเห็ดเผาะหนัง (C= cortex, H= Hartig net, M= mantle, R= rhizomorph, S= sclerotium)

รากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนังมีลักษณะทางสัณฐาน 2 แบบ ดังนี้ แบบที่ 1 รากแตกแขนงแบบ monopodial pinnate สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลปนส้ม ผิวเรียบมีความมัน พบ rhizomorph สีน้ำตาลอ่อน เจริญพันกับราก (ภาพที่ 4-5A) และมีลักษณะทางกายวิภาค คือ มีแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยใสไม่มีสี เรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma หนา 30-50 ไมโครเมตร ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นนอกหนา 5-10 ไมโครเมตร ประกอบด้วยเซลล์ขนาดใหญ่ เรียงตัวอย่างหลวม ๆ ส่วนชั้นในหนา 15-30 ไมโครเมตร ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็ก เรียงตัวติดกันแน่น มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้น (ภาพที่ 4-5B)

ส่วนแบบที่ 2 รากแตกแขนงแบบ irregular pinnate มีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกับรากเอคโตไมคอร์ไรซาแบบที่ 1 ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนัง แต่มีสีน้ำตาลเข้มถึงสีน้ำตาลบนดำ (ภาพที่ 4-6A) และมีลักษณะทางกายวิภาคแตกต่างกัน กล่าวคือ รากมีแผ่นแมนเทิลเจริญอยู่ล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลที่บางกว่า จำนวน 1ชั้น โดยมีความหนา 25 ไมโครเมตร มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้น (ภาพที่ 4-6B)




**ภาพที่ 4-5** ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาแบบที่ 1 ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนัง (C= cortex, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle)




**ภาพที่ 4-6** ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาแบบที่ 2 ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนัง (C= cortex, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle)

## 2. ชนิดและเปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซา

### 2.1 ชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซา

จากการตรวจรากเอคโตไมคอร์ไรซาเพื่อตัดปลายรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีรูปร่างหรือ morphotype ไม่เหมือนกัน morphotype ละ 2 ปลายราก/ซ้ำ/ทรีทเมนต์ นั้นพบว่ากล้าไม้พลวงที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยบริสุทธิ์และสปอร์เห็ดเผาะหนังมีรูปแบบของรากเอคโตไมคอร์ไรซาเพียง 1 แบบ จึงได้ตัดปลายรากมาทั้งหมด 12 ปลายราก ซึ่งสามารถสกัดและเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR ได้ทุกปลายราก แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง (direct sequencing) พบว่ามี 10 ปลายราก ที่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างถูกต้องชัดเจน และอีก 2 ปลายราก ไม่สามารถอ่านได้ เนื่องจากมีลักษณะของ double peaks เกิดขึ้นในบางช่วง เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI Homepage พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่อยู่กับปลายรากจำนวน 8 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 80 มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเห็ดเผาะหนังที่มีรายงานในฐานข้อมูลร้อยละ 95-97 (ตารางที่ 4-1) ในขณะที่อีก 2 ปลายราก มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Talaromyces verruculosus* ซึ่งเป็นราที่พบได้ทั่วไปทั้งในดินและในอากาศ แต่ไม่ใช่ราเอคโตไมคอร์ไรซา ทั้งนี้เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ใช้ universal primers ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของราเอคโตไมคอร์ไรซา ซึ่งไม่มีความจำเพาะเจาะจง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในราทั้ง Basidiomycetes และ Ascomycetes ดังนั้น primer คู่นี้จึงไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของรา *T. verruculosus* ซึ่งปนเปื้อนอยู่กับรากในปริมาณมาก

สำหรับรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดเผาะหนังมี 1 แบบ และได้สุ่มรากมา 4 ปลายราก ในขณะที่กล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนังมี 2 รูปแบบ แบบที่ 1 รากแตกแขนงแบบ monopodial pinnate ได้สุ่มปลายรากมาทั้งหมด 4 ราก ส่วนรากแบบที่ 2 แตกแขนงแบบ irregular pinnate สุ่มปลายรากจำนวน 2 ราก รวมทั้งสิ้น 6 ราก พบว่าทุกปลายรากสามารถสกัดและเพิ่มปริมาณ DNA ได้ อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์และอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้อย่างถูกต้องชัดเจนทุกราก เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI Homepage พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเห็ดเผาะหนังที่มีรายงานในฐานข้อมูลร้อยละ 97-100 แสดงว่ารากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมทุกรูปแบบเป็นรากที่มีเห็ดเผาะหนังอาศัยอยู่ (ตารางที่ 4-1)

### 2.2 เปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซา

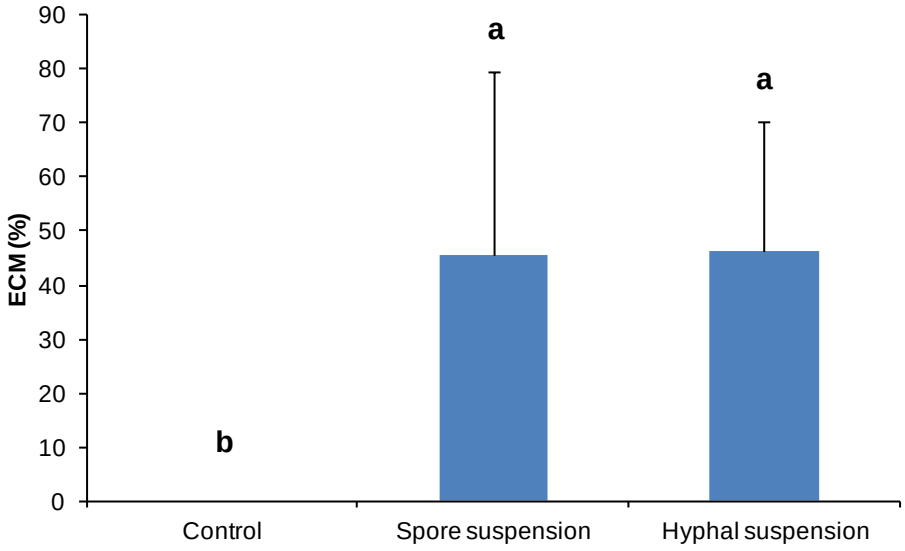
วิธีการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังที่แตกต่างกันมีผลทำให้กล้าไม้มีเปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4-2) เมื่อนำค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาของแต่ละทรีทเมนต์ไปเปรียบเทียบด้วย Tukey's test พบว่ากล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์และเส้นใยบริสุทธิ์มีเปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาแตกต่างจากกล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง (control) แต่กล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์มีเปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาไม่แตกต่างกับกล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยบริสุทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4-7) กล้าไม้พะยอมและพลวงมีเปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่มีปฏิสัมพันธ์เกิดขึ้นระหว่างวิธีการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังกับชนิดกล้าไม้ (ตารางที่ 4-2)

**ตารางที่ 4-1** ชนิดราที่อยู่ร่วมกับรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พลวงและพะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการ 2 วิธี

| Plant species | Inoculation method | Specimen | Morphotype | Similarity to DNA sequences in GenBank | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | GenBank closest species match (Accession number) | E-value | Max identity (%) |
| *D. tuberculatus* | Spore suspension | DTS1-1 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629876) | 0 | 97% |
| | | DTS3-2 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629876) | 0 | 97% |
| | | DTS2-3 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629882) | 0 | 97% |
| | | DTS2-3 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629878) | 0 | 97% |
| | Hyphal suspension | DTH1-1 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (JQ292819) | 0 | 95% |
| | | DTH2-1 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (JQ292819) | 0 | 97% |
| | | DTH3-2 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (JQ292819) | 0 | 95% |
| | | DTH3-2 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629883) | 0 | 97% |
| *S. roxburghii* | Spore suspension | SRS1-4 | monopodial pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629882) | 0 | 97% |
| | | SRS1-4 | monopodial pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629882) | 0 | 97% |
| | | SRS2-4 | monopodial pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629882) | 0 | 99% |
| | | SRS2-4 | monopodial pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629882) | 0 | 99% |
| | | SRS3-3 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629878) | 0 | 100% |
| | | SRS3-3 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 97% |
| | Hyphal suspension | SRH1-2 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629877) | 0 | 94% |
| | | SRH2-3 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 93% |
| | | SRH2-3 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 94% |
| | | SRH3-1 | irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629877) | 0 | 93% |

**ตารางที่ 4-2** การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมและพลวงที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี ด้วย Two-way ANOVA

| Inoculation Method (IM) | Plant species (PS) | ECM (%) |
|---|---|---|
| Control | *D. tuberculatus* | 0.00 |
| Spore suspension | | 59.56 |
| Hyphal suspension | | 36.86 |
| Control | *S. roxburghii* | 0.00 |
| Spore suspension | | 55.93 |
| Hyphal suspension | | 31.75 |
| | Inoculation method (IM) | $F$= 6.817, $P$=0.011 |
| | Plant species (PS) | $F$= 0.172, $P$=0.686 |
| | IM × PS | $F$= 1.700, $P$=0.224 |




**ภาพที่ 4-7** เปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี

**3. การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้**

3.1 เส้นผ่านศูนย์กลางที่คอรากและความสูง

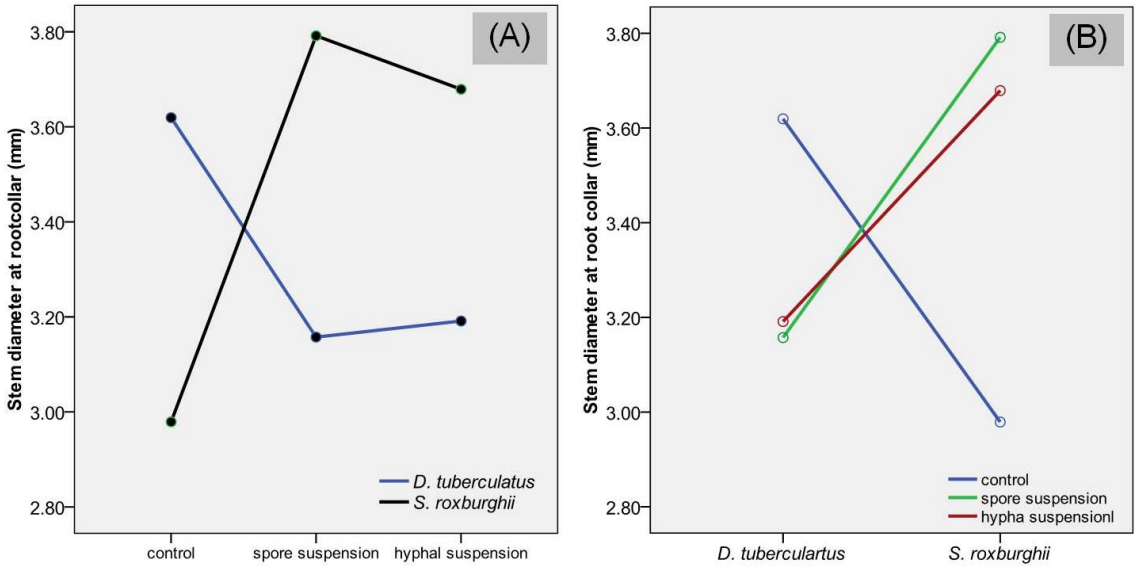
กล้าไม้พะยอมและพลวงที่มีอายุครบ 8 เดือน มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก และความสูงดังแสดงในตารางที่ 4-3 เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ Two-way ANOVA พบว่าวิธีการปลูกเชื้อที่แตกต่างกัน 3 วิธี ไม่ทำให้กล้าไม้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก และความสูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F= 0.479, $P$=0.631 และ F= 3.241, $P$= 0. 075 ตามลำดับ) ชนิดกล้าไม้ที่ต่างกัน (กล้าไม้พลวงและกล้าไม้พะยอม) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอรากไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F= 1.094, $P$= 0.316) แต่ทำให้ความสูงของกล้าไม้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F$= 17.078, $P$= 0.001) นั่นคือ

กล้าไม้พะยอมมีความสูงมากกว่ากล้าไม้พลวง และพบด้วยว่ามีปฏิสัมพันธ์ (interaction) เกิดขึ้นระหว่างวิธีการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังและชนิดกล้าไม้ ซึ่งทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางที่คอรากและความสูงมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F= 6.878, *P*= 0.010 และ *F*= 5.152, *P*= 0.024 ตามลำดับ)

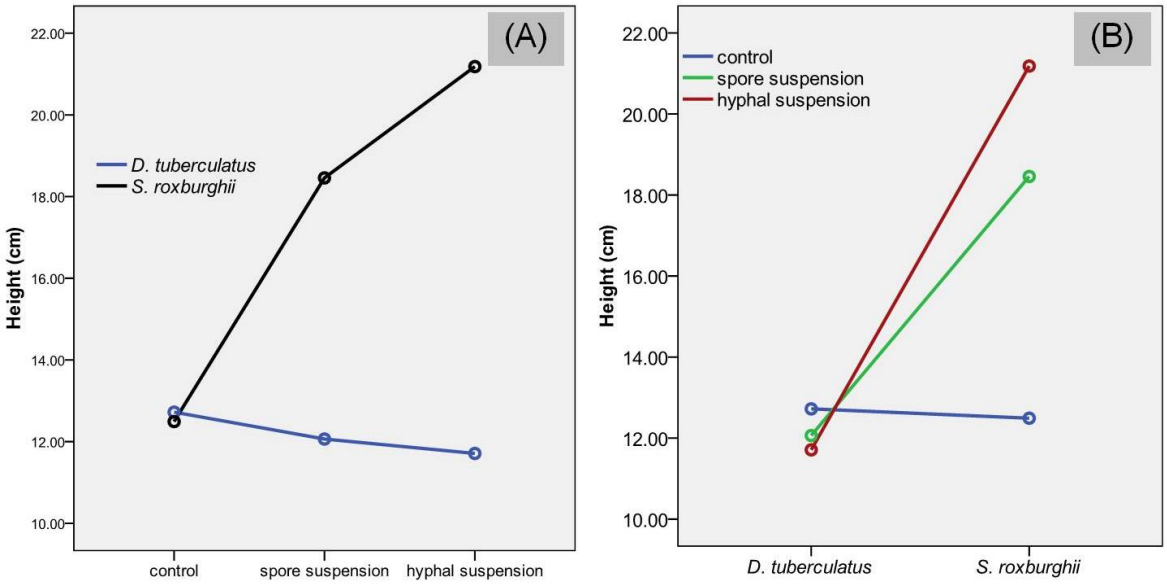
**ตารางที่ 4-3** การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอรากและความสูงของการทดลองที่ 1 ด้วย Two-way ANOVA

| Inoculation Method (IM) | Plant species (PS) | Stem diameter at root collar (mm) | Height (cm) |
|---|---|---|---|
| Control | *D. tuberculatus* | 3.619 (±0.16) | 12.722 (±0.66) |
| Spore suspension | | 3.158 (±0.33) | 12.064 (±2.62) |
| Hyphal suspension | | 3.191 (±0.40) | 11.711 (±1.96) |
| Control | *S. roxburghii* | 2.979 (±0.43) | 12.492 (±4.10) |
| Spore suspension | | 3.792 (±0.39) | 18.458 (±3.37) |
| Hyphal suspension | | 3.679 (±0.08) | 21.183 (±1.90) |
| | Inoculation method (IM) | F= 0.479, *P*= 0.631 | *F*= 3.241, *P*= 0.075 |
| | Plant species (PS) | F= 1.094, *P*= 0.316 | *F*= 17.078, *P*= 0.001 |
| | IM × PS | F= 6.878, *P*= 0.010 | *F*= 5.152, *P*= 0.024 |

จากผลการวิเคราะห์การเกิดปฏิสัมพันธ์กันจะเห็นได้ว่ากล้าไม้พะยอมมีการตอบสนองต่อการมีเห็ดเผาะหนังเป็นเอคโตไมคอร์ไรซาดีกว่ากล้าไม้พลวงทั้งด้านเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอรากและความสูง กล่าวคือ กล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์และเส้นใยบริสุทธิ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก และความสูงมากกว่ากล้าไม้พลวง (ภาพที่ 4-8 และ ภาพที่ 4-9 ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าการปลูกเชื้อด้วยสปอร์ทำให้กล้าไม้พะยอมมีเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอรากมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อด้วยเส้นใยบริสุทธิ์และไม่ปลูกเชื้อ (ภาพที่ 4-8B) แต่การปลูกเชื้อด้วยเส้นใยบริสุทธิ์ทำให้กล้าไม้พะยอมมีความสูงมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อด้วยสปอร์และไม่ปลูกเชื้อ (ภาพที่ 4-9B)




**ภาพที่ 4-8** ผลการวิเคราะห์การเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการปลูกเชื้อและชนิดกล้าไม้ซึ่งทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางที่คอรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ




**ภาพที่ 4-9** ผลการวิเคราะห์การเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการปลูกเชื้อและชนิดกล้าไม้ซึ่งทำให้ความสูงของกล้าไม้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.2 น้ำหนักแห้ง

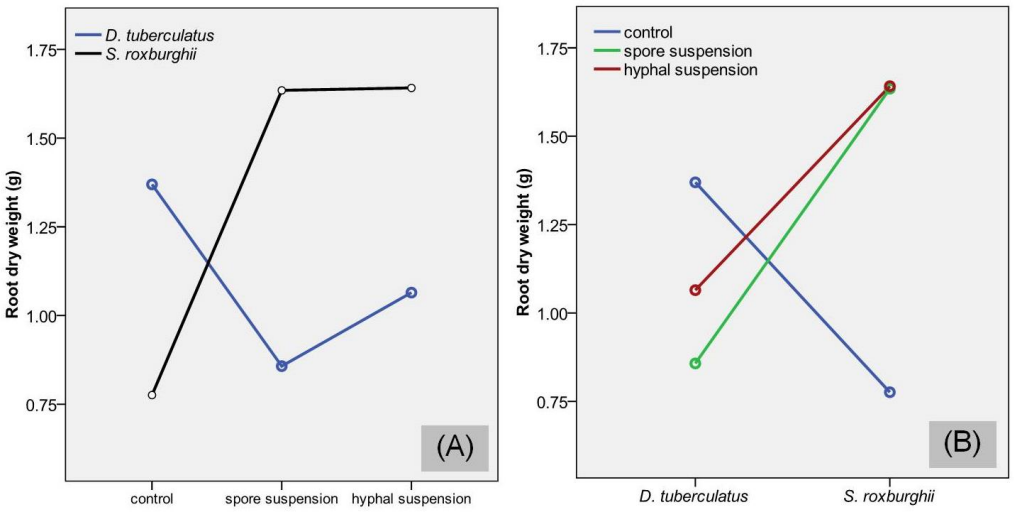
วิธีการปลูกเชื้อที่แตกต่างกัน 3 วิธี ไม่มีผลทำให้น้ำแห้งส่วนยอด น้ำหนักแห้งส่วนราก และน้ำหนักรวมของกล้าไม้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กล้าไม้ 2 ชนิดมีน้ำหนักแห้งส่วนยอดและน้ำหนักแห้งรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F$=6.942, $P$=0.022 และ $F$=6.570, $P$=0.025ตามลำดับ) นั่นคือ

กล้าไม้พะยอมมีน้ำหนักแห้งส่วนยอดและน้ำหนักแห้งรวมมากกว่ากล้าไม้พลวงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีปฏิสัมพันธ์เกิดขึ้นระหว่างวิธีการปลูกเชื้อและชนิดของกล้าไม้ ที่ทำให้น้ำหนักแห้งส่วนรากและน้ำหนักแห้งรวมของกล้าไม้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F$= 7.948, $P$= 0.006 และ $F$= 4.988, $P$= 0.027 ตามลำดับ) (ตารางที่ 4-4)

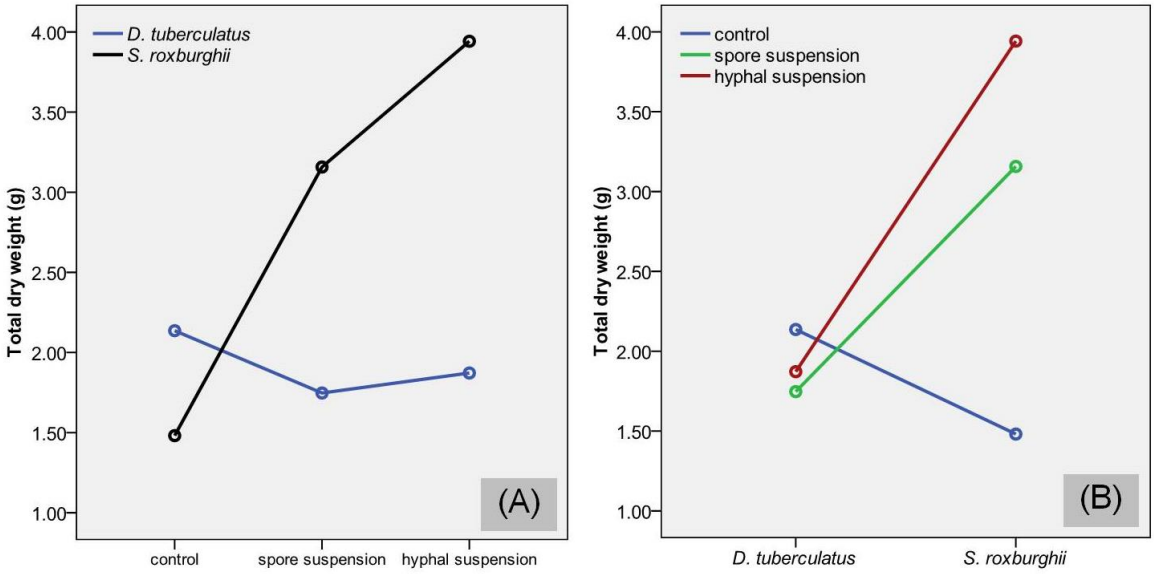
**ตารางที่ 4-4** การวิเคราะห์ความแปรนปรวนน้ำหนักแห้งส่วนยอด น้ำหนักแห้งส่วนราก และน้ำหนักแห้งรวมของการทดลองที่ 1 ด้วย Two-way ANOVA

| Inoculation Method (IM) | Plant species (PS) | Shoot dry weight (g) | Root dry weight (g) | Total Dry Weight (g) |
|---|---|---|---|---|
| Control | *D. tuberculatus* | 0.77 (±0.15) | 1.37 (±0.27) | 2.14 (±0.36) |
| Spore suspension | | 0.89 (±0.19) | 0.86 (±0.34) | 1.75 (±0.54) |
| Hyphal suspension | | 0.81 (±0.61) | 1.06 (±0.47) | 1.87 (±1.07) |
| Control | *S. roxburghii* | 0.71 (±0.49) | 0.78 (±0.33) | 1.48 (±0.77) |
| Spore suspension | | 1.52 (±0.15) | 1.63 (±0.21) | 3.16 (±0.33) |
| Hyphal suspension | | 2.30 (±1.08) | 1.64 (±0.23) | 3.94 (±1.19) |
| Inoculation method (IM) | | $F$ = 3.292, $P$ = 0.072 | $F$ = 1.160, $P$ = 0.346 | $F$ = 3.008, $P$ = 0.087 |
| Plant Species (PS) | | $F$ = 6.942, $P$ = 0.022 | $F$ = 2.793, $P$ = 0.121 | $F$ = 6.570, $P$ = 0.025 |
| IM × PS | | $F$ = 2.960, $P$ = 0.090 | $F$ = 7.948, $P$ = 0.006 | $F$ = 4.988, $P$ = 0.027 |

จากผลการวิเคราะห์การเกิดปฏิสัมพันธ์กันจะเห็นได้ว่ากล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังมีการตอบสนองต่อการมีเห็ดเผาะหนังเป็นเอคโตไมคอร์ไรซาดีกว่ากล้าไม้พลวงทั้งด้านน้ำหนักแห้งส่วนรากและน้ำหนักแห้งรวม กล่าวคือ กล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์และเส้นใยบริสุทธิ์มีน้ำหนักแห้งส่วนรากและน้ำหนักแห้งรวมมากกว่ากล้าไม้พลวงที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์และเส้นใยบริสุทธิ์ (ภาพที่ 4-10 และ ภาพที่ 4-11 ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าการปลูกเชื้อด้วยสปอร์และเส้นใยบริสุทธิ์ทำกล้าไม้พะยอมมีน้ำหนักแห้งส่วนรากมากกว่ากล้าไม้พะยอมที่ไม่ปลูกเชื้อ แต่การปลูกเชื้อทั้ง 2 วิธีนี้ ทำให้กล้าไม้พะยอมมีน้ำหนักแห้งส่วนรากไม่ต่างกัน (ภาพที่ 4-10B) แต่การปลูกเชื้อด้วยเส้นใยบริสุทธิ์ทำให้กล้าไม้พะยอมมีน้ำหนักแห้งรวมมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการปลูกเชื้อด้วยสปอร์และกล้าไม้พะยอมที่ไม่ปลูกเชื้อ (ภาพที่ 4-11B)




**ภาพที่ 4-10** ผลการวิเคราะห์การเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการปลูกเชื้อและชนิดกล้าไม้ซึ่งทำให้น้ำหนักแห้งส่วนรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ




**ภาพที่ 4-11** ผลการวิเคราะห์การเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการปลูกเชื้อและชนิดกล้าไม้ซึ่งทำให้น้ำหนักแห้งรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.3 ปริมาณธาตุอาหารของกล้าไม้

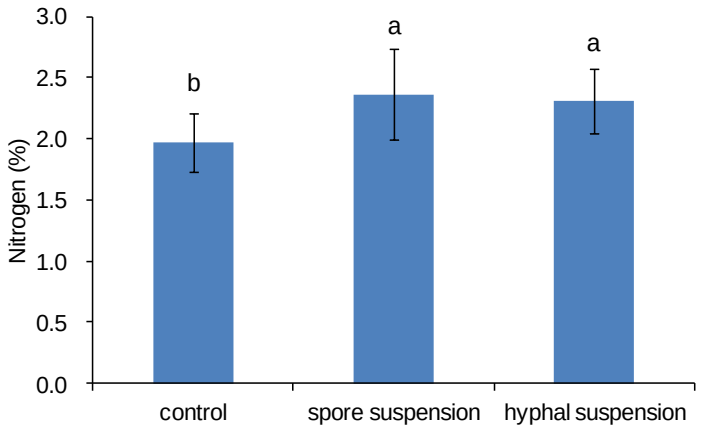
ปริมาณธาตุอาหารของกล้าไม้แสดงไว้ในตารางที่ 4-5 จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่าวิธีการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังที่แตกต่างกัน 3 วิธี ไม่ส่งผลให้กล้าไม้มีปริมาณธาตุคาร์บอน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ส่งผลให้กล้าไม้มีปริมาณไนโตรเจนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F$= 5.768, $P$= 0.018) เมื่อนำค่าเฉลี่ยของปริมาณไนโตรเจนของกล้าไม้แต่ละทรีทเมนต์มาเปรียบเทียบด้วย Tukey's test พบว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง มีปริมาณไนโตรเจนน้อยกว่ากล้าไม้ที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยสารแขวนลอยสปอร์และด้วยเส้นใยบริสุทธิ์ แต่วิธีการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง

ด้วยสปอร์และด้วยเส้นใยบริสุทธิ์ ไม่ส่งผลให้กล้าไม้มีปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4-12) ชนิดกล้าไม้ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด มีผลทำให้ปริมาณธาตุอาหารทุกธาตุแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่ากล้าไม้พะยอมมีปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสมากกว่ากล้าไม้พลวง แต่มีปริมาณโพแทสเซียมน้อยกว่ากล้าไม้พลวงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ไม่พบปฏิสัมพันธ์เกิดขึ้นระหว่างวิธีการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังและชนิดกล้าไม้ ที่มีผลต่อปริมาณธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม (ตารางที่ 4-5)

**ตารางที่ 4-5** การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณธาตุอาหารในพืชของการทดลองที่ 1 ด้วย Two-way ANOVA

| Inoculum Method (IM) | Plant species (PS) | Carbon (%) | Nitrogen (%) | Phosphorus (%) | Potassium (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Control | *D. tuberculatus* | 47.91 (±0.56) | 1.83 (±0.22) | 0.32 (±0.09) | 1.00 (±0.09) |
| Spore suspension | | 47.98 (±0.84) | 2.11 (±0.30) | 0.48 (±0.09) | 0.97 (±0.26) |
| Hyphal suspension | | 48.10 (±0.11) | 2.10 (±0.18) | 0.42 (±0.07) | 0.77 (±0.09) |
| Control | *S. roxburghii* | 51.00 (±0.68) | 2.11 (±0.18) | 0.51 (±0.17) | 0.66 (±0.12) |
| Spore suspension | | 50.88 (±0.10) | 2.62 (±0.24) | 0.61 (±0.03) | 0.61 (±0.06) |
| Hyphal suspension | | 50.95 (±0.20) | 2.52 (±0.14) | 0.55 (±0.15) | 0.53 (±0.07) |
| Inoculation method (IM) | | *F*= 0.056, *P*=0.946 | *F*= 5.768, *P*=0. 018 | *F*= 2.209, *P*= 0.152 | *F*= 3.032, *P*= 0.086 |
| Plant species (PS) | | *F*=151.533, *P*<0.001 | *F*= 15.099, *P*=0.002 | *F*= 8.379, *P*= 0.013 | *F*= 25.869, *P*< 0.001 |
| IM × PS | | *F*= 0.082, *P*=0.922 | *F*= 0.417, *P*=0.668 | *F*= 0.204, *P*=0.818 | *F*= 0.404, *P*=0.676 |



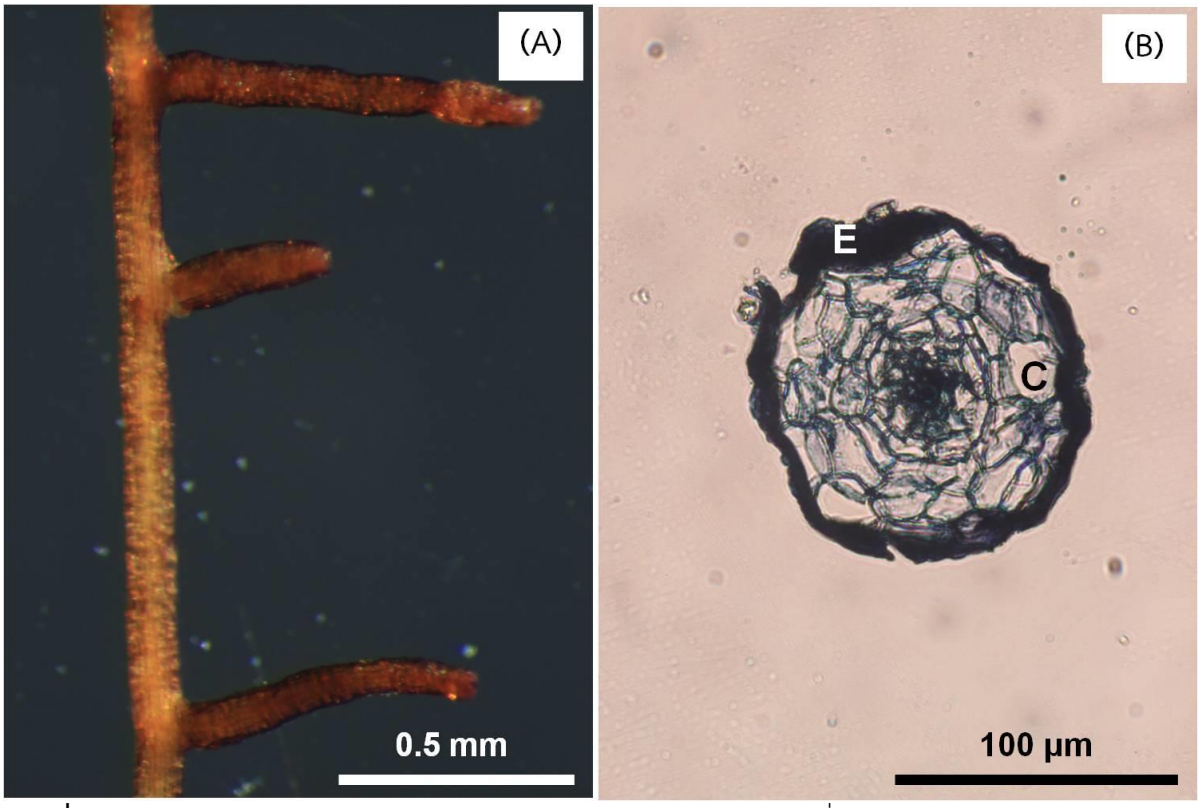

**ภาพที่ 4-12** ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนของกล้าไม้ที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี โดยใช้ Tukey's test

**การทดลองที่ 2 การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกในวัสดุปลูก 2 สูตร ต่อการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง**

1. **ลักษณะสัณฐานและกายวิภาคของราก**

**1.1 รากที่ไม่มีเอคโตไมคอร์ไรซา**

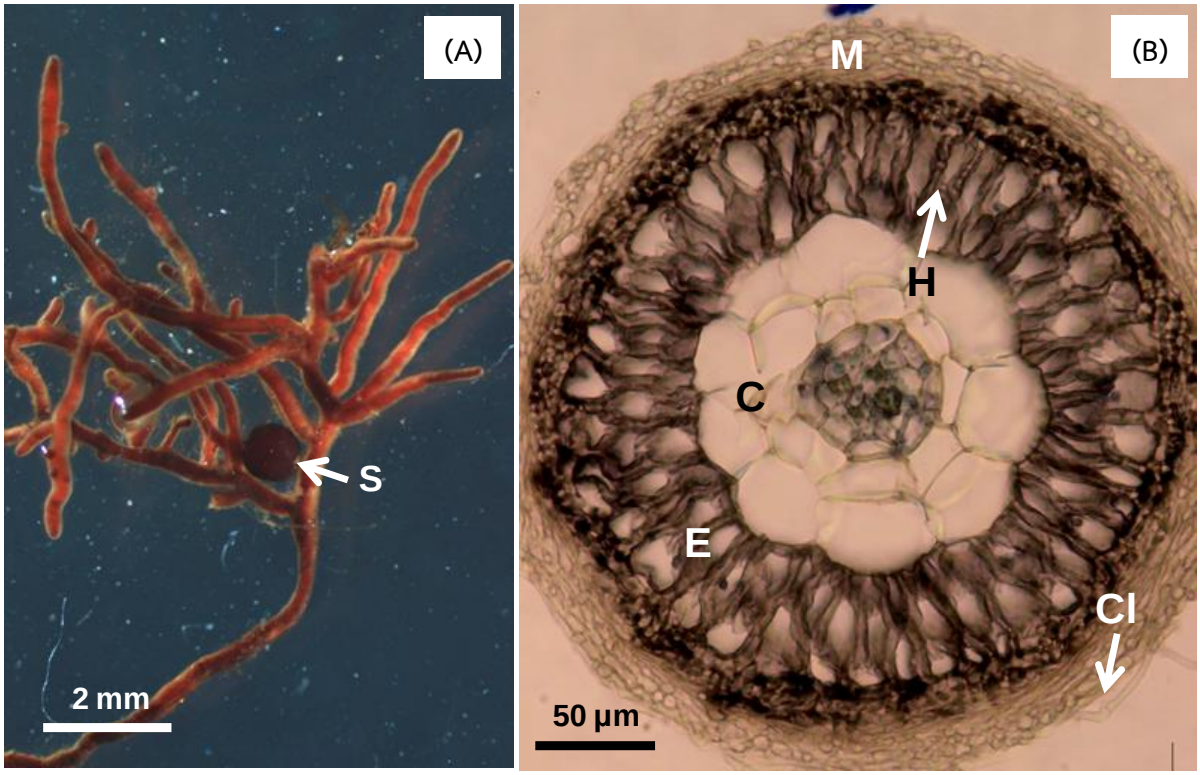
กล้าไม้พะยอมที่ไม่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน 2 สูตร มีลักษณะสัญฐานดังนี้ คือ รากแขนงเรียวเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางรากเล็กกว่ารากเอคโตไมคอร์ไรซา 1-1.5 เท่า รากมีการแตกแขนงน้อยมาก ผิวรากเรียบ สีน้ำตาลอ่อนและไม่มีเส้นใยของราพันอยู่เลย (ภาพที่ 4-13A) ส่วนลักษณะทางกายวิภาคของรากนั้น เป็นรากที่มีชั้นของเซลล์ผิวจำนวน 1 ชั้น ไม่พบแผ่นแมนเทิลและเส้นใยฮาร์ติกเน็ท (ภาพที่ 4-13B)




**ภาพที่ 4-13** ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่ไม่มีเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอม (C= cortex, E= epidermis)

**1.2 รากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซา**

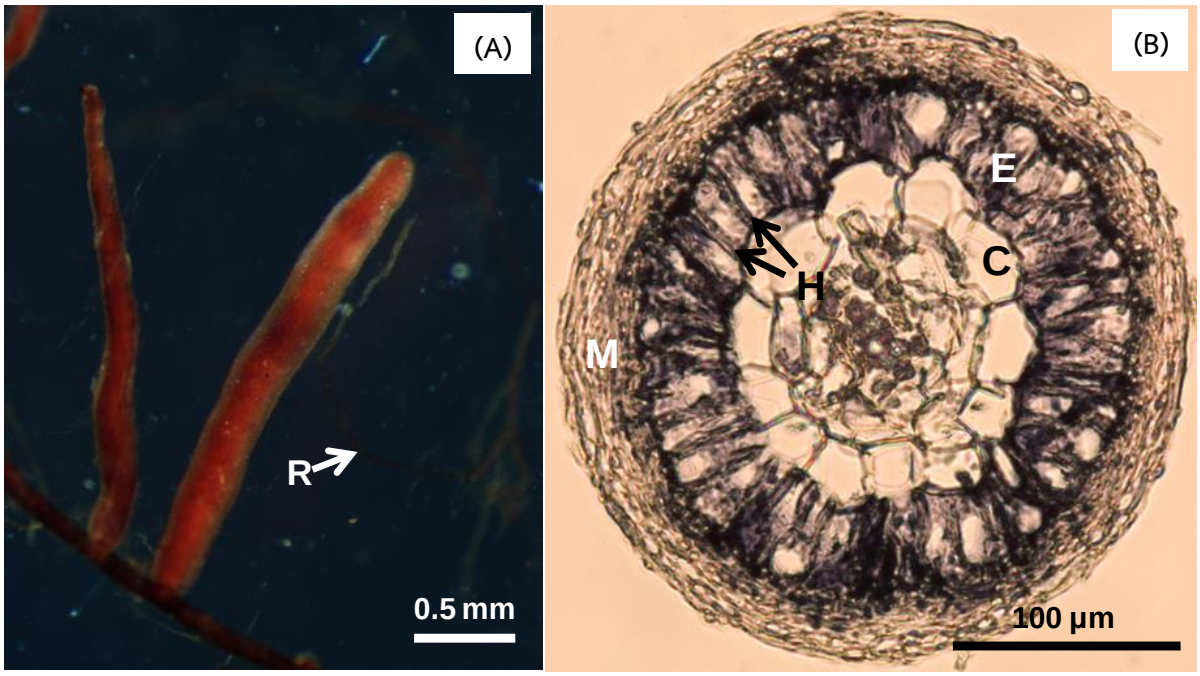
รากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 1 มีลักษณะทางสัณฐานของราก 1 แบบ คือ รากแตกแขนงแบบ irregular pinnate สีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลปนส้ม ผิวเรียบมีความมัน พบ rhizomorph สีน้ำตาลอ่อน เจริญพันกับราก และมี sclerotium สีน้ำตาลปนส้ม รูปทรงกลม ผิวเรียบเป็นมัน เกิดปนและกระจายรอบราก (ภาพที่ 4-14A) ส่วนลักษณะทางกายวิภาคของรากนั้น มีแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยใสไม่มีสี เรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma หนา 20-30 ไมโครเมตร มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้น พบ clamp connection (ภาพที่ 4-14B)




**ภาพที่ 4-14** ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาแบบที่ 1 ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 1 (C= cortex, Cl= clamp conection, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle, S= sclerotium)

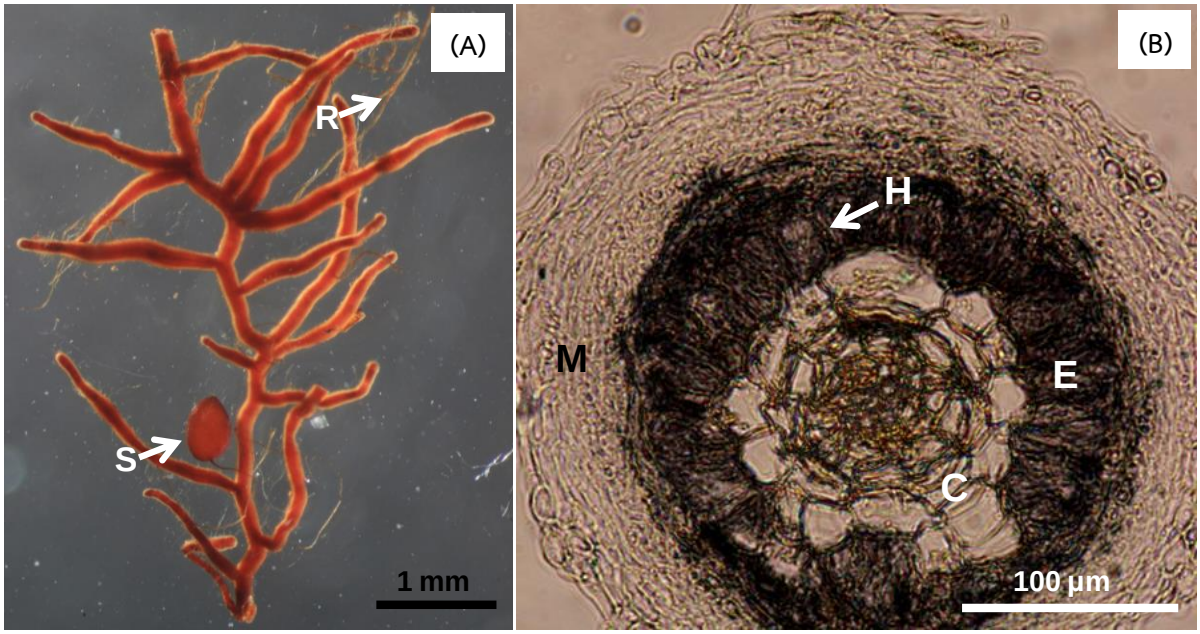
รากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 1 มีลักษณะสัณฐานของราก 2 แบบ ดังนี้

แบบที่ 1 รากแตกแขนงแบบ unramified สีน้ำตาลปนส้ม ผิวเรียบมีความมัน พบ rhizomorph สีน้ำตาลอ่อน เจริญพันกับราก (ภาพที่ 4-15A) ส่วนลักษณะทางกายวิภาคของรากนั้น มีแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยใสไม่มีสี เรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma หนา 10-30 ไมโครเมตร มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้น (ภาพที่ 4-15B)



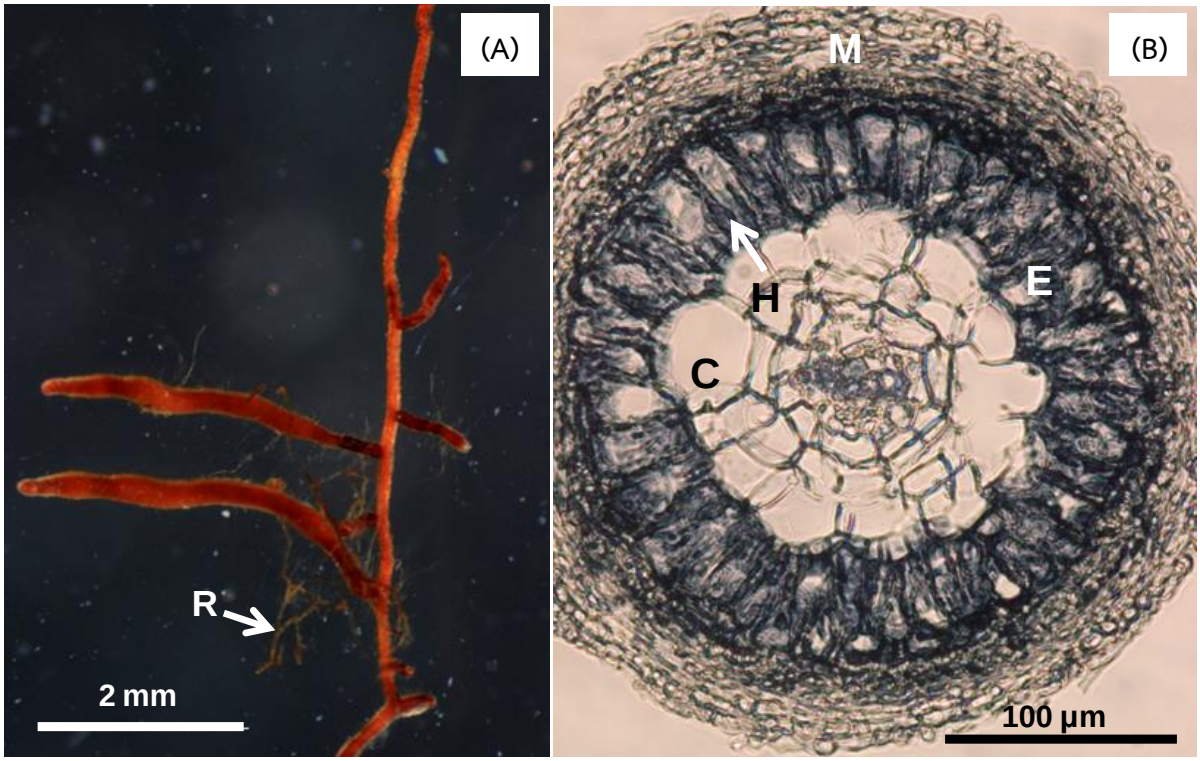

**ภาพที่ 4-15** ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาแบบที่ 1 ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 1 (C= cortex, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle, R= rhizomorph)

แบบที่ 2 รากแตกแขนงแบบ monopodial pinnate สีน้ำตาลปนส้ม ผิวเรียบมีความมัน พบ rhizomorph สีน้ำตาลอ่อน เจริญพันกับราก และมี sclerotium สีน้ำตาลปนส้มถึงสีน้ำตาลเข้ม รูปทรงกลมถึงรี ผิวเรียบเป็นมัน เกิดปนและกระจายรอบๆ ราก (ภาพที่ 4-16A) ส่วนลักษณะทางกายวิภาคของรากนั้น มีแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยใสไม่มีสี เรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นนอกหนา 10-20 ไมโครเมตร ประกอบด้วยเซลล์ขนาดใหญ่เรียงตัวอย่างหลวม ๆ ส่วนชั้นในหนา 20-30 ไมโครเมตร ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็ก เรียงตัวติดกันแน่น มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้น (ภาพที่ 4-16B)



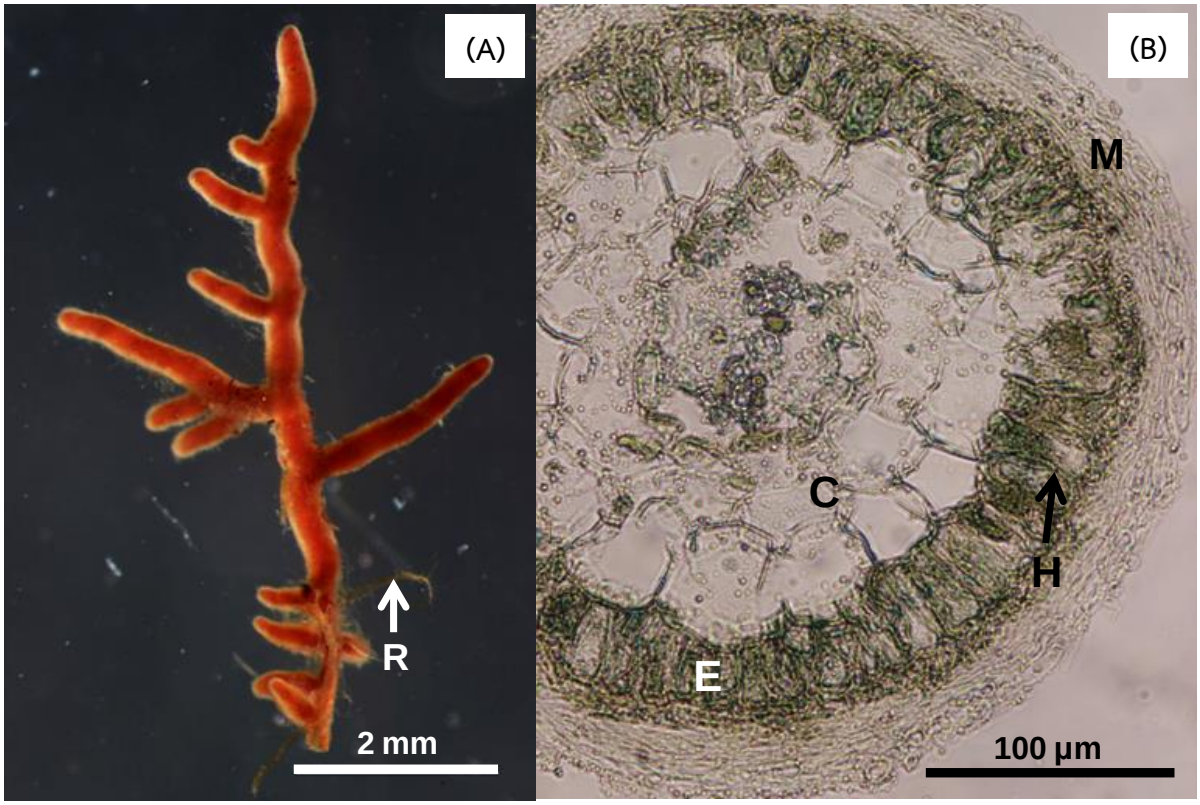

**ภาพที่ 4-16** ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาแบบที่ 2 ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 1 (C= cortex, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle, R= rhizomorph, S= sclerotium)

พบการปนเปื้อน (contamination) ในกล้าไม้พะยอมที่ไม่ปลูกเชื้อ และอยู่ในวัสดุปลูกสูตร 1 โดยมีรากเอคโตไมคอร์ไรซาเกิดขึ้นด้วย รากเอคโตไมคอร์ไรซามีลักษณะสัณฐาน 1 แบบ คือ รากแตกแขนงแบบ unramified สีน้ำตาลปนส้ม ผิวเรียบมีความมัน พบ rhizomorph สีน้ำตาลอ่อน เจริญพันกับราก (ภาพที่ 4-17A) ส่วนลักษณะทางกายวิภาคของราก มีแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยใสไม่มีสี เรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma หนา 10-20 ไมโครเมตร มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้น (ภาพที่ 4-17B)



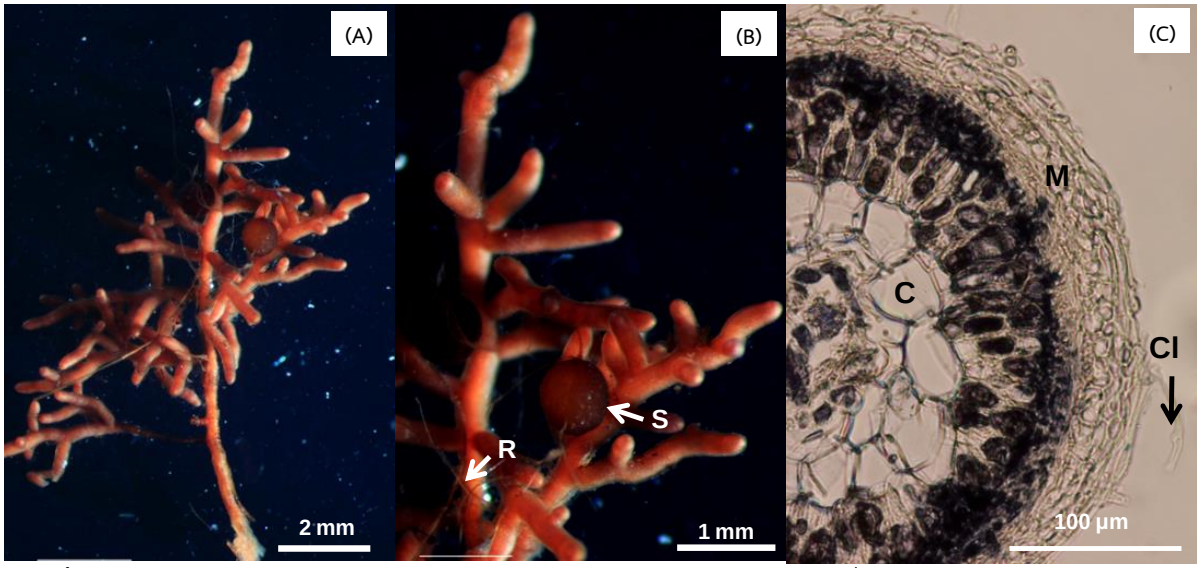

**ภาพที่ 4-17** ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ไม่ปลูกเชื้อ และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 1 (C= cortex, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle, R= rhizomorph)

รากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 2 มีลักษณะสัณฐานของราก 1 แบบ คือ รากแตกแขนงแบบ monopodial pinnate สีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาลปนส้ม ผิวเรียบมีความมัน พบ rhizomorph สีน้ำตาลอ่อน เจริญพันกับราก (ภาพที่ 4-18A) ส่วนลักษณะทางกายวิภาคของรากนั้น มีแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยใสไม่มีสี เรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma หนา 20-40 ไมโครเมตร ประกอบด้วยเซลล์ขนาดใหญ่ เรียงตัวค่อนข้างหลวม มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้น (ภาพที่ 4-18B)




**ภาพที่ 4-18** ลักษณะสัณฐาน (A) และลักษณะทางกายวิภาค (B) ของรากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 2 (C= cortex, E= epidermis, H= Hartig net, M= mantle, R= rhizomorph)

สำหรับรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใย และอยู่ในวัสดุปลูกสูตร 2 มีลักษณะสัณฐานของราก 1 แบบ คือ รากแตกแขนงแบบ irregular pinnate สีน้ำตาลปนส้ม ผิวเรียบมีความมัน พบ rhizomorph สีน้ำตาลอ่อน เจริญพันกับราก มี sclerotium สีน้ำตาลปนส้มถึงสีน้ำตาลเข้ม รูปทรงกลมถึงรี ผิวเรียบเป็นมัน เกิดปนและกระจายรอบๆ ราก (ภาพที่ 4-19A) ส่วนลักษณะทางกายวิภาคของรากนั้น มีแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยใสไม่มีสี เรียงตัวกันแบบ pseudoparenchyma หนา 10-20 ไมโครเมตร มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิวจำนวน 1 ชั้น (ภาพที่ 4-19B)




**ภาพที่ 4-19** ลักษณะสัณฐาน (A-B) และลักษณะทางกายวิภาค (C) ของรากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเห็ดเผาะหนัง และปลูกในวัสดุปลูกสูตร 2 (C= cortex, Cl= clamp conection, M= mantle, R= rhizomorph, S= sclerotium)

พบการปนเปื้อน (contamination) ในกล้าไม้พะยอมที่ไม่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง และอยู่ในวัสดุปลูกสูตร 2 โดยมีรากเอคโตไมคอร์ไรซาเกิดขึ้นด้วย รากเอคโตไมคอร์ไรซามีลักษณะสัณฐานเหมือนกับรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใย และอยู่ในวัสดุปลูกสูตร 2 กล่าวคือ รากแตกแขนงแบบ irregular pinnate (ภาพที่ 4-19)

## 2. ชนิดและเปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซา

### 2.1 ชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซา

จากการสุ่มปลายรากเอคโตไมคอร์ไรซารูปแบบ (morphotype) ละ 2 ปลายราก/ซ้ำ/ทรีทเมนต์ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกในวัสดุปลูกสูตร 1 จำนวน 16 ราก ประกอบด้วย ปลายรากเอคโตไมคอร์ไรซาของไม้พะยอมที่ไม่ปลูกเชื้อ (control) 3 ราก ปลายรากเอคโตไมคอร์ไรซาของไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เห็ดเผาะหนังจำนวน 6 ราก ปลายรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเห็ดเผาะหนังซึ่งมี 2 รูปแบบ คือ รากแตกแขนงแบบ simple และรากแตกแขนงแบบ pinnate จำนวน 3 และ 4 ราก ตามลำดับ แล้วนำไปสกัดและเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR ได้ผลออกมา 14 ราก (คิดเป็นร้อยละ 87.5) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้อย่างถูกต้องชัดเจนทุกราก เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI Homepage พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเห็ดเผาะหนัง ที่มีรายงานในฐานข้อมูลร้อยละ 96-100 แสดงว่ารากเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นรากที่มีเชื้อเห็ดเผาะหนังอาศัยอยู่ (ตารางที่ 4-6)

สำหรับผลการสุ่มรากเอคโตไมคอร์ไรซาของไม้พะยอมที่ปลูกในวัสดุปลูกสูตร 2 จำนวน 14 ปลายราก ประกอบด้วย ปลายรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ไม่ปลูกเชื้อ 2 ราก ปลายรากเอคโต

ไมคอร์ไรซาของไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์จำนวน 6 ราก และปลายรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยจำนวน 6 ราก สามารถนำไปสกัดและเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR ได้ 11 ราก (คิดเป็นร้อยละ 78.6) และสามารถวิเคราะห์และอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้อย่างชัดเจนทุกราก เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI Homepage พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเห็ดเผาะหนังที่มีรายงานในฐานข้อมูลร้อยละ 96-99 แสดงว่ารากเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นรากที่มีเชื้อเห็ดเผาะหนังอาศัยอยู่ (ตารางที่ 4-6)

**ตารางที่ 4-6** ชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่กับรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน และอยู่ในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน 2 สูตร

| Planting media | Inoculation Method | Specimen | Morphotype | Similarity to DNA sequences in GenBank | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | GenBank closest species match (Accession number) | E-value | Max identity (%) |
| Peat : Vermiculite : Sand (1 : 9 : 0) | Spore suspension | T1S1-2 | Irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (JQ292818) | 0 | 98% |
| | | T1S1-2 | Irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (JQ292818) | 0 | 97% |
| | | T1S2-1 | Irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629877) | 0 | 100% |
| | | T1S2-1 | Irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629877) | 0 | 100% |
| | | T1S3-4 | Irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (JQ292818) | 0 | 97% |
| | | T1S3-4 | Irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (JQ292818) | 0 | 98% |
| | Hyphal suspension | T1H1-3 | Unramified | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 97% |
| | | T1H1-3 | Unramified | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 96% |
| | | T1H2-1 | Monopodial pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 98% |
| | | T1H2-1 | Monopodial pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 97% |
| | | T1H3-3 | Monopodial pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 97% |
| | Control | T1C3-2 | Unramified | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 99% |
| | | T1C3-2 | Unramified | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 100% |
| | | T1C2-2 | Unramified | *Astraeus odoratus* (AJ629878) | 0 | 99% |
| Peat : Vermiculite : Sand (2 : 7 : 1) | Spore suspension | T2S1-3 | Monopodial pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 99% |
| | | T2S2-2 | Monopodial pinnate | *Astraeus odoratus* (JQ292818) | 0 | 97% |
| | | T2S2-2 | Monopodial pinnate | *Astraeus odoratus* (JQ292818) | 0 | 97% |
| | | T2S3-3 | Monopodial pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629882) | 0 | 97% |
| | | T2S3-3 | Monopodial pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629882) | 0 | 97% |

**ตารางที่ 4-6** (ต่อ)

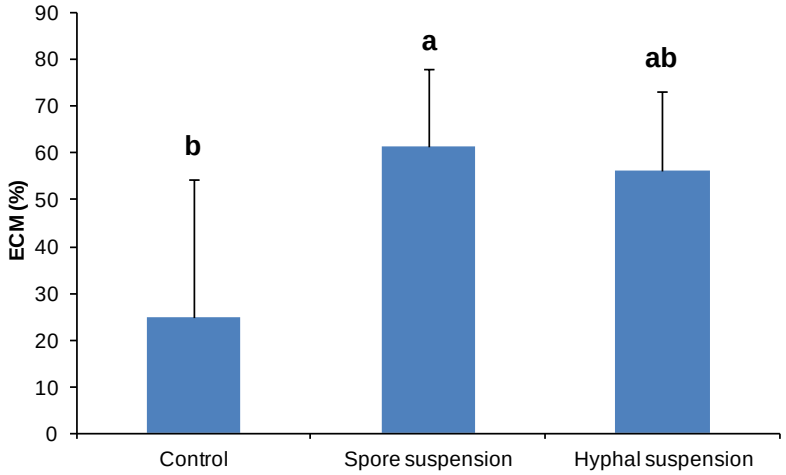
| Planting media | Inoculum | Specimens name | Morphoty | Similarity to DNA sequences in GenBank | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | GenBank closest species match (Accession number) | E-value | Max identity (%) |
| Peat : Vermiculite | | | | | 0 | 97% |
| Sand (2 : 7 : 1) | Hyphal suspension | T2H2-4 | Irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 96% |
| | | T2H2-4 | Irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 97% |
| | | T2H3-2 | Irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 97% |
| | | T2H3-2 | Irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629411) | 0 | 97% |
| | Control | T2C1-4 | Irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629878) | 0 | 99% |
| | | T2C1-4 | Irregular pinnate | *Astraeus odoratus* (AJ629878) | 0 | 98% |

### 2.2 เปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซา

จากการสุ่มตรวจรากกล้าไม้พะยอมเมื่อมีอายุ 8 เดือน พบว่ากล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีแตกต่างกัน 3 วิธี มีเปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F= 4.960, *P*=0.027) เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี มาเปรียบเทียบกันด้วย Tukey's test พบว่ากล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์มีเปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซามากกว่ากล้าไม้พะยอมที่ไม่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างจากกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยเส้นใยบริสุทธิ์ (ภาพที่ 4-20) กล้าไม้พะยอมที่ปลูกในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน 2 สูตร มีเปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F=1.110, *P*=0.313) และไม่มีปฏิสัมพันธ์เกิดขึ้นระหว่างวิธีการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังกับชนิดวัสดุปลูก (F=1.340, *P*=0.298) ดังแสดงในตารางที่ 4-7

**ตารางที่ 4-7** การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี ด้วย Two-way ANOVA

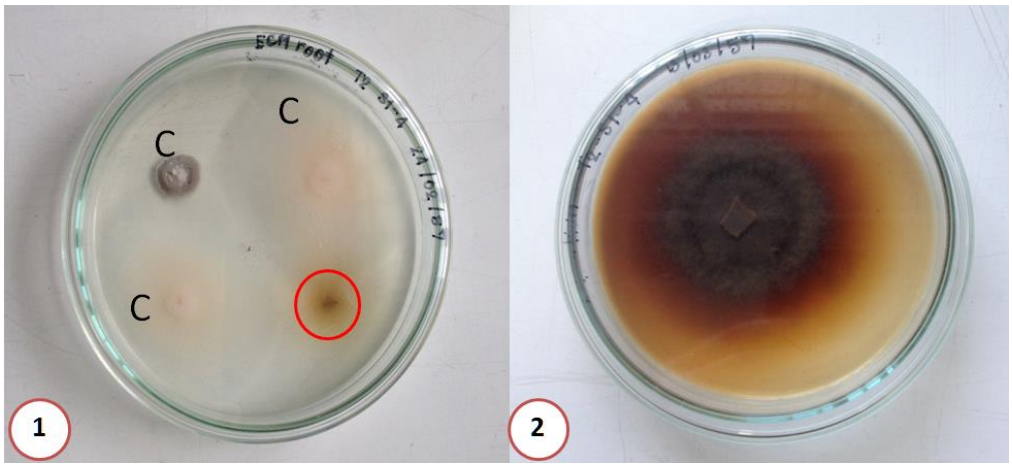
| Inoculation Method (IM) | Planting media (PM) | ECM (%) |
|---|---|---|
| Control | Peat : Vermiculite : Sand (1:9:0) | 30.27 |
| Spore suspension | | 51.14 |
| Hyphal suspension | | 75.09 |
| Control | Peat : Vermiculite : Sand (2:7:1) | 19.44 |
| Spore suspension | | 61.22 |
| Hyphal suspension | | 47.90 |
| | Inoculation method (IM) | *F*= 4.960, *P*=0.027 |
| | Planting media (PM) | *F*= 1.110, *P*=0.313 |
| | IM × PM | *F*= 1.340, *P*=0.298 |



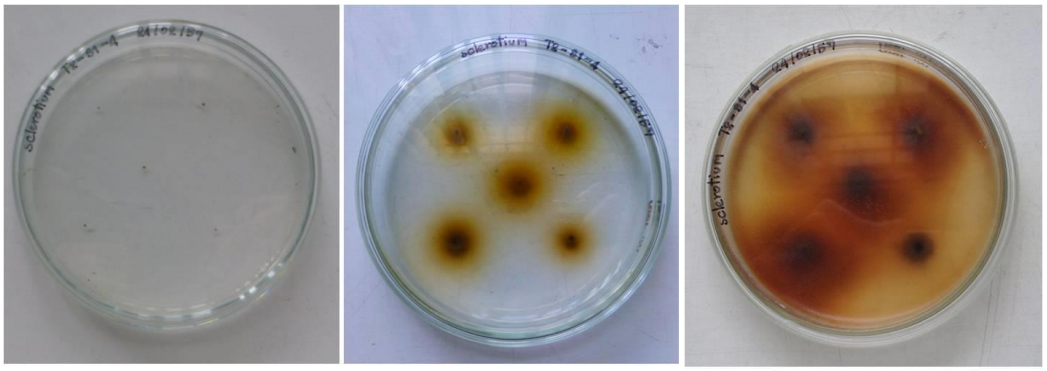

**ภาพที่ 4-20** เปอร์เซ็นต์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี

**3. การแยกราที่อยู่ร่วมกับรากเอคโตไมคอร์ไรซาและเม็ด sclerotium ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture)**

จากการนำรากเอคโตไมคอร์ไรซาและเม็ด sclerotium ของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยสปอร์ และอยู่ในวัสดุปลูกสูตร 2 (Peat : Vermiculite : Sand=2 : 7 : 1) ตัวอย่างที่ PM2S1-4 มาแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ พบว่าเมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์ รากเอคโตไมคอร์ไรซาและเม็ด sclerotium มีเส้นใยมีลักษณะสีน้ำตาลปนเหลืองถึงน้ำตาลปนเขียวเจริญออกมา เส้นใยคล้ายกำมะหยี่ และอาหารเลี้ยงเชื้อถูกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ดังแสดงในภาพที่ 4-21 และ 4-22 ซึ่งเส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับการรายงานของ Fangfuk *et al.*, (2010); Kaewgrajang *et al.*, (2013) เมื่อนำเส้นใยบริสุทธิ์ไปสกัดและเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR แล้วทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI Homepage พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเห็ดเผาะหนังที่มีรายงานในฐานข้อมูลร้อยละ 99-100 แสดงว่ารากเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นรากที่มีเชื้อเห็ดเผาะหนังอาศัยอยู่




**ภาพที่ 4-21** (1) จุดที่มีวงกลมสีแดงล้อมรอบ คือ เส้นใยของเราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เจริญออกมาจากผิวราก และ (C) เชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ปนเปื้อน (contaminant) (2) การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยราที่แยกได้จากรากเอคโตไมคอร์ไรซา




**ภาพที่ 4-22** การเติบโตของเส้นใยราที่แยกได้จากเม็ด sclerotium ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 14

**4. การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้**

ผลการวิเคราะห์วัสดุปลูก 2 สูตร พบว่าค่า pH ปริมาณอินทรียวัตถุ ปริมาณธาตุคาร์บอนทั้งหมด ธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4-8)

**ตารางที่ 4-8** การเปรียบเทียบค่า pH, อินทรียวัตถุ (organic matter) และปริมาณธาตุอาหารต่าง ๆ ของวัสดุปลูก 2 สูตร ด้วย Student's t-test

| Planting media | pH | Organic matter (%) | Total carbon (%) | Total nitrogen (%) | Phosphorus (g/kg) | Potassium (g/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Peat : Vermiculite : Sand (1 : 9 : 0) | 5.82 | 6.78 | 5.15 | 0.52 | 311.36 | 36.67 |
| Peat : Vermiculite : Sand (2 : 7 : 1) | 6.38 | 6.63 | 5.07 | 0.44 | 350.39 | 37.51 |
| | $t$ = 2.515 | $t$ = 0.257 | $t$ = 0.876 | $t$ = 1.160 | $t$ = 1.178 | $t$ = 0.192 |
| | $P$ = 0.127 | $P$ = 0.810 | $P$ = 0.430 | $P$ = 0.311 | $P$ = 0.304 | $P$ = 0.857 |

กล้าไม้ที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 3 วิธี มีการเติบโตทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก ความสูง น้ำแห้งส่วนยอดและน้ำหนักแห้งรวมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4-9, 4-10) แต่กล้าไม้มีน้ำหนักแห้งส่วนราก (ตารางที่ 4-10) และปริมาณธาตุอาหารในพืชแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4-11) เมื่อนำค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งส่วนรากและปริมาณธาตุอาหารของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธีมาเปรียบเทียบกันโดยใช้ Tukey’s test พบว่ากล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยสปอร์มีน้ำหนักแห้งส่วนรากมากกว่ากล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยบริสุทธิ์และกล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4-23) และพบว่ากล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยสปอร์มีปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมมากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยสปอร์มีปริมาณธาตุอาหารดังกล่าวไม่แตกต่างจากกล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยบริสุทธิ์ (ภาพที่ 4-24)

กล้าไม้ที่ปลูกในวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน 2 สูตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก ความสูง น้ำแห้งส่วนยอดน้ำหนักแห้งส่วนรากและน้ำหนักแห้งรวม และปริมาณธาตุอาหารต่าง ๆ ในกล้าไม้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่พบปฏิสัมพันธ์เกิดขึ้นระหว่างวิธีการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังและชนิดของวัสดุปลูกในหน่วยที่ใช้วัดการเติบโตทุกหน่วย (ตารางที่ 4-9, 4-10, 4-11)

**ตารางที่ 4-9** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก ความสูงของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี และปลูกในวัสดุปลูกแตกต่างกัน 2 สูตร โดยใช้ Two-way ANOVA

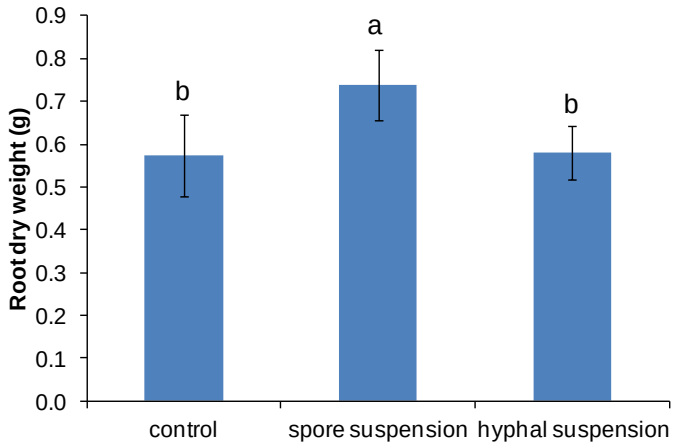
| Inoculation Method (IM) | Planting Media (PM) | Root Collar | Height (cm) |
|---|---|---|---|
| Control | Peat : Vermiculite : Sand (1 : 9 : 0) | 2.99 (±0.09) | 11.08 (±1.77) |
| Spore suspension | | 5.84 (±4.48) | 11.88 (±1.07) |
| Hyphal suspension | | 2.88 (±0.40) | 11.93 (±1.25) |
| Control | Peat : Vermiculite : Sand (2 : 7 : 1) | 2.99 (±0.27) | 11.87 (±1.96) |
| Spore suspension | | 3.01 (±0.31) | 10.47 (±0.46) |
| Hyphal suspension | | 5.77 (±4.61) | 12.07 (±0.40) |
| Inoculation method (IM) | | $F$ = 0.558, $P$ = 0.586 | $F$ = 0.625, $P$ = 0. 552 |
| Planting media (PM) | | $F$ = 0.000, $P$ = 0.989 | $F$ = 0.071, $P$ = 0.794 |
| IM × PM | | $F$ = 1.779, $P$ = 0.211 | $F$ = 1.144, $P$ = 0.351 |

**ตารางที่ 4-10** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักแห้งส่วนยอด น้ำหนักแห้งส่วนราก และน้ำหนักแห้งรวมของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี และปลูกในวัสดุปลูกแตกต่างกัน 2 สูตร โดยใช้ Two-way ANOVA

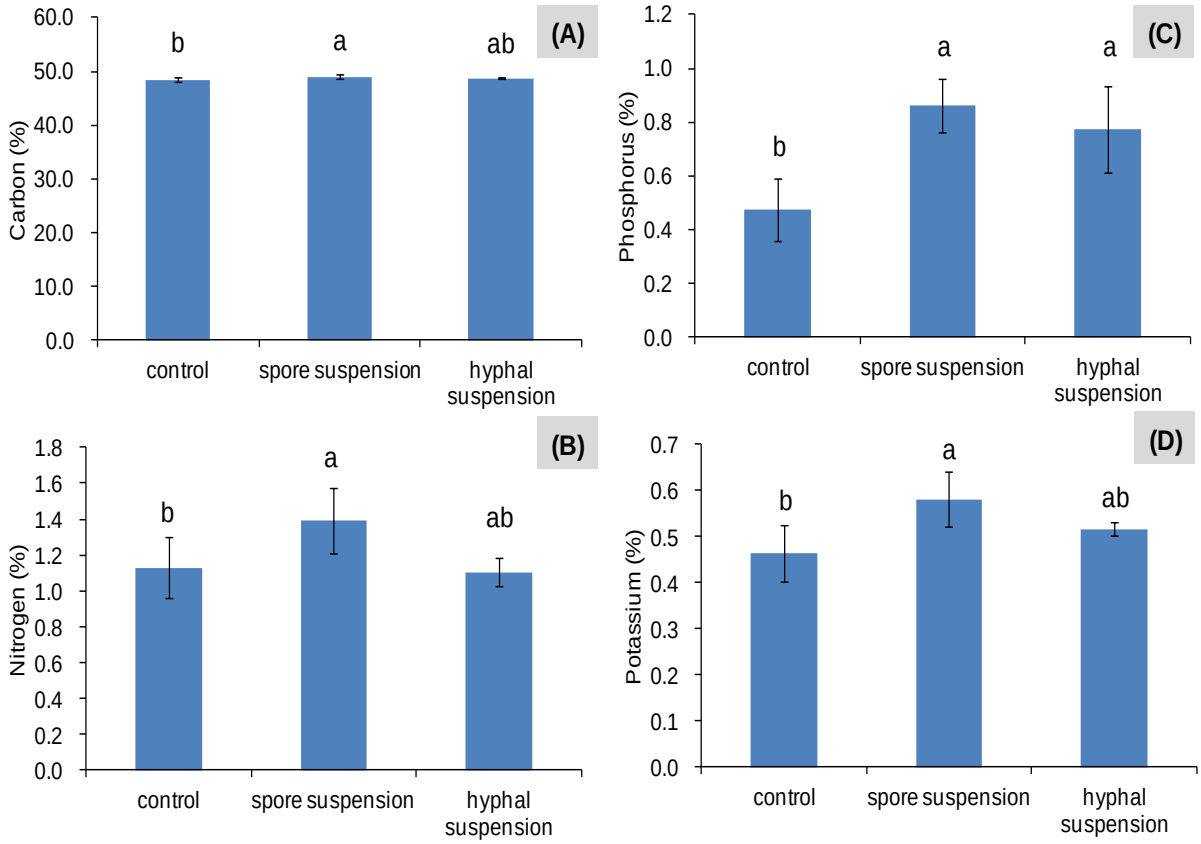
| Inoculation Method (IM) | Planting Media (PM) | Shoot dry weight (g) | Root dry weight (g) | Total Dry Weight (g) |
|---|---|---|---|---|
| Control | Peat : Vermiculite : Sand (1 : 9 : 0) | 0.48 (±0.04) | 0.54 (±0.05) | 1.02 (±0.05) |
| Spore suspension | | 0.60 (±0.04) | 0.76 (±0.16) | 1.36 (±0.16) |
| Hyphal suspension | | 0.57 (±0.04) | 0.54 (±0.01) | 1.11 (±0.04) |
| Control | Peat : Vermiculite : Sand (2 : 7 : 1) | 0.46 (±0.21) | 0.60 (±0.14) | 1.06 (±0.35) |
| Spore suspension | | 0.46 (±0.02) | 0.71 (±0.00) | 1.18 (±0.02) |
| Hyphal suspension | | 0.56 (±0.02) | 0.62 (±0.07) | 1.18 (±0.06) |
| Inoculation method (IM) | | $F$ = 1.680, $P$ = 0.227 | $F$ = 7.826, $P$ = 0. 007 | $F$ = 3.004, $P$ = 0.088 |
| Planting media (PM) | | $F$ = 1.580, $P$ = 0.233 | $F$ = 0.646, $P$ = 0.437 | $F$ = 0.098, $P$ = 0.759 |
| IM × PM | | $F$ = 0.868, $P$ = 0.445 | $F$ = 1.146, $P$ = 0.350 | $F$ = 1.140, $P$ = 0.352 |

**ตารางที่ 4-11** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณธาตุอาหารในกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี และปลูกในวัสดุปลูกแตกต่างกัน 2 สูตร โดยใช้ Two-way ANOVA

| Inoculation Method (IM) | Planting Media (PM) | Carbon (%) | Nitrogen (%) | Phosphorus (%) | Potassium (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Control | Peat : Vermiculite : Sand (1 : 9 : 0) | 48.20 | 1.09 (±0.12) | 0.41 (±0.06) | 0.45 (±0.01) |
| Spore suspension | | 48.95 | 1.27 (±0.08) | 0.79 (±0.07) | 0.57 (±0.08) |
| Hyphal suspension | | 48.73 | 1.11 (±0.09) | 0.73 (±0.07) | 0.51 (±0.00) |
| Control | Peat : Vermiculite : Sand (2 : 7 : 1) | 48.75 | 1.17 (±0.23) | 0.54 (±0.13) | 0.48 (±0.09) |
| Spore suspension | | 49.07 | 1.51 (±0.19) | 0.93 (±0.06) | 0.59 (±0.05) |
| Hyphal suspension | | 48.80 | 1.10 (±0.09) | 0.82 (±0.23) | 0.52 (±0.02) |
| Inoculation method (IM) | | $F$ = 4.688, $P$ = 0.031 | $F$ = 7.195, $P$ =0. 009 | $F$ = 17.373, $P$ < 0.001 | $F$ = 7.266, $P$ = 0.009 |
| Planting media (PM ) | | $F$ = 2.937, $P$ = 1.112 | $F$ = 2.118, $P$ = 0.171 | $F$ = 4.742, $P$ = 0.050 | $F$ = 0.692, $P$ = 0.422 |
| IM × PM | | $F$ = 1.110, $P$ = 0.361 | $F$ = 1.104, $P$ = 0.363 | $F$ = 0.071, $P$ = 0.932 | $F$ = 0.059, $P$ = 0.943 |




**ภาพที่ 4-23** ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งส่วนรากของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี โดยใช้ Tukey's test




**ภาพที่ 4-24** ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณธาตุอาหารของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยวิธีการแตกต่างกัน 3 วิธี โดยใช้ Tukey's test (A) ปริมาณคาร์บอน (%) (B) ปริมาณไนโตรเจน (%) (C) ปริมาณฟอสฟอรัส (%) (D) ปริมาณโพแทสเซียม (%)

# บทที่ 5 วิจารณ์ผลการวิจัย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

## วิจารณ์ผลการวิจัย

ลักษณะสัณฐานและกายวิภาคของรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมและพลวงจากการศึกษาครั้งนี้มีหลายแบบ ได้แก่ unramified, irregular pinnate และ monopodial pinnate รากมีสีครีม สีน้ำตาลปนส้ม และสีน้ำตาลเป็นมัน สีของเส้นใยและ rhizomorph ที่พันอยู่กับรากมีสีคล้ายคลึงกับเส้นใยของเห็ดเผาะหนังที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำรากแต่ละรูปแบบมาวิเคราะห์ชนิดของราที่เข้าอยู่อาศัยด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่าชนิดของราที่เข้าอยู่อาศัยคือ เห็ดเผาะหนัง ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่ใช้ปลูกเชื้อ รูปร่างของรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้พะยอมและพลวงที่แตกแขนงแบบ irregular pinnate ในการศึกษาครั้งนี้มีลักษณะเหมือนกับรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้ยางนาที่มีเห็ดเผาะหนังเข้าไปอาศัยอยู่ของ Kaewgrajang *et al*. (2013) นอกจากนี้ยังพบด้วยว่าเห็ดเผาะหนังสร้าง rhizomorph สีน้ำตาลอ่อนเจริญพันอยู่กับราก และสร้าง sclerotium เกิดปนกับราก ราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิดสามารถสร้าง rhizomorph ได้ แต่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาเพียงไม่กี่ชนิดที่สร้าง sclerotium ได้แก่ *Cenococcum*, *Rhizopogon*, *Suillus*, *Tuber*, *Xerocomus* และ *Paxillus involutus* (Fox, 1986; Torres and Honrubia, 1997; Petenson *et al*., 2004). ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการยืนยันการศึกษาของ Kaewgrajang *et al*., (2013) ว่า *A. odoratus* สร้างเม็ด sclerotium ได้ด้วย sclerotium เป็นโครงสร้างที่ราสร้างขึ้นเพื่อทำให้ราชนิดนั้นทนต่อสภาวะแห้งแล้งและสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในดินที่ถูกไฟไหม้ ซึ่งเมื่อสภาวะเหมาะสม sclerotium สามารถงอกเป็นเส้นใยและเจริญเข้าไปอาศัยในรากของพืชอาศัยได้ (Massicotte *et al*., 1992; Visser, 1995)

จากการตอบสนองของกล้าไม้ที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง พบว่ากล้าไม้ที่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังมีการเติบโตด้านต่างๆ ส่วนใหญ่มากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งพบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาช่วยเพิ่มการเติบโตให้แก้กล้าไม้วงศ์ยางหลายชนิด ได้แก่ ยางนา (Sangwanit *et al*., 1996; Kaewgrajang *et al*., 2013) *Dryobalanops lanceolata* (Brearley, 2006) *Shorea pinanga* (Turjaman *et al*., 2005) *S. balangeran* (Turjaman *et al*., 2011) ตะเคียนทอง และสยาแดง (*S. leprosula*) (Lee *et al*., 2008) วิธีการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังด้วยสารแขวนลอยสปอร์และเส้นใยบริสุทธิ์ส่งผลให้การเติบโตของกล้าไม้ของทั้งสองการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็สอดคล้องกับการศึกษาของ Kaewgrajang *et al*. (2013) ดังนั้นในการผลิตกล้าไม้พะยอมและพลวงให้มีเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากจึงสามารถเลือกใช้วิธีการปลูกเชื้อได้ทั้งสองวิธี

การใช้ดินที่รมควันฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีเป็นวัสดุปลูกทำให้กล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อไม่มีการปนเปื้อนของราเอคโตไมคอร์ไรซา ในขณะที่กล้าไม้ที่ปลูกในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมกันของ Peat : Vermiculite : Sand มีการปนเปื้อนเกิดขึ้นในทรีทเมนต์ที่เป็น control แต่เป็นการปนเปื้อนที่เกิดจากเห็ดเผาะหนัง ถึงแม้มีการพบราชนิดอื่นซึ่งจัดอยู่ในชั้น Ascomycetes รูปจานรองถ้วย สีส้ม ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มม. (ภาพผนวกที่ 1) เจริญเป็นกลุ่มอยู่บนผิวดินในกระถางปลูกกล้าไม้พะยอมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง อายุ 6 เดือน จำนวน 6 กระถาง (SRC1-3, SRC2-1, SRC3-1, SRC3-2, SRC3-3 และ SRC3-4) แต่เมื่อทำการสุ่มตรวจรากของกล้าไม้ในกระถางที่ปนเปื้อน กลับไม่พบการปนเปื้อนของราชนิดนี้ที่รากเอคโตไมคอร์ไรซาเลย การปนเปื้อนในทรีทเมนต์ control ที่เกิดจากเห็ดเผาะหนัง อาจเนื่องมาจากแมลงที่อยู่ในกลุ่มแมลงหางหนีบ (ภาพผนวกที่ 2) ที่พบในกระถางกล้าไม้พะยอมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง (SRC1-1) เมื่อกล้าไม้อายุ 6

เดือน แมลงอาจเป็นตัวแพร่กระจายสปอร์และเส้นใยไปยังกล้าไม้กระถางอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตามการใช้วัสดุปลูกที่มีส่วนผสมกันของ Peat : Vermiculite : Sand ทำให้กล้าไม้มีเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของเห็ดเผาะหนัง (48-75 เปอร์เซ็นต์) มากกว่ากล้าไม้ที่ปลูกในดินรมควันฆ่าเชื้อ (30-60 เปอร์เซ็นต์) และมีข้อดีคือไม่ต้องรมควันฆ่าเชื้อ เป็นวัสดุที่หาซื้อได้ง่ายในร้านขายอุปกรณ์การเกษตรและมีราคาย่อมเยาว์

# สรุปผลการวิจัย

การวิจัยเรื่องนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองคือ

**การทดลองที่ 1 การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้พลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.) และกล้าไม้พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) ต่อการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง** โดยได้ทำการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง ให้แก่กล้าไม้พลวงและพะยอมที่เติบโตอยู่ในดินที่รมควันฆ่าเชื้อแล้ว และวางอยู่ในเรือนเพาะชำกล้าไม้ที่ผนังประกอบด้วยตาข่ายละเอียดป้องกันแมลง ด้วยวิธีการ 3 วิธี คือ ปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยสปอร์ 25 มล./ต้น ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยบริสุทธิ์ 25 มล./ต้น และไม่ปลูกเชื้อ มีการวางแผนการทดลองแบบ 3x2 Split plot in Completely Randomized Design โดยมีวิธีการปลูกเชื้อเป็น main plot และกล้าไม้ 2 ชนิด เป็น sub plot แต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ และแต่ละซ้ำมีกล้าไม้ 4 ต้น ดังนั้นจึงมีกล้าไม้แต่ละชนิดจำนวน 36 ต้น และมีกล้าไม้รวมกันทั้งหมด 72 ต้น

เมื่อกล้าไม้มีอายุครบ 8 เดือน กล้าไม้ที่ปลูกเชื้อมีรากเอคโตไมคอร์ไรซาเกิดขึ้น ในขณะที่กล้าไม้ที่ไม่ได้ปลูกเชื้อไม่พบเลย โดยรูปร่างของรากเอคโตไมคอร์ไรซามี 2 แบบ คือ monopodial pinnate และ irregular pinnate มีสีครีมถึงสีน้ำตาลปนส้ม มี rhizomorph สีน้ำตาลอ่อนเจริญพันอยู่กับราก และมี sclerotium สีน้ำตาลเข้มหรือน้ำตาลปนดำ รูปทรงรี ผิวเรียบเป็นมัน เกิดปนกับรากด้วย ลักษณะทางกายวิภาคของรากพบว่ามีแผ่นแมนเทิลเจริญอยู่ล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้น และเกิดขึ้นในปริมาณร้อยละ 32-60 เมื่อตรวจชนิดราที่อยู่ร่วมกับรากด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่าส่วนใหญ่เป็นเห็ดเผาะหนังที่ใช้ในการปลูกเชื้อ พบการปนเปื้อนของรา *Talaromyces verruculosus* ด้วย

จากการวิเคราะห์ข้อมูลการเติบโตทางสถิติ พบว่าวิธีการปลูกเชื้อและชนิดของกล้าไม้ ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก และความสูงของกล้าไม้ น้ำหนักแห้งส่วนยอด ส่วนราก และน้ำหนักแห้งรวม แต่มีปฏิสัมพันธ์เกิดขึ้นระหว่างวิธีการปลูกเชื้อและชนิดของกล้าไม้ ซึ่งส่งผลให้เส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก และความสูง น้ำหนักแห้งส่วนราก และน้ำหนักแห้งรวมของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกเชื้อดีกว่ากล้าไม้พลวงที่ปลูกเชื้อ ส่วนปริมาณธาตุอาหารในกล้าไม้นั้น พบว่าวิธีการปลูกเชื้อทำให้ธาตุ N ในกล้าไม้ที่ได้รับการปลูกเชื้อสูงกว่ากล้าไม้ที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ ส่วนธาตุ C, P, K มีปริมาณเท่ากัน และชนิดของกล้าไม้มีผลต่อปริมาณธาตุอาหารในต้น โดยกล้าไม้พะยอมมีธาตุ C, N และ P สูงกว่ากล้าไม้พลวง แต่มีธาตุ K น้อยกว่า

**การทดลองที่ 2 การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้พะยอมที่ปลูกในวัสดุปลูก 2 สูตร ต่อการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนัง** โดยได้ทำการปลูกเชื้อเห็ดเผาะหนังให้แก่กล้าไม้ ที่วางอยู่ในเรือนเพาะชำกล้าไม้ที่ผนังประกอบด้วยตาข่ายละเอียดป้องกันแมลง ด้วยวิธีการปลูกเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และปลูกกล้าไม้ในวัสดุปลูก 2 สูตร คือ สูตร 1 Peat: Vermiculite: Sand = 1: 9 :0 และ สูตร 2 Peat: Vermiculite: Sand = 2: 7: 1 (V: V: V) วางแผนการทดลองแบบ 3x2 Split plot in Completely Randomized Design โดยมีวิธีการปลูกเชื้อเป็น main plot และวัสดุปลูกที่ไม่รมควันฆ่าเชื้อเป็น sub plot แต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ และแต่ละซ้ำมีกล้าไม้ 4 ต้น ดังนั้นจึงมีกล้าไม้พะยอมที่ปลูกในวัสดุปลูกแต่ละสูตรจำนวน 36 ต้น รวมเป็นกล้าไม้พะยอมทั้งหมด 72 ต้น

เมื่อกล้าไม้พะยอมมีอายุครบ 8 เดือน พบรากเอคโตไมคอร์ไรซาเกิดขึ้นในกล้าไม้พะยอมทั้งที่ปลูกเชื้อและไม่ปลูกเชื้อ โดยมีรูปร่างของราก 3 แบบ คือ unramified, monopodial pinnate และ irregular pinnate รากมีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลปนส้ม ผิวเรียบ เป็นมัน มี rhizomorph สีน้ำตาลอ่อนเจริญพันอยู่กับราก และมี sclerotium สีน้ำตาลปนส้ม รูปทรงกลมถึงรี ผิวเรียบเป็นมัน เกิดกระจายรอบรากเป็นจำนวนมาก ลักษณะกายวิภาคของรากนั้น มีแผ่นแมนเทิลเจริญล้อมรอบชั้นเซลล์ผิว แผ่นแมนเทิลประกอบด้วยเส้นใยใสไม่มีสี มีเส้นใยฮาร์ติกเน็ทเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของชั้นเซลล์ผิว จำนวน 1 ชั้น พวกที่ได้รับการปลูกเชื้อพบรากเอคโตไมคอร์ไรซา (ร้อยละ 48-75) มากกว่าพวกที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (ร้อยละ 19-30) โดยวัสดุปลูกที่ต่างกันไม่มีผลต่อปริมาณรากเอคโตไมคอร์ไรซา เมื่อนำเส้นใยเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกจากรากเอคโตไมคอร์ไรซา เม็ด sclerotium และรากเอคโตไมคอร์ไรซาไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่าชนิดของราที่อยู่ร่วมกับราก คือ เห็ดเผาะหนัง จากการวิเคราะห์ข้อมูลการเติบโตทางสถิติ พบว่าวิธีการปลูกเชื้อ ไม่ทำให้การเติบโตทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก ความสูง น้ำแห้งส่วนยอด และน้ำหนักแห้งรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ทำให้กล้าไม้มีปริมาณธาตุอาหาร และน้ำหนักแห้งส่วนรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่ากล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์มีปริมาณ C, N, P และ K สูงกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการ 2 วิธี มีปริมาณธาตุอาหารดังกล่าวไม่แตกต่างกัน สำหรับวัสดุปลูก 2 สูตร ไม่ทำให้กล้าไม้มีการเติบโตที่แตกต่างกันในด้านใดเลย ดังนั้นการผลิตกล้าไม้ให้มีเห็ดเผาะหนังเป็นเอคโตไมคอร์ไรซา จึงสามารถเลือกใช้วิธีการปลูกเชื้อด้วยสปอร์หรือด้วยเส้นใยบริสุทธิ์และวัสดุปลูกสูตรใดสูตรหนึ่งใน 2 สูตรนี้ก็ได้

# ข้อเสนอแนะ

มีข้อเสนอแนะที่มาจากผลการวิจัย ดังต่อไปนี้

1. การปลูกเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาให้แก่กล้าไม้ที่ในธรรมชาติทราบแล้วว่ามีเอคโตไมคอร์ไรซาด้วยเชื้อราชนิดที่เหมาะสม สามารถเพิ่มปริมาณรากเอคโตไมคอร์ไรซาได้อย่างแน่นอน

2. วิธีที่ง่ายและสะดวกในการผลิตกล้าไม้วงศ์ยางให้มีเห็ดเผาะหนังเป็นเอคโตไมคอร์ไรซาคือการปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยสปอร์ แต่ต้องทำในระยะเวลาที่มีการออกของดอกเห็ด และจะต้องแน่ใจว่าเห็ดที่เก็บมาเป็นเห็ดเผาะหนังซึ่งการระบุชนิดของเห็ดอาจดูจากลักษณะสัณฐานและกายวิภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ หรือใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

3. การดูแลรักษากล้าไม้ภายหลังจากการปลูกเชื้อราชนิดที่ต้องการมีความสำคัญอย่างมาก ต้องระวังการปนเปื้อนของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ ที่อาจมากับน้ำ แมลง และอากาศ

4. กล้าไม้ต่างชนิดกัน มีราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดเดียวกันได้ เช่น ในกรณีของกล้าไม้พลวงและกล้าไม้พะยอมที่มีเห็ดเผาะหนังเป็นเอคโตไมคอร์ไรซา ดังนั้นจึงควรมีการทดลองใช้ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่หลากหลายมาปลูกเชื้อให้แก่กล้าไม้ เพื่อให้ทราบชนิดราที่เหมาะสมกับกล้าไม้แต่ละชนิด

5. การใช้วัสดุเพาะที่ประกอบด้วย peat, vermiculite และทราย แทนดินได้ผลดีมาก ช่วยตัดปัญหาเรื่อง การหาดินที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตกล้าไม้ให้มีราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดที่ต้องการ และการนำดินไปอบฆ่าสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในดิน ซึ่งเป็นเรื่องที่ยุ่งยาก แม้ว่าจะต้องมีค่าใช้จ่ายในการซื้อวัสดุเพาะแต่ก็คุ้มค่ามาก

# เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง


กรมป่าไม้. 2550. สถิติการป่าไม้ของประเทศไทย. สำนักงานเลขานุการกรม กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

จำลอง เพ็งคล้าย และ ชวลิต นิยมธรรม. 2542. พรรณไม้วงศ์ไม้ยางในประเทศไทย, น. 5-206. *ใน* การสัมมนาทางวิชาการเรื่องไม้ยางนาและไม้ในวงศ์ยาง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จินตนา บุพบรรพต และ ศิริภา โพธิ์พินิจ. 2545. การใช้ประโยชน์ของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซากับกล้าไม้วงศ์ยาง: ความหลากหลายของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในสวนป่าไม้วงศ์ยางบางชนิด และการแยกเชื้อรา, น. 394-405. *ใน* รายงานการประชุมวิชาการป่าไม้. กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

ชนะ ผิวเหลือง, สมยศ กิจค้า และ จุติเทพ โพธิปักษ์. 2542. อิทธิพลของปุ๋ยและเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้ยางนาและตะเคียนทอง, น. 129-145. *ใน* การสัมมนาทางวิชาการเรื่อง ไม้ยางนาและไม้ในวงศ์ยาง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

ธารรัตน์ แก้วกระจ่าง. 2551. การเติบโตและการใช้น้ำของกล้าไม้ยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G. Don) ที่อยู่ร่วมกับเห็ดเผาะหนัง ( *Astraeus odoratus* C. Phosri, R. Watling, M.P. Martín & A.J.S. Whalley) แบบเอคโตไมคอร์ไรซา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทนุวงศ์ แสงเทียน. 2534. เอคโตไมคอร์ไรซาของไม้วงศ์ยาง (*Dipterocarpus alatus* Roxb.) และผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญชุบ บุญทวี. 2542. สวน (ป่า) ไม้ยางนา, น. 285-297. *ใน* ไม้ยางนาและไม้ในวงศ์ยาง เล่ม 3: นานาสาระเกี่ยวกับไม้วงศ์ยาง. กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ. 356 หน้า.

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

ศูนย์วิจัยป่าไม้. 2552. โครงการส่งเสริมปลูกต้นไม้เพื่อเป็นทุนระยะยาว: รายงานฉบับสมบูรณ์. ศูนย์วิจัยป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 193 น.

สำนักพระราชวัง. 2550. ไม้ยางนา จากป่าสู่วัง. บริษัท บเรนเวอร์ค ดีไซน์ จำกัด, กรุงเทพฯ.

สุภาณี เพชรแก้ว. 2545. การจำแนกชนิดของเอคโตไมคอร์ไรซาในไม้ยางนาโดยใช้ลำดับเบสของ Mitochondrial Large Subunit rDNA. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์, อุทัยวรรณ แสงวณิช, T. Morinaga, Y. Nishizawa และY. Murakami. 2551. ความหลากหลายของเห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 514 หน้า.

อุทัยวรรณ แสงวณิช. 2537. เอคโตไมคอร์ไรซาของไม้ป่า, น. 192-199. *ใน* ชมรมนักเรียนทุนมูลนิธิ “อานันทมหิดล”, บรรณาธิการ. เรื่องน่ารู้สำหรับประชาชน เล่มที่ 21. บริษัท เอช. เอ็น. กรุ๊ป จำกัด, กรุงเทพฯ.

อนิวรรต เฉลิมพงษ์ และ ธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ. 2524. การสำรวจเชื้อราไมคอร์ไรซาที่สัมพันธ์กับรากต้นไม้ในระบบนิเวศน์วิทยาป่าเต็งรังท้องที่ป่าสะแกราช. กองบำรุง, กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

อนิวรรต เฉลิมพงษ์ และ ธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ. 2525. การสำรวจเอคโตไมคอร์ไรซาในระบบนิเวศวิทยาป่าดิบแล้ง. กองบำรุง, กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

Alwis, D.P. and K. Abeynayake. 1980. A survey of mycorrhizae in some forest tree of Sri Lanka, pp. 146-153. *In* P. Mikola, ed. Tropical Mycorrhiza Research. Oxford Press, Oxford.

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

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

Fangfuk, W., K. Okada, R. Petchang, C. To-anum, M. Fukada and A. Yamada. 2010a. *In vitro* mycorrhization of edible *Astraeus* mushrooms and their morphological characterization. Mycoscience 51: 234-241.

Fangfuk, W., R. Petchang, C. To-anum, M. Fukada and A. Yamada. 2010b. Identification of Japanese *Astraeus,* based on morphological and phylogenetic analyses. Mycoscience 51: 291-299.

Iotti M. and A. Zambonelli. 2006. A quick and precise technique foridentifying ectomycorrhizas by PCR. Mycol Res 110: 60–65.

Petcharat, V. 2005. Edible *Astraeus* (Basidiomycota) from Thailand. Nordic Journal of Botany 23 (4): 499-503.

Phosri, C., R. Watling, M. P. Martín and A. J. S. Whalley. 2004. The genus *Astraeus* in Thailand. Mycotaxon 89(2): 453-463

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

Phosri, C., R. Watling, Suwannasai N, Wilson A and M. P. Martín. 2014. A new representative of star-shaped fungi: *Astraeus sirindhoniae* sp. nov. from Thailand. Plos ONE 9(5): e71160. doi:10.1371/journal.pone.0071160.

Hadi, S., Y. Fakuara, Y. Setiadi, R. Prematuri and S.T. Nuhamara. 1991. Status of mycorrhiza research on dipterocarps in Indonesia, pp. 75-81. *In* Proceedings of Pre-Workshop on BIO-REFOR. March 26-28, Bogor, Indonesia.

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

Pollisco, M.T. 1991. Ecology and propagation of the Philippine dipterocarps: a review, pp. 20-44. *In* Proceedings of Pre-Workshop on BIO-REFOR. March 26-28, Bogor, Indonesia.

Shyun, C.N., F. Lapeyrie and S.S. Lee. 1994. The survival and competitiveness of *Pisolithus tinctorius* in outplanted seedling of *Dipterocarpus alatus* and *Shorea glauca* in Malaysia: Preliminary report. *In* Abstract of the Fifth Round-table Conference on Dipterocarps. 7-10 November, 1994. Chiang Mai.

Singh, K.G. 1966. Ectotropic mycorrhiza in equatorial rain forest. Malay. Forester 39: 13-19.

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

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

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

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

# ภาคผนวก

**ตารางผนวกที่ 1** ผลการวิเคราะห์ดินซึ่งผ่านการรมด้วยสารเคมีเพื่อฆ่าสิ่งมีชีวิตทุกชนิดก่อนนำมาใช้ปลูกกล้าไม้

| Sample | Soil Texture | | | | pH | Organic matter | | Total | Total nitrogen | | Phosphorus | | Potassium | | Calcium | | Magnesium | | Remark |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Name | %Sand | %Silt | %Clay | Texture | | % | Rate | carbon (%) | % | Rate | (mg/kg) | Rate | (mg/kg) | Rate | (mg/kg) | Rate | (mg/kg) | Rate | |
| 1 | 63 | 9 | 28 | SCL | 5.01 | 5.21 | VH | 1.64 | 0.18 | H | 4.01 | L | 40.72 | L | 211.80 | L | 28.18 | VL | 0-15 |
| 2 | 60 | 12 | 28 | SCL | 5.08 | 6.10 | VH | 1.8 | 0.19 | H | 4.16 | L | 36.74 | L | 210.80 | L | 25.38 | VL | 0-15 |
| 3 | 59 | 11 | 30 | SCL | 5.04 | 6.88 | VH | 1.96 | 0.20 | H | 3.50 | L | 32.78 | L | 216.60 | L | 24.68 | VL | 0-15 |
| 4 | 57 | 14 | 29 | SCL | 5.11 | 6.15 | VH | 2.22 | 0.20 | H | 3.72 | L | 46.82 | L | 247.80 | L | 31.30 | VL | 0-15 |

**ภาพผนวกที่ 1** เห็ดถ้วยสีส้มที่เจริญเป็นกลุ่มอยู่บนผิวดิน

**ภาพผนวกที่ 2** ภาพถ่ายจากกล้อง Stereomicroscope ของแมลงในกลุ่มแมลงหางหนีบที่พบในดิน

# ประวัติผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการและคณะผู้วิจัย ประกอบด้วย

**1. ฝ่ายไทย**

**หัวหน้าโครงการวิจัย**

| | |
|---|---|
| ชื่อ-นามสกุล | นางสาวอุทัยวรรณ แสงวณิช |
| คุณวุฒิ | Ph.D. (Forest Resources) (Forest Pathology and Mycorrhizal Physiology), University of Washington, Seattle, U.S.A. |
| อาชีพ | ข้าราชการ |
| หน่วยงาน | ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| บัตรประจำตัวประชาชน | 3101500252054 |
| สถานที่ติดต่อ | ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 |
| โทรศัพท์ | 02-579-0176 ต่อ 520 |
| โทรสาร | 02-942-8107 |
| E-mail | fforuws@ku.ac.th |
| สัดส่วนงานวิจัย | 20% |

**รองหัวหน้าโครงการวิจัย**

| | |
|---|---|
| ชื่อ-นามสกุล | นายมณฑล จำเริญพฤกษ์ |
| คุณวุฒิ | Ph.D. (Forestry) Agroforestry University of the Philippines (UPLB) |
| อาชีพ | ข้าราชการ |
| หน่วยงาน | ภาควิชาวนวัฒนวิทยา คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| บัตรประจำตัวประชาชน | 3199900030293 |
| สถานที่ติดต่อ | ภาควิชาวนวัฒนวิทยา คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 |
| หมายเลขโทรศัพท์ | 02-579-0171 ต่อ 114 |
| โทรสาร | 02-942-8112 |

| | |
|---|---|
| E-mail | fformtj@ku.ac.th |
| สัดส่วนงานวิจัย | 10% |

**ผู้ร่วมงานวิจัยคนที่ 1**

| | |
|---|---|
| ชื่อ-นามสกุล | นายเจษฎา วงค์พรหม |
| คุณวุฒิ | วท. ม. (วนศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| อาชีพ | พนักงานมหาวิทยาลัย |
| ตำแหน่งและหน่วยงาน | เจ้าหน้าที่บริหารงาน<br>สถานีวิจัยวนศาสตร์พังงา<br>คณะวนศาสตร์<br>มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| บัตรประจำตัวประชาชน | 3560500330425 |
| สถานที่ติดต่อ | สถานีวิจัยวนศาสตร์พังงา<br>หมู่ 1 ตำบลบางม่วง อำเภอตะกั่วป่า<br>จังหวัดพังงา 82190 |
| หมายเลขโทรศัพท์ | 076-593601 |
| โทรสาร | 076-593601 |
| E-mail | wongprom_65@hotmail.com |
| สัดส่วนงานวิจัย | 10% |

**ผู้ร่วมงานวิจัยคนที่ 2**

| | |
|---|---|
| ชื่อ-นามสกุล | นางเยาวภา อร่ามศิริรุจิเวทย์ (ตาปราบ) |
| คุณวุฒิ | วท.ด. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)<br>มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| อาชีพ | ข้าราชการ |
| หน่วยงาน | ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์<br>มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์<br>50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว<br>เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 |
| บัตรประจำตัวประชาชน | 3709900347461 |
| สถานที่ติดต่อ | ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์<br>มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์<br>50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว<br>เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 |
| โทรศัพท์ | 02-562-5555 ต่อ 4012 |
| โทรสาร | 02-579-2081 |
| E-mail | fsciypt@nontri.ku.ac.th |

สัดส่วนงานวิจัย 10%

**ผู้ร่วมงานวิจัยคนที่ 3**

| | |
|---|---|
| ชื่อ-นามสกุล | นายบารมี สกลรักษ์ |
| คุณวุฒิ | วท.ม. (วนศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| อาชีพ | นิสิตปริญญาเอก สาขานิเวศวิทยาป่าไม้<br>ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์<br>มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| บัตรประจำตัวประชาชน | 3101900561208 |
| สถานที่ติดต่อ | ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์<br>มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์<br>50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว<br>เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 |
| E-mail | sakolrak.b@gmail.com |
| สัดส่วนงานวิจัย | 25% |

**ประวัติผู้ร่วมวิจัยคนที่ 4**

| | |
|---|---|
| ชื่อ-นามสกุล | นางสาวธารรัตน์ แก้วกระจ่าง |
| คุณวุฒิ | Ph.D. (Agricultural Sciences) Tottori University, Japan |
| อาชีพ | พนักงานมหาวิทยาลัยสายวิชาการ ตำแหน่งอาจารย์ |
| หน่วยงาน | ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์<br>มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| บัตรประจำตัวประชาชน | 3170600008707 |
| สถานที่ติดต่อ | ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์<br>มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์<br>50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว<br>เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 |
| โทรศัพท์ | 02-579-0176 ต่อ 506 |
| โทรสาร | 02-942-8107 |
| E-mail | ffortrk@ku.ac.th |
| สัดส่วนงานวิจัย | 25% |

**2. ฝ่ายต่างประเทศ**

**หัวหน้าโครงการวิจัย**

| | |
|---|---|
| ชื่อ นามสกุล | Mr. Takashi Yamanaka |
| คุณวุฒิ | Ph. D., Kyoto University |

| | |
|---|---|
| ด้านความเชี่ยวชาญ | Trees and mycorrhizal associations |
| ตำแหน่ง | Team Leader; Studies include symbiotic interaction between Frankia, actinorrhizal plants and ectomycorrhizal fungi, stimulation of growth of pine and oak by ectomycorrhizal fungi, cultivation of matsutake mushroom |
| หน่วยงาน | Forestry and Forest Products Research Institute, Japan |