

สังคมนาเอกโตไมคอร์ไรซาในป่าสนผสมเต็งรัง และการทดสอบการสร้างไมคอร์ไรซาของ
ราเอกโตไมคอร์ไรซาชนิดกินได้ในสภาวะทดลอง



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2557

สังคมราเอกโตไมคอร์ไรซาในป่าสนผสมเต็งรัง และการทดสอบการสร้างไมคอร์ไรซาของ
ราเอกโตไมคอร์ไรซาชนิดกินได้ในสภาวะทดลอง



ปริญญาโท
ของ
ปริยากรณ์ ดอกไม้

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พฤษภาคม 2557

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สังคมราเอกโตไมคอร์ไรซาในป่าสนผสมเต็งรัง และการทดสอบการสร้างไมคอร์ไรซาของ
ราเอกโตไมคอร์ไรซาชนิดกินได้ในสภาวะทดลอง



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2557

ปริยาภรณ์ ดอกไม้. (2557). *สังคมราเอกโตไมคอร์ไรซาในป่าสนผสมเต็งรัง และการทดสอบการสร้างไมคอร์ไรซาของราเอกโตไมคอร์ไรซาชนิดกินได้ในสภาวะทดลอง*. ปรินญาณิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: อาจารย์ ดร.ณัฐวิภา สุวรรณาศรัย, อาจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี.

ดอกเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซาจำนวน 28 และ 109 ตัวอย่าง เก็บรวบรวมได้จากพื้นที่ป่าสนผสมเต็งรัง ณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จ.ชัยภูมิ ช่วงเดือนพฤษภาคม – ตุลาคม พ.ศ. 2554 ผลการจัดจำแนกชนิดของราเอกโตไมคอร์ไรซาโดยอาศัยข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS สามารถจัดจำแนกชนิดเห็ดทั้ง 28 ตัวอย่าง ได้ 8 วงศ์ (Amanitaceae, Boletaceae, Diplocystaceae, Gomphaceae, Inocybaceae, Russulaceae, Sclerodermataceae และ Tricholomataceae) 13 สกุล 20 ชนิด ซึ่งวงศ์ที่พบมากที่สุดได้แก่ Gomphaceae (ร้อยละ 39.3) รองลงมาคือ Boletaceae (ร้อยละ 21.4) ในขณะที่รากเอกโตไมคอร์ไรซาจำนวน 109 ตัวอย่าง สามารถแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือ morphotypes ได้เท่ากับ 23 morphotypes เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนได้ 96 ตัวอย่าง (ร้อยละ 88) แต่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียง 44 ตัวอย่าง (ร้อยละ 40.4) ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถจัดจำแนกชนิดได้ 9 วงศ์ (Amanitaceae, Boletaceae, Ceratobasidiaceae, Inocybaceae, Russulaceae, Sclerodermataceae, Sebacinaceae, Thelephoraceae และ Dothideomycetes (*Cenococcum geophilum*) 10 สกุล 30 ชนิด ซึ่งวงศ์ที่พบมากที่สุดได้แก่ Russulaceae (ร้อยละ 50) รองลงมาคือ Thelephoraceae (ร้อยละ 22.7) จากตัวอย่างเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซาที่เก็บรวบรวมได้ มีเพียง 1 ตัวอย่างของเห็ด *Astraeus sirindhorniae* PKBP28 และ 1 ตัวอย่างของรากเอกโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma sinnamariense* (RBP1-1) ที่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MNC ที่อุณหภูมิ 30°C ได้ ดังนั้นจึงได้เลือกเห็ด *A. sirindhorniae* PKBP28 มาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราเจริญได้ดีที่สุดคือ MNC และ MS ที่ pH 6 และ อุณหภูมิห้อง (28-30°C) จากนั้นทำการทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาโดยใช้พีช 2 ชนิด คือ กล้าสนสามใบ และกล้ายางนา เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าไม่มีการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในกล้าสนสามใบ แต่พบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในกล้ายางนา ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 6.25 ของการติดเชื้อเมื่อใส่เชื้อที่อยู่ในรูปของเส้นใย และคิดเป็นร้อยละ 36.77 ของการติดเชื้อเมื่อใส่เชื้อในรูปของสารแขวนลอยสปอร์ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายางนาเป็นพืชอาศัยของเห็ด *A. sirindhorniae* นอกจากนี้ได้ตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อเห็ด *A. sirindhorniae* จากรากเอกโตไมคอร์ไรซาโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ผลการทดสอบรากเอกโตไมคอร์ไรซาจำนวน 160 ตัวอย่าง (root tips) สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ 143 ตัวอย่าง (ร้อยละ 89.38) จากนั้นสุ่ม 15 ตัวอย่างไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าทุกตัวอย่างมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเห็ด *A. sirindhorniae* เท่ากับร้อยละ 100

ECTOMYCORRHIZAL FUNGI COMMUNITY IN PINE-OAK FOREST AND MYCORRHIZAL
SYNTHESIS OF EDIBLE ECTOMYCORRHIZAL FUNGI IN VITRO



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Biotechnology
at Srinakharinwirot University

May 2014

Preeyaporn Dokmai. (2014). *Ectomycorrhizal fungi community in Pine-Oak forest and mycorrhizal synthesis of edible ectomycorrhizal fungi in vitro*. Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr. Nuttika Suwannasai, Dr. Cherdchai Phosri.

The ectomycorrhizal (ECM) fungi both fruit bodies and root tips were collected from pine-oak forest in PhuKhieo Wildlife Sanctuary, Chaiyaphum Province, during October to December 2011. The study site was performed in 100×100 m plot. The total number of fungi studied was 28 and 109 samples, respectively. They were then identified by using both morphological and molecular characteristics. The nucleotide sequences of ITS were determined and analysed. Ectomycorrhizal fruit-bodies obtained were identified as belonging to 8 families (Amanitaceae, Boletaceae, Diplocystaceae, Gomphaceae, Inocybaceae, Russulaceae, Sclerodermataceae and Tricholomataceae), 13 genera and 20 species. The dominant ECM families were the Gomphaceae (39.3%) and Boletaceae (21.4%) respectively. Ectomycorrhizal root tips were divided into 23 different morphotypes based on mantle colours, shapes and branching. From a total 109 ECM root samples, 96 (88%) samples were successfully amplified, but only 44 (40.4%) samples were successfully sequenced. They were divided into 9 families (Amanitaceae, Boletaceae, Ceratobasidiaceae, Inocybaceae, Russulaceae, Sclerodermataceae, Sebacinaceae, Thelephoraceae and Dothideomycetes (*Cenococcum geophilum*)), 10 genera and 30 species. The most frequent fungal taxa found were Russulaceae (50%) followed by Thelephoraceae (22.7%). Among all collections, only one sample of fruit body, *Astraeus sirindhorniae* PKBP28, and one sample of ECM root, *Scleroderma sinnamariense* (RBP1-1), were obtained for pure cultures. *Astraeus sirindhorniae* PKBP28 was then selected. The optimum conditions were studied for inoculum production. The optimal medium, pH and temperature for mycelial growth were MNC, pH 6 and room temperature (28-30°C). The ability of *A. sirindhorniae* to form ectomycorrhizae was tested with two seedlings of *Pinus kesiya* and *Dipterocarpus alatus* using both mycelial inoculum and spore suspension. At 6 months after inoculation, *A. sirindhorniae* ectomycorrhizae developed a sheath, rhizomorphs and hartig net on *D. alatus* lateral roots in both treatments. The percentages of ectomycorrhizal formation using mycelial inoculum and spore suspension were 6.25% and 36.77%, respectively. There was no ectomycorrhizal formation observed from *P. kesiya* roots. These results indicate that *D. alatus* is a host of *A. sirindhorniae*. Moreover, the ITS2 region was analysed to detect all ECM roots. From a total 160 ECM root tips, 140 (89.38%) samples were amplified. Fifteen Amplicons were then selected to sequence and analysed. The comparison results revealed 100% similarity to *A. sirindhorniae* for all samples.

ปริญญาบัตร

เรื่อง

สังคมนาเอกโตไมคอร์ไรซาในป่าสนผสมเต็งรัง และการทดสอบการสร้างไมคอร์ไรซาของ

ราเอกโตไมคอร์ไรซาชนิดกินได้ในสภาวะทดลอง

ของ

ปรียาภรณ์ ดอกไม้

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒน์กุล)

วันที่ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2557

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาบัตร

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ที่ปรึกษาหลัก

..... ประธาน

(อาจารย์ ดร.ณัฐฉิภา สุวรรณาศรัย)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ)

..... ที่ปรึกษาร่วม

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ณัฐฉิภา สุวรรณาศรัย)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญาโทฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์ ดร. ญัฐจิภา สุวรรณาศรัย อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท และอาจารย์ ดร.เชตชัย โพธิ์ศรี อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโทร่วม ผู้ที่ทุ่มเทให้ความช่วยเหลืออย่างเต็มที่ เสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและคำแนะนำทั้งในด้านการศึกษา และการจัดทำวิจัยมาโดยตลอด อีกทั้งยังคอยตักเตือนสั่งสอน แนะนำทั้งในด้านวิทยากร ความรู้ จริยธรรมประกอบการทำปริญญาโทที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้ากราบขอพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) (ภายใต้การดูแลของ ดร.เชตชัย โพธิ์ศรี) ข้าพเจ้ากราบขอพระคุณอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ชิงฉินาญ โพธิ์เวชกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รังษิรุจิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ อาจารย์ ดร.ประวิติ อังประภาพรชัย และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ให้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ทำให้ผู้วิจัยนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการจัดทำงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ที่เอื้อสถานที่และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ในการศึกษาทดลอง

ขอขอบพระคุณ Associate Professor Dr. Akiyoshi Yamada (Agriculture, Shinshu University, Nagano, Japan) ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำเทคนิคในการแยกและเพาะเลี้ยงราเอกโตไมคอร์ไรซา รวมทั้งความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ไปศึกษาแลกเปลี่ยนความรู้ที่ประเทศญี่ปุ่น

ขอขอบพระคุณ หัวหน้าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน รวมทั้งอาจารย์ ดร.รุ่งเพชร แข็งแรง (มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม) ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการเก็บรวบรวมตัวอย่างราเอกโตไมคอร์ไรซาที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาอนุเคราะห์เมล็ดยางนาเพื่อใช้ในการทำวิจัย และให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณนางสาวดวงเนตร ปทุมมา เจ้าหน้าที่สวนรุกขชาติห้วยแก้ว จ.เชียงใหม่ ที่กรุณาอนุเคราะห์เมล็ดสนสามใบเพื่อใช้ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรรมการสอบปริญญาโท และช่วยแก้ไขปริญญาโทฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย ที่มอบเงินทุนอุดหนุนนิสิตแลกเปลี่ยน (Postgraduate Student Exchange, GRAD S-4-57) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

ท้ายที่สุดข้าพเจ้าขออภิวินิจฉัยถึงพระคุณของบิดา มารดาที่สนับสนุน ช่วยเหลือและให้กำลังใจข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำปริญญาโทจนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับมิตรภาพ ความช่วยเหลือ และน้ำใจอันมีค่าอย่างยิ่งและขอขอบคุณผู้มีพระคุณท่านอื่นๆ ที่มีได้กล่าวนามในที่นี้ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านจนปริญญาโทฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

ปรียาภรณ์ ดอกไม้

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลังและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ผลที่ได้รับจากการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ไมคอร์ไรซา.....	5
อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา.....	6
เอคโตไมคอร์ไรซา.....	7
เอคเทนโดไมคอร์ไรซา.....	8
อีริคอยด์ไมคอร์ไรซา.....	9
อาร์บิวทอยด์ไมคอร์ไรซา.....	10
โมโนโทรพอยด์ไมคอร์ไรซา.....	11
ออร์คิดไมคอร์ไรซา.....	12
ราเอคโตไมคอร์ไรซา.....	13
ความสัมพันธ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัย.....	13
บทบาทที่สำคัญของราเอคโตไมคอร์ไรซา.....	19
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของราเอคโตไมคอร์ไรซา.....	23
รากเอคโตไมคอร์ไรซา.....	24
เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา.....	30
การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของราเอคโตไมคอร์ไรซา.....	36
ความหลากหลายของราเอคโตไมคอร์ไรซาในประเทศไทย.....	37
เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่สามารถรับประทานได้ในประเทศไทย.....	39
การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในพืชอาศัย.....	41
การทดสอบในสภาวะที่ปราศจากเชื้อ.....	41
การทดสอบในกระถางปลูก.....	43
การผลิตหัวเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่รับประทานได้.....	44

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	47
การสำรวจและการเก็บรวบรวมตัวอย่างราเอกโตไมคอร์ไรซา.....	49
การคัดแยกและเพาะเลี้ยงเส้นใยราบริสุทธิ.....	50
การคัดแยกเส้นใยของเห็ดให้บริสุทธิ์.....	51
การคัดแยกเส้นใยของรากเอกโตไมคอร์ไรซาให้บริสุทธิ์.....	51
การศึกษาเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซาโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน.....	52
การจำแนกชนิดของเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซา.....	52
การจำแนกชนิดของรากเอกโตไมคอร์ไรซา.....	52
การศึกษาเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซาโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์	
บริเวณ internal transcribed spacers (ITS).....	53
การสกัดดีเอ็นเอของเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซา.....	53
การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์	
(Polymerase Chain Reaction, PCR).....	54
การโคลนดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์ (DNA cloning vector).....	57
การเชื่อมต่อนชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ (Ligation).....	57
การนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิต	
(Transformation).....	58
การคัดเลือกพลาสมิด.....	58
การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากพลาสมิดด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์	
(Polymerase Chain Reaction, PCR).....	58
การทำชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	59
การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซา.....	59
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซา	
บริสุทธิ์.....	59
การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	60
การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH).....	60
การศึกษาผลของอุณหภูมิ.....	60
การวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญในสภาวะต่างๆ.....	60
การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัย.....	61
การเตรียมเมล็ดสนสามใบและเมล็ดยางนา.....	61

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	61
การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในจานเลี้ยงเชื้อ.....	61
การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง.....	61
การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาบนวัสดุปลูก.....	62
การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในถุงเพาะชำ.....	62
การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาโดยใช้สารแขวนลอยของสปอร์.....	63
การตรวจสอบการติดเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซาในรากพืชทดสอบ.....	63
การตรวจวัดการเจริญเติบโตของพืช.....	63
การวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตของพืช.....	64
การตรวจสอบลักษณะของรากเอกโตไมคอร์ไรซา.....	64
การตรวจวัดร้อยละการติดเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซา.....	64
การตรวจพิสูจน์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	64
4 ผลการทดลอง	66
การเก็บรวบรวมตัวอย่างราเอกโตไมคอร์ไรซาและการเพาะเลี้ยงเส้นใย บริสุทธิ์.....	66
การจำแนกชนิดของเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซาโดยอาศัยลักษณะทาง สัณฐาน.....	69
เห็ดเอกโตไมคอร์ไรซา.....	69
รากเอกโตไมคอร์ไรซา.....	85
การจัดจำแนกชนิดของเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซาโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอ ไทด์บริเวณ Internal transcribed spacers (ITS).....	91
เห็ดเอกโตไมคอร์ไรซา.....	91
รากเอกโตไมคอร์ไรซา.....	95
ความสัมพันธ์ของเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซา.....	100
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซาบริสุทธิ์.....	104
ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	104
ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH).....	106
ผลของอุณหภูมิ.....	107
การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัย.....	109

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 (ต่อ)	109
การเตรียมกล้าไม้สนสามใบและกล้าไม้ยางนา.....	109
การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในจานเลี้ยงเชื้อ.....	110
การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MNC และ MS.....	110
การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในวัสดุปลูก.....	111
การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในถุงเพาะชำ.....	111
การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมจากเส้นใย ราเห็ดเผาะสีรินทร (<i>A. sirindhorniae</i> PKBP28-1).....	111
การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาโดยใช้สารแขวนลอยของสปอร์ ราเห็ดเผาะสีรินทร (<i>A. sirindhorniae</i>).....	120
การตรวจพิสูจน์รากเอกโตไมคอร์ไรซาด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล.....	122
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	124
บรรณานุกรม	131
ภาคผนวก	144
ภาคผนวก ก.....	145
ภาคผนวก ข.....	149
ภาคผนวก ค.....	153
ภาคผนวก ง.....	155
ภาคผนวก จ.....	165
ประวัติย่อผู้วิจัย	167

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ตัวอย่างความสัมพันธ์ของราเอกโตไมคอร์ไรซากับชนิดพืชอาศัย.....	16
2 พืชอาศัยของราเอกโตไมคอร์ไรซา.....	18
3 ตัวอย่างเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซา.....	34
4 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	47
5 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	48
6 ไพร์เมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการทดลอง.....	55
7 จำนวนตัวอย่างรากเอกโตไมคอร์ไรซาและชนิดพืชที่พบในพื้นที่ป่าสนผสมเต็งรัง.....	67
8 ชนิดของตัวอย่างเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาที่พบในแปลงศึกษา.....	70
9 ลักษณะของรากเอกโตไมคอร์ไรซา และบริเวณที่พบในพื้นที่บึงแพน.....	88
10 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซา ใน ฐานข้อมูล GenBank และ Unite.....	93
11 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรากเอกโตไมคอร์ไรซา ในฐานข้อมูล GenBank และ Unite.....	96
12 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของรากเอกโตไมคอร์ไรซาของรากเอกโต ไมคอร์ไรซาที่สร้างจากรา <i>A. sirindhorniae</i> PKBP28-1.....	123

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ลักษณะการเจริญของราไมคอร์ไรซาชนิดต่างๆ ร่วมกับรากพืชอาศัย.....	6
2 ลักษณะการเจริญของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาร่วมกับรากพืช.....	7
3 ลักษณะการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาร่วมกับรากพืช.....	8
4 ลักษณะการเจริญของราเอคเทโนโดไมคอร์ไรซาร่วมกับรากพืช.....	9
5 ลักษณะการเจริญของราอีริคอยด์ไมคอร์ไรซาร่วมกับรากพืช.....	10
6 ลักษณะการเจริญของราอาร์บุดอยด์ไมคอร์ไรซาร่วมกับรากพืช.....	11
7 ลักษณะการเจริญของราโมโนโทรพอยด์ไมคอร์ไรซาที่พบในพืชชนิด <i>Monotropa</i> sp...	12
8 ลักษณะรากของต้นกล้วยไม้ที่มีความสัมพันธ์กับราออร์คิดไมคอร์ไรซา.....	13
9 โครงสร้างของเอคโตไมคอร์ไรซาในพืชมีดอกและพืชเมล็ดเปลือย.....	14
10 แผนภูมิความสัมพันธ์ของราไมคอร์ไรซากับชนิดพืชอาศัย.....	15
11 การแลกเปลี่ยนสารอาหารของราเอคโตไมคอร์ไรซากับรากพืชอาศัย.....	20
12 ความสัมพันธ์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาและดอกเห็ด.....	24
13 การแตกกิ่งของรากเอคโตไมคอร์ไรซา.....	25
14 ลักษณะปลายรากของราเอคโตไมคอร์ไรซา.....	26
15 ลักษณะพื้นผิวของรากเอคโตไมคอร์ไรซา.....	27
16 ลักษณะการเรียงตัวของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาบริเวณแมนเทิลในรากพืชอาศัย.	28
17 ลักษณะของซิสทีเดียมที่พบในราเอคโตไมคอร์ไรซาบริเวณแมนเทิลในรากพืชอาศัย...	29
18 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของหมวกเห็ด.....	30
19 ลักษณะของหมวกเห็ด.....	31
20 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานในการจัดจำแนกชนิดของหมวกเห็ดและก้านดอก.....	32
21 เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่รับประทานได้ในประเทศไทย.....	41
22 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในสภาวะปราศจากเชื้อ.....	43
23 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในกระถางปลูก.....	44
24 แผนภาพแสดงตำแหน่งในการเก็บตัวอย่างดินและรากเอคโตไมคอร์ไรซา.....	50
25 แผนภาพแสดงตำแหน่งและทิศทางของไพรเมอร์บริเวณ ITS และ rDNA ที่ใช้ในการ ทดลอง.....	54
26 พื้นที่ศึกษาบริเวณป่าสนผสมเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวและจุดเก็บตัวอย่าง	66
27 ตัวอย่างราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เพาะเลี้ยงได้.....	69
28 <i>Amanita</i> sp. PKBP11.....	71

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
29 <i>Boletellus</i> sp. PKBP23	71
30 <i>Astreaus sirindhorniae</i> PKBP28.....	73
31 <i>Gomphus</i> sp. PKBP27.....	74
32 <i>Inocybe</i> sp.. PKBP26.....	75
33 <i>Lactarius</i> sp. PKBP17.....	76
34 <i>Mycoamanranthus</i> sp. PKBP8.....	76
35 ลักษณะของดอกเห็ดและเบสิดิโอสปอร์ของ <i>Pulveroboletus</i> sp. PKBP13 และ <i>Pulveroboletus</i> sp. PKBP14.....	77
36 ลักษณะของดอกเห็ดและเบสิดิโอสปอร์ของ <i>Ramaria</i> species 1 PKBP02 และ <i>Ramaria</i> species 2 PKBP04.....	79
37 ลักษณะของดอกเห็ดและเบสิดิโอสปอร์ของ <i>Ramaria</i> species 3 PKBP06 และ <i>Ramaria</i> species 4 PKBP15	80
38 ลักษณะดอกเห็ดและเบสิดิโอสปอร์ของ <i>Ramaria</i> species 5 PKBP18, <i>Ramaria</i> species 6 PKBP24 และ <i>Ramaria</i> species 7 PKBP25.....	82
39 <i>Russula</i> sp. PKBP10.....	83
40 ลักษณะดอกเห็ดและเบสิดิโอสปอร์ของ <i>Scleroderma</i> sp. PKBP5 และ <i>Scleroderma</i> sp. PKBP16.....	84
41 <i>Tricholoma</i> sp. PKBP22.....	84
42 <i>Tylopilus</i> sp. PKBP12.....	85
43 ตัวอย่างรากเอกโตไมคอร์ไรซา morphotypes ต่าง ๆ ที่พบในพื้นที่บึงแปน.....	86
44 กราฟร้อยละของรากเอกโอไมคอร์ไรซาแบ่งตาม morphotypes ในพื้นที่บึงแปน.....	90
45 ตัวอย่างผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซา.....	91
46 ตัวอย่างผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของรากเอกโตไมคอร์ไรซา.....	95
47 จำนวนชนิดของรากเอกโตไมคอร์ไรซาที่พบใน 23 morphotype (MP) ของรากพืช อาศัย.....	100
48 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซาที่ได้จากการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่า.....	102

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
49 กราฟแสดงจำนวนชนิดของเห็ดและรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบในวงศ์ต่างๆ.....	103
50 ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (<i>A. sirindhorniae</i> PKBP28-1) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MS, PDA, MMN, และ MNC ค่า pH เท่ากับ 6 ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 4 สัปดาห์.....	104
51 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดอาหารและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการเจริญเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (<i>A. sirindhorniae</i> PKBP28-1).....	105
52 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดอาหารและมวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) ของเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (<i>A. sirindhorniae</i> PKBP28-1).....	106
53 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และมวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) ของเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (<i>A. sirindhorniae</i> PKBP28-1).....	107
54 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการเจริญเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (<i>A. sirindhorniae</i> PKBP28-1).....	108
55 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (<i>A. sirindhorniae</i> PKBP28-1).....	108
56 การเตรียมกล้าไม้สนสามใบและกล้าไม้ยางนา.....	109
57 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาของราเห็ดเผาะสิรินธร (<i>Astraeus sirindhorniae</i> PKBP28-1) กับกล้าไม้สนสามใบบนจานเลี้ยงเชื้อ MS.....	110
58 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้สนสามใบ อายุ 6 เดือน.....	112
59 การเปรียบเทียบการเติบโตทางความสูงของกล้าไม้สนสามใบที่เติมหัวเชื้อเห็ดเผาะสิรินธร (<i>A. sirindhorniae</i> PKBP28-1) กับชุดควบคุม เมื่อปลูกลานาน 6 เดือน.....	112
60 การเปรียบเทียบมวลชีวภาพของกล้าสนสามใบที่เติมหัวเชื้อเห็ดเผาะสิรินธร (<i>A. sirindhorniae</i> PKBP28-1) กับชุดควบคุม เมื่อปลูกลานาน 6 เดือน.....	114
61 รากกล้าไม้สนสามใบอายุ 6 เดือน.....	115
62 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ยางนา อายุ 6 เดือน.....	116
63 การเปรียบเทียบการเติบโตทางความสูงของกล้าไม้ยางนาที่เติมหัวเชื้อเห็ดเผาะสิรินธร (<i>A. sirindhorniae</i> PKBP28-1) กับชุดควบคุม เมื่อปลูกลานาน 6 เดือน.....	117
64 การเปรียบเทียบมวลชีวภาพของกล้าไม้ยางนาที่เติมหัวเชื้อเห็ดเผาะสิรินธร (<i>A. sirindhorniae</i> PKBP28-1) กับชุดควบคุม เมื่อปลูกลานาน 6 เดือน.....	118
65 รากยางนาจากชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อราเห็ดเผาะสิรินธร(<i>A. sirindhorniae</i>)...	119

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
66 รากกล้าไม้ยางนาจากชุดการทดลองที่เติมสปอร์เห็ดเผาะสีรินธร (<i>A. sirindhorniae</i>).....	121
67 ผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 ของราก เอคโตไมคอร์ไรซาที่ได้จากการทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาด้วยรา <i>A. sirindhorniae</i>	122



บทที่ 1

บทนำ

1. ภูมิหลังและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประชากรในโลกมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น แต่พื้นที่อยู่อาศัยและทรัพยากรมีอยู่อย่างจำกัดทำให้ไม่เพียงพอกับจำนวนประชากร ก่อให้เกิดการบุกรุกพื้นที่ป่าเพื่อปลูกสร้างที่อยู่อาศัยและทำการเกษตร รวมทั้งการตัดไม้ทำลายป่าเพื่อนำไม้ไปใช้ประโยชน์โดยไม่ได้ปลูกทดแทน ทั้งยังขาดจิตสำนึกในการอนุรักษ์ป่าไม้ ทำให้พื้นที่ป่าในปัจจุบันเสื่อมโทรมลง ความหลากหลายทางชีวภาพของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ลดลง ซึ่งอาจนำไปสู่การสูญพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตบางชนิด ในปีพุทธศักราช 2551 สำนักแผนงานและสารสนเทศ กรมป่าไม้ ได้รายงาน bahwa พื้นที่ป่าของประเทศไทยเหลืออยู่ 171,586.65 ตารางกิโลเมตร หรือ 33.44% ของพื้นที่ทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบกับ 35 ปีที่ผ่านมาพบว่าพื้นที่ป่าลดลงไปถึง 22.61% ของพื้นที่เดิม (กรมป่าไม้, 2555: ออนไลน์) นอกจากนี้ปัญหาดังกล่าวแล้วยังเกิดจากการผ่อนผันให้ประชาชนอยู่อาศัยในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ และมีการขยายพื้นที่เดิมที่ไม่มีการแสดงแนวเขตการควบคุมที่ชัดเจน ดังนั้นจึงส่งผลให้เกิดการสูญเสียพื้นที่ป่าจากการขยายตัวของชุมชนกลางป่า และขอบป่าอนุรักษ์มาอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะหลังจากที่มีการส่งเสริมการปลูกพืชไร่ต่างๆ สวนยางพารา ปาล์มน้ำมัน ทำให้เกิดการสูญเสียพื้นที่ป่าเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการมุ่งเน้นให้มีการอนุรักษ์ป่าไม้เพื่อเพิ่มพื้นที่ป่าและดำรงรักษาป่าไว้ให้อยู่ในสภาพที่อุดมสมบูรณ์ให้ได้มากที่สุด ประกอบกับการให้ความรู้กับประชาชนถึงคุณประโยชน์ของป่า โดยส่งเสริมให้ประชาชนสามารถอยู่ร่วมกับป่าได้อย่างเกื้อกูลซึ่งกันและกัน

ราเอคโตไมคอร์ไรซา (Ectomycorrhizal fungi, ECM) เป็นราดินที่มีความสัมพันธ์กับรากพืชชั้นสูง โดยต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ ราเอคโตไมคอร์ไรซาและพืชอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) โดยราได้รับ น้ำตาล กรดอะมิโน และวิตามิน จากการสังเคราะห์แสงของพืช เนื่องจากราไม่มีคลอโรฟิลล์ ราจึงต้องดูดสารเหล่านี้จากรากพืช และราจะเจริญหุ้มล้อมรอบรากทำให้รากมีลักษณะบวมคล้ายนมจึงสามารถรักษาความชื้นได้นานกว่าปกติ ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึม และร่ายังช่วยดูดแร่ธาตุโดยเฉพาะฟอสฟอรัส สารอาหารต่างๆ รวมทั้งน้ำให้กับพืช นอกจากนี้รายังช่วยป้องกันพืชจากเชื้อก่อโรคต่างๆ ได้อีกด้วย ดังนั้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่แห้งแล้งพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอยู่นั้นจะเจริญเติบโตได้ดีกว่าพืชที่ไม่มีราเอคโตไมคอร์ไรซา พืชอาศัยของราเอคโตไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่ ได้แก่ ไม้วงศ์สน (Pinaceae) ไม้วงศ์กำลังเสือโคร่ง (Betulaceae) ไม้วงศ์กระถินณรงค์ (Fabaceae) ไม้วงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) ไม้วงศ์ก่อ (Fagaceae) และ ไม้วงศ์ยูคาลิปตัส (Myrtaceae) เป็นต้น (Brundrett, 2009: 37-77)

ราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดสร้างดอกเห็ด (fruiting body) ที่รับประทานได้ และมีรสชาติดี จึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภค แต่เนื่องจากเห็ดกลุ่มนี้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ทำให้มีราคาแพง และ

พบได้บางฤดูกาลเท่านั้น ตัวอย่างเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาที่รับประทานได้ และเป็นที่ยอมรับในต่างประเทศ เช่น เห็ดทรัฟเฟิลขาว (*Tuber magnatum*) ซึ่งมีราคาสูงถึง 30,000-390,000 บาทต่อกิโลกรัม ขึ้นอยู่กับขนาดและกลิ่นรส เห็ดมัตสึทาเกะ (*Tricholoma matsutake*) มีราคา 1,200-15,000 บาทต่อกิโลกรัม เป็นต้น (Hall; Yun; & Amicucci. 2003: 433-438) ส่วนในประเทศไทย ตัวอย่างที่พบเช่น เห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus*) เห็ดเผาะฝ้าย (*Astraeus asiaticus*) มีราคา 300-400 บาทต่อกิโลกรัม (Dell; et al. 2005: 1-11) เห็ดตับเต่า (*Phlebopus portentosus*) มีราคา 120-180 บาทต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ยังมีเห็ดมันปูเล็ก (*Cantharellus minor*) เห็ดมันปูใหญ่ (*Cantharellus cibarius*) และเห็ดน้ำหมาก (*Russula luteotacta*) ซึ่งรับประทานได้ในบางพื้นที่เท่านั้น แม้ว่าเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซานี้จะมีราคาสูงกว่าเห็ดที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (Dell; et al. 2005: 1-11) แต่ผู้บริโภคก็ยังนิยมที่จะซื้อรับประทานเนื่องจากรสชาติ และลักษณะเฉพาะของเนื้อเห็ด (Sanmee; et al. 2003: 527-532) นอกจากนี้เห็ดส่วนใหญ่ยังมีแคลอรี โซเดียม ไขมัน และคอเลสเตอรอลต่ำ ในขณะที่มีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไฟเบอร์ วิตามิน และแร่ธาตุสูง (Kues; & Liu. 2000: 141-152)

เห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาบางชนิด มีคุณค่าทางการแพทย์และเภสัชกรรม เป็นแหล่งผลิตสารชนิดใหม่ๆ เช่น มีรายงานว่าเห็ดเผาะหนังสร้างสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* และเซลล์มะเร็งได้ โดยงานวิจัยนี้พบสารทั้งหมด 9 ชนิด ซึ่งสาร *astradoric acids A* และ *B* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับปานกลาง โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50 และ 25 $\mu\text{g/mL}$ และเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 34.69 และ 18.57 $\mu\text{g/mL}$ กับเซลล์มะเร็งช่องปาก และ 19.99 และ 48.35 $\mu\text{g/mL}$ กับเซลล์มะเร็งปอด ตามลำดับ (Arpha; et al. 2012: 9834-9841) ในปี 2012 มีงานวิจัยพบว่าสารสกัด Methanolic ของเห็ดมันปูใหญ่ และเห็ดฟานสีส้ม สามารถต้านการอักเสบได้ โดยยับยั้งการผลิต nitric oxide และลดการแสดงออกของ Interleukin- 1β และ Interleukin-6 ที่เป็นผลมาจากการกระตุ้นของ lipopolysaccharide (Moro; et al. 2012: 350-355)

ในปัจจุบันผลผลิตของเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาที่เก็บได้นั้นมีจำนวนลดลง อาจเนื่องมาจากการตัดไม้ทำลายป่า การสูญเสียพืชอาศัย การจัดการพื้นที่ป่าด้วยการปลูกพืชที่หนาแน่นเกินกว่าที่เกิเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ การปลูกป่าทดแทนด้วยพืช ที่ไม่ได้เป็นพืชอาศัยของรา การเกิดภาวะโลกร้อนและฝนกรด (Hall; Yun; & Amicucci. 2003: 433-438) จึงทำให้เกิดผลกระทบต่อปริมาณและความหลากหลายของชนิดเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซา ในปัจจุบันนักวิจัยจึงคัดเลือกเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงได้นำมาผลิตหัวเชื้อกันมากขึ้น ดังนั้นงานวิจัยได้ทำการศึกษาการผลิตหัวเชื้อเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาชนิดที่รับประทานได้ในกล้าไม้อาศัย รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของหัวเชื้อเห็ดเพื่อนำไปส่งเสริมการเพาะเห็ดในธรรมชาติร่วมกับการปลูกป่า ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาที่สามารถรับประทานได้ ทำให้ประชาชนที่อาศัยอยู่บริเวณใกล้พื้นที่ป่าสามารถเก็บไปรับประทานหรือนำไปขายเพื่อเพิ่มรายได้ของครอบครัวให้มากขึ้น และ

นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมให้ประชาชนมีจิตสำนึกในการช่วยกันดูแลรักษาพื้นที่ป่าของชุมชนไม่ให้เกิดการทำลายป่าไม้ ทำให้เกิดการอนุรักษ์อย่างยั่งยืน

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 2.1 เพื่อจัดจำแนกชนิดและศึกษาความสัมพันธ์ของราเอกโตไมคอร์ไรซาทั้งดอกเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซา ในพื้นที่ป่าสนผสมเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จ. ชัยภูมิ
- 2.2 เพื่อคัดแยกและเพาะเลี้ยงเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาชนิดที่รับประทานได้
- 2.3 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาชนิดที่รับประทานได้
- 2.4 เพื่อทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาของเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้กับพืชอาศัยในจานเพาะเชื้อและถุงเพาะชำ

3. ขอบเขตของการวิจัย

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างราเอกโตไมคอร์ไรซาทั้งชนิดที่เป็นดอกเห็ดและรากไมคอร์ไรซาในพื้นที่ป่าสนผสมเต็งรัง โดยการวางแผนที่มีขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 100 x 100 เมตร ณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จ. ชัยภูมิ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง จากนั้นคัดแยกและเพาะเลี้ยงราเอกโตไมคอร์ไรซาที่รวบรวมได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ศึกษาเพื่อการจัดจำแนกชนิดของราเอกโตไมคอร์ไรซาโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานและทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) คัดเลือกเห็ดชนิดที่รับประทานได้มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเพื่อการผลิตหัวเชื้อ และเพาะเลี้ยงร่วมกับพืชอาศัยโดยการทดสอบในจานเพาะเชื้อและในถุงเพาะชำ กับพืช 2 ชนิด คือกล้วยไม้สนสามใบ และกล้วยไม้ยางนา เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยวัดการเจริญจากความสูงของพืชทดสอบทุกเดือน และหามวลชีวภาพรวม (น้ำหนักแห้งของลำต้น ใบ และราก) ในเดือนที่ 6 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อ จากนั้นตรวจหาการติดเชื้อของเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาบริเวณรากพืชทดสอบโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของราก ความหนาของชั้นแมนเทิล (mantle) รวมทั้งโครงสร้างต่างๆ ของเอกโตไมคอร์ไรซา ยืนยันชนิดของราที่พบในรากพืชทดสอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาที่ใช้ในการทดสอบ

4. ผลที่ได้รับจากการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลความสัมพันธ์ของราเอกโตไมคอร์ไรซาชนิดที่พบทั้ง บนดิน และใต้ดินในพื้นที่ป่าสนผสมเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จ. ชัยภูมิ และได้สายพันธุ์เห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาบริสุทธิ์ รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลการทดสอบการเจริญของเห็ดร่วมกับพืชอาศัยเพื่อนำมาใช้ในการขยายพันธุ์เห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาต่อไป นอกจากนี้ยังได้คู่ไพรเมอร์ที่มี

ความจำเพาะกับเชื้อเอกโตไมคอร์ไรซาที่ใช้ในการทดสอบที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อเห็ดดังกล่าวจากรากเอกโตไมคอร์ไรซาจำนวนมากได้



บทที่ 2

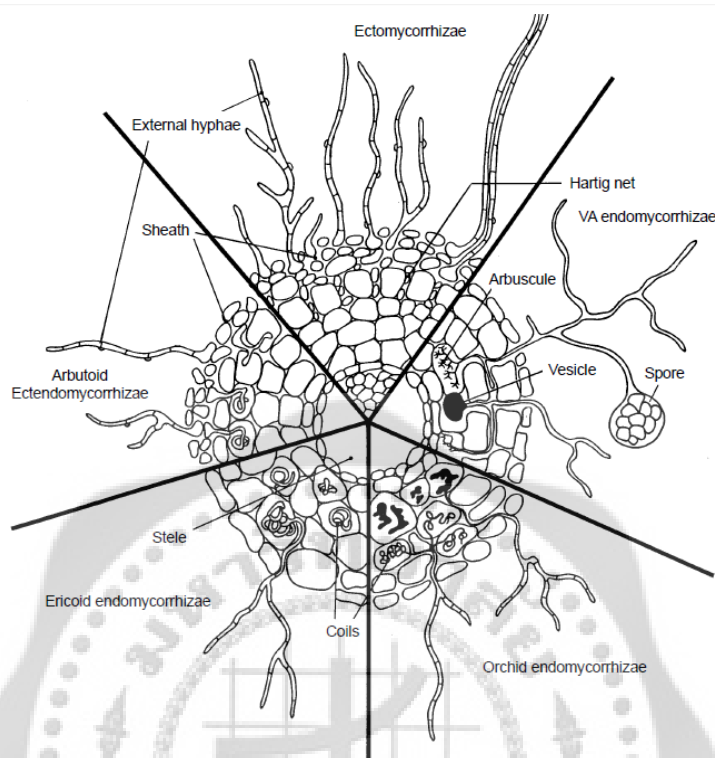
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ไมคอร์ไรซา

ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) มาจากภาษากรีกคำว่า “mykes” และคำว่า “rhiza” โดยนักโรคพืชวิทยาชาวเยอรมันชื่อ เอ.บี. แพรงค์ ในปี ค.ศ. 1885 ได้ให้คำจำกัดความว่า หมายถึง “fungus” หรือ “mushroom” และ “root” ตามลำดับ (Agarwal; & Sah. 2009: 107-116) ดังนั้นไมคอร์ไรซาจึงหมายถึงความสัมพันธ์ระหว่างรากที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) ซึ่งจะช่วยในการดูดซึมธาตุอาหาร และน้ำให้กับพืช เช่น ฟอสฟอรัส และไนโตรเจน เป็นต้น ในขณะที่พืชให้น้ำตาล กรดอะมิโน และวิตามินกับรา (Smith; & Read. 1997: 1-605) ซึ่งเส้นใยของรากที่เจริญอยู่ภายนอกกรากนั้นยังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมธาตุอาหาร และรักษาความชุ่มชื้นให้กับพืช ดังนั้นพืชที่มีราไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่จึงมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าพืชที่ไม่มีราไมคอร์ไรซา นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ารากไมคอร์ไรซาสามารถช่วยยับยั้งการเจริญของราโรคพืชรวมทั้งไส้เดือนฝอยอีกด้วย จากรายงานในปี 2008 เอลเซ็น; และคนอื่นๆ (Elsen; et al. 2008: 251-256) ได้ทำการทดลองใช้ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) ทดสอบการชักนำให้เกิดการควบคุมทางชีวภาพเพื่อช่วยต้านไส้เดือนฝอยในต้นกล้วย พบว่าต้นกล้วยที่มีราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเจริญอยู่มีจำนวนไส้เดือนฝอยลดลงอย่างมีนัยสำคัญคือ 72% เมื่อเทียบกับต้นควบคุม และยังพบอีกว่าพืชที่มีราไมคอร์ไรซาสามารถเจริญได้ในดินที่มีสภาพไม่เหมาะสม เช่น ดินที่มีความเป็นกรดสูง ดินเค็ม เป็นต้น มีการวิจัยทดสอบความสามารถในการทนความเค็มของราเอคโตไมคอร์ไรซา 3 ชนิด คือ *Suillus bovinus*, *S. luteus* และ *Boletus luridus* โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่มีความเข้มข้นต่างกันในการทดสอบ (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 mol/L) พบว่ารากเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิด สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่ง *B. luridus* และ *S. bovinus* มีอัตราการเจริญสูงกว่า *S. luteus* แต่อัตราการเจริญของรากทั้ง 3 ชนิด ลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้มวลชีวภาพของ *B. luridus* มีปริมาณสูงที่สุดในทุกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ดังนั้นรากเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถทนต่อดินที่มีความเค็มสูงได้ แต่ความสามารถในการทนความเค็มขึ้นอยู่กับความสามารถของราแต่ละชนิด (Tang; et al. 2009: 948–953) พบการเจริญของราไมคอร์ไรซาได้ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ของรากพืชขึ้นอยู่กับชนิดของรา บางชนิดมีความจำเพาะกับพืช ทั้งนี้พบรากที่มีความสัมพันธ์กับรากพืชชั้นสูงมากกว่า 90% ของชนิดพืชตัวอย่างในต้นไม้ป่าหญ้า และพืชเกษตรหลายชนิด (Bonfante; & Genre. 2010: 1-11)

แบ่งกลุ่มไมคอร์ไรซาตามลักษณะการเจริญของราไมคอร์ไรซา และ/หรือ ชนิดพืชอาศัยได้ 7 กลุ่ม (ภาพประกอบ 1) ได้แก่ (1) arbuscular mycorrhizae (endomycorrhizae), (2) ectomycorrhizae, (3) ectendomycorrhizae, (4) ericoid mycorrhizae, (5) arbutoid mycorrhizae,

(6) monotropoid mycorrhizae และ (7) orchid mycorrhizae (Allen; et al. 2003: 217-303; Smith; & Read. 2008: 1-787)



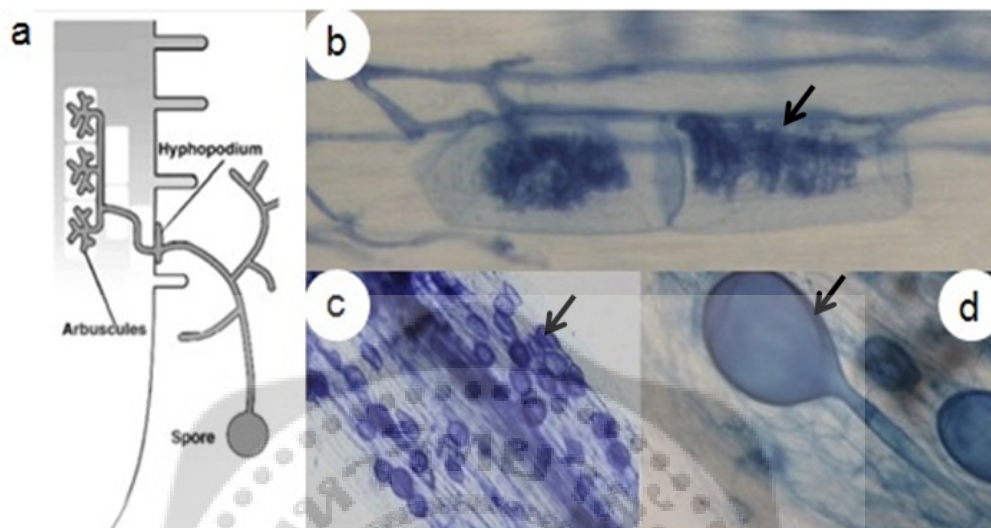
ภาพประกอบ 1 ลักษณะการเจริญของราไมคอร์ไรซาชนิดต่างๆ ร่วมกับรากพืชอาศัย

ที่มา : Selosse, Marc-André; & Tacon, Francois Le. (1998). The Land Flora : A hototroph–Fungus Partnership?. *Journal of Trends in Ecology & Evolution*. 13(1): 16.

1.1 อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhizae)

อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhizae) หรือเวสสิคูลาร์-อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (vesicular-arbuscular mycorrhizae) หรือ เอนโดไมคอร์ไรซา (endomycorrhizae) ไมคอร์ไรซา กลุ่มนี้ เส้นใยราจะเจริญอยู่รอบๆ รากบางส่วนเจริญเข้าไปภายในเซลล์ของรากพืช โดยจะเจริญอยู่ระหว่างและภายในเซลล์ของรากพืชในชั้นคอร์เท็กซ์ (cortex) สร้างโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่าอาร์บัสคูล (arbuscule) มีลักษณะการแตกกิ่งของเส้นใยราที่ละคู่ (dichotomous) คล้ายต้นไม้ (tree-like) ขนาดเล็ก คล้ายดอกกะหล่ำ ภายในเซลล์แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือการแตกกิ่งแบบ arum และการขดไปมาของเส้นใยแบบ paris (Brundrett. 2004: 473–495; 2008: online) ซึ่งโครงสร้างอาร์บัสคูลนี้จะมีอายุเพียง 2-14 วัน จากนั้นจะสลายไป แล้วจึงพบโครงสร้างอีกแบบหนึ่งซึ่งมีลักษณะคล้ายถุงรูปไข่ เรียกว่าเวสสิเคิล (vesicle) (ภาพประกอบ 2) โดยทั้งสองโครงสร้างนี้จะทำหน้าที่ในการเก็บสะสมธาตุอาหารสำหรับราแต่พืชสามารถย่อยสลายและนำไปใช้ได้ นอกจากนี้ยังมีเส้นใยบางส่วนที่พัฒนาไปสร้างสปอร์ซึ่งได้จากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศอีกด้วย ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจัดอยู่ใน

ไฟลัม Glomeromycota ซึ่งแบ่งตามสกุล (genus) ได้ 7 สกุล คือ *Glomus*, *Entrophospora*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Archaeospora* และ *Paraglomus* นอกจากนี้ยังแบ่งตามชนิดได้มากกว่า 200 ชนิด (species) (Redecker; & Raab. 2006: 885-895)



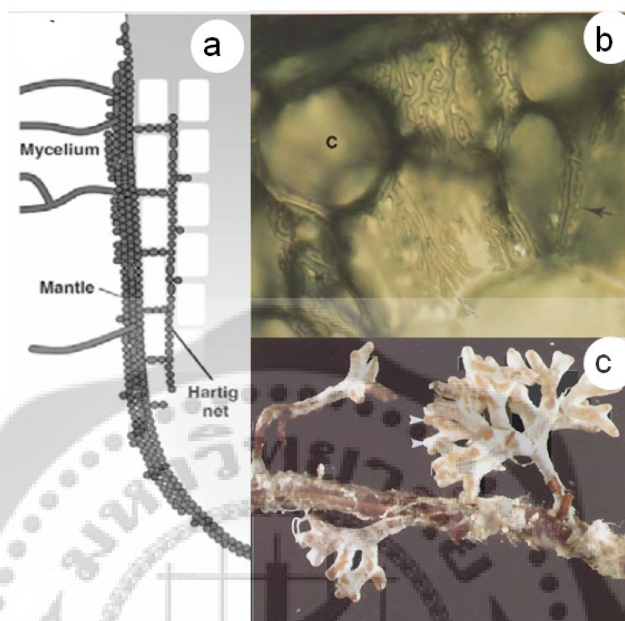
ภาพประกอบ 2 ลักษณะการเจริญของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาร่วมกับรากพืช (a) โครงสร้างเจริญของรกายในและภายนอกเซลล์รากพืช, (b) โครงสร้างอาร์บัสคูลภายในรากพืช *Senecio inaequidens* (ลูกศร), (c-d) โครงสร้างเวสสิเคิลภายในราก *Verbena officinalis* (ลูกศร)

ที่มา: Bonfante, Paola; & Genre, Andrea. (2010). Mechanisms Underlying Beneficial Plant–Fungus Interactions in Mycorrhizal Symbiosis. *Nature Communications*. 1(48): 3.; Bedini, Stefano; et al. (2010). Molecular Characterization and Glomalin Production of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Colonizing a Heavy Metal Polluted Ash Disposal Island, Downtown Venice. *Soil Biology and Biochemistry*. 42(5): 761.

1.2 เอกโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhizae)

เอกโตไมคอร์ไรซาเป็นการอยู่ร่วมกันระหว่างราและรากพืชโดยราเอกโตไมคอร์ไรซาจะเจริญรอบๆ ราก และสานตัวเป็นชั้นหรือเป็นปลอกห่อหุ้มรากเรียกว่า แมนเทิล (mantle) ซึ่งจะมีความหนาและสีที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของรา นอกจากนี้เส้นใยบางส่วนจะเจริญเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ของรากพืชในชั้นเอพิเดอร์มิส (epidermis) และคอร์เท็กซ์ แล้วเจริญสานกันเป็นตาข่ายอยู่รอบๆ เซลล์เรียกว่า ฮาทิกเน็ต (hartig net) (ภาพประกอบ 3) (Burgess; Dell; & Malajczuk. 1994: 731-739) ราเอกโตไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota รองลงมาคือ

Ascomycota และ Zygomycota ตามลำดับ ราเอกโตไมคอร์ไรซาบางชนิดสามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเจริญเป็นดอกเห็ดบริเวณพืชอาศัยได้ เช่น เห็ดบางชนิดในสกุล *Boletus*, *Cortinarius*, *Hebelema*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Russula*, *Suillus* และ *Tricholoma* เป็นต้น



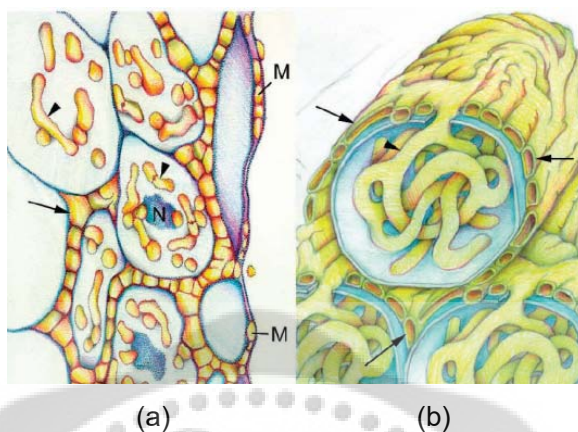
ภาพประกอบ 3 ลักษณะการเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซาร่วมกับรากพืช (a) โครงสร้างการเจริญของชั้นแมนเทิลและฮาติกเน็ต, (b) ชั้นของฮาติกเน็ต, (c) ราเอกโตไมคอร์ไรซา

ที่มา: Bonfante, Paola; & Genre, Andrea. (2010). Mechanisms Underlying Beneficial Plant – Fungus Interactions in Mycorrhizal Symbiosis. *Nature Communications*. 1(48): 1-11.; Brundrett, Mark C; et al. (1996). *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. pp. 18, 192.

1.3 เอกเทนโดไมคอร์ไรซา (ectendomycorrhizae)

เอกเทนโดไมคอร์ไรซามีลักษณะชั้นแมนเทิลบาง บางครั้งอาจไม่มีเลย มีชั้นฮาติกเน็ต และเส้นใยราสามารถเข้าไปเจริญภายในชั้นเอพิเดอร์มิส และชั้นคอร์เท็กซ์ (Egger; & Fortin. 1988: 113–114) (ภาพประกอบ 4) มีความสัมพันธ์กับรากขนาดสั้นๆ คล้ายกับความสัมพันธ์แบบเอกโตไมคอร์ไรซา ที่เนื้อเยื่อของรากถูกชักนำให้มีลักษณะแตกเป็น 2 กิ่ง (Yu; Egger; & Peterson. 2001: 167–177) โดยพบว่าอยู่ในชนิด *Wilcoxina* (*W. mikolae* และ *W. rehmi*) และ *Sphaerosporella brunnea* เป็นต้น พบได้น้อยในชนิด *Phialophora finlandia* และ *Chloridium*

paucisporum นอกจากนี้ยังพบว่าเอคเทนโดไมคอร์ไรซามีความสัมพันธ์กับพืชมีดอกในสกุล *Larix* และพืชเมล็ดเปลือยในสกุล *Pinus* (Egger; & Fortin. 1988: 113–114)

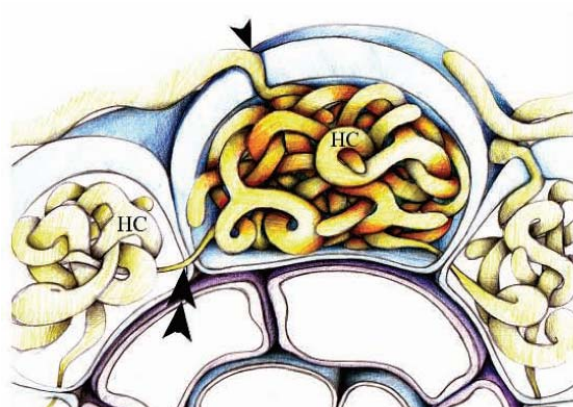


ภาพประกอบ 4 ลักษณะการเจริญของราเอคเทนโดไมคอร์ไรซาร่วมกับรากพืช (a) ภาพตัดตามขวางแสดงชั้นแมนเทิลที่บาง (M), เส้นใยที่เรียงตัวเป็นฮาติกเนท (ลูกศร), เส้นใยที่อยู่ภายในเซลล์ (หัวลูกศร), และนิวเคลียสที่มีเส้นใยล้อมรอบ (N) ของเซลล์ล้อมรอบด้วยเส้นใย, (b) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฮาติกเนท (ลูกศร) และเส้นใยที่อยู่ภายในเซลล์ (หัวลูกศร)

ที่มา: Peterson, Larry R.; Massicotte, Hugues B.; & Melville, Lewis H. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. p. 47.

1.4 อีริคอยด์ไมคอร์ไรซา (ericoid mycorrhizae)

ลักษณะของพืชที่มีความสัมพันธ์แบบนี้จะมีการสร้างลักษณะพิเศษบริเวณด้านข้างของราก เรียกว่า hair root มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคบ โดยราอีริคอยด์ไมคอร์ไรซาจะเกาะอยู่ที่เซลล์เอพิเดอร์มิส สร้างเส้นใยแทงเข้าไปภายในแต่ละเซลล์ในลักษณะที่ซับซ้อน (ภาพประกอบ 5) พบว่ามีความสัมพันธ์กับพืชในอันดับ Ericales พบในวงศ์หลักๆ คือ วงศ์ Ericaceae และวงศ์ Epacridaceae (Peterson; Massicotte; & Melville. 2004: 1-173)

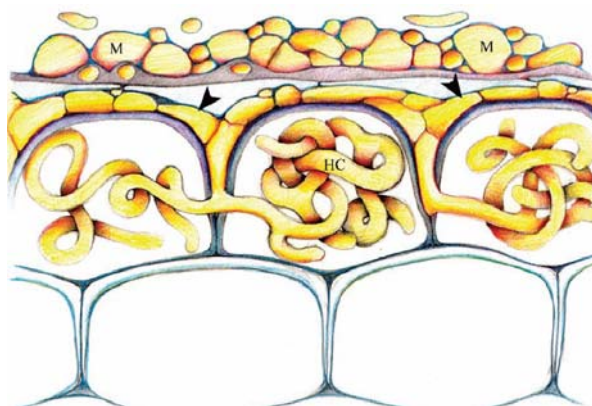


ภาพประกอบ 5 ลักษณะการเจริญของราอีริคอยด์ไมคอร์ไรซาเจริญร่วมกับรากพืช ลักษณะเส้นใยของรกายในเซลล์เอพิเดอร์มิสผ่านผนังเซลล์ที่หนา (หัวลูกศร), เส้นใยที่มีลักษณะซับซ้อน (HC) และ เส้นใยขนาดเล็ก (หัวลูกศรซ้ำ 2 อัน) เชื่อมระหว่างเซลล์เอพิเดอร์มิสที่อยู่ติดกัน

ที่มา: Peterson, Larry R.; Massicotte, Hugues B.; & Melville, Lewis H. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. p. 85.

1.5 อาร์บุตอยด์ไมคอร์ไรซา (arbutoid mycorrhizae)

ลักษณะของอาร์บุตอยด์ไมคอร์ไรซาพบไรโซมอร์ฟ (rhizomorphs) ที่สร้างจากชั้นแมนเทิลเพื่อหาสารอาหาร ส่วนฮาติกเนทอยู่รอบเซลล์เอพิเดอร์มิสเกิดเป็นฮาติกเนทแบบ paraepidermal และมีเส้นใยรูปร่างซับซ้อนภายในเอพิเดอร์มิส (ภาพประกอบ 6) ราชนิดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota และ Ascomycota ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับพืช 2 สกุล ในวงศ์ Ericaceae คือ *Arbutus* และ *Arctostaphylos* และในวงศ์ Pyrolaceae ได้แก่ สกุล *Pyrola* (Peterson; Massicotte; & Melville. 2004: 1-173)

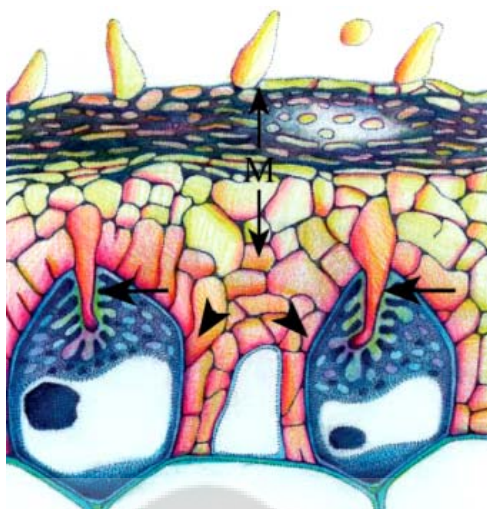


ภาพประกอบ 6 ลักษณะการเจริญของราอาร์บิวทอยด์ไมคอร์ไรซาร่วมกับรากพืช ลักษณะของชั้นแมนเทิล (M), ฮาติกเนทแบบ paraepidermal (หัวลูกศร) และ เส้นใยภายในเซลล์ที่มีลักษณะซับซ้อน (HC)

ที่มา: Peterson; Massicotte; & Melville. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. p. 101.

1.6 โมโนโทรพอยด์ไมคอร์ไรซา (monotropoid mycorrhizae)

โมโนโทรพอยด์ไมคอร์ไรซามีชั้นแมนเทิลบางมาก และมีฮาติกเนทแบบ paraepidermal ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของราชนิดนี้ การเข้าสู่เซลล์เอพิเดอร์มิสจะสร้างเส้นใยฮาติกเนทหรือชั้นแมนเทิลเข้าภายในเซลล์ การตอบสนองของพืชอาศัยนั้นจะเกิดการสร้างลักษณะที่คล้ายกับนิ้วบริเวณผนังเซลล์ (ภาพประกอบ 7) ลักษณะอีกอย่างของโมโนโทรพอยด์ไมคอร์ไรซา คือ มีความสัมพันธ์กับพืชที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ (achlorophyllous) ซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (heterotroph) พืชเหล่านี้อาศัยราในการเชื่อมโยงไปยังต้นไม้หรือไม้พุ่มที่สังเคราะห์แสง (autotroph) บริเวณใกล้เคียงเพื่อดูดซึมคาร์บอน พืชที่ไม่สังเคราะห์แสงและมีความสัมพันธ์กับรานี้อยู่ในวงศ์ Ericaceae ซึ่งมีทั้งหมด 10 สกุล คือ *Allotropa*, *Cheilothea*, *Hemitomes*, *Monotropa*, *Monotropantham*, *Monotropsis*, *Pityopus*, *Pleuricospora*, *Pterospora* และ *Sarcodes* (Peterson; Massicotte; & Melville. 2004: 1-173)

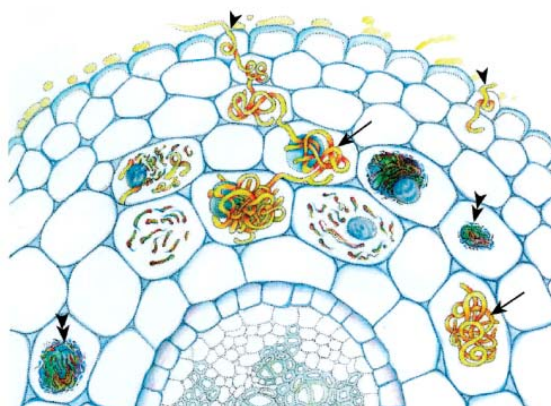


ภาพประกอบ 7 ลักษณะการเจริญของราไมโทรพอยต์ไมคอร์ไรซาที่พบในพืชชนิด *Monotropa* sp. ลักษณะของชั้นแมนเทิล (M), ฮาทิกเนท (หัวลูกศร) และ ลักษณะพิเศษคล้ายนิ้วของราที่สร้างบริเวณผนังเซลล์ (ลูกศร)

ที่มา: Peterson, Larry R.; Massicotte, Hugues B.; & Melville, Lewis H. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. p. 112.

1.7 ออร์คิดไมคอร์ไรซา (orchid mycorrhizae)

ลักษณะสำคัญของออร์คิดไมคอร์ไรซา คือ การสร้างเส้นใยที่ขดเป็นวงกลมซ้อนกันไปมาภายในเซลล์ของพืชอาศัย เรียกว่า pelotons (ภาพประกอบ 8) ราชนิดนี้มีความสำคัญกับการงอกของเมล็ดในธรรมชาติ นอกจากนี้รายังผลิตเอนไซม์ เช่น เซลลูเลส (cellulases) และ โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ย่อยสารอินทรีย์ในดินให้เป็นน้ำตาลที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งราและพืช ออร์คิดไมคอร์ไรซานั้นพบได้ในพืชวงศ์ Orchidaceae เท่านั้น (Peterson; Massicotte; & Melville. 2004: 1-173)



ภาพประกอบ 8 ลักษณะรากของต้นกล้วยไม้ที่มีความสัมพันธ์กับราอาร์คิโดไมคอร์ไรซา เส้นใยสามารถเจริญเข้าไปภายในรากโดยผ่านเอพิเดอร์มิส (หัวลูกศร) เมื่อเวลาผ่านไปเส้นใยของราที่มีลักษณะวงกลมจะถูกย่อยสลาย (หัวลูกศรซ้ำ 2 อัน) และมีการสร้างเส้นใยแบบ pelotons ในเซลล์คอร์เท็กซ์ (ลูกศร)

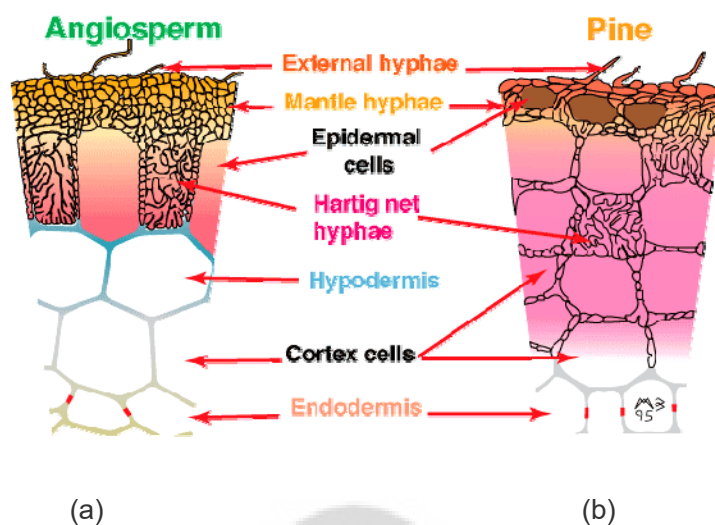
ที่มา: Peterson, Larry R.; Massicotte, Hugues B.; & Melville, Lewis H. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. p. 127.

2. ราเอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhizal fungi)

กลุ่มราไมคอร์ไรซาที่มีความสำคัญและพบการแพร่กระจายมากที่สุดคือ ราเอคโตไมคอร์ไรซา และราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา โดยเฉพาะราเอคโตไมคอร์ไรซาที่สามารถเจริญเป็นดอกเห็ดที่รับประทานได้ ซึ่งสามารถนำมาใช้ผลิตหัวเชื้อให้กับพืชในการปลูกป่าร่วมกับการเพาะเห็ดในธรรมชาติ

2.1 ความสัมพันธ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัย

ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถแบ่งตามลักษณะการเจริญร่วมกับพืชอาศัยได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มแรกเป็นราชนิดที่มีความสัมพันธ์กับพืชดอก (angiosperms) เช่น ไม้วงศ์ยูคาลิปตัส (Myrtaceae) ไม้วงศ์กำลังเสือโคร่ง (Betulaceae) ไม้วงศ์กระถินณรงค์ (Fabaceae) ไม้วงศ์ก่อ (Fagaceae) เป็นต้น ซึ่งพบชั้นของเส้นใยฮาทิกเนทของราเฉพาะที่เซลล์เอพิเดอร์มิสเท่านั้น ส่วนกลุ่มที่สองคือราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดที่มีความสัมพันธ์กับพืชเมล็ดเปลือย (gymnosperms) เช่น พืชวงศ์สน (Pinaceae) ซึ่งจะพบเส้นใยฮาทิกเนทอยู่ในชั้นของเอพิเดอร์มิสและคอร์เท็กซ์ (Alexander; & Hogberg. 1986: 541-549; Kottke; & Oberwinkler. 1986: 1-24; Massicotte; Ackerley; & Peterson. 1986: 1127-1132) (ภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบในพืชอาศัย (a) พืชมีดอก และ (b) พืชเมล็ดเปลือย

ที่มา: Brundrett, Mark C. (2008). *Mycorrhizal Associations: The Web Resource*. (Online).

ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยนั้นพบว่าพืชหนึ่งชนิดสามารถมีความสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซาได้หลายชนิด (Borowicz; & Juliano. 1991: 385-392; Molina; Massicotte; & Trappe. 1992: 357-423) ตัวอย่างงานวิจัยของ ฮอร์ตัน และ บรันส์ (Horton; & Bruns. 1998: 331-339) ศึกษาราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เจริญร่วมกับพืช Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) และ Bishop pine (*Pinus muricata*) พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาไม่มีความจำเพาะกับพืชอาศัยทั้งสองชนิด

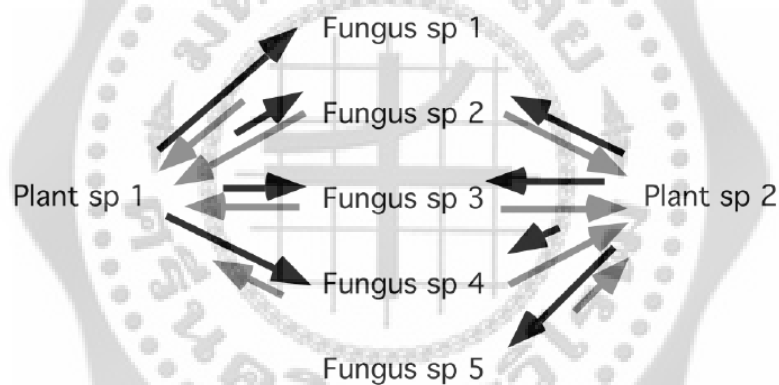
ในขณะที่ แกแลน และ โมรีโน (Galan; & Moreno. 1998: 265-271) รายงานว่าราเอคโตไมคอร์ไรซา *Ruhlandiella berolenensis* ซึ่งพบอยู่ที่ดินมีความจำเพาะกับต้นยูคาลิปตัส (*Eucalyptus* spp.) ทั้งนี้ความจำเพาะของราเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของราและพืช รวมทั้งลักษณะนิเวศวิทยา ซึ่งความสัมพันธ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยนั้นน่าจะมี ความสัมพันธ์ดังภาพประกอบ 10 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของพืช 2 ชนิด ที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซา ชนิด sp.2, sp.3 และ sp.4 ซึ่งสามารถอาศัยร่วมกับพืชทั้งสองชนิดได้ (Plant sp.1 และ Plant sp.2) ในขณะที่ราชนิด sp.1 และ sp.5 มีความจำเพาะกับพืชชนิดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (Bruns; Bidartondo; & Taylor. 2002: 352-359)

นอกจากนี้ยังมีรายงานความสัมพันธ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยอีกหลายงานวิจัย เช่น โอเบะสะ; และคนอื่นๆ (Obase; et al. 2007: 209-215) ศึกษาความสัมพันธ์ของเอคโตไมคอร์ไรซากับพืช 8 ชนิด พบว่ามีความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซากับพืช 6 ชนิด ได้แก่ *Betula platyphylla* var. *japonica*, *Populus maximowiczii*, *Quercus crispula*, *Salix hultenii*

var. *angustifolia*, *S. integra* และ *S. sachalinensis* ส่วนพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Acer mono* และ *Rosa multiflora* นั้นไม่พบความสัมพันธ์กันแบบเอคโตไมคอร์ไรซา

อิโรเสะ; ชิโรซุ และ โทะคุมะสุ (Hirose; Shirouzu; & Tokumasu. 2010: 255-260) ศึกษาพืชอาศัยและการกระจายของ *Suillus pictus* ในประเทศญี่ปุ่น โดยทดสอบกับ *Pinus densiflora*, *P. thunbergii* และ *P. parviflora* หลังจากใส่เชื้อ *S. pictus* กับเมล็ดพืชทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 3 เดือน พบว่ามีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากของพืชทั้ง 3 ชนิด

โพธิ์ศรี; และคนอื่นๆ (Phosri; et al. 2012: 2287-2298) ศึกษาความหลากหลายและสังคมของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบใต้ดินในป่าเต็งรังของประเทศไทย พบราเอคโตไมคอร์ไรซามีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยในป่าเต็งรังทั้งหมด 69 ชนิด ตัวอย่างแสดงความสัมพันธ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยแสดงในตาราง 1 และชนิดของพืชที่มีรายงานว่าพบการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาแสดงในตาราง 2



ภาพประกอบ 10 แผนภูมิความสัมพันธ์ของราไมคอร์ไรซากับชนิดพืชอาศัย (ลูกศรแสดงทิศทางความสัมพันธ์ที่ได้รับประโยชน์ร่วมกัน)

ที่มา: Bruns, Thomas D.; Bidartondo, Martin I.; & Taylor, Lee D. (2002). Host Specificity in Ectomycorrhizal Communities: What Do the Exceptions Tell Us?. *Integrative and Comparative Biology*. 42(2): 352-359.

ตาราง 1 ตัวอย่างความสัมพันธ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซากับชนิดพืชอาศัย

พืชอาศัย	ราเอคโตไมคอร์ไรซา	เอกสารอ้างอิง
Betulaceae		
<i>Alnus glutinosa</i>	<i>Gyrodon lividus</i> (Bull.) Sacc., <i>Inocybe maculate</i> Boud., <i>Lactarius</i> <i>evosmus</i> Kuhner & Roman., <i>Russula velenovskyi</i> Melzer & <i>Zvara</i> .	Tedersoo; et al. 2006: 734-748
<i>Betula pubescens</i>	<i>Gyrodon lividus</i> (Bull.) Sacc., <i>Inocybe maculate</i> Boud., <i>Lactarius</i> <i>evosmus</i> Kuhner & Roman., <i>Russula velenovskyi</i> Melzer & <i>Zvara</i> .	
<i>Corylus avellana</i>	<i>Entoloma sinuatum</i> (Bull.) P.Kumm., <i>Rhizopogon roseolus</i> (Corda) Th. Fr.	
Dipterocarpaceae		
<i>Shorea pinanga</i>	<i>Pisolithus arhizus</i> (Scop.) Rauschert.	Turjaman; Tamai; & Segah. 2005: 67-73
<i>Dipterocarpus alatus</i>	<i>Amanita hemibapha</i> subsp. <i>javanica</i> Corner & Bas., <i>Amanita</i> <i>princeps</i> Corner & Bas., <i>Scleroderma aereolatum</i> Fr. <i>Russula densifolia</i> sensu NCL., <i>Russula pectinata</i> sensu NCL., <i>Lactarius uyedae</i> Singer, <i>Gymnomyces redolens</i> (G.Cunn.) Pfister., <i>Tomentella sublilacina</i> (Ellis & Holw.) Wakef.	จินตนา บุพบรรพต; & ศิริภา โพธิ์พินิจ. 2545: 394- 406 Phosri; et al. 2012: 2287- 2298

ตาราง 1 (ต่อ)

พืชอาศัย	ราเอคโตไมคอร์ไรซา	เอกสารอ้างอิง
Elaeocarpaceae		
<i>Elaeocarpus hygrophilus</i>	<i>Astraeus odoratus</i> Phosri, Watling, M.P. Martin & Whalley. <i>Phlebopus portentosus</i> (Berk. & Broome) Boedijin.	ธารรัตน์ แก้วกระจ่าง. 2551 Thongklang; et al. 2010: 413-425
Fagaceae		
<i>Quercus robur</i>	<i>Boletus radicans</i> sensu Rea., <i>Entoloma sinuatum</i> (Bull.) P.Kumm., <i>Gyrodon lividus</i> , (Bull.) Sacc., <i>Lactarius evosmus</i> Kuhner & Roman., <i>Rhizopogon</i> <i>roseolus</i> (Corda) Th. Fr., <i>Russula velenovskyi</i> Melzer & Zvara.	Tedersoo; et al. 2006: 734-748
Pinaceae		
<i>Pinus kesiya</i>	<i>Phlebopus portentosus</i> (Berk. & Broome) Boedijin. <i>Astraeus odoratus</i> Phosri, Watling, M.P. Martin & Whalley., <i>Pisolithus albus</i> (Cooke & Masse) Priest	Sanmee; et al. 2010: 15- 22 เชิดชัย โพธิ์ศรี. 2548
<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Entoloma sinuatum</i> (Bull.), <i>Rhizopogon roseolus</i> (Corda) Th. Fr.	Tedersoo; et al. 2006: 734-748
Salicaceae		
<i>Populus maximowiczii</i>	<i>Laccaria amethystine</i> Cooke., <i>Hebeloma mesophaeum</i> (Pers.) Quel., <i>Thelephora terrestris</i> Ehrh.	Obase; et al. 2009: 143- 145

จำนวนชนิดของพืชและราที่มีความสัมพันธ์กันแบบเอกโตไมคอร์ไรซาพบว่ามีประมาณ 8,000 และ 20,000-25,000 ชนิดตามลำดับ (Rinaldi; Comannidi; & Kuyper. 2008: 1-45) พืชที่มีรายงานว่าพบการเจริญของเอกโตไมคอร์ไรซาแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 พืชอาศัยของราเอกโตไมคอร์ไรซา

วงศ์พืช (family)	สกุลของพืช (genus)
Asteropeiceae	<i>Asteropeia</i> (Madagascar)
Betulaceae	<i>Alnus</i> , <i>Betula</i> , <i>Carpinus</i> , <i>Corylus</i> , <i>Ostrya</i> , <i>Ostryopsis</i>
Casuarinaceae	<i>Allocasuarina</i> , <i>Casuarina</i>
Cistaceae	<i>Cistus</i> , <i>Fumana</i> , <i>Helianthemum</i> , <i>Hudsonia</i> , <i>Lechea</i> , <i>Tuberaria</i>
Cyperaceae	<i>Kobresia</i>
Dipterocarpaceae	<i>Anisoptera</i> , <i>Dipterocarpus</i> , <i>Hopea</i> , <i>Marquesia</i> , <i>Monotes</i> , <i>Shorea</i> , <i>Vateria</i> , <i>Vateriopsis</i> , <i>Vatica</i>
Ericaceae	<i>Arctostaphylos</i> , <i>Cassiope</i> , <i>Chimaphila</i> , <i>Comarostaphylis</i> , <i>Gaultheria</i> , <i>Kalmia</i> , <i>Leucothoe</i> , <i>Pyrola</i> , <i>Pterospora</i> , <i>Sarcodes</i>
Fabaceae I	<i>Azelia</i> , <i>Anthonotha</i> , <i>Aphanocalyx</i> , <i>Berlinia</i> , <i>Brachystegia</i> ,
Caesalpinioideae	<i>Cryptosepalum</i> , <i>Dicymbe</i> , <i>Didelotia</i> , <i>Eperua</i> , <i>Gilbertiodendron</i> ,
(Caesalpiniaceae)	<i>Gleditsia</i> , <i>Intsia</i> , <i>Isoberlinia</i> , <i>Julbernardia</i> , <i>Microberlinia</i> , <i>Monopetalanthus</i> , <i>Paraberlinia</i> , <i>Paramacrolobium</i> , <i>Pellegriniodendron</i> , <i>Tetraberlinia</i> , <i>Toubaouate</i>
Fabaceae II	<i>Aldinia</i> , <i>Gastrolobium</i> , <i>Gompholobium</i> , <i>Jacksonia</i> , <i>Lonchocarpus</i> ,
Papiloinoideae	<i>Mirbelia</i> , <i>Oxylobium</i> , <i>Pericopsis</i>
(Papilionaceae)	
Fabaceae III	<i>Acacia</i> , <i>Calliandra</i>
Mimosoideae	
(Mimosaceae)	
Fagaceae	<i>Castanea</i> , <i>Castanopsis</i> , <i>Fagus</i> , <i>Lithocarpus</i> , <i>Quercus</i>
Gnetaceae	<i>Gnetum</i>
Junglandaceae	<i>Carya</i> , <i>Engelhardtia</i>
Meliaceae	<i>Owenia</i>

ตาราง 2 (ต่อ)

วงศ์พืช (family)	สกุลของพืช (genus)
Myrtaceae	<i>Allosyncarpia, Agonis, Angophora, Baeckea, Eucalyptus</i> <i>Leptospermum, Melaleuca, Tristania, Tristaniopsis</i>
Nothofagaceae (Fagaceae)	<i>Nothofagus</i>
Nyctaginaceae	<i>Guapira, Neea, Pisonia</i>
Phyllanthaceae (Euphorbiaceae)	<i>Uapaca, Poranthera</i>
Pinaceae	<i>Abies, Cathaya, Cedrus, Keteleeria, Larix, Picea, Pinus, Pseudolarix,</i> <i>Pseudotsuga, Tsuga</i>
Polygonaceae	<i>Coccoloba, Polygonum</i>
Rhamnaceae	<i>Cryptandra, Pomederris, Spyridium, Trymalium</i>
Rosaceae	<i>Dryas, Cercocarpus, Purshia</i>
Salicaceae	<i>Populus, Salix</i>

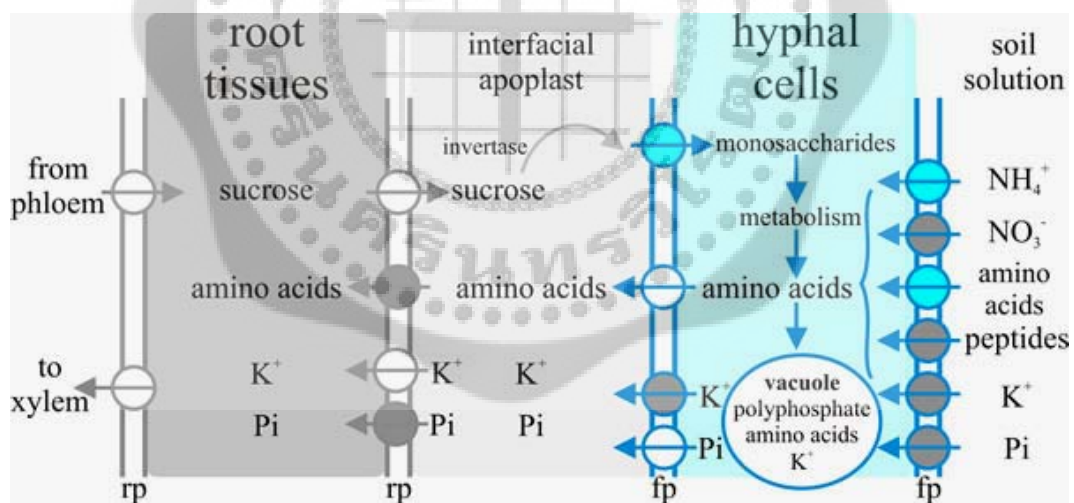
ที่มา: Brundrett, Mark C. (2009). Mycorrhizal Associations and Other Means of Nutrition of Vascular Plants: Understanding the Global Diversity of Host Plants by Resolving Conflicting Information and Developing Reliable Means of Diagnosis. *Plant Soil*. 320: 37-77.

2.2 บทบาทที่สำคัญของราเอคโตไมคอร์ไรซา

เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซามีบทบาทที่สำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอาศัยโดยเฉพาะพืชเศรษฐกิจ รวมทั้งไม้ป่าชนิดต่างๆ เช่น ไม้วงศ์สน ไม้วงศ์ก่อ ไม้วงศ์ยาง เป็นต้น ดังนั้นจึงมีงานวิจัยหลายงานที่กล่าวถึงการนำราเอคโตไมคอร์ไรซามาใช้ในการผลิตหัวเชื้อและการปลูกป่าตัวอย่าง เช่น โอลีเวียรา; ฟรังโก และ คาสโตร (Oliveira; Franco; & Castro. 2012: 95-103) ได้ศึกษาการทำหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ *Pinus pinaster* โดยกล่าวถึงประโยชน์และบทบาทของราเอคโตไมคอร์ไรซาไว้หลายประการ เช่น การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การป้องกันโรคพืช การใช้ปรับปรุงดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก การใช้เป็นตัวบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ของดิน และการใช้เป็นอาหาร เป็นต้น

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

เนื่องจากเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซามีขนาดเล็กกว่ารากฝอยของพืช จึงสามารถเจริญผ่านอนุภาคของดิน หรือช่องขนาดเล็กของหินเพื่อเข้าไปดูดซึมธาตุอาหารให้กับพืชอาศัยได้ (Obase; et al. 2012: 388–392) เช่น ช่วยในการดูดซึมไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แร่ธาตุอื่นๆ รวมทั้งน้ำไปสู่พืช การแลกเปลี่ยนสารอาหารระหว่างรากและรากพืชอาศัยที่มีความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซานั้นแสดงในภาพประกอบ 11 คือ รากพืชจะปล่อยน้ำตาล เช่น ซูโครส ไปยังบริเวณช่องว่างระหว่างรากกับเส้นใยรา (interfacial apoplast) จากนั้น จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ของพืชได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) ที่เส้นใยราสามารถนำเข้าสู่เซลล์ไปใช้ได้ ในขณะที่เดียวกันราก็สามารถนำแร่ธาตุต่างๆ เช่น ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) และกรดอะมิโนบางชนิดที่อยู่ในดินเข้าสู่เซลล์แล้วส่งผ่านให้รากพืชได้เช่นกัน นอกจากนี้ราก็ยังสามารถผลิตเอนไซม์บางชนิด เช่น ฟอสฟาเทส (phosphatase) ออกมาย่อยสารประกอบฟอสฟอรัสที่อยู่ในดินให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ได้อีกด้วย (Moore. 2012: Online) (ภาพประกอบ 11) ราเอคโตไมคอร์ไรซายังช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพของรากฝอย และสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ฮอร์โมน รวมทั้ง วิตามินที่เป็นประโยชน์ให้กับพืช (Amaranthus. 1998: 1-17)



ภาพประกอบ 11 การแลกเปลี่ยนสารอาหารของราเอคโตไมคอร์ไรซากับรากพืชอาศัย rp คือ เยื่อหุ้มเซลล์ของราก (root plasma membrane) และ fp คือ เยื่อหุ้มเซลล์ของรา (fungal plasma membrane)

ที่มา: Moore, Devid. (2012). *Nutrient exchange*. (Online)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอยู่จะช่วยให้ต้นไม้มีความแข็งแรง ทนต่อสภาพพื้นที่แห้งแล้ง ทนต่อความเป็นกรด-ด่างของดิน และช่วยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของดินให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งพบว่าสามารถช่วยเพิ่มการเจริญของพืชได้ถึง 1-7 เท่า เมื่อเทียบกับการเจริญของพืชปกติ (กิตติมา ด้วงแคว. 2548: 187-201)

งานวิจัยของ สุนัดดา โยมญาติ (2551) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของราเอคโตไมคอร์ไรซา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Astraeus asiaticus*, *A. odoratus* และ *Pisolithus abditus* ต่อการเจริญของกล้าไม้วงศ์ยาง 7 ชนิด คือ *Shorea siamensis*, *S. roxburghii*, *S. farinose*, *Dipterocarpus intricatus*, *D. obtusifolius*, *D. alatus* และ *Hopea odorata* พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาทุกสายพันธุ์เกิดการติดเชื้อในกล้าไม้ทดสอบ และส่งเสริมให้กล้าไม้ที่มีการเพาะหัวเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่ากล้าไม้ที่ไม่มีการเพาะหัวเชื้อและยังพบว่าความสูงของลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอราก และน้ำหนักแห้งในส่วนของลำต้นเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 51.94%, 50.11% และ 64.38% ตามลำดับ ทั้งนี้การนำกล้าไม้ที่มีการเจริญของราเอคโตไมคอร์ไรซาไปใช้ในการปลูกป่าจะช่วยเสริมสร้างระบบนิเวศป่าไม้ให้มีความอุดมสมบูรณ์มากขึ้น ช่วยให้มีการย่อยสลายของซากพืชและแร่ธาตุที่ไม่เป็นประโยชน์ให้กลับกลายเป็นธาตุอาหารที่มีประโยชน์ต่อพืช

การป้องกันโรคพืช

ความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซานั้นสามารถช่วยป้องกันพืชอาศัยจากโรคพืชได้ โดยรานั้นจะผลิตสารปฏิชีวนะมายับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค และยับยั้งการเกิดโรคโดยการให้สารอาหารกับพืชอาศัย ทำให้พืชมีความแข็งแรงและต้านทานหรือทนต่อเชื้อก่อโรคได้ เช่น *Rhizoctonia* เป็นสาเหตุของโรคเน่าคอดิน บางครั้งเป็นสาเหตุการเกิดโรครากเน่า *Phythium* และ *Phytophthora* เป็นสาเหตุของโรครากเน่า ส่วน *Fusarium* และ *Verticillium* ทำให้เกิดโรคเหี่ยว นอกจากนี้ร่ายังมีการสร้างชั้นของเส้นใยห่อหุ้มรากพืช หรือสร้างชั้นแมนเทิลที่เป็นลักษณะทางกายภาพของเอคโตไมคอร์ไรซาเพื่อป้องกันรากจากโรค (Ianson; & Smeenk. 2010: 1-7) ชاکรวารตี และ ฮวาง (Chakravarty; & Hwang. 1991: 97-106) ศึกษาความสามารถของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา *Laccaria laccata* กับราโรคพืช *Fusarium oxysporum* ที่ก่อโรคกับพืช *Pinus banksiana* พบว่ารา *F. oxysporum* มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพาะเชื้อ *L. laccata* ร่วมกับเมล็ดพืช *P. banksiana* พบว่า *L. laccata* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ได้

การใช้ปรับปรุงดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก

การสร้างความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซา อาจมีผลกับความไวต่อโลหะหนักของพืชอาศัยโดยใช้กลไกที่แตกต่างกัน กลไกหนึ่งที่เกิดขึ้นคือ กลไกทางกายภาพโดยการสร้างชั้นแมนเทิลจากเส้นใยรารอบรากพืชซึ่งพบว่าช่วยให้พืชเจริญในดินที่มีความเข้มข้นของโลหะหนักสูงได้ (lordache; Gherghel; & Kothe. 2009: 414-432) ซึ่งเส้นใยของร่ายังสามารถป้องกันการดูดซึมของ

สังกะสี, แคลเซียม และ แมงกานีส ของพืชจากดินที่มีสารโลหะหนักเหล่านี้มากเกินไปเป็นการป้องกันและส่งเสริมรากพืชให้เจริญเติบโตได้และยังฟื้นฟูดินที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักในปริมาณสูงได้อีกด้วย (Ianson; & Smeenk. 2010: 1-7) ซึ่งกลไกในการปรับปรุงดินโดยใช้ราไมคอร์ไรซานั้นพบว่าเราจะทำการเก็บสะสมโลหะหนักไว้ภายในเส้นใยของรา (Iordache; Gherghel ; & Kothe. 2009: 414-432) แครน; บาร์เคย์ และ ไดท์ทอน (Crane; Barkay; & Dighton. 2012: 245-251) ศึกษาผลของปรอทบนเมล็ดสน *Pinus rigida* และสังคมของเอคโตไมคอร์ไรซา โดยนำเมล็ดสนปลูกในดินที่มีสารปรอทเข้มข้น 0-366 $\mu\text{g/g}$ แล้วบ่มเป็นเวลานาน 5 เดือน จากนั้นตรวจสอบการรอดชีวิตของต้นสน การเจริญเติบโต และสังคมของราเอคโตไมคอร์ไรซา ผลการทดลองพบว่าการรอดชีวิตของต้นสนลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารปรอท โดยต้นสนสามารถทนสารปรอทได้ถึง 198 $\mu\text{g/g}$ นอกจากนี้การเพิ่มสารปรอทที่ความเข้มข้น 88 $\mu\text{g/g}$ ลงในดิน มีผลในการลดความหลากหลายของราเอคโตไมคอร์ไรซา ในขณะที่การใส่สารปรอทในระดับที่มีความเข้มข้นต่ำไม่มีผลกับสังคมราเอคโตไมคอร์ไรซาเช่นเดียวกับในต้นควบคุม

การใช้เป็นตัวบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ของดิน

ทั้งนี้ความหลากหลายของราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพเพื่อบอกคุณภาพของสิ่งแวดล้อมได้โดยเราจะสร้างสารประกอบประเภทไกลโคโปรตีน (glycoprotein) บริเวณเส้นใยที่ชื่อว่า glomalin มีลักษณะคล้ายกาว เป็นสาเหตุที่ทำให้อนุภาคของดินจับตัวเข้าด้วยกัน หรือทำให้เกิดการรวมกลุ่มของดิน และเส้นใยของรายังช่วยจับกับอนุภาคของดินที่ไม่รวมกันให้มารวมกลุ่มกันอีกด้วย ซึ่งสารประกอบดังกล่าวทำให้อนุภาคดินช่วยในการอุ้มน้ำ และรักษาความชื้นรวมทั้งธาตุอาหารในดินได้ดีขึ้น (Ianson; & Smeenk. 2010: 1-7)

การใช้เป็นอาหาร

เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิดสามารถนำมาใช้เป็นอาหารรับประทานได้ แม้ว่าบางชนิดจะมีพิษซึ่งพบเป็นส่วนน้อย แต่บางชนิดสามารถนำมาใช้เป็นเห็ดสมุนไพรได้ (กิตติมา ต้วงแคว. 2548: 187-201) เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่นิยมนำมารับประทาน เช่น เห็ดเผาะ เห็ดหัวเห็ดมันปูใหญ่ เห็ดมันปูเล็ก เป็นต้น เห็ดเหล่านี้มีคุณค่าทางอาหารและทางเศรษฐกิจ จึงมีผู้นิยมนำไปรับประทานอย่างกว้างขวางและมีความต้องการทางการค้าสูง เนื่องจากเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซามีรสชาติดี มีกลิ่นหอม และหารับประทานได้ยาก ซึ่งเห็ดมีแคลอรี โซเดียม ไขมัน และคลอโรสเตรอรอลต่ำ แต่มีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไฟเบอร์ วิตามิน และแร่ธาตุสูง ทำให้เห็ดเป็นอาหารที่มีคุณสมบัติเหมาะแก่การนำไปบริโภค (Kues; & Liu. 2000: 141-152) ในงานวิจัยของแสนหมี; และคนอื่นๆ (Sanmee; et al. 2003: 527-532) ได้ศึกษาถึงคุณค่าทางอาหารของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่รับประทานได้ พบว่าองค์ประกอบต่างๆ มีดังนี้ โปรตีน 14.0-24.2% ไขมัน 2.7-9.5% เส้นใย 8.3-16.8% และคาร์โบไฮเดรต 41.6-65.1% (% ของน้ำหนักแห้ง) ส่วนธาตุอาหารหลัก

ได้แก่ ฟอสฟอรัส 2.1-8.1 mg/g โพแทสเซียม 12.8-45.2 mg/g กำมะถัน 1.1-6.1 mg/g แคลเซียม 0.1-2.4 mg/g แมกนีเซียม 0.5-1.6 mg/g (mg/g ของน้ำหนักแห้ง) ส่วนธาตุอาหารรอง ได้แก่ เหล็ก 162-3254 mg/kg สังกะสี 37.8-253 mg/kg แมงกานีส 13.0-329 mg/kg ทองแดง 11.6-81.1 mg/kg โบรอน 1.6-7.1 mg/kg ซีลีเนียม 0-12.6 mg/kg (mg/kg ของน้ำหนักแห้ง) แสดงให้เห็นว่าเห็ดประกอบไปด้วยสารอาหารที่หลากหลายและมีประโยชน์ต่อการนำมาบริโภค

การใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดมีรายงานว่าสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่น polysaccharides, peptidoglucans, terpenoids, สารประกอบ phenolic, steroids และ lectins เป็นต้น สารเหล่านี้สามารถนำไปใช้ทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรมในการเป็น antitumor, antimicrobial, antiviral และ antioxidant เป็นต้น (Badalyan. 2012: 317-334) ในงานวิจัยของ ยาง และคนอื่นๆ (Yang; et al. 2010: 497-503) ศึกษาสารสกัดจากเห็ด *Tricholoma matsutake* ซึ่งเป็นเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่นิยมรับประทาน นอกจากมีรสชาติดีแล้วยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย โดยการสกัดสารในกลุ่ม polysaccharides แล้วทดสอบกับเซลล์มะเร็งผิวหนัง (B16) พบว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ โนะริคุระ; และคนอื่นๆ (Norikura; et al. 2011: 6974-6979) นำสารสกัดจากเห็ด *Thelephora aurantiotincta* ได้แก่ *p*-terphenyl derivative, thelephantin O และ vialinin A ไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco2) พบว่าสามารถลดจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้ทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของราเอคโตไมคอร์ไรซา

เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถพบการเจริญได้บริเวณรากฝอยหรือรากแขนงของพืชอาศัยจึงทำให้รากพืชมีสี รูปทรง และหน้าที่เปลี่ยนไปจากเดิม (Amaranthus. 1998: 1-17) และหลายชนิดพบว่าสามารถเจริญเป็นดอกเห็ดได้อีกด้วย (ภาพประกอบ 12) ดังนั้นการศึกษาเพื่อการจัดจำแนกชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาจึงต้องศึกษาทั้งระยะที่เจริญบริเวณรากพืชอาศัย หรือรากเอคโตไมคอร์ไรซา และระยะที่เจริญเป็นดอกเห็ด หรือเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา ซึ่งพบได้เฉพาะบางฤดูเท่านั้น



ภาพประกอบ 12 ความสัมพันธ์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาและดอกเห็ด (a-b) *Rhizopogon roseolus*, (c-d) *Cortinarius odorifer* และ (e-f) *Laccaria amethystine*

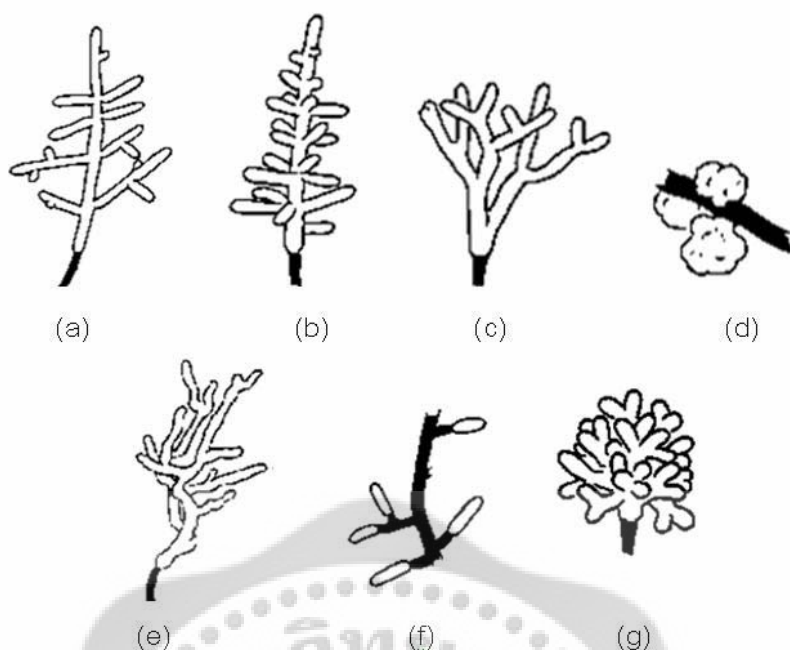
ที่มา: Egli, Simon; Hutter, Sylvia; & Peter, Martina. (2010). *Fundiv – Functional Diversity*. (Online).

3.1 รากเอคโตไมคอร์ไรซา

ลักษณะของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่สำคัญที่ใช้ในการศึกษาประกอบการจัดจำแนกชนิด เช่น ลักษณะของสี รูปร่าง การแตกกิ่ง และลักษณะพื้นผิว เป็นต้น

ก) ลักษณะการแตกกิ่ง

ลักษณะการแตกกิ่งของรากเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถแบ่งออกได้เป็น 7 แบบ คือ monopodial pinnate, monopodial pyramidal, dichotomous, irregular, tuberculate, not branched (ไม่แตกกิ่ง) และ coralloid (ภาพประกอบ 13)



ภาพประกอบ 13 การแตกกิ่งของรากเอคโตไมคอร์ไรซา (a) monopodial pinnate (b) monopodial pyramidal (c) dichotomous (d) tuberculate (e) irregular (f) not branched และ (g) coralloid

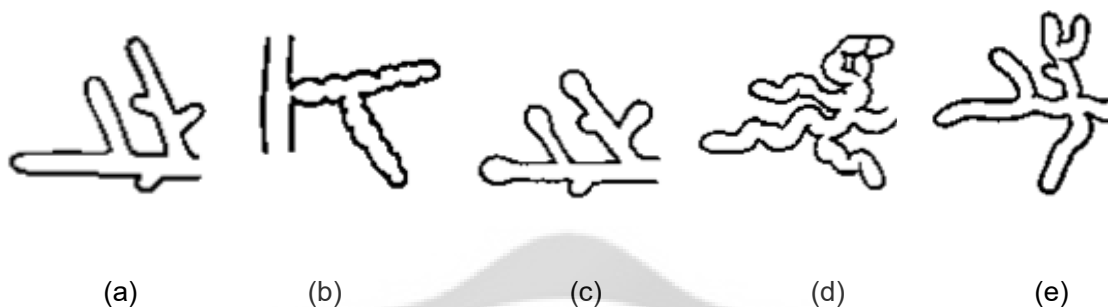
ที่มา: Goodman, Doug; Durall, Dan; & Trofymow, Tony. (2008). *Morphology of Ectomycorrhizal System (Dissection Microscope)*. (Online).

การแตกกิ่งแบบ (1) monopodial pinnate คือการแตกกิ่งที่มีลักษณะของกิ่งที่แตกออกมาสั้นกว่าแกนกลาง และอยู่ในระนาบเดียวกัน (2) monopodial pyramidal คือการแตกกิ่งคล้ายกับ monopodial pinnate แต่ระนาบของกิ่งแตกกิ่งออกไป 3 ระนาบหรือมากกว่านั้น (3) dichotomous คือการแตกกิ่งออกเป็น 2 กิ่ง และเจริญออกไปมีความยาวใกล้เคียงกัน ซึ่งจะเจริญแตกกิ่งที่ละ 2 กิ่งเช่นนี้ไปเรื่อยๆ (4) tuberculate คือกิ่งที่แตกออกมานั้นจะอัดแน่นด้วยเส้นใยพันกันไปมา มีรูปร่างเหมือนกับผลมะเขือเทศขนาดเล็ก (5) irregular คือการแตกกิ่งโดยไม่มีแกนหลักหรือแตกเป็น 2 กิ่งอย่างสม่ำเสมอ (6) not branched คือไม่มีการแตกกิ่ง (7) coralloid คือการแตกกิ่งที่มีการแตกกิ่งอัดแน่นมาก มีลักษณะคล้ายปะการัง (Goodman; et al. 2008: online)

ข) ลักษณะของปลายราก

ลักษณะของปลายรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบมี 5 แบบคือ straight, beaded, club-shaped, tortuous และ bent ลักษณะของปลายรากแบบ (1) straight คือลักษณะเป็นเส้นตรงมี

ขอบเรียบ (2) beaded คือลักษณะคล้ายสายร้อยลูกปัด (3) club-shaped คือลักษณะของส่วนยอดกว้างกว่าส่วนฐาน (4) tortuous คือลักษณะส่วนปลายบิดงอ หรือโค้งหลายๆ ครั้ง และมีปลายรากหลายระนาบ และ (5) bent คือลักษณะส่วนปลายรากที่โค้งหรือหักงอ แต่ปลายรากนอนไปในระนาบเดียว (ภาพประกอบ 14) (Goodman; Durall; & Trofymow. 2008: online)

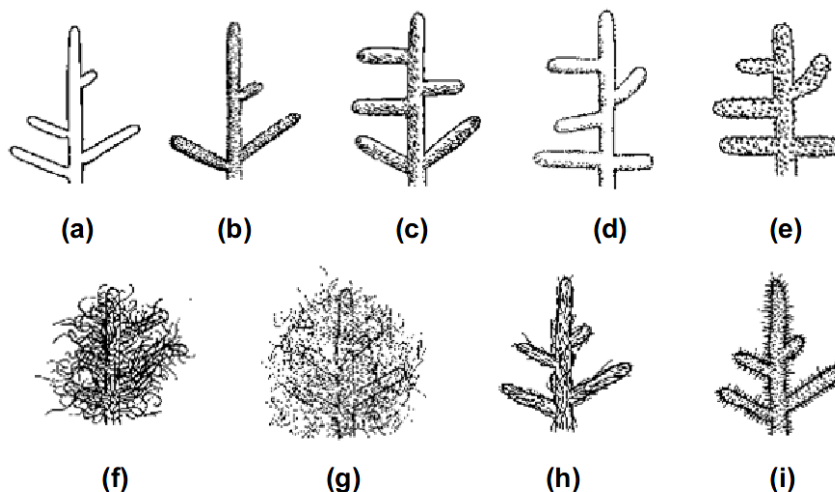


ภาพประกอบ 14 ลักษณะปลายรากของราเอคโตไมคอร์ไรซา (a) straight (b) beaded (c) club-shaped (d) tortuous และ (e) bent

ที่มา: Goodman, Doug; Durall, Dan; & Trofymow, Tony. (2008). *Morphology of Ectomycorrhizal System (Dissection Microscope)*. (Online).

ค) ลักษณะพื้นผิวของรากเอคโตไมคอร์ไรซา

ลักษณะพื้นผิวของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบมี 9 แบบ คือ smooth, grainy, felty, velvety, warty, wooly, cottony, stringy และ spiny ลักษณะพื้นผิวแบบ (1) smooth คือมีพื้นผิวเรียบ (2) grainy คือมีปุ่มเล็กๆ หรือเม็ดเล็กๆ คล้ายกับกระดาษทรายเนื้อละเอียดที่ผิว (3) felty คือมีเส้นใยราอยู่ที่ผิวหรือพันอยู่รอบๆ คล้ายผ้าสักหลาดเนื้อหยาบ (4) velvety คือมีลักษณะคล้ายผ้ากำมะหยี่ เพราะมีการเจริญของเส้นใยราบริเวณผิวเส้นสั้นๆ (5) warty คือมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ หรือก้อนเล็กๆ คล้ายกระดาษทรายเนื้อหยาบ (6) wooly คือมีลักษณะของเส้นใยราบริเวณผิวหนาและพันอยู่จำนวนมาก (7) cottony คือลักษณะที่มีเส้นใยราบางๆ จำนวนมาก โดยเส้นใยราแต่ละเส้นไม่แยกออกกันอย่างชัดเจน (8) stringy คือมีลักษณะของเส้นใยราราคขนาดเล็ก พันอยู่รอบผิวของราก (9) spiny คือมีลักษณะของซิสทีเดีย (cystidia) ที่แข็งชัดเจนอาจพบทั้งขนาดเล็กและยาว (ภาพประกอบ 15) (Goodman; Durall; & Trofymow. 2008: online)



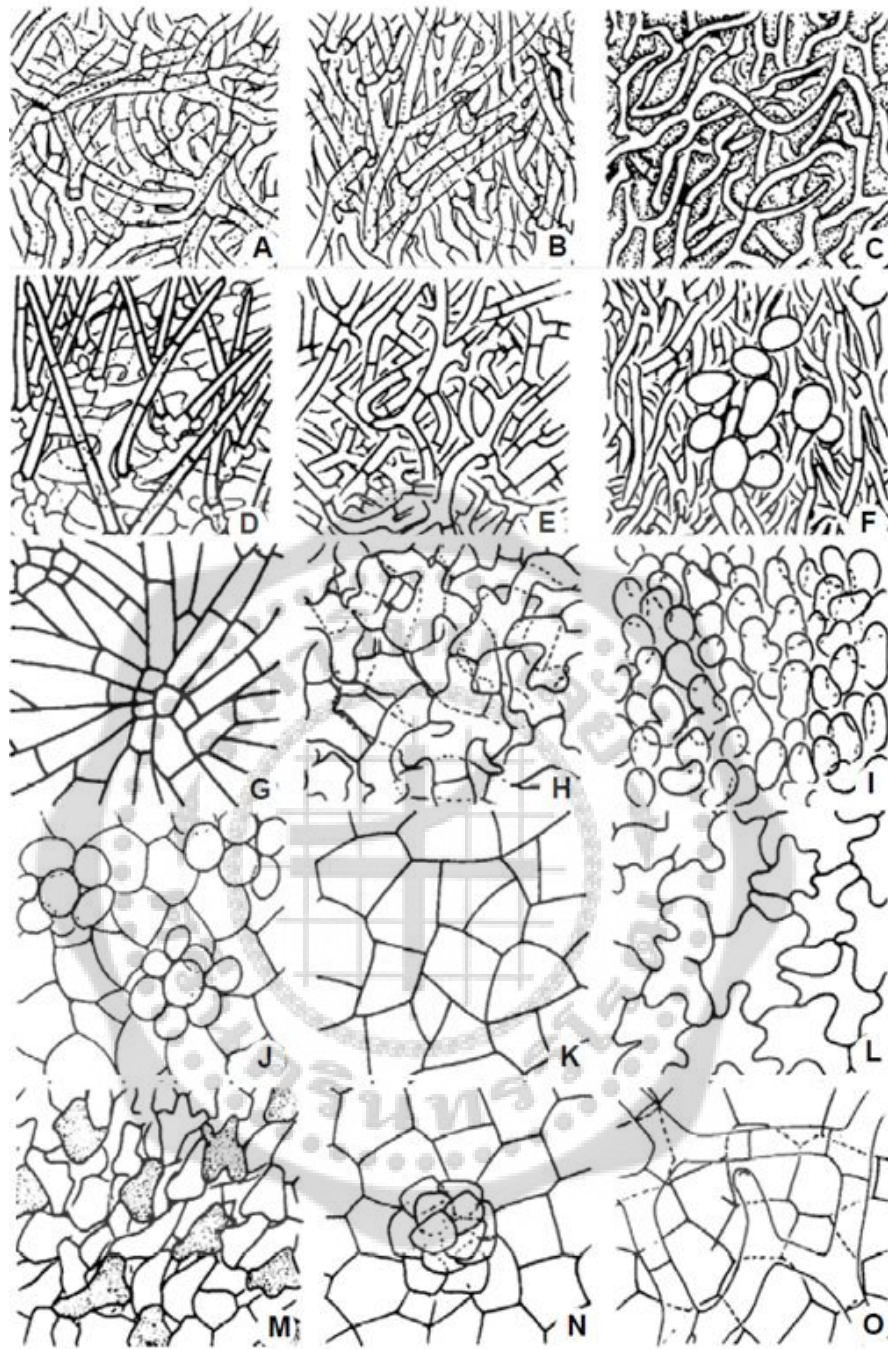
ภาพประกอบ 15 ลักษณะพื้นผิวของรากเอคโตไมคอร์ไรซา (a) smooth (b) grainy (c) felty (d) velvety (e) warty (f) wooly (g) cottony (h) stringy และ (i) spiny

ที่มา: Goodman, Doug; Durall, Dan; & Trofymow, Tony. (2008). *Morphology of Ectomycorrhizal System (Dissection Microscope)*. (Online).

ง) ลักษณะโครงสร้างอื่นๆ

นอกจากการศึกษาลักษณะภายนอกของรากแล้ว การศึกษาถึงลักษณะเส้นใยที่เจริญภายในเซลล์รากพืชก็มีความสำคัญเช่นกัน (Suz; et al. 2008: 437-473) เช่น ลักษณะการเจริญของเส้นใยแบบ plectenchymatous คือการเจริญของเส้นใยที่เรียงตัวเป็นเส้นเดี่ยวๆ และสานกันอย่างหลวมๆ (ภาพประกอบ 16A-F) หรือลักษณะการเจริญของเส้นใยแบบ pseudoparenchymatous คือเส้นใยจะมีลักษณะเป็นเซลล์คล้ายเซลล์พืช เรียงตัวกันหนาแน่น (ภาพประกอบ 16G-O) (Suz; et al. 2008: 437-473)

โครงสร้างของไรโซมอร์ฟ (rhizomorphs) มีลักษณะเป็นเส้นใยหลายๆ เส้นมาสานรวมตัวกันจนมีลักษณะคล้ายรากพืชเจริญออกมาจากชั้นแมนเทิลไปยังดินภายนอกรากพืช ไรโซมอร์ฟนี้อาจมีการพัฒนาไปเป็นโครงสร้างที่มีประสิทธิภาพสำหรับการขนส่งน้ำและธาตุอาหารให้กับพืชได้ (Suz; et al. 2008: 437-473)



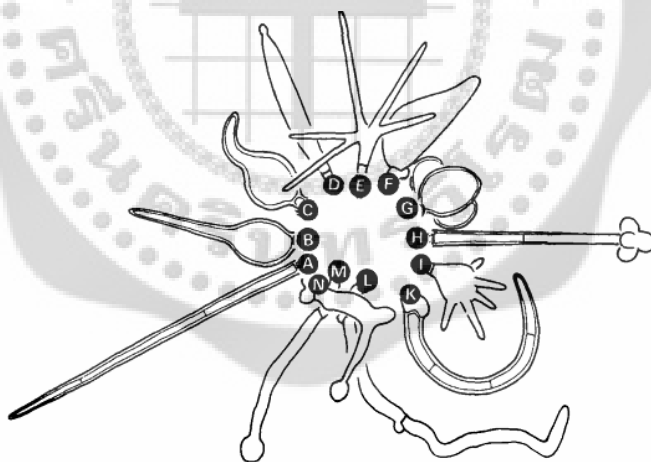
ภาพประกอบ 16 ลักษณะการเรียงตัวของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาบริเวณแมนเทิลในรากพืชอาศัย
(A-I) การเรียงตัวแบบ plectenchymatous และ (J-O) การเรียงตัวแบบ pseudoparenchymatous

ที่มา: Agerer, Reinhard. (1991). Characterization of Ectomycorrhiza. *Methods in Microbiology*, San Diego: Academic Press. p. 50

โครงสร้างของซิสทีเดีย (cystidia) มีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีรูปแบบและขนาดที่หลากหลาย บางครั้งมีลักษณะเป็นเส้นใยปกติ อาจโค้งตรงหรืองอคล้ายตะขออาจพบการแตกกิ่งหรือไม่แตกกิ่งก็ได้ (ภาพประกอบ 17) สามารถพบได้ในชั้นแมนเทิล ไโรโซมอร์ฟ รวมทั้งพบในระยะที่สร้างดอกเห็ดบริเวณ ดอกหมวก (cap) ครีบดอก (gills) และก้านดอก (stip) เป็นต้น (Suz; et al. 2008: 437-473)

โครงสร้างของอิมานาดิงไฮฟี (emanating hyphae) มีลักษณะเส้นใยที่สร้างอยู่บนผิวของชั้นแมนเทิล หรือบนผิวไโรโซมอร์ฟ มีผนังกัน มีรูปร่างและสีได้หลากหลาย อาจมีผนังเซลล์หนาหรือบาง บางชนิดมีการสร้างคริสตัล (crystal) หรือบางชนิดสามารถสร้างสารที่ทำให้เกิดสีได้ นอกจากนี้ยังมีการสร้างเส้นใยเชื่อมต่อระหว่างอิมานาดิงไฮฟี เรียกว่า anastomoses ซึ่งมีได้หลายลักษณะ เช่น มีขนาดยาว มีขนาดสั้น หรือมีการสร้าง clamps เป็นต้น (Suz; et al. 2008: 437-473)

โครงสร้างของฮาติกเนต (hartig net) เป็นโครงสร้างของราที่สร้างขึ้นเพื่อเป็นบริเวณในการเชื่อมต่อกันระหว่างราและพืชอาศัย โดยราจะสร้างเส้นใยแทงเข้าไปตรงช่องว่างระหว่างเซลล์ ซึ่งในพืชมีดอกฮาติกเนตสร้างจากชั้นแมนเทิลเข้าไปสู่เซลล์เอพิเดอร์มิสส่วนในพืช เมล็ดเปลือกฮาติกเนตจะเข้าไปในเซลล์ลึกกว่าในพืชมีดอก คือ เข้าไปถึงชั้นคอร์เท็กซ์ (Suz; et al. 2008: 437-473)

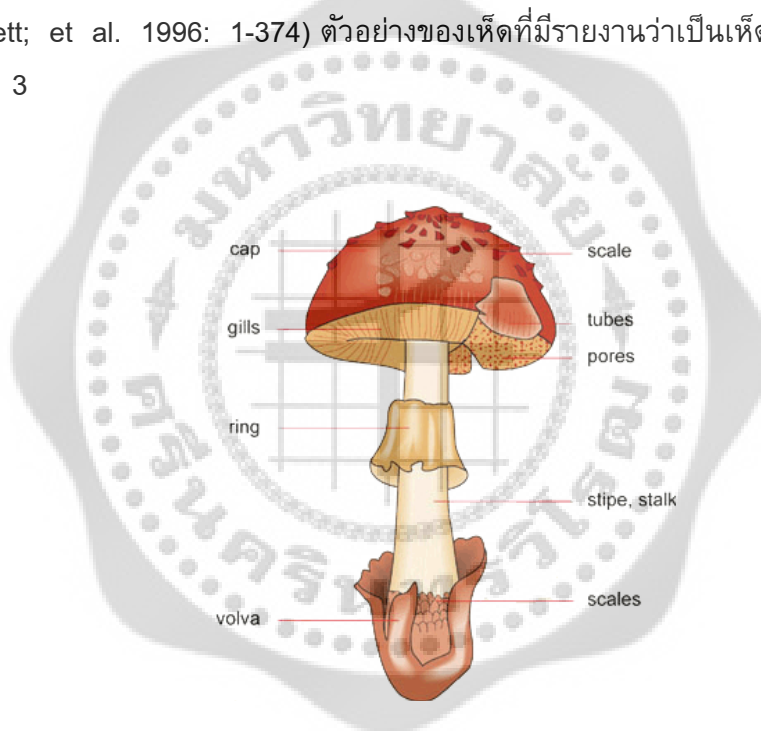


ภาพประกอบ 17 ลักษณะของซิสทีเดียที่พบในราเอคโตไมคอร์ไรซาบริเวณแมนเทิลของรากพืชอาศัย A) ลักษณะแฉลม B) ลักษณะฐานพองออกปลายตรง C) ลักษณะยางคโค้ง D) ลักษณะกระบอกเรียวที่ปลายมีเม็ดกลมขนาดเล็ก F) ลักษณะกระบอก G) ลักษณะกลม H) ลักษณะปลายมีพู่ K) ลักษณะตะขอ E, I, M, N) ไม่สามารถจำแนกชนิดได้

ที่มา: Agerer, Reinhard. (1991). Characterization of Ectomycorrhiza. *Methods in Microbiology*, San Diego: Academic Press. p. 56

3.2 เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา

เนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดสามารถเจริญเป็นดอกเห็ดได้ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สำคัญในการจัดจำแนกชนิด อีกทั้งบางชนิดพบว่าสามารถนำมารับประทานได้ ตัวอย่างของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา เช่น เห็ดห้า (*Phlebopus portentosus*), เห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus*), เห็ดมัตสึทาเกะ (*Tricholoma matsutake*), เห็ดทรัฟเฟิล (*Tuber melanosporum*), เห็ดมันปูใหญ่ (*Cantharellus cibarius*), เห็ดฟาน (*Lactarius volemus*) เป็นต้น โดยโครงสร้างสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิด เช่น ลักษณะดอกหมวก (cap) ครีบอก (gills) วงแหวน (ring/annulus) ก้านดอก (stipe) และ เยื่อหุ้มดอกอ่อน (volva, outer veil หรือ universal veil) รวมทั้งลักษณะรูปร่าง สี ขนาดของสปอร์ (ภาพประกอบ 18) นอกจากนี้ยังมีลักษณะอื่นๆ เช่น กลิ่น รสชาติ และผิวสัมผัส เป็นต้น โดยจำแนกลักษณะของเห็ดตาม บรันเดิร์ท; และคนอื่นๆ (Brundrett; et al. 1996: 1-374) ตัวอย่างของเห็ดที่มีรายงานว่าเป็นเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา แสดงในตาราง 3



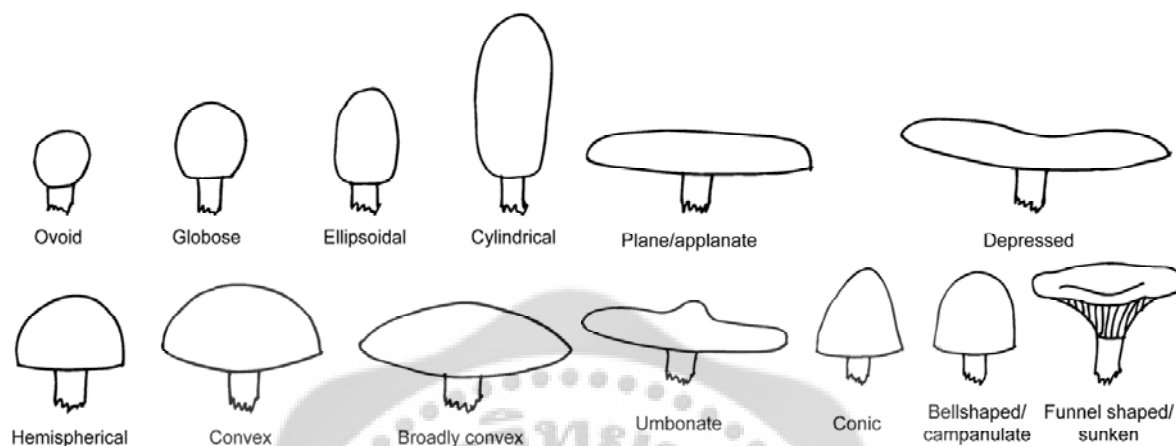
ภาพประกอบ 18 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของดอกเห็ด

ที่มา: Dery, Bernard. (2011). *Vegetal Biology*. (Online)

ก) ลักษณะของหมวกเห็ด (cap)

หมวกเห็ดเป็นส่วนประกอบของเห็ดที่จะเจริญขึ้นไปในอากาศ เมื่อมีการเจริญเต็มที่แล้วหมวกเห็ดจะบานออก จึงสามารถสังเกตลักษณะของหมวกเห็ดแต่ละชนิดได้ ซึ่งมีได้หลายลักษณะ โดยจะมีความแตกต่างกันทั้งขนาด รูปร่าง สี ลักษณะของผิว ลักษณะขอบ และความชื้น

รูปร่างของหมวกเห็ด เช่น ทรงกระบอก (cylindrical) ระฆัง (bell-shaped) ทรงกรวย (conic) และ โคน (convex) เป็นต้น (ภาพประกอบ 19) ส่วนผิวของหมวกเห็ดด้านบนอาจมีลักษณะเรียบ ขรุขระ ลื่น มีสะเก็ด หรือมีขน เป็นต้น (อนงค์; พูนพิไล; & อุทัยวรรณ. 2551: 256)

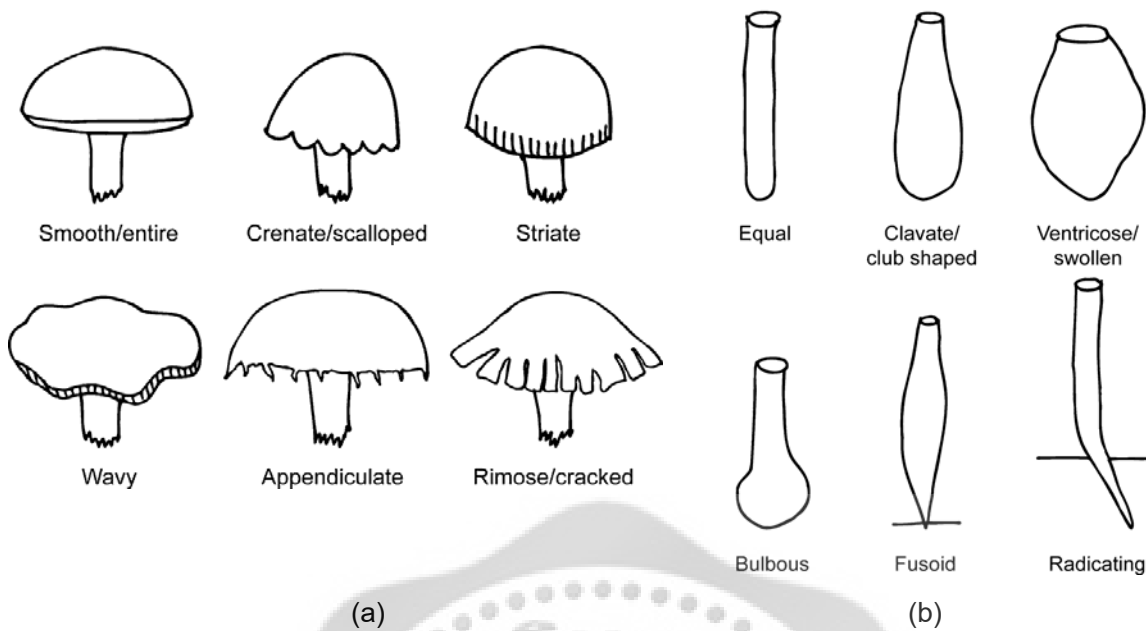


ภาพประกอบ 19 ลักษณะของหมวกเห็ด

ที่มา: Baker; et al. (2013). *Mushroom Terms Glossary*. (Online).

ข) ลักษณะของการเจริญใต้หมวกเห็ด

ภายใต้หมวกเห็ดอาจมีครีบดอก (gills) ซึ่งมีลักษณะการเรียงตัวกันเป็นแนวยาววนตามรัศมีของก้านมีลักษณะเป็นครีบหรือซี่ และมีสปอร์อยู่ภายใน การเรียงตัวขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด บางชนิดอาจเรียงตัวกันสม่ำเสมอหรือบางชนิดมีการเรียงตัวกันอย่างหนาแน่น ในขณะที่เห็ดบางชนิดใต้หมวกเห็ดอาจไม่ได้มีลักษณะเป็นครีบ บางชนิดอาจมีลักษณะเป็นรู (pore) หรือหนาม ส่วนขอบของหมวกเห็ดนั้นอาจมีลักษณะ เรียบ (smooth) คลื่น (wavy) หยัก (crenate) หรือรยางค์ (appendiculate) เป็นต้น แสดงในภาพประกอบ 20a (อนงค์; พูนพิไล; & อุทัยวรรณ. 2551: 256)



ภาพประกอบ 20 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานในการจัดจำแนกชนิดของเห็ด (a) ลักษณะของขอบเห็ด และ (b) ลักษณะของก้านดอก

ที่มา: Baker; et al. (2013). *Mushroom Terms Glossary*. (Online).

ค) ลักษณะของก้านดอก (stipe)

ก้านดอกของเห็ดมีลักษณะขนาด รูปร่าง และสีแตกต่างกัน ส่วนบนยึดติดกับเห็ดหรือยึดติดกับครีบดอก มีทั้งผิวเรียบ ขรุขระ มีขน หรือมีสะเก็ด บางชนิดมีวงแหวนหรือเยื่อบางๆ คล้ายวงแหวนติดรอบก้านส่วนบน รูปร่างของก้านอาจมีได้หลายลักษณะ เช่น มีลักษณะเรียวลงมาถึงโคน (tapering toward base), มีขนาดเท่ากันตั้งแต่ยอดจนถึงโคน (equal), มีลักษณะคล้ายกระบอง (club-shaped), มีฐานโค้งเป็นกระเปาะกลม (bulbous) และมีเนื้อเยื่อหุ้มที่โคนคล้ายถ้วย (cup) เป็นต้น แสดงในภาพประกอบ 20b (อนงค์; พูนพิไล; & อุทัยวรรณ. 2551: 256)

ง) วงแหวน (ring/annulus)

วงแหวนหรือม่าน (veil) จะพบบริเวณของก้านดอกและขอบเห็ดซึ่งจะถูกยึดไว้ด้วยกันเมื่อเป็นดอกอ่อน เมื่อดอกเห็ดบานจะขาดแยกออกจากขอบเห็ด เหลือเพียงบางส่วนที่ติดอยู่กับก้านในลักษณะวงแหวน เรียกว่า เยื่อขอบเห็ด (inner veil หรือ partial veil) หลังจากดอกเห็ดโตเต็มที่พบว่าบางชนิดวงแหวนจะหลุดออก แต่บางชนิดอาจไม่มีวงแหวน (อนงค์; พูนพิไล; & อุทัยวรรณ. 2551: 256)

จ) เยื่อหุ้มดอกอ่อน (volva, outer veil หรือ universal veil)

เป็นเนื้อเยื่อที่ห่อหุ้มเห็ดทั้งดอกในระยะที่เป็นดอกอ่อน เมื่อเห็ดเจริญเติบโตขึ้นเนื้อเยื่อจะขาดออกเพื่อให้ดอกเห็ดและก้านได้ยึดตัวสูงขึ้น ทิ้งให้เนื้อเยื่อบางส่วนที่มีลักษณะคล้ายถ้วยอยู่บริเวณโคนก้าน (อนงค์; พูนพิไล; & อุทัยวรรณ. 2551: 256)

ฉ) ลักษณะอื่น ๆ

สีสปอร์

การจำแนกชนิดของเห็ดสามารถศึกษาจากสีของสปอร์ได้เช่นเดียวกัน เห็ดที่มีครีบบางกลุ่มนั้นมีสีของสปอร์ที่หลากหลาย เช่น สีขาว สีน้ำตาลแก่ สีน้ำตาลอ่อน สีเหลือง สีน้ำตาลอมม่วง สีน้ำตาลดำ สีน้ำตาลแดง สีดำ และสีน้ำเงิน เป็นต้น ในการจำแนกชนิดต้องทำรอยพิมพ์สปอร์ (spore print) เพื่อดูสีของสปอร์ที่เป็นสีจริง เนื่องจากสีที่ปรากฏบนครีบบั้นอาจมีสีที่ผิดเพี้ยน สีของสปอร์นี้สามารถบอกได้ถึงระดับวงศ์เช่น สีดำ จัดอยู่ในวงศ์ Coprinaceae เป็นต้น (อนงค์ จันท์ศรีกุล. 2552: 10-19)

กลิ่น

เห็ดบางชนิดอาจมีกลิ่นที่จำเพาะ เช่น กลิ่นผลไม้ กลิ่นเนื้อสด กลิ่นฉุน กลิ่นคลื่นเหียน และกลิ่นดิน เป็นต้น ในการทดสอบกลิ่นนั้นจะต้องทดสอบกับดอกที่สดและควรหลีกเลี่ยงดอกที่เน่าแล้ว (อนงค์ จันท์ศรีกุล. 2552: 10-19)

รสชาติ

เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกชนิดของเห็ด โดยตัดเนื้อเห็ดชิ้นเล็กๆ นำมาสัมผัสกับลิ้น หลังจากทดสอบแล้วคายออก ห้ามกลืนเด็ดขาดเนื่องจากเห็ดบางชนิดมีพิษ อาจเกิดอันตราย รสชาติของน้ำยางและครีบบก็ควรทดสอบด้วยเช่นกัน รสชาติของเห็ด เช่น มีรสอ่อน รสขม รสฝาด และรสเผ็ด เป็นต้น (อนงค์ จันท์ศรีกุล. 2552: 10-19)

น้ำยาง

เห็ดบางชนิดมีหยดน้ำใสหรือขุ่น บนหมวกของเห็ด ครีบบ หรือก้านมีน้ำยางสีขาวหรือสีอื่น ถ้าเกิดเนื้อเยื่อมีการฉีกขาดหรือแตกออกอาจมีปริมาณน้ำยางมากขึ้น น้ำยางอาจมีการเปลี่ยนสีเมื่อแห้งหรือย้อมสีที่ครีบบ (อนงค์; พูนพิไล; & อุทัยวรรณ. 2551: 256)

การทดสอบด้วยสารเคมี

นอกจากการจำแนกชนิดด้วยลักษณะต่างๆ ข้างต้นแล้วยังใช้การทดสอบด้วยสารเคมีเนื่องจากว่าเนื้อเยื่อของเห็ดบางชนิดเมื่อหยดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ลงบนดอกเห็ดแล้วพบว่าเกิดการเปลี่ยนสีไปเป็นสีดำ วิธีการทดสอบนี้ทำได้โดยหยดสารเคมีลงบนเนื้อเยื่อโดยตรง ซึ่งปกติใช้เนื้อเยื่อที่หมวกเห็ดและก้าน แล้วสังเกตทันทีหลังจากหยดสารและสังเกตสีอีกครั้งเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 3-5 นาทีซึ่งสารเคมีที่ใช้ทดสอบกันทั่วไป คือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 15% แอมโมเนีย (NH₃) เข้มข้น 30% และ เฟอริกซัลเฟต (FeSO₄) เข้มข้น 10% (อนงค์ จันท์ศรีกุล. 2552: 10-19)

ตาราง 3 ตัวอย่างเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา

ไฟลัม (Phylum)	สกุล (Genus)
Ascomycota	<i>Amylascus, Balsamia, Barssia, Cazia, Cenococcum, Chloridium, Choiromyces, Delastria, Dingleya, Elaphomyces, Eremiomyces, Fischerula, Genea, Geopora, Geopyxis, Gilkeya, Glischroderma, Gymnohydnotrya, Gyromitra, Helvella, Humaria, Hydnobolites, Hydnocystis, Hydnotrya, Hydnotryopsis, Kalaharituber, Labyrinthomyces, Leptodontidium, Loculotuber, Meliniomyces, Mycocylandia, Neocudoniella, Nothojafnea, Otidea, Pachyphloeus, Paradoxa, Paurocotylis, Peziza, Phaeangium, Phialocephala, Phialophora, Picoa, Plicaria, Pseudaleuria, Pseudotulostoma, Pulvinula, Reddellomyces, Ruhlandiella, Sarcosphaera, Sowerbyella, Sphaerosoma, Sphaerosporella, Sphaerozone, Stephensia, Tarzetta, Terfezia, Tirmania, Tricharina, Trichophaea, Tuber, Underwoodia, Wilcoxina, Wynnella</i>
Basidiomycota	<i>Afroboletus, Albatrellus, Alnicola, Alpova, Amanita, Amarrendia, Amaurodon, Amphinema, Anamika, Andebbia, Arcangeliella, Aroramyces, Astraeus, Aureoboletus, Auritella, Austroboletus, Austrogaster, Austrogautieria, Austropaxillus, Bankera, Boletellus, Boletochaete, Boletopsis, Boletus, Bothia, Boughera, Byssocorticium, Byssoporia, Calostoma, Cantharellus, Castoreum, Chalciporus, Chamonixia, Chlorogaster, Chondrogaster, Chroogomphus, Clavariadelphus, Clavulina, Coltricia, Coltriciella, Corditubera, Cortinarius, Craterocola, Craterellus, Cribbea, Cystangium, Cystogomphus, Dermocybe, Descolea, Descomyces, Destuntzia, Diplocystis, Efibulobasidium, Entoloma, Fevansia, Fistulinella, Fuscogyroporus, Gallacea, Gastroboletus, Gastroleccinum, Gastrotlyopilus, Gautieria, Gigasperma, Gloeocantherellus, Gomphidius, Gomphogaster, Gomphus, Gummiglobus, Gummivena, Gymnogaster, Gymnomyces, Gymnopaxillus, Gyrodon,</i>

ตาราง 3 (ต่อ)

ไฟลัม (Phylum)	สกุล (Genus)
Basidiomycota	<i>Gyroporus, Hallingea, Hebeloma, Heimioporus, Hoehnelogaster, Horakiella, Hydngium, Hydnellum, Hydnum, Hygrophorus, Hymenogaster, Hysterangium, Inocybe, Laccaria, Lactarius, Leccinellum, Leccinum, Lenzitopsis, Leucogaster, Leucopaxillus, Leucophleps, Lindtneria, Lyophyllum, Maccagnia, Mackintoshia, Macowanites, Malajczukia, Mayamontana, Melanogaster, Membranomyces, Mesophellia, Multifurca, Mycoamaranthus, Mycolevis, Naucoria, Nothocastoreum, Octaviana, Paragyrodon, Paxillus, Paxillogaster, Phellodon, Phylloporus, Piloderma, Pisolithus, Podohydngium, Polyozellus, Polyporoletus, Pseudohysterangium, Pseudotomentella, Psiloboletinus, Pulveroboletus, Ramaria, Retiboletus, Rhizopogon, Rhodactina, Rhopalogaster, Riessia, Riessiella, Royoungia, Rozites, Rubinoboletus, Russula, Sarcodon, Scleroderma, Scutiger, Sebacina, Setchelliogaster, Setogyroporus, Sinoboletus, Sistotrema, Stephanopus, Stephanospora, Strobilomyces, Suillus, Thelephora, Timgrovea, Tomentella, Tomentellopsis, Torrendia, Tremellodendron, Tremelloscypha, Tricholoma, Truncocolumella, Tubosaeta, Tulasnella, Turbinellus, Tylopilus, Tylospora, Veloporphyrellus, Xanthoconium, Zelleromyces</i>
Zygomycota	<i>Endogone, Peridiospora, Sclerogone, Youngiomyces</i>

ที่มา: Rinaldi, Andrea C.; Comandini, Ornella; & Kuyper, Thomas W. (2008). Ectomycorrhizal Fungal Diversity: Separating the Wheat from Chaff. *Fungal Diversity*. 33: 1-45.

4. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของราเอคโตไมคอร์ไรซา

ในการจำแนกชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซานอกจากลักษณะทางสัณฐานแล้วต้องศึกษา ลักษณะทางพันธุกรรมร่วมด้วย เนื่องจากบางชนิดมีลักษณะทางสัณฐานที่คล้ายคลึงกันมากดังนั้น การจำแนกชนิดจึงทำได้ยากประกอบกับในประเทศไทยมีความหลากหลายของเห็ดราสูงเนื่องจาก อยู่ในแถบร้อนชื้น นอกจากนี้ราเอคโตไมคอร์ไรซามีทั้งระยะที่เจริญอยู่ที่ดินและระยะที่สร้างดอก เห็ดอยู่เหนือพื้นดิน ซึ่งในระยะที่สร้างดอกเห็ดสามารถพบได้ในบางช่วงฤดูเท่านั้น ทำให้การจำแนก ชนิดของเห็ดเป็นไปได้ยากอีกทั้งราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดอาจไม่มีการสร้างดอกเห็ดเลยก็ได้ การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มี ประสิทธิภาพสามารถใช้ในการศึกษาเพื่อการจัดจำแนกชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้งชนิดที่สร้าง ดอกเห็ดและราเอคโตไมคอร์ไรซาได้ ซึ่งบริเวณที่นิยมใช้ในการศึกษา เช่น บริเวณ ribosomal DNA (rDNA) และ internal transcribed spacer (ITS) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาดีเอ็นเอของ ยีน RNA Polymerase I และ II และ Elongation factor I อีกด้วย ในปี 1993 การ์เดส และ บรันส์ (Gardes; & Bruns. 1993: 113-118) ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับบริเวณ ITS ของเห็ด ราในกลุ่ม Basidiomycetes คือ ไพรเมอร์ ITS1F/ITS4B โดยทำการทดสอบกับเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes 13 ชนิด Basidiomycetes 14 ชนิด และ พืช 15 ชนิด พบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4B หรือ ITS1F/ITS4B สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ Basidiomycetes ได้ทุกชนิด และสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ Ascomycetes และพืชบางชนิดได้เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อผสมดีเอ็นเอ ของรา Basidiomycetes กับดีเอ็นเอพืช พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของรา ได้ต่างจากดีเอ็นเอของพืชอย่างชัดเจน

ทีเดอซุ; และคนอื่นๆ (Tedersoo; et al. 2008: 479-490) ได้ศึกษาสังคมของรา เอคโตไมคอร์ไรซาที่เจริญอยู่ที่ดินในประเทศทัสมาเนีย โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ กับราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายคู่ จากบริเวณ LSU-rDNA และ ITS เช่น ITS1F/LB-W, ITS1F/LA-W, LrOR/LB-Y และ LrOR/LB-Z เป็นต้น ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพใน การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและจำแนกชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซาได้ทั้งหมด 123 ชนิด โดยพบ *Cortinarius*, *Tomentella*–*Thelephora*, *Russula*–*Lactarius*, *Clavulina*, *Descolea* และ *Laccaria* เป็นจำนวนมาก

โพร์ศรี; และคนอื่นๆ (Phosri; et al. 2012: 2287-2298) ศึกษาความหลากหลายและสังคม ราเอคโตไมคอร์ไรซาของป่าเต็งรังในประเทศไทย โดยศึกษารากเอคโตไมคอร์ไรซาทั้งลักษณะทาง สัณฐานและลักษณะทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITSOF-T/LB-W, ITSOF-T/LA-W หรือ ITSOF-T/ITS4 พบว่าจาก 283 ตัวอย่างสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ 194 ตัวอย่าง (68.5%) และจำแนกชนิดได้ 69 ชนิด ส่วนมากพบอยู่ในสกุล *Russula-lactarius*, *Tomentella-thelephora*, *Sordariales*, *Sebacina* และ *Cantharellus* ตามลำดับ

บาห์ราม; และคนอื่นๆ (Bahram; et al. 2013: 11-19) ศึกษาความสัมพันธ์ของราเอกโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้สนกับพืชอาศัยประจำถิ่น โดยนำปลายรากเอกโตไมคอร์ไรซามาศึกษา ลักษณะทางพันธุกรรมบริเวณ ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITSOF-T/LB-W, ITSOF-T/ITS4 หรือ ITSOF-T/ITS2 ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สมบูรณ์ นำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเออีกครั้งด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสกุลของราแต่ละชนิด ได้แก่ ITS4-Tom, ITS4-Seb, ITS4-Russ, ITS4-Cg, ITS4-Clavu หรือ LR3-Pez ซึ่งมีความจำเพาะกับ *Tomentella–Thelephora*, *Sebacina*, *Russula–Lactarius*, *Cenococcum*, *Clavulina* และ *Pezizales* ตามลำดับ พบว่าสามารถจำแนกชนิดของราเอกโตไมคอร์ไรซาที่มีความสัมพันธ์กับสนและพืชประจำถิ่นได้ทั้งหมด 55 ชนิด (84.6%) และมีเพียง 4 ชนิด (5.9%) ที่พบเฉพาะในรากของสนเท่านั้น

5. ความหลากหลายของราเอกโตไมคอร์ไรซาในประเทศไทย

ประเทศไทยมีเห็ดราจำนวนมากและมีความหลากหลายสูง โดยเฉพาะทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ การสำรวจความหลากหลายของเห็ดราในประเทศไทยมีผู้ศึกษากันอย่างกว้างขวางแต่ผู้เชี่ยวชาญทางด้านนี้ยังมีอยู่น้อยจึงต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญและข้อมูลจากต่างประเทศ การสำรวจราเอกโตไมคอร์ไรซาที่เคยมีรายงานมีหลายงานวิจัยด้วยกัน เช่น

ในปี พ.ศ. 2525 อนิวรรณ เจลิมพงษ์; และธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ (2525: 1-29) สำรวจเห็ดราเอกโตไมคอร์ไรซาในระบบนิเวศป่าดิบแล้งของสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช ต.วังน้ำเขียว อ.ปักธงชัย จ.นครราชสีมา พบเห็ดราเอกโตไมคอร์ไรซาทั้งหมด 6 วงศ์ 18 ชนิด ชนิดที่มีความสำคัญได้แก่ วงศ์ Russulaceae: *Russula aeruginea* (เห็ดโคลหลังเขียว) *R. alboareolata* (เห็ดน้ำแป้ง) วงศ์ Amanitaceae: *Amanita caesarea* (เห็ดระโงกเหลือง) วงศ์ Boletaceae: *Boletellus obcurecoccineus* (เห็ดน้ำผึ้ง) วงศ์ Cortinariaceae: *Cortinarius albobviolaceus* (เห็ดขี้เถ้า) และวงศ์ Diplocystaceae: *Astraeus asiaticus* (เห็ดเผาะฝ้าย)

ในปี 2004 แสนหมี่ (Sanmee. 2004: 1-282) ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของพืชอาศัยและการเจริญของเห็ดราเอกโตไมคอร์ไรซาชนิดที่รับประทานได้ในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย พบเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes จำนวน 300 ชนิด (48 วงศ์) และเชื้อราในกลุ่ม Basidiomycetes จำนวน 285 ชนิด ซึ่งพบว่าเป็นราเอกโตไมคอร์ไรซา 70% วงศ์ที่พบมากที่สุดคือ Russulaceae (64 ชนิด) รองลงมาคือ Boletaceae (53 ชนิด) และ Amanitaceae (21 ชนิด) ตามลำดับ

เดล; และคนอื่นๆ (Dell; et al. 2005: 1-11) ศึกษาความหลากหลายของราเอกโตไมคอร์ไรซาในป่าเต็งรังของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่ามีราเอกโตไมคอร์ไรซา 57 ชนิด ซึ่งชนิดที่พบมาก ได้แก่ *Amanita*, *Astraeus*, *Heimiella*, *Pterygellus*, *Mycoamaranthus* และ *Russula* เป็นต้น

โพธิ์ศรี; และคนอื่นๆ (Phosri; et al. 2004: 453-463; 2007: 275-286) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานและลักษณะทางพันธุกรรมของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาสกุล *Astraeus* ที่พบในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เปรียบเทียบกับตัวอย่าง *Astraeus* จากทั่วโลกจำนวน 41 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์จากแผนภูมิวิวัฒนาการ พบว่า *Astraeus* ที่พบในประเทศไทยที่แตกต่างจากประเทศอื่นๆ มี 2 ชนิด โดยให้ชื่อใหม่ว่า *A. odoratus* และ *A. asiaticus* ตามลำดับ

กิตติมา ด้วงแค; และคนอื่นๆ (2550: 1-16) ศึกษาความหลากหลายของชนิดเห็ดราไมคอร์ไรซาบริเวณพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่ ระหว่างปี พ.ศ. 2547-2550 ซึ่งพบทั้งหมด 51 ชนิด 24 สกุล 15 วงศ์ และพบว่าเห็ดไมคอร์ไรซาที่สามารถรับประทานได้ เช่น เห็ดตะไคลขาวหรือเห็ดหล่ม (*Russula delica*) เห็ดน้ำแป้ง (*R. alboareolata*) เห็ดหล่มกระเขี้ยวหรือเห็ดหอมเป่า (*R. virescens*) เห็ดหน้าม่วงหรือเห็ดหน้ามอย (*R. cyanoxantha*) เห็ดฟานน้ำตาลแดง (*Lactarius volemus*) และเห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus*) เป็นต้น

แสนหมี; และคนอื่นๆ (Sanmee; et al. 2008: 97-123) ศึกษาเห็ดสกุล *Amanita* ในภาคเหนือของประเทศไทย พบว่าจาก 25 ชนิด ที่พบในประเทศไทยเป็น *Amanita* ชนิดใหม่ถึง 18 ชนิด ได้แก่ *A. alboflavescens*, *A. avellaneosquamosa*, *A. chepangiana*, *A. clarisquamosa*, *A. flavipes*, *A. fritillaria*, *A. fuliginea*, *A. hongoi*, *A. japonica*, *A. manginiana*, *A. obsita*, *A. ovalispora*, *A. pseudoporphyria*, *A. rubrovolvata*, *A. sinensis*, *A. sinocitrina*, *A. subglobosa* และ *A. virgineoides*

สีหะนันท์ และ เพชรรัตน์ (Seehanan; & Petcharat. 2008: 109-118) สืบค้นและเก็บตัวอย่างเห็ด *Boletes* ในภาคใต้ ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในช่วงปี 2000-2005 โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐาน พบว่าสามารถจำแนกชนิดได้ 9 ชนิด คือ *Boletellus ananas*, *Boletellus emodensis*, *Boletus griseipurpureus*, *Boletus nanus*, *Heimiella retispora*, *Phlebopus colossus*, *Pulveroboletus ravenelii*, *Strobilomyces confusus* และ *Strobilomyces floccopus* โดยพบ *Phlebopus colossus* มากในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วน *Boletus griseipurpureus* พบมากในภาคใต้

โพธิ์ศรี; และคนอื่นๆ (Phosri; et al. 2012: 195-208) ศึกษาความหลากหลายของราเอคโตไมคอร์ไรซาในป่าสนเขา ทางภาคเหนือของประเทศไทย และพบเห็ดชนิดใหม่ในสกุล *Pisolithus* คือ *Pisolithus orientalis*

อังอัจฉริยะ; และคนอื่นๆ (Aungaudchariya; et al. 2012: 1991-1998) ศึกษาเห็ดชนิด *Boletus griseipurpureus* (เห็ดเสม็ด) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับพืช *Melaleuca leucadendron* และ *Acacia mangium* ใน 3 จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย คือ จ.ตรัง จ.นครศรีธรรมราช และ จ.สงขลา โดยศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมบริเวณ ITS พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเห็ดทั้งหมดมีความคล้ายคลึงกันสูงและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยแผนภูมิวิวัฒนาการแบบต้นไม้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการพบว่า มีโปรตีนสูง และไขมันต่ำ อีกด้วย

6. เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่สามารถรับประทานได้ในประเทศไทย

เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดพบว่าสามารถนำมารับประทานได้ และได้รับความนิยมทั่วโลก เนื่องจากมีรสชาติอร่อย หายาก และมีคุณค่าทางโภชนาการ บางชนิดมีราคาสูง เช่น เห็ดทรัฟเฟิล (truffles), เห็ดขมื่น (cantharellus), เห็ดมัตสึทาเกะ (matsutake), เห็ดพอร์ซินี (porcini) เป็นต้น เห็ดเหล่านี้มีวงชีวิตที่ซับซ้อนยากต่อการเพาะเลี้ยงในเรือนเพาะเห็ด เนื่องจากมีความสัมพันธ์ช่วงหนึ่งในวงชีวิตร่วมกับรากพืช แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีความพยายามอย่างมากที่จะเพาะเลี้ยงเห็ดดังกล่าว (Deborah. 2012: online) ในประเทศไทยได้มีการศึกษาเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิด ทั้งทางด้านโภชนาการหรือคุณค่าทางอาหาร และการผลิตหัวเชื้อ ตัวอย่างเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบในประเทศไทย เช่น เห็ดระโงกขาว (*Amanita princeps*) เห็ดระโงกเหลือง (*Amanita hemibapha*) เห็ดตับเต่าดำ (*Phaeogyroporus portentosus*) เห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus*) เห็ดเผาะฝ้าย (*Astraeus asiaticus*) เห็ดมันปูเล็ก (*Cantharellus minor*) เห็ดมันปูใหญ่ (*Cantharellus cibarius*) เห็ดแดงน้ำหมาก (*Russula emetic*) เห็ดหน้าม่วง (*Russula cyanoxantha*) เห็ดน้ำผึ้ง (*Boletus colossus*) เป็นต้น (ภาพประกอบ 21) ซึ่งบางชนิดพบว่ามีราคาสูง

เห็ดระโงกขาว (*Amanita princeps*) ลักษณะของเห็ดอ่อนจะมีเปลือกหุ้มรูปไข่สีขาว เมื่อเจริญจะดันเนื้อเยื่อด้านบนให้ปริแตกออกเห็นหมวกสีขาวครีม เปลือกหุ้มหมวกเห็ดรูปถ้วยติดกับโคนก้าน เมื่อบานหมวกเห็ดจะมีรูปร่างคล้ายกระจก้นจนถึงแบนเว้ากลาง มีผิวเรียบ ขอบดอกมีรั้วชัดเจน ครีบดอกมีการเรียงตัวค่อนข้างถี่ สีขาวครีม ไม่ติดกับก้าน เยื่อหุ้มครีบมีสีขาว สปอร์มีลักษณะใส เป็นรูปหยดน้ำ ผิวของหมวกเห็ดเมื่อถูกความชื้นในอากาศจะมีลักษณะเหนียวหนืด พบการเจริญในป่าดิบแล้งและป่าเต็งรัง (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.). 2550: 1-154)

เห็ดระโงกเหลือง (*Amanita hemibapha*) ลักษณะของหมวกเห็ดตรงกลางมีสีน้ำตาล แล้วสีจะอ่อนลงมาเรื่อยๆ เมื่อถึงขอบหมวก ผิวหมวกมีลักษณะมัน ขอบหมวกเป็นรั้ว ไม่มีขน ครีบสีขาวนวลและค่อนข้างห่าง มีเปลือกหุ้มโคน ปลายเปลือกหุ้มจะบานออกไม่ลึบติดไปกับก้าน ลักษณะของก้านกลวง มีผิวมัน ย่น ลื่นมือ ที่สำคัญคือ ก้านเปราะเมื่อบีบจะแตกง่าย พบการเจริญในป่าเต็งรัง (พรรณพร กุลมา; มณฑุศิลป์ ศิริมาตย์; & สายสมร ล้ายอง. 2554: 273-280)

เห็ดตับเต่าดำ (*Phlebopus portentosus*) ลักษณะของเห็ดจะมีเนื้อมีหน้าง รูปปร่างคล้ายร่ม ส่วนที่อยู่ใต้หมวกมีลักษณะเป็นรู อ่อนนุ่ม โคนก้านมักโป่งออกและผิวก้านมักมีลักษณะคล้ายร่างแห หรือขรุขระ ไม่เรียบ รอยพิมพ์สปอร์มีสีน้ำตาลถึงสีเหลือง (วว. 2550: 1-154) หมวกเห็ดมีสีดำ มีขนละเอียดคล้ายเขม่าสีเทาดำ ขอบบางและอ่อนนุ่มคล้ายฟองน้ำ ก้านมีความยาวตั้งแต่ 8-15 เซนติเมตร โคนใหญ่เป็นรูปใบพายสีดำ หรือดำอมน้ำตาล (สุรเชษฐ์ พัฒนพานิชสวัสดิ์. 2551)

เห็ดมันปูใหญ่ (*Cantharellus cibarius*) ดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายรูปกระจุกหนูขนาดเล็ก เมื่อเจริญหมักเห็ดจะแผ่แบนขอบยกสูงขึ้นตุลคล้ายกรวยตื้น ผิวหมวกค่อนข้างเรียบสีเหลืองส้ม ครีบดอกเป็นสันนูนขึ้นมามีสีอ่อนกว่าสีหมวก สปอร์ของเห็ดมันปูใหญ่มีลักษณะใส รูปร่างรีปลายมนทั้งสองด้าน ภายในมีหยดน้ำมันสองหยด พบในป่าดิบแล้งและป่าเต็งรัง (วว. 2550: 1-154)

เห็ดมันปูเล็ก (*Cantharellus minor*) ลักษณะของดอกเห็ดอ่อนมีลักษณะคล้ายรูปกระจุกหนูเว้ากลาง เมื่อบานมีลักษณะเป็นรูปกรวยหรือรูปปากแตร หมวกมีผิวเรียบมีลักษณะหยักเป็นคลื่นสีเหลือง ด้านล่างมีสันนูนสูงคล้ายครีบ ก้านเป็นทรงกระบอกมักโค้งงอ สปอร์ใส รูปร่างกลมถึงรีปลายมนทั้งสองด้าน ผิวเรียบ ลักษณะของหมวกเห็ดเมื่อบานมักฉีกขาดง่าย พบได้ในป่าดิบแล้ง และป่าเต็งรัง (วว. 2550: 1-154)

เห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus*) และเห็ดเผาะฝ้าย (*Astraeus asiaticus*) เป็นเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่นิยมรับประทานในประเทศไทยและมีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 300-400 บาท (Sanmee; et al. 2003: 527-532)

เห็ดเผาะหนัง มีรูปร่างกลมหรือแบน สีน้ำตาลอ่อน มีขนาดไม่เกิน 6.5 เซนติเมตร ผิวของเห็ดเรียบและแข็ง มีเส้นใยหรือ rhizomorph สีน้ำตาลแดง ดอกเห็ดมีกลิ่นแรงคล้ายกลิ่นของดินชั้นผิวดินของเห็ด (exoperidium) มีสีน้ำตาลอมเหลือง ประกอบด้วยหลายชั้นมีความหนาน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร เมื่อดอกแก่ผิวดินชั้นนอกจะแตกออกเป็นรูปร่างคล้ายดาว 3-9 แฉก ผิวดินชั้นใน (endoperidium) ไม่มีก้าน ลักษณะค่อนข้างกลม มีขนาดกว้าง 1.3-2.5 เซนติเมตร สีน้ำตาลเหลืองถึงน้ำตาลอ่อนหรือสีดำปนม่วง ส่วนกลีบา (gleba) มีสีน้ำตาลปนม่วงและน้ำตาลดำ สปอร์ของเห็ดเผาะหนังมีรูปร่างกลม มีหนามยาว 1.04-1.66 ไมโครเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5-15.2 ไมโครเมตร สีม่วงบางครั้งสีน้ำตาลหรือน้ำตาลดำ มีความหนาแน่นของสปอร์พอบานกลาง (Phosri; et al. 2004: 453-463)

เห็ดเผาะฝ้าย มีรูปร่างกลมหรือแบน สีน้ำตาล มีขนาด 1.87-2.97 เซนติเมตร ผิวของเห็ดถูกปกคลุมไปด้วย mycelium สีขาว กลิ่นของเห็ดเผาะฝ้ายไม่แรงเท่าเห็ดเผาะหนัง ผิวดินชั้นนอก (exoperidium) มีสีขาว หนา และมีหลายชั้น โดยมีขนาดไม่เกิน 1 มิลลิเมตร เมื่อดอกแก่จะแตกออกเป็นแฉกคล้ายดาว 5-12 แฉก ผิวดินชั้นใน (endoperidium) ไม่มีก้าน มีลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.3-2.4 เซนติเมตร สีขาวถึงเทาควันบุรี กลีบา (gleba) ในขณะยังเป็นดอกอ่อนมีสีขาว พอแก่แล้วเปลี่ยนเป็นสีม่วง สปอร์มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.75-15.2 ไมโครเมตร สีม่วง มีหนามอยู่โดยรอบ หนามยาว 0.90-1.45 ไมโครเมตร และมีความหนาแน่นมากสามารถพบได้ในป่าเต็งรัง และพบว่ามีความสัมพันธ์กับไม้ตระกูลยาง เช่น ยางนา เต็งรัง และพะยอม (Phosri; et al. 2004: 453-463)



ภาพประกอบ 21 เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่รับประทานได้ในประเทศไทย (a) เห็ดระโงกขาว (*Amanita princeps*) (b) เห็ดระโงกเหลือง (*Amanita hemibapha*) (c) เห็ดเผาะฝ้าย (*Astraeus asiaticus*) และ (d) เห็ดตับเต่า (*Phaeogyroporus portentosus*)

ที่มา: มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร. (2552). พืชภูพาน. (ออนไลน์).

7. การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในพืชอาศัย

7.1 การทดสอบในสภาวะที่ปราศจากเชื้อ

ก) การทดสอบในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flasks)

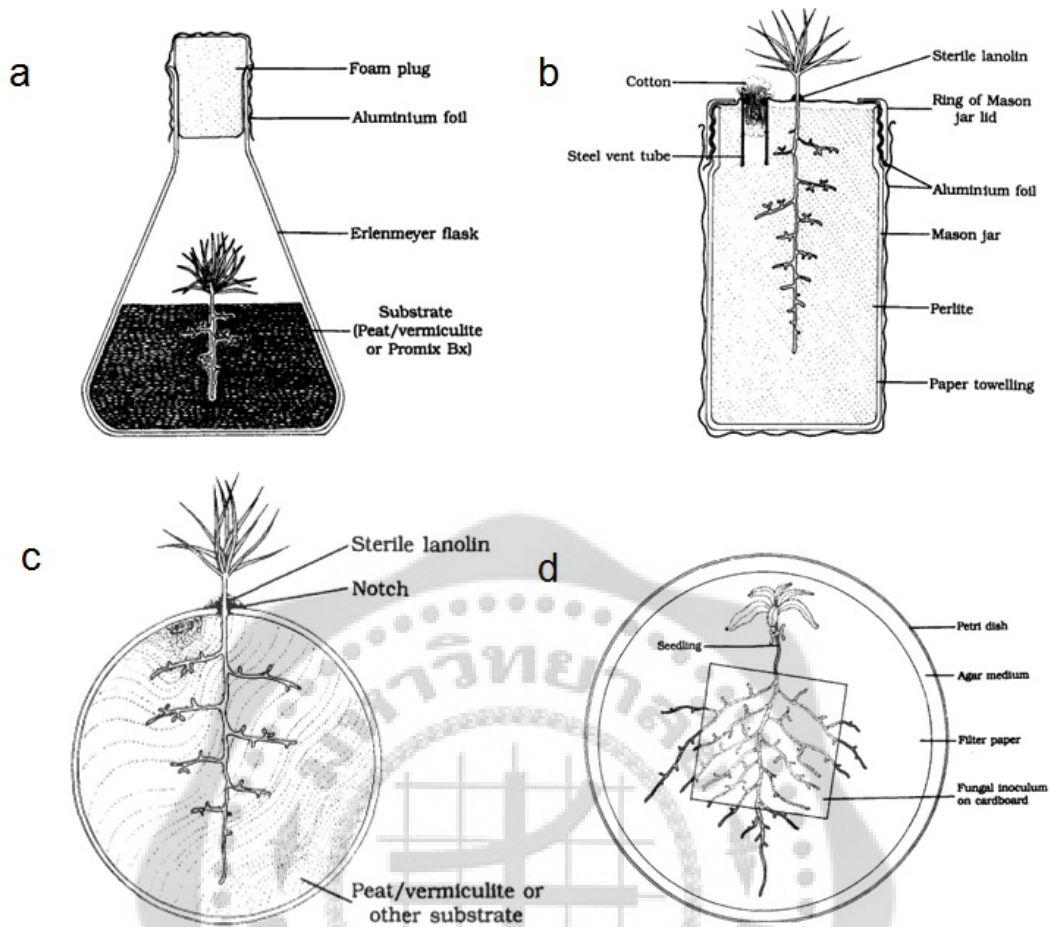
ผู้คิดค้นวิธีการนี้คือ เมลิน ในปี 1922 (Melin. 1922: 161-196) โดยใช้ขวดรูปชมพู่ใส่ทรายเพื่อเป็นวัสดุปลูก ต่อมา ในปี 1953 แฮ็คสกีโล (HacsKaylo. 1953: 971-975) ได้เปลี่ยนวัสดุปลูกเป็นเวอร์มิคูไลต์ (vermiculite) แทน หลังจากนั้น มาร์กซ์ และ แซค (Marx; & Zak. 1965: 66-75) ได้เปลี่ยนวัสดุปลูกเป็นพีทมอส (peat moss) ผสมกับเวอร์มิคูไลต์ ซึ่งการทดสอบในขวดรูปชมพู่ทำได้โดยนำขวดใส่วัสดุปลูกและสารอาหาร จากนั้นปิดปากขวดด้วยโฟมหรือสำลีและครอบด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่อเย็นแล้วนำเมล็ดพืชที่ปราศจากเชื้อปลูกลงในขวดรูปชมพู่ภายใต้สภาวะปราศจากเชื้อ การใส่เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถใส่ก่อนของเส้นใยที่กำลังเจริญหรือใส่เส้นใยราที่ผสมกับน้ำลงไป แสดงในภาพประกอบ 22a (Peterson; & Chakravarty. 1991: 75-105)

ข) การทดสอบในขวดแก้ว (Mason jars)

ในปี ค.ศ. 1967 แทรปป์ (Trappe. 1967: 121-130) คิดค้นวิธีการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในสภาวะที่ปราศจากเชื้อ โดยใช้ขวดแก้วปากกว้าง ภายในบรรจุวัสดุปลูกเพอร์ไลต์ (Perlite) และสารอาหารลงไป นำท่อเหล็กขนาดเล็กใส่ลงไปในเพอร์ไลต์โดยมีปลายด้านหนึ่งยื่นออกมาเหนือปากขวดเพื่อทำเป็นช่องอากาศ นำเพอร์ไลต์ที่อยู่ในท่อออก และปิดปากขวดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นเจาะช่องให้ท่อเหล็กผ่านอะลูมิเนียมฟอยล์แล้วปิดช่องด้วยสำลี นำขวดแก้วที่เตรียมไปหนึ่งขวด เชื้อ จากนั้นทิ้งให้เย็น ทำการเจาะช่องอะลูมิเนียมฟอยล์เพื่อใส่กล้าไม้ที่งอกจากเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวลงไปปลูกโดยให้ส่วนยอดโผล่ออกมาภายนอกขวดแล้วปิดช่องด้วยลวดไนลันที่ปราศจากเชื้อ และหุ้มขวดแก้วทั้งหมดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ แสดงในภาพประกอบ 22b (Peterson; & Chakravarty. 1991: 75-105)

ค) การทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อ

ผู้ริเริ่มการทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อคือ ดัดดริดจ์ (Duddridge. 1986: 457-464) เป็นวิธีที่ง่ายและมีประสิทธิภาพ โดยบรรจุวัสดุปลูกพีทมอสและเวอร์มิคูไลต์ในจานเลี้ยงเชื้อใส่สารอาหารลงไป จากนั้นใส่เมล็ดพืชที่ปราศจากเชื้อผ่านช่องที่ตัดบริเวณขอบจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ยอดกล้าไม้เจริญออกภายนอกใส่เชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซาแล้วปิดช่องว่างด้วยลวดไนลันที่ปราศจากเชื้อและพันรอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม จากนั้นหุ้มจานเลี้ยงเชื้อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ แสดงในภาพประกอบ 22c อีกวิธีหนึ่งคือนำเมล็ดพืชที่ปราศจากเชื้อที่มีการงอกของรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร วางบนกระดาษกรองที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง แล้วนำเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซาที่เพาะเชื้อบนเซลโลเฟนหรือกระดาษกรองปิดทับลงบนรากโดยคว่ำหน้าด้านที่มีเส้นใยลง ปิดรอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม แสดงในภาพประกอบ 22d (Peterson; & Chakravarty. 1991: 75-105)

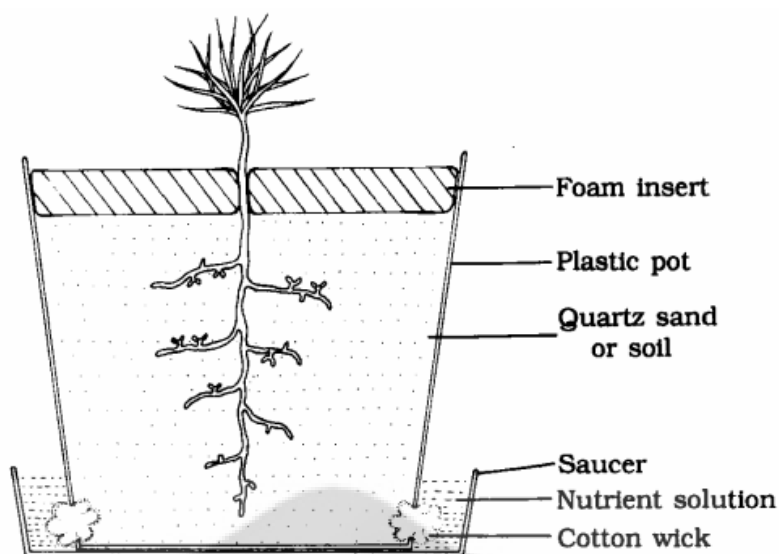


ภาพประกอบ 22 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในสภาวะปราศจากเชื้อ (a) การทดสอบในขวดรูปชมพู่ (b) การทดสอบในขวดแก้ว (mason jar) และ (c และ d) การทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อ

ที่มา: Peterson, Larry R.; & Chakravarty, P. (1991). *Techniques in Synthesizing Ectomycorrhiza. Methods in Microbiology*. 23: 77, 79, 87, 90.

7.2 การทดสอบในภาชนะปลูก

การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในภาชนะปลูกมีหลายภาชนะ เช่น ในกล่องไม้ กล่องกระจก และกระถาง เป็นต้น ซึ่งการทดสอบในกระถางพลาสติกมีการใช้วัสดุปลูกที่หลากหลาย โดยนำกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร ใส่ทรายหรือดิน จากนั้นใส่เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา และวางกระถางลงบนจานซึ่งมีสารอาหารบรรจุอยู่ ซึ่งส่วนของกระถางจะเจาะรูที่ฐานออกด้วยส้อมเพื่อดูดซับสารอาหารบนจานรองกระถาง หลังจากนั้นนำเมล็ดที่ปราศจากเชื้อใส่ไปยังวัสดุปลูก นำโฟมวางทับลงบนหน้าวัสดุปลูกเพื่อลดการสูญเสียความชื้น (Peterson; & Chakravarty. 1991: 75-105)



ภาพประกอบ 23 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในกระถางปลูก

ที่มา: Peterson, Larry R.; & Chakravarty, P. (1991). *Techniques in Synthesizing Ectomycorrhiza. Methods in Microbiology.* 23: 99.

8. การผลิตหัวเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่รับประทานได้

เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นเห็ดที่ได้รับความนิยม มีราคาสูง หาได้ยาก และไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในเรือนเพาะเห็ด ทำให้มีงานวิจัยหลายงานให้ความสนใจในการผลิตหัวเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาเพื่อเพิ่มทรัพยากรเห็ด และเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจ นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชอาศัยอีกด้วย

ยะมะตะ; โอะกุระ และ โอมะสะ (Yamada; Ogura; & Ohmasa. 2001: 59-66) ได้ผลิตหัวเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่รับประทานได้กับกล้าไม้ โดยนำเห็ด *Lyophyllum*, *Tricholoma*, *Leucopaxillus*, *Suillus*, *Rhizopogon*, *Lactarius* และ *Morchella* ทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับต้นสน *Pinus densiflora* พบว่าหลังจากใส่เชื้อไปเป็นเวลา 2-4 เดือน *Lyophyllum*, *Tricholoma*, *Suillus*, *Rhizopogon* และ *Lactarius* มีการสร้างความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซาขึ้น จากนั้นนำต้นสนที่มีไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ไปปลูกในกระถางโดยใช้ดินเป็นวัสดุปลูกไว้ที่อุณหภูมิ 23°C รดน้ำกลั่น 2 ครั้งต่อสัปดาห์ พบว่าเชื้อทดสอบ 10 ชนิดจากทั้งหมด 17 ชนิดมีการสร้างไพรโมเดีย (primordia) ขึ้น และพบว่า *Tricholoma flavovirens*, *Rhizopogon rubescens* และ *Lactarius akahatsu* มีการพัฒนาเป็นดอกเห็ดในพืชอาศัย

แสนหมี่ (Sanmee. 2004: 1-282) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา *Phaeogyroporus portentosus* และ *Astraeus odoratus* พบว่า *P. portentosus* สามารถเจริญได้ดีในอาหาร Gamborg, MMN และ MS ที่อุณหภูมิ 30°C ส่วน *A. odoratus* สามารถเจริญได้ดีในอาหาร Fries ที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ส่วนค่าความเป็นกรดต่างพบว่าทั้งสองชนิดสามารถเจริญได้ดีที่ pH 4 แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ pH 2 และ มากกว่า 7 และพบว่าความเค็มมีผลกับการเจริญของเชื้อ *P. portentosus* แต่ไม่มีผลกับเชื้อ *A. odoratus* ส่วนการเจริญในวัสดุปลูกอื่นๆ พบว่า *P. portentosus* สามารถเจริญได้ในอาหารธัญพืชทุกชนิดและชนิดที่เหมาะสมที่สุดคือเมล็ดข้าวฟ่าง ส่วน *A. odoratus* พบว่าสามารถเจริญได้ในพีทมอสและเวอร์มิคูไลท์เท่านั้น ส่วนการทดลองการสร้างดอกเห็ดของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัย 6 ชนิด ได้แก่ *Castanopsis tribuloides*, *Dipterocarpus alatus*, *Dimocarpus longan*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Pinus kesiya* และ *Syzygium cumini* โดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองในห้องปฏิบัติการโดยทดสอบกับ *E. camaldulensis* และการทดลองในโรงเรือนกับพืชที่เหลืออีก 5 ชนิด หลังจากใส่เชื้อนาน 8 เดือน พบว่าในการทดลองภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการพบรากที่มีลักษณะบวมสั้นสีน้ำตาลซึ่งแตกต่างจากรากของ *E. camaldulensis* ทั่วไป แต่เมื่อทำการตัด section แล้วไม่พบฮาติกันเทท หรือ แมนเทิล ส่วนในโรงเรือน พบราไมคอร์ไรซาลักษณะที่แตกต่างกันหลายชนิดแต่ไม่สามารถระบุชนิดได้ เมื่อใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับเชื้อทดสอบ (HAR2A) พบว่าดีเอ็นเอของรากไมคอร์ไรซาจากพืช *P. kesiya* เท่านั้นที่พบการติดเชื้อทดสอบ นอกจากนี้ยังพบชั้นแมนเทิลและฮาติกันเททอีกด้วย

แมสสิคอต; เมลวิลล์ และ ปีเตอร์สัน (Massicotte; Melville; & Peterson. 2005: 141-149) ศึกษาราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิด *Laccaria bicolor* กับต้นสน 2 สายพันธุ์ (*Pinus resinosa* และ *Pinus sylvestris*) พบว่ามีความสัมพันธ์กับเอคโตไมคอร์ไรซาโดยมีการสร้างเส้นใยพันรอบราก หลังจากใส่เชื้อ 7-12 วัน และหลังจากนั้นประมาณ 20 วัน มีการสร้างกิ่งด้านข้างแตกออกเป็น 2 กิ่ง แบบ dichotomous ซึ่งปกคลุมไปด้วยชั้นแมนเทิล ต่อมามีการรวมตัวของเส้นใยพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด หลังจากใส่เชื้อประมาณ 50 วัน

ทองกลาง; และคนอื่นๆ (Thongklang; et al. 2010: 413-425) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซา *Phlebobus portentosus* (เห็ดหัว) เพื่อการผลิตหัวเชื้อและการเจริญเติบโตของพืชอาศัย พบว่าที่อุณหภูมิ 30°C pH 4 อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอน (malt extract) และแหล่งไนโตรเจน (yeast extract) เท่ากับ 10:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยมากที่สุด จากนั้นศึกษาการผลิตหัวเชื้อในอาหารธัญพืชจำนวน 16 ชนิด พบว่าเห็ดหัวสามารถเจริญได้ดีที่สุดในข้าวบาร์เลย์ที่เติมอาหารเหลว Murashige & Skoog (MS) โดยเส้นใยจะเจริญเต็มขวดภายในเวลา 30 วัน นอกจากนี้เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C ในที่มีดเป็นเวลา 60 วัน พบว่าเกิดการรวมตัวของเส้นใยเห็ดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะเป็นตุ่มคล้ายการสร้างดอกเห็ด จากนั้นได้นำหัวเชื้อไปปลูกเชื้อให้พืชอาศัยทั้งหมด 4 ชนิด คือ มะกอกน้ำ มะกล่ำต้น มะไฟจีน และผักหวานบ้าน หลังจากใส่เชื้อเป็นเวลา 4 เดือน พบว่าเส้นใย

ของเห็ดสามารถเข้าไปเจริญอยู่กับรากของมะกล่ำต้น มะไฟจีน และผักหวานบ้าน ส่วนต้นมะกอกน้ำนั้นใช้เวลา 6 เดือนจึงพบว่าเส้นใยมีการเจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ของราก

ชิโมะมูระ; และคนอื่นๆ (Shimomura; et al. 2011: 529-536) ทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาชนิด *Rhizopogon roseolus* กับพืช *Pinus thunbergii* โดยนำเมล็ด *P. thunbergii* ที่ปราศจากเชื้อและมีการงอกของรากวางลงบนกระดาษกรองที่อยู่บนผิวหน้าอาหารแข็ง MMN และนำเส้นใยรา *R. roseolus* ที่ตัดด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางข้างรากกล้าไม้ ปิดรอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยลาโนลินและพาราฟิล์ม บ่มที่อุณหภูมิ 23°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยหลังจากเพาะเชื้อ 2 สัปดาห์ พบว่ามีการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาใน 4 ไอโซเลท และเมื่อครบ 8 สัปดาห์ พบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาเป็นจำนวนมาก ต่อมานำกล้าไม้ที่มีการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาดังกล่าวไปใช้เป็นต้นแม่ปลูกลงในกระถางที่มีเวอร์มิคูไลท์ผสมเปลือกไม้และปุ๋ยหมักในอัตราส่วนที่เท่ากัน แล้วปลูกกล้าไม้ที่ไม่มีเอกโตไมคอร์ไรซาอบต้นแม่ นำสารแขวนลอยเส้นใยราของ *R. roseolus* ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใส่ลงไปบริเวณรากของกล้าไม้ที่ไม่มีเอกโตไมคอร์ไรซา ในสัปดาห์ที่ 12, 16 และ 20 หลังปลูก พบว่ามีการเจริญของดอกเห็ดเกิดขึ้นหลังจากปลูกกล้าไม้มานาน 32 สัปดาห์



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 4 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	ประเทศ
กระดาษกรอง (cellulose acetate filter)	Filtrex	USA
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (microscope)	Olympus	Japan
กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope)	Olympus	Japan
เข็มฉีดยาพลาสติก (syringe)	Terumo	Japan
เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer)	Fisher Scientific	USA
เครื่องเขย่าสาร (incubator shaker)	Sartorius	Germany
เครื่องชั่งสาร	IKA	Malaysia
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	Sorvall	USA
เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (thermo cycler)	Bioer	China
เครื่องตัด section (sliding microtome)	Leica Microsystems	Germany
เครื่องวัด pH (pH meter)	Fisher Scientific	UK
เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis apparatus)	Bioer Technology	China
ชุดถ่ายภาพเจล (UV-transilluminator)	Viber Lourmat	Germany
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	Sanyo	Japan
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส	Jouan	Germany
ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator)	Shel-lab	Germany
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	Nitech	Thailand
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air sterilizing oven)	Fisher Scientific	UK
เตาไมโครเวฟ (microwave)	Imarflex	Thailand
หม้อนิ่งความดันไอน้ำ (autoclave)	Meditop.Co.,Ltd	Thailand
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	Heto	USA

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

ตาราง 5 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Agar	Marine chemicals	India
Acetic acid	Merck KGaA	Germany
Agarose	Amresco	USA
Ammonium(+)Tartrate	lobachemie	India
Ampicillin	GPO	Thailand
Basic fuchsin	Fluka chemie	Switzerland
Calcium chloride (CaCl ₂)	Univar	Australia
Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)	Amresco	USA
D-Glucose anhydrous	Fisher Scientific	UK
Diammonium hydrogen orthophosphate	Ajax	New Zealand
Ethanol	Merck KGaA	Germany
Ethidium bromide solution	Biorad	USA
Favorprep™ Gel/PCR purification mini kit	Favorgen	Taiwan
Isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG)	Bio basic	Canada
Methylene blue	Unilab	Australia
MillerLuria-Bertani broth (LB)	Titan Biotech	India
Phenol/chloroform/Isoamyl alcohol 25:24:1 pH 8	Research organics	USA
Potato dextrose agar	Difco	USA
RBC TA cloning vector kit	RBC Bioscience	Taiwan
RNase A	Amresco	USA
Sodium acetate	Ajax Finechem	Australia
Sodium hypochlorite	Ajax Finechem	Australia
Streptomycin	Genral Drug House	Thailand
Taq DNA polymerase (KAPA 2X)	KAPA Biosystems	USA
Taq DNA polymerase (TopTaq 2X master mix kit)	Qiagen	USA

ตาราง 5 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
<i>Taq</i> DNA polymerase (Phire® plant direct PCR kit)	Finnzymes	USA
Tetracycline	Oxoid	England
Tissue embedding medium	Paraplast Plus	Netherlands
Tris-Borate EDTA buffer power (TBE)	Amresco	USA
Tryptone type I	HiMedia	India
Tween 80	Ajax	New zealand
Water-Dnase & Rnase free	Phyto Technology Laboratories™	USA
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside)	Amresco	USA
Yeast extract powder	HiMedia	India
100 bp DNA ladder Marker	RBC Bioscience	Taiwan
6x loading dye	RBC Bioscience	Taiwan

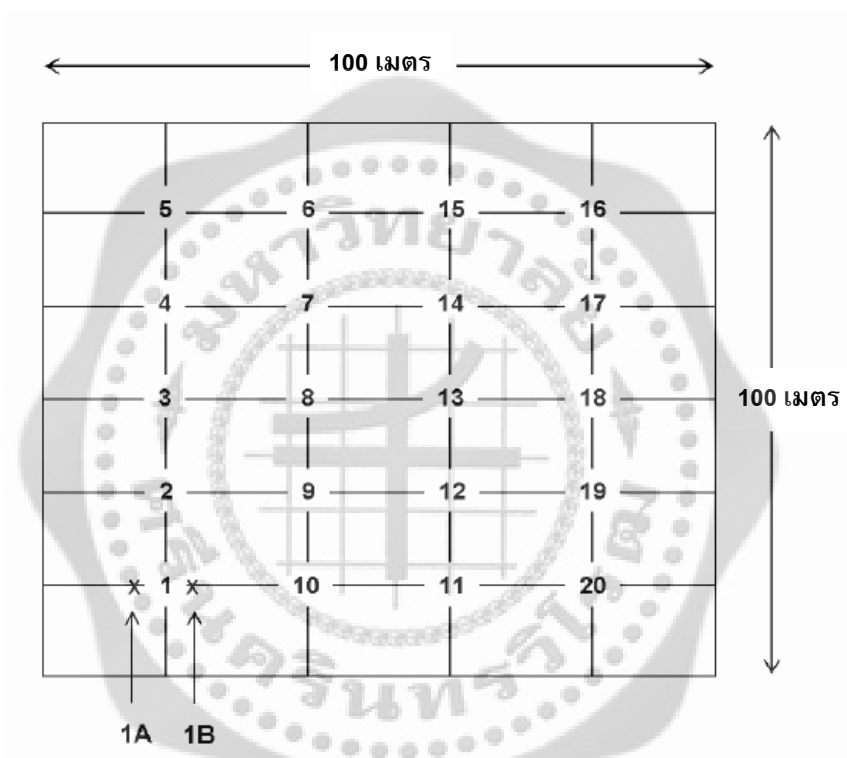
วิธีดำเนินการทดลอง

1. การสำรวจและการเก็บรวบรวมตัวอย่างราเอกโตไมคอร์ไรซา

เก็บรวบรวมตัวอย่างของราเอกโตไมคอร์ไรซา ได้แก่ รากและดอกเห็ด จากพื้นที่ป่าสนผสมเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จ. ชัยภูมิ เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง และพบการเจริญของเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาที่หลากหลาย ซึ่งการเก็บตัวอย่างราเอกโตไมคอร์ไรซานั้นเก็บในช่วงฤดูฝน เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2554 การเก็บตัวอย่างได้ตัดแปลงจากโพธิ์ศรี; และคนอื่นๆ (Phosri; et al. 2010: 1-7) โดยวางแผนเพื่อสำรวจและเก็บตัวอย่างแปลงตัวอย่างมีขนาด กว้าง × ยาว เท่ากับ 100 × 100 ตารางเมตร (ภาพประกอบ 24) และเก็บตัวอย่างทั้งหมด 20 จุด แต่ละจุดเก็บ 2 บริเวณ (A และ B) ที่อยู่ตรงข้ามกัน โดยเก็บห่างจากต้นไม้ยืนต้นเป็นระยะ 1-1.5 เมตร แต่ละบริเวณจะขุดดินลึกประมาณ 5-10 เซนติเมตร ตามแนวของรากต้นไม้ และมีระยะห่างของต้นไม้แต่ละต้นประมาณ 8 เมตร จากนั้นเก็บตัวอย่างดินที่มีรากเอกโตไมคอร์ไรซาประมาณ 200-300 กรัม ใส่ถุงพลาสติก แล้วบันทึกรายละเอียดของตำแหน่งพิกัดที่เก็บ รวมทั้งชนิดพืชอาศัย และวัน เดือน ปี ที่เก็บ เป็นต้น

ส่วนตัวอย่างเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาที่พบในบริเวณแปลงสำรวจ ใช้แปรงเขี่ยเศษดินออกบันทึกภาพ และเก็บรวบรวมใส่ถุงกระดาษหรือกล่องพลาสติก พร้อมทั้งบันทึกรายละเอียด

เช่นเดียวกับตัวอย่างดินและรากเอกโตไมคอร์ไรซา นำตัวอย่างเห็ดที่ได้มาศึกษาและแยกเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมภายใน 24 ชั่วโมง และตัดเนื้อเยื่อด้านในของดอกเห็ดขนาดประมาณ 1×1 ตารางเซนติเมตร ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ส่วนดอกเห็ดนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40°C หลังจากนั้นเก็บในกล่องพลาสติกที่มีซิลิกาเจลอยู่ เพื่อเก็บรักษาเป็นตัวอย่างแห้ง (fungal herbarium) ใช้ในการศึกษาในห้องปฏิบัติการต่อไป ส่วนตัวอย่างดินและรากเอกโตไมคอร์ไรซาจะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อการศึกษาต่อไป



ภาพประกอบ 24 แผนภาพแสดงตำแหน่งในการเก็บตัวอย่างดินและรากเอกโตไมคอร์ไรซา หมายเลข 1-20 แสดงจุดเก็บตัวอย่างเริ่มเก็บจุดที่ 1 ถึงจุดที่ 20 ตัวอักษร 1A และ 1B แสดงการเก็บตัวอย่างจุดละ 2 บริเวณ

2. การคัดแยกและเพาะเลี้ยงเส้นใยราบริสุทธ์

นำตัวอย่างของดอกเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซาที่รวบรวมได้มาแยกเพาะเลี้ยงให้บริสุทธิ์ตามวิธีการดังต่อไปนี้

2.1 การคัดแยกเส้นใยของเห็ดให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างเห็ดที่เก็บรวบรวมได้มาคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยการใช้ใบมีดที่ปราศจากเชื้อตัดดอกเห็ดแล้วใช้เข็มเขี่ยที่ปราศจากเชื้อเขี่ยเนื้อเยื่อด้านในบริเวณก้านดอกมาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Modified Norkrans's C (MNC) และ Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) (Yamada; & Katsuya. 1995: 315-323) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ หรือจนพบการเจริญของเส้นใย จากนั้นใช้เข็มเขี่ยขนาดเล็กที่ปราศจากเชื้อเขี่ยบริเวณปลายของเส้นใยที่เจริญย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ แล้วตรวจสอบเส้นใยที่แยกได้โดยการทำ wet mount ในสารละลาย lactophenol cotton blue เพื่อตรวจหาโครงสร้างของ clamp connection ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อราในกลุ่ม Basidiomycetes เก็บรักษาเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ที่ได้ไว้ในหลอดอาหาร MNC เอียง ที่อุณหภูมิ 15°C เพื่อใช้ในการทดสอบกับพืชอาศัยและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางพันธุกรรมต่อไป

2.2 การคัดแยกเส้นใยจากรากเอคโตไมคอร์ไรซาให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่อยู่ในดินที่รวบรวมได้ในแต่ละบริเวณมาแยกจากดินอย่างระมัดระวัง โดยแบ่งกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐาน เช่น สี ลักษณะการแตกกิ่ง และลักษณะของพื้นผิว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (OLYMPUS รุ่น SZ-ST, Japan) ล้างรากเพื่อเอาดินออกหลายๆ ครั้ง จนสะอาด แบ่งรากเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละลักษณะออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บไว้เพื่อศึกษาการจัดจำแนกชนิดจะอธิบายรายละเอียดไว้ในข้อ 3.3 อีกส่วนนำมาแยกเพาะเชื้อโดยใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีสารละลาย 0.01% polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้ว vortex เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำทิ้งทำเช่นนี้ซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง นำตัวอย่างรากใส่ในบีกเกอร์ขนาด 200 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย 0.005% Tween 80 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ซึ่งตั้งอยู่บน magnetic stirrer ล้างเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำตัวอย่างมาแช่ในสารละลาย 1% sodium hypochlorite นาน 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง และจึงนำรากเอคโตไมคอร์ไรซามาตัดเป็นท่อนสั้นๆ ขนาดประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ก้อนนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MNC ที่เติมยาปฏิชีวนะ streptomycin (100 µg/ml) และ tetracycline (50 µg/ml) และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 1-2 สัปดาห์ หรือจนพบการเจริญของเส้นใย โดยตรวจสอบการเจริญของเส้นใยทุกวัน จากนั้นใช้เข็มเขี่ยขนาดเล็กที่ปราศจากเชื้อเขี่ยบริเวณปลายของเส้นใยที่เจริญย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ ตรวจหาโครงสร้างของ clamp connection ซึ่งเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซาบริสุทธิ์ที่ได้จะถูกเก็บรักษาไว้ในหลอดอาหาร MNC เอียง ที่อุณหภูมิ 15°C (Yamada; et al. 2001: 43-50)

3. การศึกษาเห็ดและรากเห็ดโตไมคอร์ไรซาโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตัวอย่างดอกเห็ดสดที่เก็บรวบรวมได้ และรากเห็ดโตไมคอร์ไรซาที่ตัดแยกตามลักษณะทางสัณฐานในข้อ 2.2 ได้นำมาจัดจำแนกชนิดเบื้องต้นโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.1 การจำแนกชนิดของเห็ดเห็ดโตไมคอร์ไรซา

นำตัวอย่างดอกเห็ดที่เก็บรวบรวมได้มาทำรอยพิมพ์สปอร์ (spore print) จากนั้นทำ wet mount ในน้ำ และสารละลาย melzer's reagent (ภาคผนวก ข) เพื่อศึกษาลักษณะ รูปร่าง ขนาด และสีของเบสิดิโอสปอร์ (basidiospores) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยสีของสปอร์เทียบรหัสสีกับแผนภาพสีของ Royal Botanic Garden Edinburgh (1969) วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ทั้งหมด 20-30 สปอร์เพื่อหาขนาดสปอร์เฉลี่ย จากนั้นศึกษาลักษณะ สี การเปลี่ยนสีหลังทำให้เกิดรอยซ้ำของดอกเห็ด ขนาดของดอกเห็ดจำแนกตามวิธีของ บาส (Bas. 1969: 285-579) ศึกษา ลักษณะของครีบดอก ก้านดอก วงแหวน เปลือกหุ้มดอกอ่อน กลิ่น รสชาติ น้ำยาง และลักษณะที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบกับสารเคมี จากนั้นจัดจำแนกชนิดในเบื้องต้นตาม ลาร์เจนท์, เดวิด และ วอทลิง (Largent; Johnson; & Watling. 1977: 1-148; Largent; Stuntz; & Hadley. 1986: 1-166) และงานวิจัยอื่นๆ ได้แก่

1. Preliminary molecular identification of *Boletus griseipurpureus* Corner from Thailand and its nutritional value (Aungaudchariya; et al. 2012: 1991-1998)
2. Morphology and subdivision of *Amanita* and a monograph on its section *Lepidella* (Bas. 1969: 285-579)
3. Some species of wild Boletes in Thailand (Seehanan; & Petcharat. 2008: 109-118)
4. Die *Amanita*-Arten von Südwestchina (Yang. 1997: 1-240)
5. The genus *Astraeus* in Thailand (Phosri; et al. 2004: 453-463)
6. Molecular study of the genus *Astraeus* (Phosri; et al. 2007: 275-286) เป็นต้น

3.2 การจำแนกชนิดของรากเห็ดโตไมคอร์ไรซา

นำตัวอย่างรากเห็ดโตไมคอร์ไรซาจากข้อ 2.2 มาศึกษาอย่างละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ บันทึกลงสี ลักษณะการแตกกิ่ง และลักษณะพื้นผิว จากนั้นเก็บรากแต่ละลักษณะใส่ในสารละลาย CTAB (ภาคผนวก ข) (Doyle; & Doyle. 1990: 13-15) ที่ 4°C ก่อนนำไปศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ส่วนตัวอย่างอีกส่วนทำการตัด section รากด้วยมือ แล้วย้อมสีด้วย

สารละลาย lactophenol cotton blue ก่อนนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS รุ่น LABOMED) เพื่อศึกษาโครงสร้างของชั้นแมนเทิลที่หุ้มล้อมรอบราก รวมทั้งฮาติกเนทและโครงสร้างอื่นๆ เบื้องต้นตามวิธีของ อะเกอร์เรอร์ (Agerer. 1991: 25-74) แล้วบันทึกภาพ ทำ section แบบบางด้วยวิธีการตัด microtome ตัดแปลงจาก บรันเดร็ท, เมลวิลล์ และ ปีเตอร์สัน (Brundrett; Melville; & Peterson. 1994: 1-161) เริ่มจากเอาน้ำออกจากตัวอย่างรากเอกโตไมคอร์ไรซา โดยแช่ในสารละลาย ethanol ที่มีความเข้มข้นจากน้อยไปมาก และแช่ใน Tissue Embedding Medium ที่ผสมกับ ethanol ในอัตราส่วน 1:1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) จากนั้นแช่ใน Tissue Embedding Medium (ภาคผนวก ข) ตั้งไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยน Tissue Embedding Medium ใหม่ทุกวัน เมื่อครบ 3 ครั้งแล้วนำมาละลายและตรึงลงในฐานรองสำหรับการตัดด้วยเครื่อง microtome (Leica, Germany) และนำตัวอย่างแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ -4°C เป็นเวลา 2 วันเพื่อให้ Tissue Embedding Medium แข็งพอสำหรับการตัด section หลังจากตัด section แล้ว นำชิ้นริบบิ้นตัวอย่างที่ได้แช่ลงในภาชนะที่มีน้ำซึ่งตั้งอยู่บนเตาที่อุณหภูมิ 60°C โดยมีเจลาตินละลายเป็นฟิล์มด้านบนผิวน้ำเพื่อช่วยในการเกาะติดกับแผ่นสไลด์ จากนั้นใช้แผ่นสไลด์ซ้อนริบบิ้นที่มีเจลาตินอยู่ด้านล่างขึ้นมา ทำสไลด์ให้อุ่นด้วยการผ่านไฟของตะเกียงแอลกอฮอล์ หยดสี methylene blue ลงไปเป็นเวลา 10-15 วินาที เมื่อครบเวลาล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นย้อมทับด้วยสี basic fuchsin ประมาณ 10 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นและทำให้แห้งโดยการผ่านไฟหรือการตั้งทิ้งไว้ ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ และยัดแผ่นปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บสังเกตลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพเพื่อเป็นข้อมูลประกอบการจัดจำแนกชนิดร่วมกับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งรายละเอียดอธิบายในข้อ 4

4. การศึกษาเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซาโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS)

ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเห็ดจะใช้เนื้อเยื่อด้านในของดอกเห็ดสด ส่วนรากเอกโตไมคอร์ไรซาจะใช้ส่วนปลายรากที่แยกได้ในข้อ 2.2 มาทำการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อการระบุชนิดร่วมกับข้อมูลทางสัญญาณโดยมีขั้นตอนดังนี้

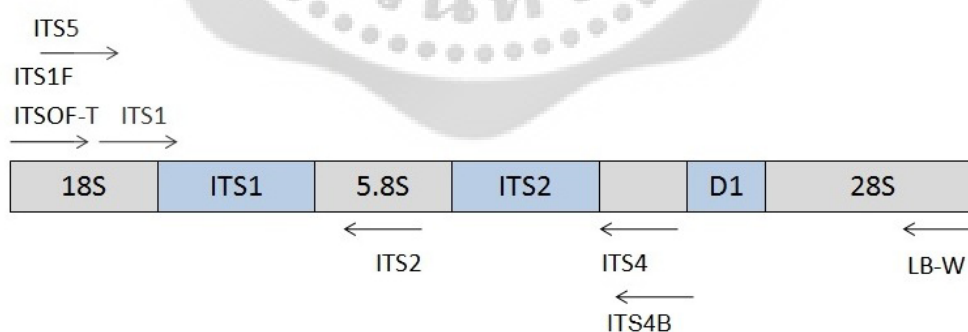
4.1 การสกัดดีเอ็นเอของเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซา

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อดอกเห็ด (หรือปลายรากเอกโตไมคอร์ไรซา) ที่อยู่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร มาสกัดดีเอ็นเอโดยตัดแปลงตามวิธีของ แซมบรูค; ฟริทซ์ และ มาเนียทิส (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 1989) โดยบดให้ละเอียดแล้วเติมสารละลาย CTAB เข้มข้น 2 % ปริมาตร 200 ไมโครลิตรและสารละลาย Rnase A ความเข้มข้น 100

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำไป vortex และบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 60 นาที โดยจะทำการพลิกกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง เมื่อครบเวลานำไป vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm (11,239 ×g) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนน้ำใสที่อยู่ด้านบนใสในหลอด microcentrifuge ใหม่แล้วเติมสารละลาย phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) (Research organics, USA) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนน้ำใสที่เก็บได้ นำไป vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm (11,239 ×g) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสด้านบนใสในหลอด microcentrifuge ใหม่ แล้วเติมสารละลาย sodium acetate (NaOAc) เข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ที่แช่เย็นในปริมาณ 1/10 เท่าของปริมาณน้ำใส เติมสารละลาย isopropanol ที่แช่เย็น ในปริมาณ 1 เท่าของปริมาณทั้งหมด แล้วพลิกกลับหลอดไปมาให้เข้ากันเบาๆ จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm (11,239 ×g) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย ethanol เข้มข้น 70% ที่แช่เย็นปริมาณ 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm (11,239 ×g) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง และปล่อยให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ Dnase และ Rnase ปริมาณ 20-50 ไมโครลิตร แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้

4.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacers (ITS) ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

สารละลายดีเอ็นเอของเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซาที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่แสดงในภาพประกอบ 25 และตาราง 6



ภาพประกอบ 25 แผนภาพแสดงตำแหน่งและทิศทางของไพรเมอร์บริเวณ ITS และ rDNA ที่ใช้ในการทดลอง

ที่มา: ดัดแปลงจาก Tedersoo; et al. (2008). Strong Host Preference of Ectomycorrhizal Fungi in a Tasmanian Wet Sclerophyll Forest as Revealed by DNA Barcoding and Taxon-Specific Primers. *New Phytologist*. 180: 479–490.

ตาราง 6 ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์		ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3')	เอกสารอ้างอิง
ITSOF-T	forward	ACTTGGTCATTTAGAGGAAGT	Taylor; & McCormick. 2008: 1020-1033
LB-W	reverse	CTTTTCATCTTTCCCTCACGG	Tedersoo; et al. 2008: 479-490
ITS1F	forward	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes; & Bruns. 1993: 113-118
ITS4B	reverse	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Gardes; & Bruns. 1993: 113-118
ITS1	forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White; et al. 1990: 315-322
ITS4	reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White; et al. 1990: 315-322
ITS5	forward	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White; et al. 1990: 315-322

ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของตัวอย่างเห็ดเริ่มแรกเลือกใช้ไพรเมอร์ของ ITS1F/ITS4B เนื่องจากมีความจำเพาะกับเชื้อราที่อยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes มากที่สุด (Gardes; & Bruns. 1993: 113–118) แต่เนื่องจากตัวอย่างเห็ดนั้นมีความหลากหลายของ สายพันธุ์สูง จึงเลือกใช้ไพรเมอร์อื่นๆ ร่วมด้วย ในกรณีที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1F/ITS4B ตัวอย่างของคู่ไพรเมอร์อื่นๆ ที่ใช้ เช่น คู่ไพรเมอร์ ITS1F/ITS4, ITS1/ITS4B และ ITS5/ITS4 เป็นต้น โดยมีส่วนผสมของสารในปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Forward primer (10 μ M)	1	0.4 ไมโครโมลาร์
Reverse primer (10 μ M)	1	0.4 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5	10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA Polymerase (KAPA หรือ TopTaq 2X master mix kit)	12.5	1.25 ยูนิตต่อ 25 ไมโครลิตร
Water sterile DNase/RNase free	5.5	-

หมายเหตุ: ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร

จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR (Thermal Cycler, China) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ปฏิกิริยา PCR	อุณหภูมิ	เวลา
1. Initial denaturation	95 °C	5 นาที
2. Denaturation	95 °C	1 นาที
3. Annealing	50-55 °C*	1 นาที
4. Extension	72 °C	2 นาที
5. Final extension	72 °C	10 นาที

ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2 ถึง ขั้นตอนที่ 4 จำนวน 35 รอบ

หมายเหตุ: * หมายถึง ช่วงอุณหภูมิอาจปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสม ขึ้นอยู่กับชนิดของรา

ส่วนในการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของรากเอกโตไมคอร์ไรซา นำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITSOF-T/LB-W หรือในกรณีที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ ITSOF-T/LB-W ได้ ใช้คู่ไพรเมอร์อื่นแทน เช่น ITSOF-T/ITS4 หรือ ITSOF-T/ITS2 เป็นต้น (Tedersoo; et al. 2008: 479-490; 2011; Bahram; et al. 2011: 313-320; Phosri; et al. 2012: 2287-2298) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Forward primer (10 µM)	1	0.5 ไมโครโมลาร์
Reverse primer (10 µM)	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5	10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Finnzyme)	0.4	1.5 ยูนิตต่อ 20 ไมโครลิตร
1x Phire® PCR buffer	10	-
Water sterile DNase/RNase free	2.6	-

หมายเหตุ: ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร

จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR (Thermal Cycler, China) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ปฏิกิริยา PCR	อุณหภูมิ	เวลา
1. Initial denaturation	98 °C	5 นาที
2. Denaturation	98 °C	5 วินาที

3. Annealing	56-57 °C*	5 วินาที
4. Extension	72 °C	20 วินาที
5. Final extension	72 °C	1 นาที

ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2 ถึง ขั้นตอนที่ 4 จำนวน 40 รอบ

หมายเหตุ: * หมายถึง ช่วงอุณหภูมิอาจปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสม ขึ้นอยู่กับชนิดของรา

หลังจากเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ด้วยชุดเครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder marker) ใช้ความเข้มข้นของเจลอะกาโรส 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5X TBE (Amresco) (ภาคผนวก ข) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำเจลมาย้อมในสารละลาย ethidium bromide เข้มข้น 10 µg/ml เป็นเวลา 10-15 นาที นำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV-transilluminator และบันทึกภาพ

4.3 การโคลนดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์ (DNA cloning vector)

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มจำนวนและทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมกับเวกเตอร์ โดยเวกเตอร์ที่ใช้คือ TA cloning vector หลังจากนั้นจึงทำการโคลนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ TOP10 ด้วยวิธีการดังนี้

4.3.1 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ (Ligation)

นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์โดยใช้ TA cloning vector (RBC TA cloning vector kit, Taiwan) ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
Ligation buffer A	0.5
Ligation buffer B	0.5
RBC TA cloning vector	1.0
PCR purify product	2.0-2.5
T4 DNA ligase	0.5

จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดป่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่ได้โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ในขั้นต่อไป

4.3.2 การนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Transformation)

นำแบคทีเรีย *E.coli* TOP10 ที่ผ่านการเตรียมความพร้อมให้สามารถรับดีเอ็นเอจากภายนอก หรือที่เรียกว่าคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell) (ภาคผนวก ค) ซึ่งเก็บรักษาอยู่ที่อุณหภูมิ -70°C มาวางอยู่ในน้ำแข็งที่เตรียมไว้เพื่อให้ละลายช้าๆ ใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อละลายแล้วนำรีคอมบิแนนท์ที่เตรียมไว้ผสมลงไปกับคอมพีเทนต์เซลล์ในปริมาณ 1 ไมโครลิตร โดยใช้ทูปคนช้าๆ จากนั้นบ่มไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำไปแช่ใน water bath ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที โดยเขย่าเบาๆ หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ใส่ Soc medium (ภาคผนวก ก) ลงไปประมาณ 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Miller Luria-Bertani (LB agar) (ภาคผนวก ก) ที่มียาแอมพิซิลลิน (ampicillin) เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) Isopropylthiogalactoside (IPTG) เข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) และ X-gal เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง

4.3.3 การคัดเลือกพลาสมิด

หลังจากบ่มครบ 14 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นโคโลนีสีน้ำเงินและสีขาวเกิดขึ้นในการคัดเลือกพลาสมิดนั้นจะคัดเลือกโคโลนีสีขาว เนื่องจากดีเอ็นเอเข้าไปแทรกในส่วน multiple cloning site ตรงบริเวณยีน *lacZ* ซึ่งเป็นบริเวณที่ผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) ซึ่งจะสามารถย่อยสับสเตรท X-gal ได้ ดังนั้นเมื่อบริเวณยีน *lacZ* ถูกขึ้นดีเอ็นเอแทรกทำให้การผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสไม่สมบูรณ์ จึงทำให้ไม่สามารถย่อยสับสเตรท X-gal ได้ โคโลนีของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดที่มีขึ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่จึงมีสีขาว ส่วนโคโลนีสีฟ้าเกิดจากไม่มีขึ้นดีเอ็นเอเข้าไปแทรกบริเวณยีน *lacZ* ทำให้มีการผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) ที่สมบูรณ์ สามารถย่อยสับสเตรท X-gal เกิดสารสีน้ำเงิน ดังนั้นจึงคัดเลือกโคโลนีสีขาวจำนวน 3 โคโลนี โดยเขี่ย 1 โคโลนี ต่อ 1 หลอด microcentrifuge ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เพื่อตรวจสอบโคโลนีที่ได้ว่ามีขึ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการหรือไม่ด้วยวิธี PCR

4.4 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากพลาสมิดด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำหลอด microcentrifuge ที่มีโคโลนีสีขาวอยู่มาทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ เวลา และอุณหภูมิ ตามแต่ละบริเวณที่ศึกษา เช่นเดียวกับวิธีการทดลองในข้อ 4.2 จากนั้นจึงนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ถ้า

ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีนมีขนาดที่ถูกต้องจึงนำชิ้นดีเอ็นเอไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

4.5 การทำชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนจากขั้นตอน 4.2 และ/หรือ 4.4 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification mini Kit ตามวิธีในคู่มือ ก่อนส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st BASE (Malaysia) ผ่านบริษัท Ward Medic, Ltd. ประเทศไทย ผลที่ได้นำมาตรวจสอบด้วยโปรแกรม Chromas (Technelysium Pty.Ltd) และเทียบเคียงความเหมือนผ่านโปรแกรม BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) กับฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) และ UNITE (Abarenkov; et al. 2010: 189–196) ซึ่งค่าร้อยละความเหมือน (% similarity) ที่ได้จากการเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลที่ยอมรับได้คือร้อยละ 97 ในการจัดจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์

4.6 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดและรากเอคโตไมคอร์ไรซา

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเห็ดและรากที่ได้จากข้อ 4.2 และ/หรือ 4.4 มาจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ (multiple sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) และ Neighbor Joining (NJ) ด้วยโปรแกรม MEGA (Tamura; et al. 2011: 2731-2739) ซึ่งในแต่ละวิธีจะมีการกำหนดค่าความเหมือน (bootstrap analysis) ให้มีค่าเท่ากับ 1000 หมายถึง กำหนดให้โปรแกรมมีการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้อัตโนมัติทั้งหมด 1000 ครั้ง เพื่อให้ได้แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้อัตโนมัติที่มีความเป็นไปได้มากที่สุด และพิสูจน์ว่าเป็นแผนภูมิที่ดีที่สุด และมีความถูกต้องมากที่สุด

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาบริสุทธิ์

นำเส้นใยราบบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2.1 และ 2.2 มาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญโดยเลือกศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, ค่า pH และ อุณหภูมิ เพื่อเพิ่มจำนวนราเอคโตไมคอร์ไรซาให้ได้ปริมาณมาก เพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อ และทดสอบการสร้างรากเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยต่อไป

5.1 การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้เครื่องเจาะจุกคออร์กัดบริเวณขอบของโคโลนีให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 4 ชนิด ได้แก่ Modified Melin-Norkrans (MMN), Modified Norkrans's C (MNC), Potato Dextrose Agar (PDA) และ Murashige and Skoog medium (MS) (ภาคผนวก ก) โดยปรับ pH เท่ากับ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C โดยทำการทดสอบอาหารละ 5 ซ้ำ วัดการเจริญของราโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นหลอมอาหารนำเส้นใยออกมาล้างน้ำหลาย ๆ ครั้งก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อหามวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) ของเส้นใย แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติตามวิธีข้อ 5.4 เพื่อหาอาหารที่เหมาะสมในการเจริญ

5.2 การศึกษาผลความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ใช้เครื่องเจาะจุกคออร์กัดบริเวณขอบของโคโลนีให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เลี้ยงในอาหารเหลวชนิด MNC 50 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในแต่ละ pH ทำทั้งหมด 5 ซ้ำ จากนั้นนำมากรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman no. 1 นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อหามวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) ของเส้นใย แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติตามวิธีข้อ 5.4 เพื่อหาค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญ

5.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิ

ใช้เครื่องเจาะจุกคออร์กัดบริเวณขอบของโคโลนีให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เลี้ยงบนอาหารแข็ง MNC ที่มี pH เท่ากับ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, อุณหภูมิห้อง และ 37°C ในแต่ละอุณหภูมิทำทั้งหมด 5 ซ้ำ วัดการเจริญของราโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นหลอมอาหารนำเส้นใยออกมาล้างน้ำหลาย ๆ ครั้งก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อหามวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) ของเส้นใย แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติตามวิธีข้อ 5.4 เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ

5.4 การวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญในสภาวะต่าง ๆ

นำค่าเฉลี่ยการเจริญของเส้นใย ได้แก่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และน้ำหนักแห้งของเส้นใย ในแต่ละทรีทเมนต์ (อาหาร, ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ) ระยะเวลา 1 เดือน มาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนต์โดยใช้ one-way ANOVA เลือกวิธีของ Duncan tests

6. การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัย

ราเอกโตไมคอร์ไรซาปกติมีการเจริญอยู่ร่วมกับพืชอาศัย การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยจึงเป็นสิ่งที่ช่วยยืนยันว่าเส้นใยที่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งได้เป็นราเอกโตไมคอร์ไรซา โดยนำเส้นใยจากข้อ 2.1 และ 2.2 มาใช้ในทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซากับรากพืชอาศัย

6.1 การเตรียมเมล็ดสนสามใบและเมล็ดยางนา

เริ่มจากการนำเมล็ดสนสามใบ (*Pinus kesiya* Royle ex Gordon; Pinaceae) แช่ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเมล็ดที่จมน้ำนำมาทำการฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ใน ethanol เข้มข้น 70 % เป็นเวลา 3-5 นาที แช่ใน hydrogen peroxide เข้มข้น 30 % เป็นเวลา 30 นาที ขณะที่แช่อยู่นั้นควรเขย่าให้สารละลายสัมผัสกับเมล็ดได้ทั่วถึง ล้างน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง และนำเมล็ดวางลงบน water agar เข้มข้น 0.5 % บ่มที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หรือจนกว่าเมล็ดงอก บางส่วนเพาะลงในทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้งโดยแต่ละครั้งห่างกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 สัปดาห์หรือจนกว่าเมล็ดงอก

การเตรียมเมล็ดยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb. Ex G. Don; Dipterocarpaceae) เริ่มจากการตัดปีก ล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด จากนั้นแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เข้มข้น 3% นาน 30 นาที นำเมล็ดไปล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ หรือจนกว่าเมล็ดงอก

6.2 การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในจานเลี้ยงเชื้อ

ในการทดสอบนี้เลือกใช้พืชอาศัยคือกล้าสนสามใบในการทดสอบ

6.2.1 การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

นำกระดาษเซลโลเฟนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้งโดยแต่ละครั้งห่างกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชนิด คือ MNC และ MS จากนั้นนำเส้นใยของรามาลีงให้เจริญบนกระดาษเซลโลเฟนเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C แล้วนำกล้าสนสามใบที่งอกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MNC และ MS ที่มีกระดาษเซลโลเฟนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ววางอยู่ เจาะขอบของจานเลี้ยงเชื้อเป็นช่องว่างให้ยอดของกล้าสนเจริญออกมาได้ จากนั้นตัดเส้นใยของราที่อยู่บนกระดาษเซลโลเฟนขนาด 2×2 ตารางเซนติเมตรโดยวางคว่ำด้านที่มีเส้นใยของราลงบนรากของต้นสน และใช้วาสลินปิดช่องที่เจาะบนจาน ใช้พาราฟิล์มพันรอบจานเลี้ยงเชื้อ นำกระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์หุ้มเพื่อป้องกันแสงรบกวนรากและรา บ่มที่อุณหภูมิห้องและให้แสงนาน 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4-8 สัปดาห์ หลังจากครบกำหนดนำมาศึกษาการติดเชื้อราที่รากสนโดยตรวจหาโครงสร้างของเอกโตไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

และกล้องจุลทรรศน์ นำรากสนบางส่วนตัด section เพื่อตรวจหาโครงสร้างของฮาติกเนท และวัดความหนาของชั้นแมนเทิล

6.2.2 การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาบนวัสดุปลูก

นำวัสดุปลูก ได้แก่ พีทมอสและเวอร์มิคูไลท์ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง จากนั้นบรรจุลงในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 9 เซนติเมตร โดยเจาะที่บริเวณขอบจานเป็นช่องเพื่อให้ยอดของกล้าสนเจริญออกมาได้ แล้วเติมอาหารเหลว MNC ลงไปปริมาตรเท่ากับ 1 มิลลิลิตร นำกล้าสนวางลงบนวัสดุปลูก แล้วนำเส้นใยราวางทับบนรากของกล้าสนอีกทีหนึ่ง ปิดช่องที่เจาะไว้ด้วยวาสลีนและใช้พาราฟิล์มพันรอบจานเลี้ยงเชื้อ นำกระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์หุ้มเพื่อป้องกันแสงรบกวนต่อการเจริญของราก บ่มที่อุณหภูมิห้อง และให้แสงนาน 14 ชั่วโมงต่อวันเป็นระยะเวลานาน 4-8 สัปดาห์ หลังจากครบกำหนดนำมาศึกษาการติดเชื้อราที่รากสนโดยตรวจหาโครงสร้างของเอกโตไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์ นำรากสนบางส่วนตัด section เพื่อตรวจหาโครงสร้างของฮาติกเนท และวัดความหนาของชั้นแมนเทิล

6.3 การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในถุงเพาะชำ

ในการทดสอบนี้เลือกใช้พีชอาศัย 2 ชนิด คือกล้าสนสามใบ และกล้ายางนาในการทดสอบ โดยเริ่มจากเตรียมวัสดุปลูกพีทมอสและเวอร์มิคูไลท์ผสมกันอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเหลว MNC (pH 6) ลงไป 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที นำเส้นใยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จำนวน 3 ชิ้น ใส่ลงไปในวัสดุปลูกที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30-32°C) นาน 4 สัปดาห์ หรือจนเส้นใยเจริญทั่ววัสดุปลูก

จากนั้นเตรียมภาชนะปลูกโดยนำพีทมอสและเวอร์มิคูไลท์ที่มีเส้นใยเจริญอยู่ผสมกับดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง มาผสมกันในอัตราส่วนของหัวเชื้อเส้นใยราต่อดินเท่ากับ 1:8 (ปริมาตร:ปริมาตร) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใส่ลงในถุงเพาะชำขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 5 x 11 เซนติเมตร นำกล้าสนสามใบและกล้ายางนาอายุ 1 เดือน ที่เตรียมไว้ในข้อ 6.1 มาเพาะลงในถุงเพาะชำที่อุณหภูมิห้อง ให้แสงนาน 14 ชั่วโมงต่อวัน และให้น้ำ 20 มิลลิลิตรต่อวัน เป็นเวลา 6 เดือน แต่ละชนิดพีชทำอย่างละ 10 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมราเอกโตไมคอร์ไรซา วัดการเจริญของต้นกล้าจากความสูงทุกเดือน เมื่อครบ 6 เดือน นำมาหามวลชีวภาพรวม (น้ำหนักแห้ง

ของใบ ลำต้น และราก) นอกจากนี้ได้ทำการสุ่มตรวจรากเอกโตไมคอร์ไรซาในเดือนที่ 3 และ 6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจหาโครงสร้างและวัดความหนาของชั้นแมลเทิลและฮาติกเนทของราเอกโตไมคอร์ไรซา

6.4 การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาโดยใช้สารแขวนลอยของสปอร์

ตัวอย่างดอกเห็ดสดที่เก็บรวบรวมได้ ทำการผ่ากลางตัวอย่างและนำสปอร์มาผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Tween 20 เข้มข้น 0.1% เพื่อลดแรงตึงผิวของน้ำและช่วยในการกระจายสปอร์ แล้วนำมานับจำนวนสปอร์ด้วย hemacytometer ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้มีค่าเท่ากับ 10^{12} สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง ปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วบรรจุลงในถุงเพาะชำขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 5 x 11 เซนติเมตร นำกล้าสนสามใบ และกล้ายางนาอายุ 1 เดือน ที่เตรียมไว้ในข้อ 6.1 มาเพาะลงในถุงเพาะชำ ที่อุณหภูมิห้อง ให้แสงนาน 14 ชั่วโมงต่อวัน และให้น้ำ 20 มิลลิลิตรต่อวัน เป็นเวลา 6 เดือน แต่ละชนิดพืชทำอย่างละ 6 ซ้ำ วัดการเจริญของต้นกล้าจากความสูงทุกเดือน เมื่อครบ 6 เดือน นำมาหามวลชีวภาพรวม (น้ำหนักแห้งของใบ ลำต้น และราก) จากนั้นสุ่มตรวจรากเอกโตไมคอร์ไรซาในเดือนที่ 6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจหาโครงสร้างและวัดความหนาของชั้นแมลเทิลและฮาติกเนทของราเอกโตไมคอร์ไรซา

7. การตรวจสอบการติดเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซาในรากพืชทดสอบ

หลังจากการทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยมีการเจริญเติบโตตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว นำพืชในข้อ 6.2 และ 6.3 มาตรวจสอบการติดเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซา ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

7.1 การตรวจวัดการเจริญเติบโตของพืช

ตรวจวัดการเจริญของพืชหลังจากปลูกกล้าไม้ทุกๆ เดือนเป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยการวัดความสูงของลำต้น เมื่อครบกำหนด 6 เดือน นำมาหามวลชีวภาพรวม (น้ำหนักแห้งของใบ ลำต้น และราก) โดยการนำไปอบแห้งที่ อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บไว้ที่โถดูดความชื้นก่อนนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง

7.2 การวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตของพืช

นำค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ความสูง มวลชีวภาพเหนือดิน มวลชีวภาพใต้ดิน และมวลชีวภาพรวม ของกล้าไม้อายุ 6 เดือน ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนต์โดยใช้ Independent-Samples T-Test

7.3 การตรวจสอบลักษณะของรากเอกโตไมคอร์ไรซา

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างรากและดินรอบรากประมาณ 10 กรัม ของแต่ละต้นของพืช ทดสอบในทุกชุดการทดลอง มาตรวจหาโครงสร้างเอกโตไมคอร์ไรซา คือลักษณะทางสัณฐานของรากที่เปลี่ยนแปลงไปจากรากปกติ เช่น สี ขนาด ผิวสัมผัส และการแตกกิ่ง เป็นต้น จากนั้นตรวจสอบลักษณะภายในรากเบื้องต้นด้วยวิธีการตัดตามขวางและตามยาวด้วยมือ ทำ wet mount ด้วยสารละลาย lactic acid เข้มข้นร้อยละ 85 ศึกษาลักษณะของชั้นแมนเทิล และฮาติกเนทภายในรากด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Agerer, 1991: 25–74) จากนั้นศึกษาลักษณะภายในด้วยวิธี microtome ตามวิธีในข้อ 3.2

7.4 การตรวจวัดร้อยละการติดเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซา

เมื่อทำการสุ่มตรวจรากเอกโตไมคอร์ไรซาจากพืชทดสอบในทุกชุดการทดลองแล้ว คำนวณหาร้อยละการติดเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซา ด้วยวิธี grid line ดังนี้

โดยสุ่มรากและดินจากพืชทดสอบประมาณ 10 กรัม จากนั้นเลือกรากออกมาตัดเป็นท่อนสั้นๆ ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร นำมาวางเรียงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำอยู่เล็กน้อย โดยให้แต่ละรากกระจายอยู่ทั่วจานอย่างสม่ำเสมอ ไม่มีการซ้อนทับกัน โดยกั้นจานเลี้ยงเชื้อที่นำมาได้ทำการขีดเป็นช่องตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัส โดยแต่ละช่องมีขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 1 ตารางเซนติเมตร จากนั้นนับจำนวนรากเอกโตไมคอร์ไรซาและรากที่ไม่ใช่เอกโตไมคอร์ไรซาที่พาดอยู่บนเส้นตารางทั้งตามแนวขวาง คือ นับแถวที่หนึ่งจากซ้ายไปขวาตามด้วยแถวที่สองขวาไปซ้ายทำเช่นนี้ไปจนถึงเส้นสุดท้ายของจานเลี้ยงเชื้อ และตามแนวยาว โดยเริ่มนับจากเส้นที่หนึ่งจากบนลงล่าง แถวที่สองจากล่างขึ้นบน นับเช่นนี้ไปจนถึงเส้นสุดท้าย เมื่อนับเสร็จแล้วนำจำนวนที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการติดเชื้อของรากเอกโตไมคอร์ไรซา (Brundrett; et al. 1996: 1-734)

7.5 การตรวจพิสูจน์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตัดปลายรากเอกโตไมคอร์ไรซาที่ตรวจพบจากข้อ 7.3 นำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ 4.1 และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 ด้วยไพรเมอร์ ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACG CAGC-3') และ ITS4B (5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3') โดยมีส่วนผสมของสารในปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
ITS3 (10 µM)	1	0.4 ไมโครโมลาร์
ITS4B (10 µM)	1	0.4 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5	10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA Polymerase (TopTaq		
2X master mix kit)	12.5	1.25 ยูนิต์ต่อ 25 ไมโครลิตร
Water sterile DNase/RNase free	5.5	-

หมายเหตุ: ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร

จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR (Thermal Cycler, China) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ปฏิกิริยา PCR	อุณหภูมิ	เวลา
1. Initial denaturation	95 °C	2 นาที
2. Denaturation	95 °C	30 วินาที
3. Annealing	55 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	30 วินาที
5. Final extension	72 °C	10 นาที

ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2 ถึง ขั้นตอนที่ 4 จำนวน 35 รอบ

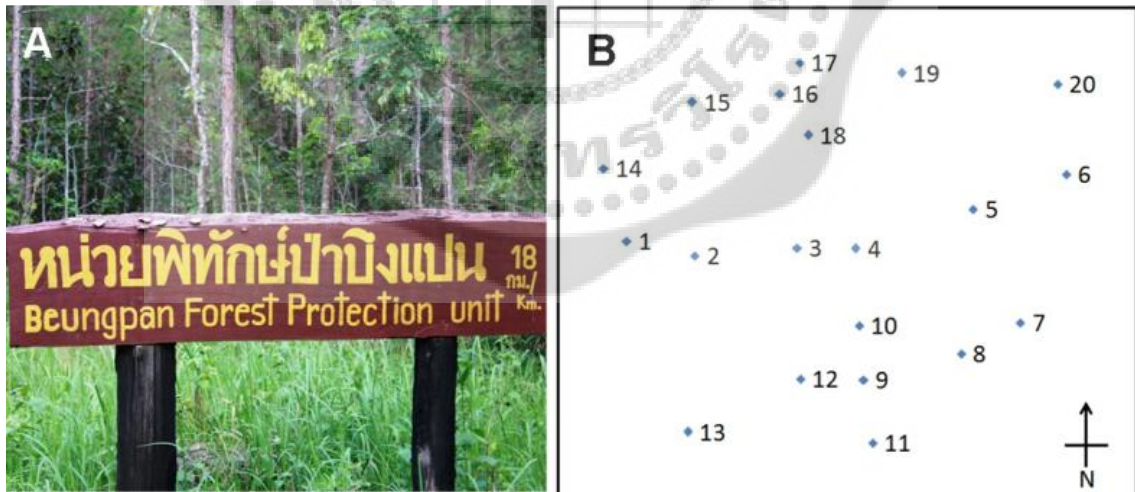
จากนั้นตรวจวัดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification mini Kit ก่อนส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลที่ได้นำมาเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank และ UNITE รวมทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ของราเอกโตไมคอร์ไรซาที่ใช้ในการทดสอบ (*Astraeus sirindhorniae*) เพื่อเป็นการยืนยันว่าราเอกโตไมคอร์ไรซาที่สร้างเป็นชนิดเดียวกับราที่ทดสอบจริง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างราเอคโตไมคอร์ไรซาและการเพาะเลี้ยงเส้นใยราบริสุทธิ์

ผลการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างราเอคโตไมคอร์ไรซา ทั้งดอกเห็ดและราก จากพื้นที่ป่าสนผสมเต็งรัง ณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จ.ชัยภูมิ ในช่วงเดือนพฤษภาคม – ตุลาคม พ.ศ. 2554 โดยการวางแปลงขนาด กว้าง x ยาว เท่ากับ 100 x 100 เมตร โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 20 จุด รายละเอียดแสดงในวิธีการทดลองข้อ 1 เส้นทางสำรวจและปักจุดแสดงในภาพประกอบ 26 ซึ่งชนิดพืชที่พบในแต่ละจุดได้แก่ สนสามใบ (*Pinus kesiya* Royle ex Gordon.), ทะโล้ (*Schima wallichii* choisy), ก่อดำ (*Lithocarpus truncatus* Rehd. & Wils.), ก่อขาว (*Castanopsis argentea* (Blume) A. DC.), หมือดโลด (*Aporosa villosa* Lindl. Baill.), มะก้อ (*Lithocarpus ceriferus* A. Camus), ยางเหียง (*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. ex Miq.), ตาฉี่เคย (*Craibiodendron stellatum* W.W. Smith) และตับเต่า (*Diospyros ehretioides* Wall. ex G. Don) ซึ่งพืชส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Fagaceae และ Pinaceae ตามลำดับ (ตาราง 7) ตัวอย่างราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เก็บรวบรวมได้มีจำนวนทั้งหมด 109 ตัวอย่าง ส่วนดอกเห็ดที่พบในพื้นที่มีจำนวน 28 ตัวอย่าง



ภาพประกอบ 26 พื้นที่ศึกษา (A) ป่าสนผสมเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว และ (B) จุดเก็บตัวอย่าง

ตาราง 7 จำนวนตัวอย่างราเอคโตไมคอร์ไรซาและชนิดพืชที่พบในพื้นที่ป่าสนผสมเต็งรัง

จุดเก็บ ตัวอย่าง	ราเอคโตไมคอร์ไรซา (ตัวอย่าง)		พิกัด	ชนิดพืช (วงศ์)
	ดอกเห็ด	ราก		
1	3	11*	16°24'14.2"N 101°34'45.9"E	<i>Pinus kesiya</i> Royle ex Gordon. (Pinaceae)
2	-	5	16°24'14.1"N 101°34'46.4"E	<i>Schima wallichii</i> choisy (Theaceae)
3	-	11	16°24'14.1"N 101°34'47.1"E	<i>Pinus kesiya</i> Royle ex Gordon. (Pinaceae)
4	-	7	16°24'14.1"N 101°34'47.5"E	<i>Lithocarpus truncatus</i> Rehd. & Wils. (Fagaceae)
5	-	2	16°24'14.4"N 101°34'48.3"E	<i>Lithocarpus truncatus</i> Rehd. & Wils. (Fagaceae)
6	2	5	16°24'14.7"N 101°34'48.9"E	<i>Lithocarpus truncatus</i> Rehd. & Wils. (Fagaceae)
7	2	7	16°24'13.6008"N 101°34'48.612"E	<i>Castanopsis argentea</i> (Blume) A. DC. (Fagaceae)
8	-	8	16°24'13.3776"N 101°34'48.202"E	<i>Aporosa villosa</i> Lindl. Baill. (Euphorbiaceae)
9	2	3	16°24'13.1904"N 101°34'47.528"E	<i>Castanopsis argentea</i> (Blume) A. DC. (Fagaceae)
10	-	5	16°24'13.5792"N 101°34'47.5"E	<i>Lithocarpus ceriferus</i> A.Camus (Fagaceae)
11	2	4	16°24'12.7332"N 101°34'47.59"E	<i>Dipterocarpus obtusifolius</i> Teijsm.ex Miq. (Dipterocarpaceae)
12	2*	3	16°24'13.194"N 101°34'47.089"E	<i>Dipterocarpus obtusifolius</i> Teijsm.ex Miq. (Dipterocarpaceae)
13	1	8	16°24'12.816"N 101°34'46.308"E	<i>Pinus kesiya</i> Royle ex Gordon. (Pinaceae)
14	3	5	16°24'14.7096"N 101°34'45.728"E	<i>Pinus kesiya</i> Royle ex Gordon. (Pinaceae)
15	2	5	16°24'15.1884"N 101°34'46.34"E	<i>Craibiodendron stellatum</i> W.W. Smith (Ericaceae)

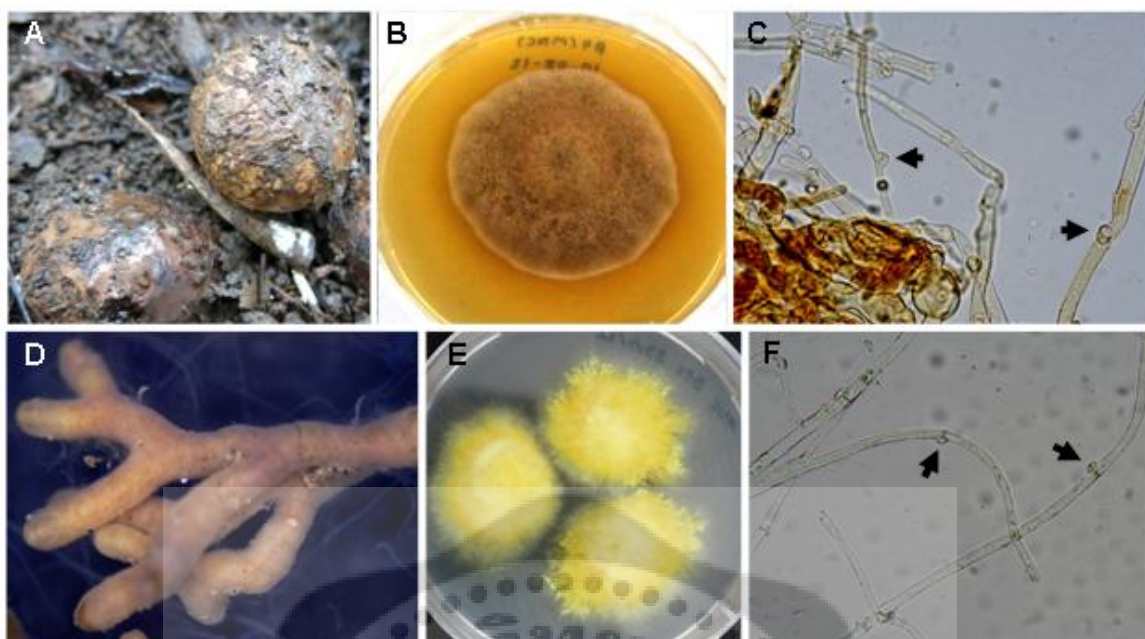
หมายเหตุ: * หมายถึงตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงเส้นใยราบริสุทธิได้ - หมายถึงไม่พบตัวอย่าง

ตาราง 7 (ต่อ)

จุดเก็บ ตัวอย่าง	ราเอกโตไมคอร์ไรซา (ตัวอย่าง)		พิกัด	ชนิดพืช (วงศ์)
	ดอกเห็ด	ราก		
16	1	7	16°24'15.246"N 101°34'46.949"E	<i>Castanopsis argentea</i> (Blume) A. DC. (Fagaceae)
17	2	5	16°24'15.4728"N 101°34'47.086"E	<i>Lithocarpus truncatus</i> Rehd. & Wils. (Fagaceae)
18	2	2	16°24'14.9508"N 101°34'47.147"E	<i>Pinus kesiya</i> Royle ex Gordon. (Pinaceae)
19	3	4	16°24'15.3972"N 101°34'47.791"E	<i>Diospyros ehretioides</i> Wall. ex G. Don (Ebenaceae)
20	1	2	16°24'15.3216"N 101°34'48.868"E	<i>Lithocarpus ceriferus</i> A. Camus (Fagaceae)

หมายเหตุ: * หมายถึง ตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงเส้นใยราบริสุทธิได้ - หมายถึง ไม่พบตัวอย่าง

ตัวอย่างดอกเห็ดทั้ง 28 ตัวอย่าง สามารถเพาะเลี้ยงได้เพียง 1 ตัวอย่าง คือ PKBP28 จากจุดเก็บตัวอย่างที่ 12 บริเวณต้นยางเหียง ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ไอโซเลท ตามจำนวนดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้ ได้แก่ PKBP28-1, PKBP28-2, PKBP28-3 และ PKBP28-4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Modified Norklans's C (MNC) ที่อุณหภูมิ 30°C เส้นใยละเอียด ช้อนกันแน่น สีน้ำตาลทอง ส่วนตัวอย่างรากเอกโตไมคอร์ไรซาจำนวน 109 ตัวอย่าง สามารถเพาะเลี้ยงได้เพียง 1 ตัวอย่าง คือ RBP1-1 ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ไอโซเลท ได้แก่ RBP1-1a, RBP1-1b, RBP1-1c และ RBP1-1d จากจุดเก็บตัวอย่างที่ 1 บริเวณต้นสนสามใบ ซึ่งเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MNC ที่อุณหภูมิ 30°C เส้นใยทั้งสองไอโซเลทมีลักษณะคล้ายกันคือเส้นใยละเอียด ช้อนกันแน่น สีเหลือง เมื่อศึกษาเส้นใยทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบโครงสร้างของ clamp connection ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของราในกลุ่ม Basidiomycetes (ภาพประกอบ 27) ค่าร้อยละของตัวอย่างดอกเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซาที่เพาะเลี้ยงได้มีค่าเท่ากับร้อยละ 3.57 และร้อยละ 0.92 ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างราที่เพาะเลี้ยงได้นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทางพันธุกรรมเพื่อคัดเลือกมาทดสอบการสร้างไมคอร์ไรซากับรากพืชอาศัยต่อไป



ภาพประกอบ 27 ตัวอย่างราเอกโตไมคอร์ไรซาที่เพาะเลี้ยงได้ (A) เห็ด PKBP28 (B) การเจริญของเส้นใยราบน MNC (C) ลักษณะของ clamp connection (ลูกศร) (D) ราเอกโตไมคอร์ไรซา RBP1-1a (E) การเจริญของเส้นใยราบน MNC และ (F) ลักษณะของ clamp connection (ลูกศร)

2. การจำแนกชนิดของเห็ดและราเอกโตไมคอร์ไรซาโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน

2.1 เห็ดเอกโตไมคอร์ไรซา

นำตัวอย่างเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาจำนวน 28 ตัวอย่าง มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานตามที่อธิบายในวิธีการทดลองข้อ 3.1 เพื่อการจัดจำแนกชนิดเบื้องต้น พบว่าสามารถจำแนกได้ 8 วงศ์ (family) 13 สกุล (genus) มากกว่า 20 สปีชีส์ (species) รายละเอียดแสดงในตาราง 8 ซึ่งวงศ์ที่พบมากที่สุดได้แก่ Gomphaceae รองลงมาคือ Boletaceae และ Russulaceae ตามลำดับ ส่วนการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์นั้นได้ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) มาช่วย ผลแสดงในการทดลองข้อ 3

ตาราง 8 ชนิดของตัวอย่างเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบในแปลงศึกษา

วงศ์ (family)	สกุล (genus)	รหัสตัวอย่าง
Amanitaceae	<i>Amanita</i> sp.	PKBP11
Boletaceae	<i>Boletellus</i> sp.	PKBP23
	<i>Mycoamanranthus</i> sp.	PKBP8
	<i>Pulveroboletus</i> sp.	PKBP13, PKBP14, PKBP21
	<i>Tylopilus</i> sp.	PKBP12,
Diplocystaceae	<i>Astraeus</i> sp.	PKBP28 *
Gomphaceae	<i>Gomphus</i> sp.	PKBP1, PKBP7, PKBP20, PKBP27
	<i>Ramaria</i> species 1	PKBP2
	<i>Ramaria</i> species 2	PKBP4
	<i>Ramaria</i> species 3	PKBP6
	<i>Ramaria</i> species 4	PKBP15
	<i>Ramaria</i> species 5	PKBP18
	<i>Ramaria</i> species 6	PKBP24
	<i>Ramaria</i> species 7	PKBP25
Inocybaceae	<i>Inocybe</i> sp.	PKBP26
Russulaceae	<i>Lactarius</i> sp.	PKBP17
	<i>Russula</i> sp.	PKBP9, PKBP10
Sclerodermataceae	<i>Scleroderma</i> sp.	PKBP3, PKBP5, PKBP16
Tricholomataceae	<i>Tricholoma</i> sp.	PKBP22

หมายเหตุ: * หมายถึง ตัวอย่างที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ และตัวอย่างที่ PKBP19 เป็นตัวอย่างดอกเห็ดอ่อนตรวจไม่พบสปอร์ ไม่สามารถจำแนกชนิดได้

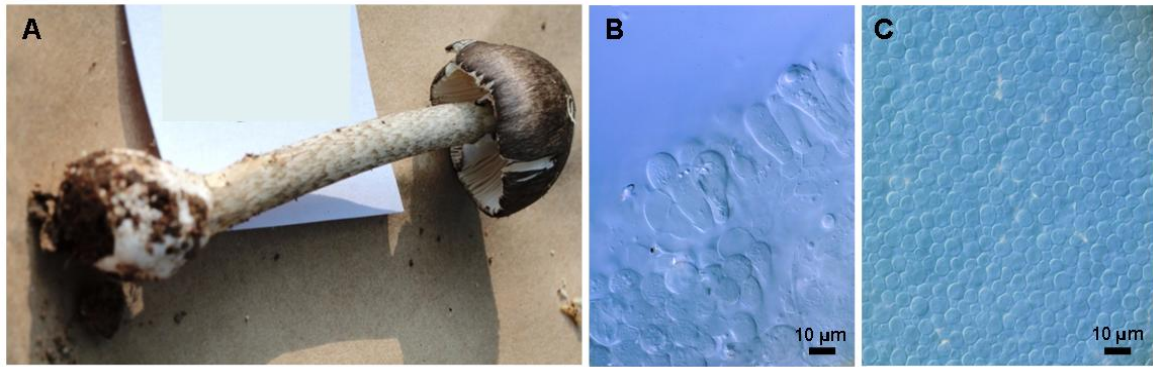
***Amanita* sp. (วงศ์ Amanitaceae)**

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP11 (ภาพประกอบ 28)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

หมวก = มีรูปร่างคล้ายร่มสีน้ำตาล น้ำตาล ผิวเรียบ มีขนาด 1.8 เซนติเมตร ครีบ = มีสีขาวเรียงตัวสม่ำเสมอ ก้าน = มีรูปร่างทรงกระบอกยาวตรงโคนเป็นกระเปาะ ก้านมีสีขาวสลับกับสีน้ำตาลเป็นรูปรอยหยัก ขนาด 0.5 × 4.5 เซนติเมตร สปอร์ = ไม่พบ

หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ และมีรายงานว่าเป็นเห็ดพิษ



ภาพประกอบ 28 *Amanita* sp. PKBP11 (A) ดอกเห็ด และ (B-C) เนื้อเยื่อใต้หมวก

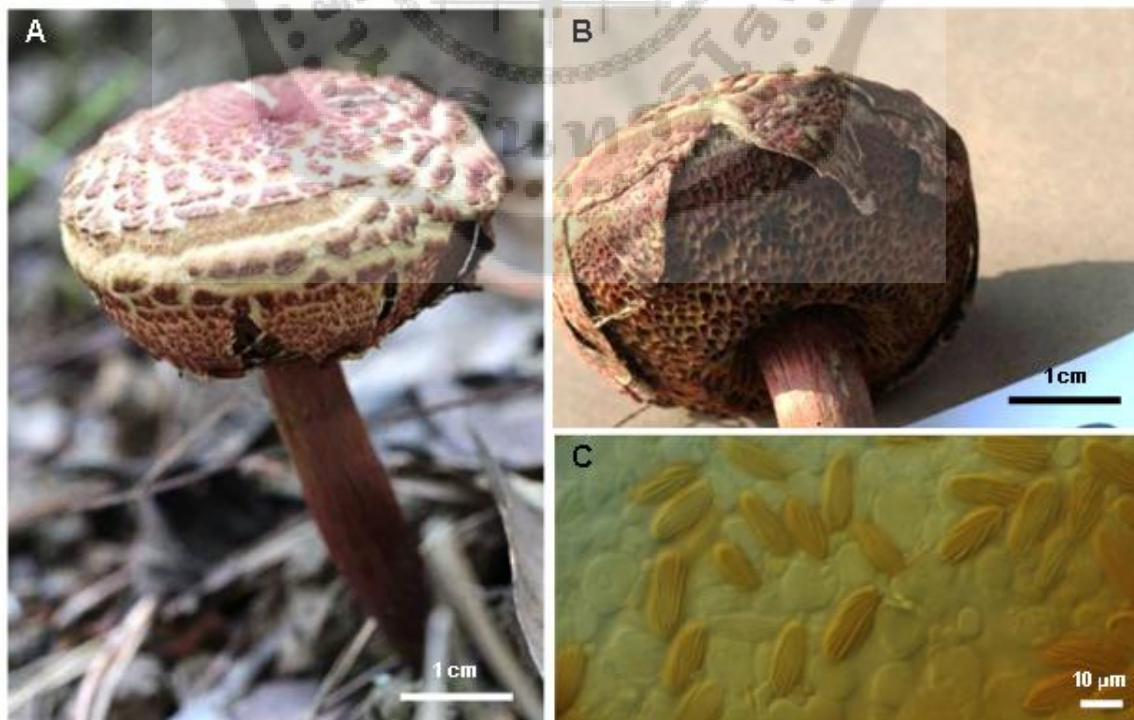
***Boletellus* sp. (วงศ์ Boletaceae)**

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP23 (ภาพประกอบ 29)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

หมวก = มีรูปร่างโค้งนูน มีเกล็ดสีน้ำตาลแดงอยู่บนผิวหมวก เนื้อเยื่อใต้หมวกฉีกขาด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 4 เซนติเมตร ครีบ = ไม่มีแต่มีลักษณะเป็นรูกว้าง (pore) ก้าน = ทรงกระบอกยาวสีน้ำตาลแดง ขนาด 0.9×4.9 เซนติเมตร สปอร์ = สีน้ำตาลอ่อน รูปร่างทรงรี ผิวเป็นลายเส้นตรงไปตามแนวยาว บางเส้นตัดกัน ขนาดกว้าง \times ยาว เท่ากับ $7-10 \times 14-21$ ไมโครเมตร

หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ และมีรายงานว่าเป็นเห็ดพิษ



ภาพประกอบ 29 *Boletellus* sp. PKBP23 (A-B) ลักษณะของดอกเห็ด และ (C) เบสิดิโอสปอร์

***Astraeus sirindhorniae* (วงศ์ Diplocystaceae)**

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP28 (ภาพประกอบ 30)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

ดอกเห็ด = มีรูปร่างกลมหรือแบน สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาล ขณะยังอ่อนมีสีขาวเหลือง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 2-5.5 เซนติเมตร ผิวเรียบและนุ่ม กลิ่นแรงคล้ายกลิ่นดินชื้น ผงชั้นนอก (exoperidium) หนา มีหลายชั้น ขนาดมากกว่า 1 mm. มีสีเหลือง สีน้ำตาล และสีน้ำตาลเข้ม เมื่อแก่เต็มที่จะมีการแตกออกลักษณะคล้ายดาว ผงชั้นใน (endoperidium) มีสีน้ำตาลอ่อนและขาว มีก้านที่เป็นลักษณะของพิเศษ (stipitate) มีสีขาว สปอร์ = สีเทาวันบุหรี รูปร่างกลม มีหนามอยู่รอบๆ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 4.5-6.6 ไมครอน

หมายเหตุ: สามารถเพาะเลี้ยงเส้นใยราบริสุทธิ์ได้บนอาหาร MNC ที่อุณหภูมิ 30°C เส้นใยเล็กละเอียด เจริญชอนกันแน่น มีสีน้ำตาลทอง เส้นใยเจริญขึ้นด้านบนมากกว่าแผ่ออกด้านข้าง เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีน้ำตาล เมื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบโครงสร้างของ clamp connection

***Gomphus* sp. (วงศ์ Gomphaceae)**

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP1, PKBP7, PKBP20, PKBP27 (ภาพประกอบ 31)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

หมวก = มีรูปร่างเป็นทรงกรวยลึก มีสีส้มตรงกลาง ส่วนขอบนอกเป็นสีเหลืองอ่อน พื้นผิวขรุขระ ขอบเป็นคลื่น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 3 เซนติเมตร ครีบ = มีลักษณะเป็นสันเตี้ยบางอันเชื่อมกันเป็นตาข่าย ก้าน = มีรูปร่างเรียวยาวจากปลายสู่โคนดอก สีเหลืองอ่อน ขนาด 0.5-1.1 × 1.5-3 เซนติเมตร สปอร์ = รูปร่างทรงรี ผิวขรุขระ ปลายของสปอร์ด้านหนึ่งมีติ่ง มีขนาด 4-7 × 7-15 ไมโครเมตร

หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้

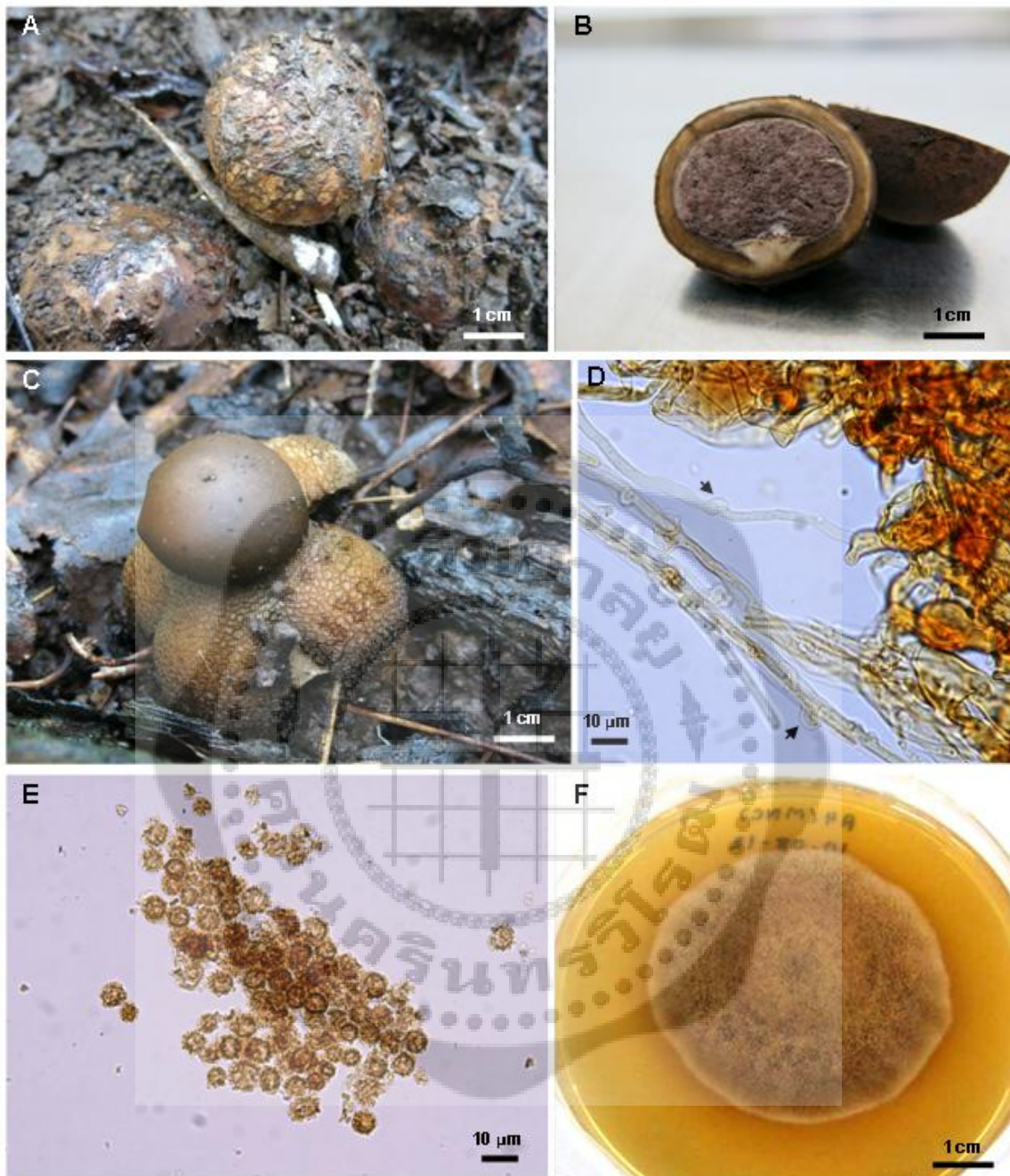
***Inocybe* sp. (วงศ์ Inocybaceae)**

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP26 (ภาพประกอบ 32)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

หมวก = มีรูปร่างทรงกลม สีน้ำตาลอ่อน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 2.5 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีผิวเรียบ ครีบ = เรียงไม่ติดกับก้าน ก้าน = มีรูปร่างทรงกระบอกสีขาว ผิวเรียบ มีขนาด 1 × 1.8 เซนติเมตร สปอร์ = รูปร่างกลมรี ผิวขรุขระ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.3-7.2 ไมโครเมตร

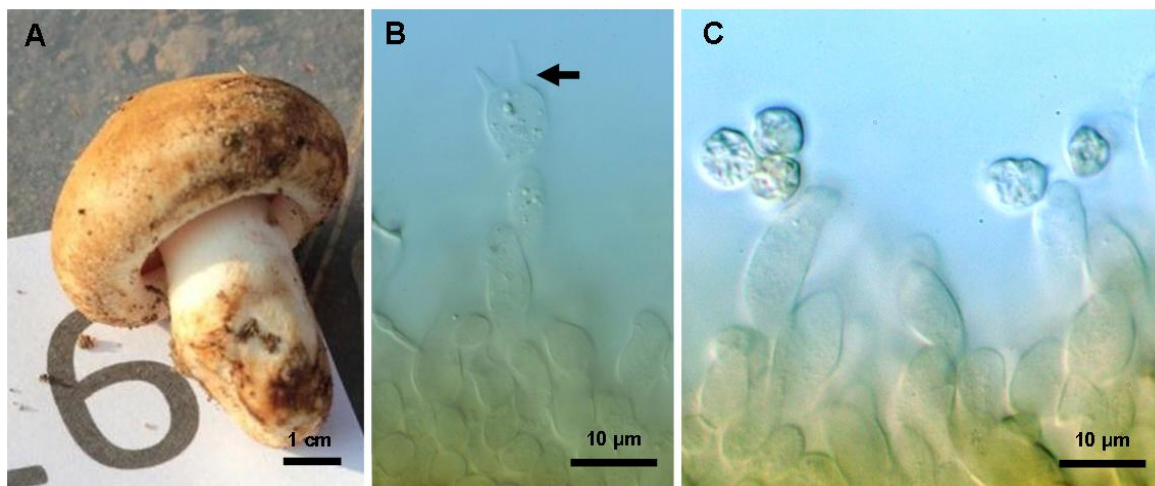
หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้



ภาพประกอบ 30 *Astraeus sirindhorniae* PKBP28 (A-C) ลักษณะของดอกเห็ด (D) ลักษณะของเส้นใยที่มีโครงสร้าง clamp connection (ลูกศร) (E) เบสิดิโอสปอร์ และ (F) ลักษณะของเส้นใยที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MNC



ภาพประกอบ 31 *Gomphus* sp. PKBP27 (A-B) ลักษณะของดอกเห็ด (C) เบสิดิเทียม (ลูกศร) และ เบสิดิโอสปอร์ (D) เบสิดิโอสปอร์



ภาพประกอบ 32 *Inocybe* sp. PKBP26 (A) ลักษณะของดอกเห็ด (B) เบสิดีเยม (ลูกศร) และ (C) เบสิดิโอสปอร์

***Lactarius* sp. (วงศ์ Russulaceae)**

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP17 (ภาพประกอบ 33)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

หมวก = มีรูปร่างคล้ายจาน สีส้มอ่อน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 4.5 เซนติเมตร พื้นผิวหมวกเรียบ ครีบ = ของเห็ดชนิดนี้เรียงตัวไม่สม่ำเสมอ มีครีบเล็กสลับกับครีบยาว ก้าน = ทรงกระบอกสีส้มอ่อนกว่าหมวก มีผิวเรียบ ขนาด 0.7×2.2 เซนติเมตร สปอร์ = สีใส รูปร่างกลม มีหนามอยู่โดยรอบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 7-8 ไมโครเมตร
หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้

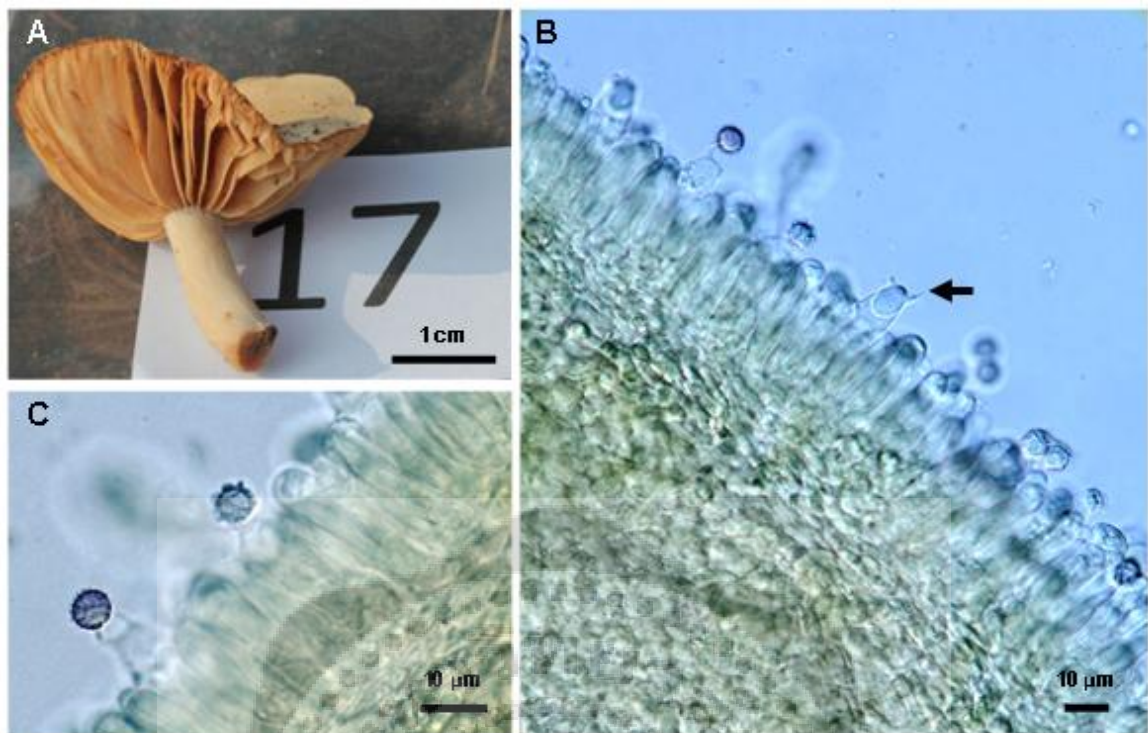
***Mycoamanranthus* sp. (วงศ์ Boletaceae)**

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP8 (ภาพประกอบ 34)

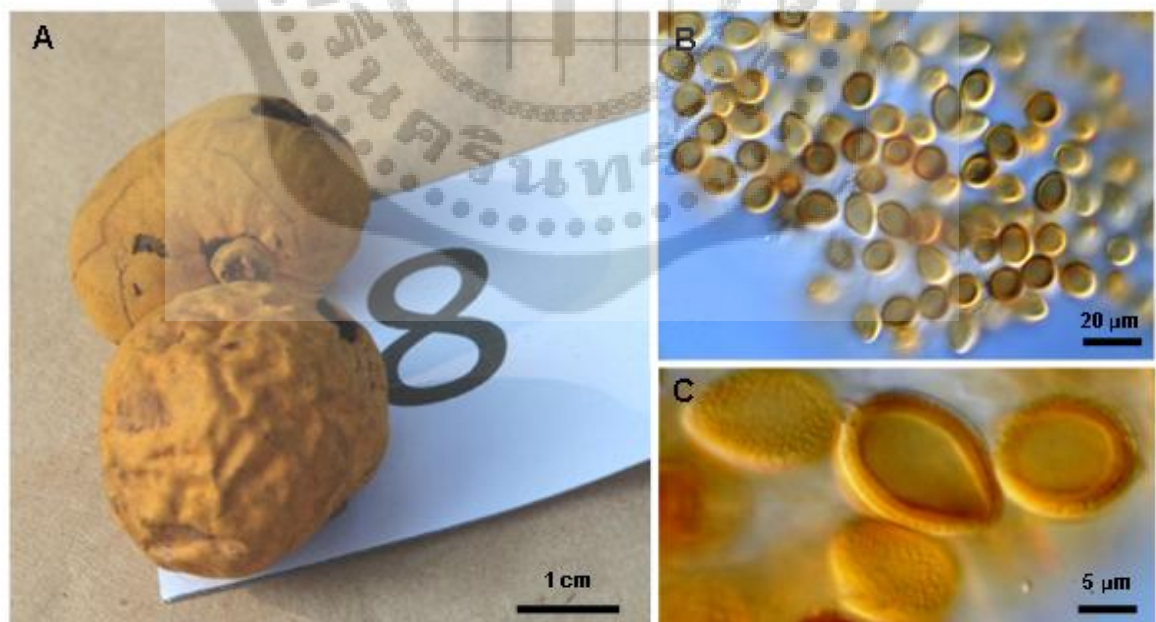
ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

ดอกเห็ด = มีรูปร่างค่อนข้างกลม สีเหลืองขมื่น ผิวมีลักษณะขรุขระ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 2.5 เซนติเมตร สปอร์ = สีน้ำตาล รูปร่างหยดน้ำ ผิวขรุขระ ผนังหนา มีขนาดเท่ากับ $7-9 \times 9-14$ ไมโครเมตร

หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้



ภาพประกอบ 33 *Lactarius* sp. PKBP17 (A) ลักษณะของดอกเห็ด (B) เบสิดีเยม (ลูกศร) และ เบสิดิโอสปอร์ (C) เบสิดิโอสปอร์



ภาพประกอบ 34 *Mycoamanranthus* sp. PKBP8 (A) ลักษณะของดอกเห็ด และ (B-C) เบสิดิโอสปอร์

***Pulveroboletus* sp. (วงศ์ Boletaceae)**

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP13, PKBP14, PKBP21 (ภาพประกอบ 35)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

หมวก = มีรูปร่างคล้ายร่ม มีสีเหลือง พื้นผิวมีฝุ่นสีเหลืองปกคลุมอยู่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

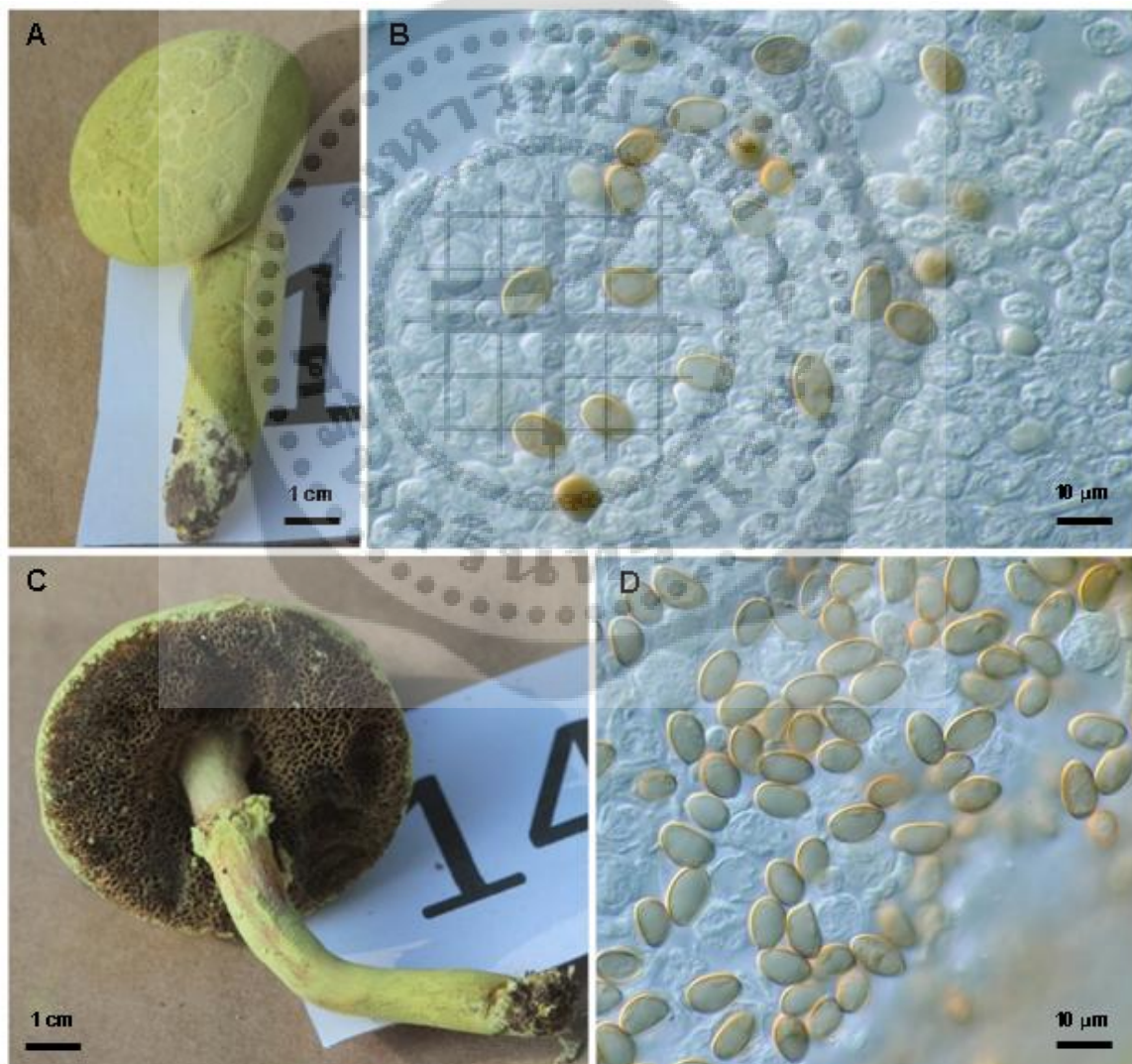
เท่ากับ 2.2-4 เซนติเมตร ครีบ = ไม่มี มีรูพรุนคล้ายฟองน้ำ (pores) ใต้ดอกหมวก ก้าน = เป็น

ทรงกระบอกผิวมีฝุ่นสีเหลืองปกคลุมเช่นเดียวกับหมวก ขนาดกว้าง × ยาวเท่ากับ 0.6-1.2 × 2.8-5

เซนติเมตร สปอร์ = สีเหลือง รูปร่างทรงรียาว ผิวเรียบ ขนาดกว้าง × ยาวเท่ากับ 4-6 × 4.9-9

ไมโครเมตร 3-6 × 6-10 ไมโครเมตร

หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้



ภาพประกอบ 35 ลักษณะของดอกเห็ดและเบสิดิโอสปอร์ (A-B) *Pulveroboletus* sp. PKBP13 และ (C-D) *Pulveroboletus* sp. PKBP14

Ramaria species 1 (วงศ์ Gomphaceae)

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP2 (ภาพประกอบ 36A-C)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

ดอกเห็ด = รูปร่างของเห็ดมีการแตกเป็น 2 กิ่งสั้นๆ ออกจากก้านหลักทำให้เกิดเป็นพุ่มคล้ายปะการัง มีการแตกแบบแผ่กว้าง มีสีขาวยเหลือง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 4 เซนติเมตร ผิวของเห็ดเรียบ ก้าน = มีรูปร่างทรงกระบอก สปอร์ = สีใส รูปร่างทรงรี ผิวขรุขระ ปลายด้านหนึ่งมีติ่ง ขนาดกว้าง × ยาวเท่ากับ 3.5-5 × 8-10 ไมโครเมตร

หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้

Ramaria species 2 (วงศ์ Gomphaceae)

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP4 (ภาพประกอบ 36D-F)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

ดอกเห็ด = รูปร่างของเห็ดมีการแตกเป็น 2 กิ่ง มีขนาดยาว ออกจากก้านหลักทำให้เกิดเป็นพุ่มคล้ายปะการัง มีการแตกแบบแผ่กว้าง มีสีเทา มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 7 เซนติเมตร ผิวของเห็ดเรียบ ก้าน = สีขาว มีรูปร่างทรงกระบอก สปอร์ = สีเหลือง รูปร่างทรงรี ผิวขรุขระ ปลายด้านหนึ่งมีติ่ง ขนาดกว้าง × ยาวเท่ากับ 3-6 × 9.5-12.5 ไมโครเมตร

หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้

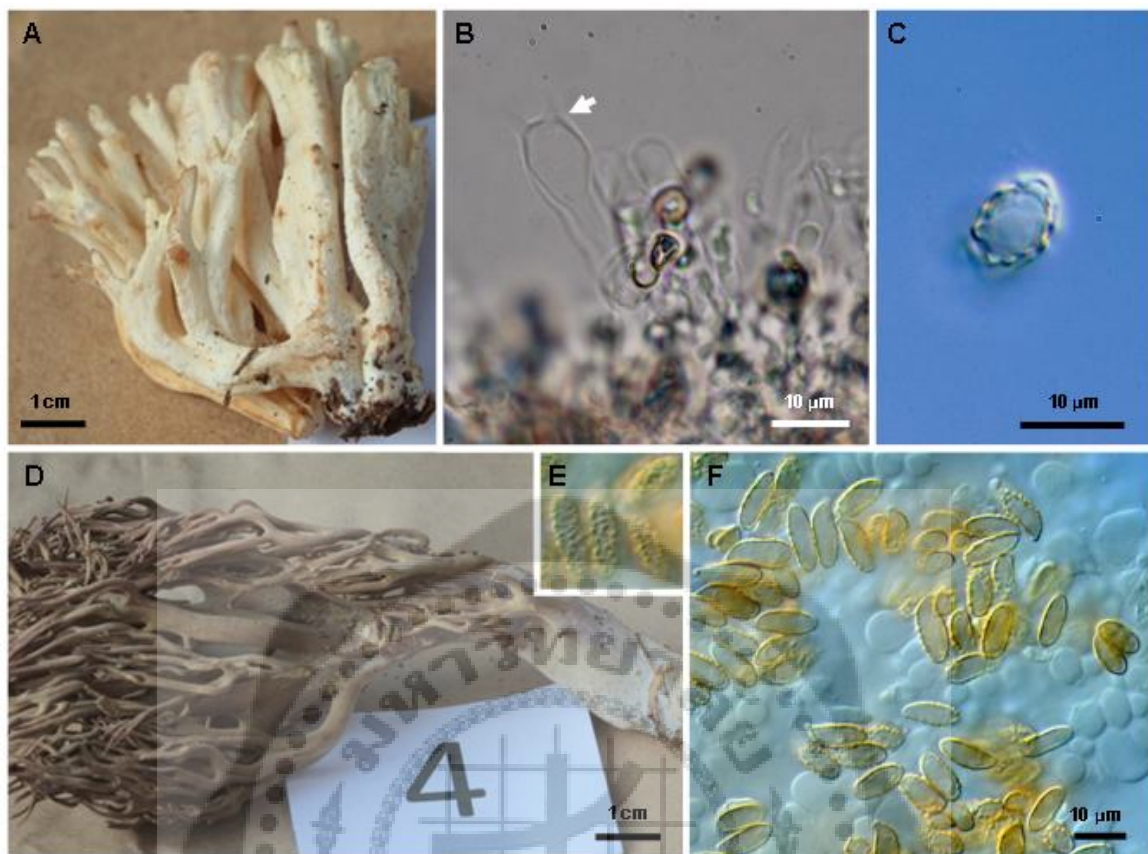
Ramaria species 3 (วงศ์ Gomphaceae)

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP6 (ภาพประกอบ 37A-C)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

ดอกเห็ด = รูปร่างของเห็ดมีการแตกเป็น 2 กิ่ง มีขนาดยาว ออกจากก้านหลักทำให้เกิดเป็นพุ่มคล้ายปะการัง มีการแตกแบบแผ่กว้าง มีสีเทาเข้ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 4 เซนติเมตร ผิวของเห็ดเรียบ ก้าน = สีขาว มีรูปร่างทรงกระบอก สปอร์ = สีเหลือง รูปร่างทรงรี ผิวขรุขระ ปลายด้านหนึ่งมีติ่ง ขนาดกว้าง × ยาวเท่ากับ 4-5.5 × 8-14 ไมโครเมตร

หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้



ภาพประกอบ 36 ลักษณะของดอกเห็ดและเบสิดิโอสปอร์ (A-C) *Ramaria* species 1 PKBP02 และ (D-F) *Ramaria* species 2 PKBP04

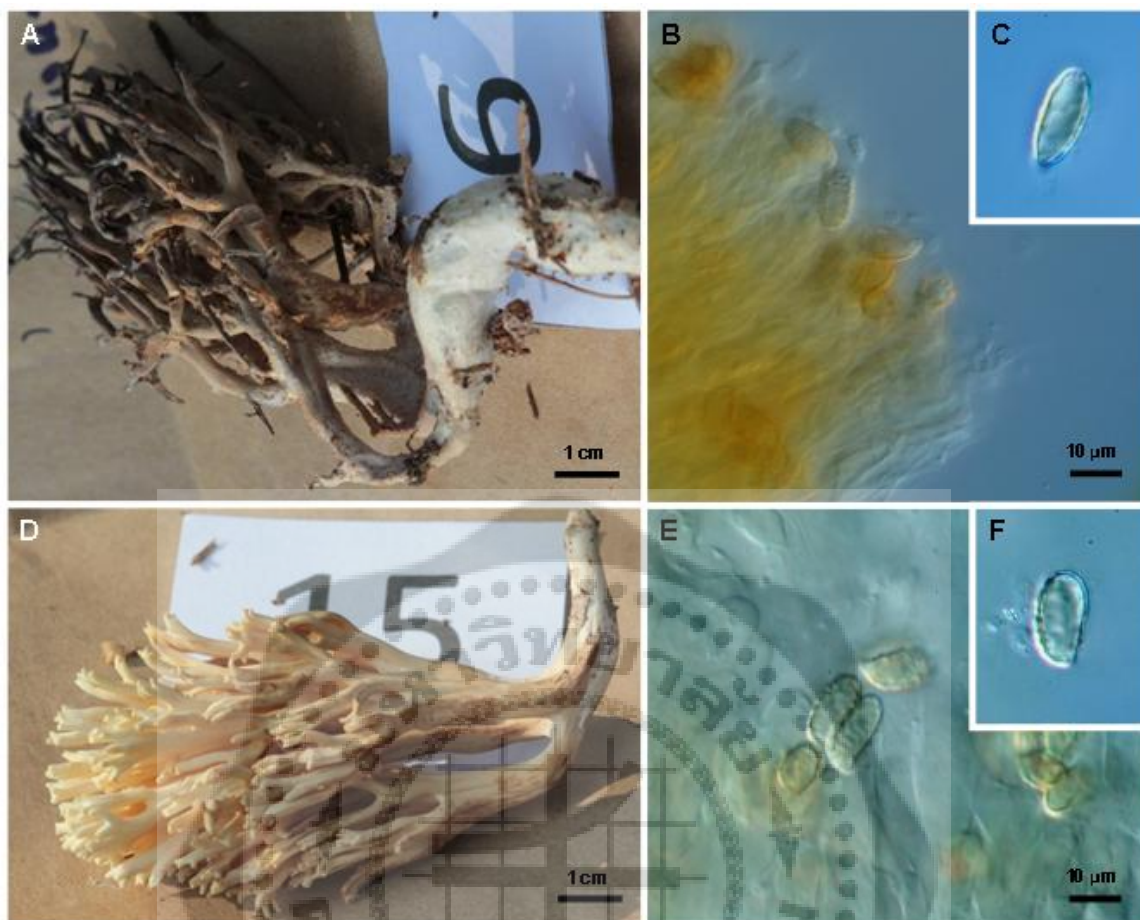
***Ramaria* species 4 (วงศ์ Gomphaceae)**

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP15 (ภาพประกอบ 37D-F)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

ดอกเห็ด = รูปร่างของเห็ดมีการแตกเป็น 2 กิ่ง ออกจากก้านหลักทำให้เกิดเป็นพุ่มคล้ายปะการัง สีขาวเหลือง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 4 เซนติเมตร ผิวของเห็ดเรียบ ก้าน = มีรูปร่างทรงกระบอก สปอร์ = สีเหลืองอ่อน รูปร่างทรงรี ผิวขรุขระ ปลายด้านหนึ่งมีติ่ง ขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 3-5 × 6-11 ไมโครเมตร

หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้



ภาพประกอบ 37 ลักษณะของดอกเห็ดและเบสิดิโอสปอร์ (A-C) *Ramaria* species 3 PKBP06 และ (D-F) *Ramaria* species 4 PKBP15

***Ramaria* species 5 (วงศ์ Gomphaceae)**

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP18 (ภาพประกอบ 38A-C)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

ดอกเห็ด = รูปร่างของเห็ดมีการแตกเป็น 2 กิ่ง ออกจากก้านหลักทำให้เกิดเป็นพุ่มคล้ายปะการัง มีการแตกแบบแผ่กว้าง มีสีขาวเหลือง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 4 เซนติเมตร ผิวของเห็ดเรียบ ก้าน = มีรูปร่างทรงกระบอก สปอร์ = สีใส รูปร่างทรงรี ผิวขรุขระ ปลายด้านหนึ่งมีติ่ง ขนาดกว้าง × ยาวเท่ากับ 4-4.6 × 9-10 ไมโครเมตร

หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้

Ramaria species 6 (วงศ์ Gomphaceae)

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP24 (ภาพประกอบ 38D-E)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

ดอกเห็ด = รูปร่างของเห็ดมีการแตกเป็น 2 กิ่ง ออกจากก้านหลักทำให้เกิดเป็นพุ่มคล้ายปะการัง มีลักษณะโค้งงอ มีการแตกแบบแผ่กว้าง มีสีขาวเหลืองปนน้ำตาล มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 3.5 เซนติเมตร ผิวของเห็ดเรียบ ก้าน = มีรูปร่างทรงกระบอก สปอร์ = สีใสถึงเหลืองอ่อน รูปร่างทรงรี ผิวขรุขระ ปลายด้านหนึ่งมีติ่ง ขนาดกว้าง × ยาวเท่ากับ 4-5 × 7-11 ไมโครเมตร
หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้

Ramaria species 7 (วงศ์ Gomphaceae)

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP25 (ภาพประกอบ 38F-H)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

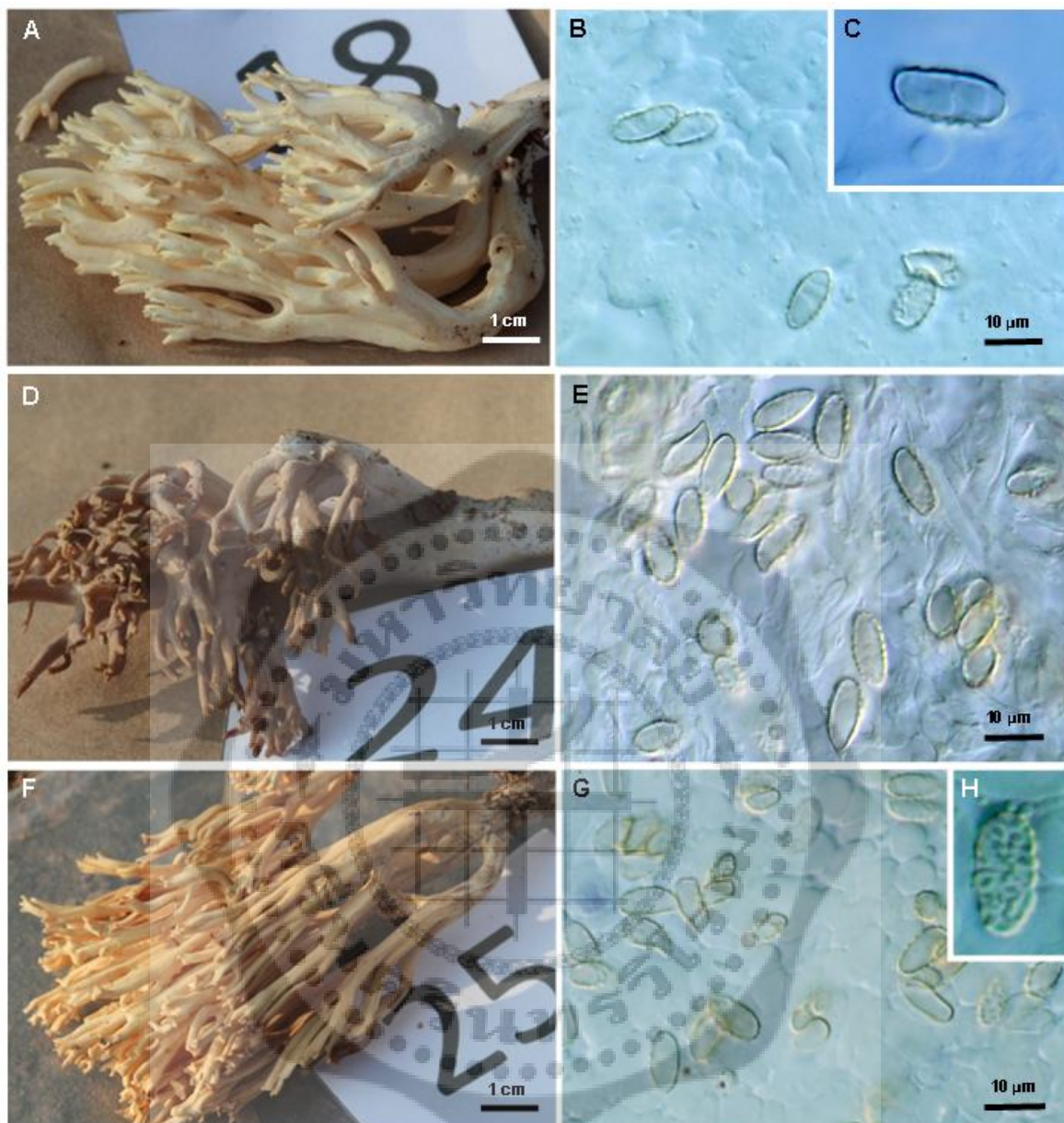
ดอกเห็ด = รูปร่างของเห็ดมีการแตกเป็น 2 กิ่ง ออกจากก้านหลักทำให้เกิดเป็นพุ่มคล้ายปะการัง มีการแตกแบบแผ่กว้าง มีสีน้ำตาลส้ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 4.5 เซนติเมตร ผิวของเห็ดเรียบ ก้าน = มีรูปร่างทรงกระบอก สปอร์ = สีเหลืองอ่อน รูปร่างทรงรี ผิวขรุขระ ปลายด้านหนึ่งมีติ่ง ขนาด 4-5.5 × 7.5-11 ไมโครเมตร
หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้

Russula sp. (วงศ์ Russulaceae)

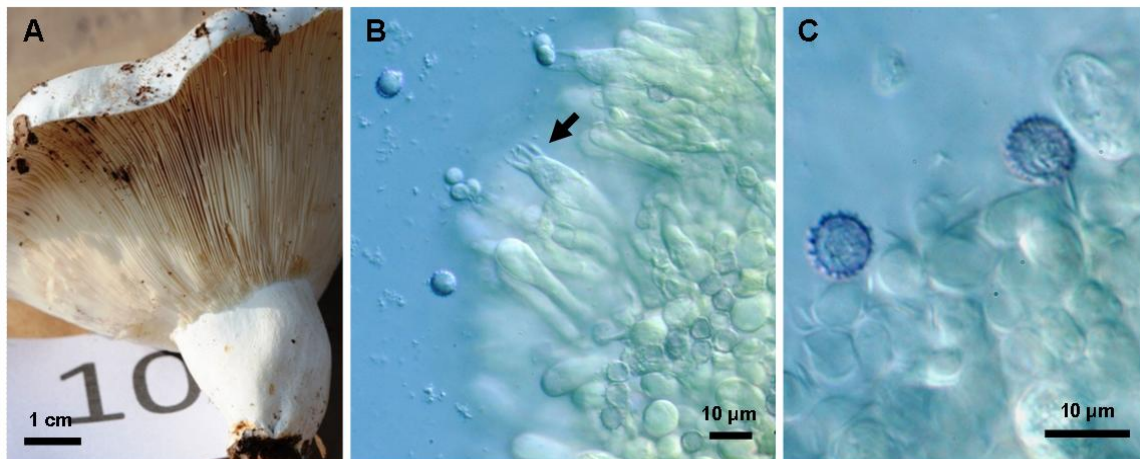
ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP9 และ PKBP10 (ภาพประกอบ 39)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

หมวก = มีรูปร่างทรงกลม เว้าตรงกลาง สีขาว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6-8 เซนติเมตร พื้นผิวเรียบ ครีบ = ด้านที่ติดกับก้านเรียงตัวสม่ำเสมอ ส่วนด้านบนมีการเรียงตัวแตกสาขาออกไปเป็นตาข่าย ก้าน = ของเห็ดมีรูปร่างเรียวยาวลงสีขาวเช่นเดียวกับหมวก ขนาดกว้าง × ยาวเท่ากับ 1.7 × 2.7 เซนติเมตร สปอร์ = มีรูปร่างกลม ด้านหนึ่งมีติ่งที่ปลายและผิวมีหนามโดยรอบ สปอร์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 5-6 ไมโครเมตร
หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้



ภาพประกอบ 38 ลักษณะดอกเห็ดและเบสิดิโอสปอร์ (A – C) *Ramaria* species 5 PKBP18, (D – E) *Ramaria* species 6 PKBP24 และ (F – H) *Ramaria* species 7 PKBP25



ภาพประกอบ 39 *Russula* sp. PKBP10 (A) ลักษณะของดอกเห็ด (B) เบสิดีเทียม (ลูกศร) และ (C) เบสิดิโอสปอร์

***Scleroderma* sp. (วงศ์ Sclerodermataceae)**

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP3, PKBP5, PKBP16 (ภาพประกอบ 40)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

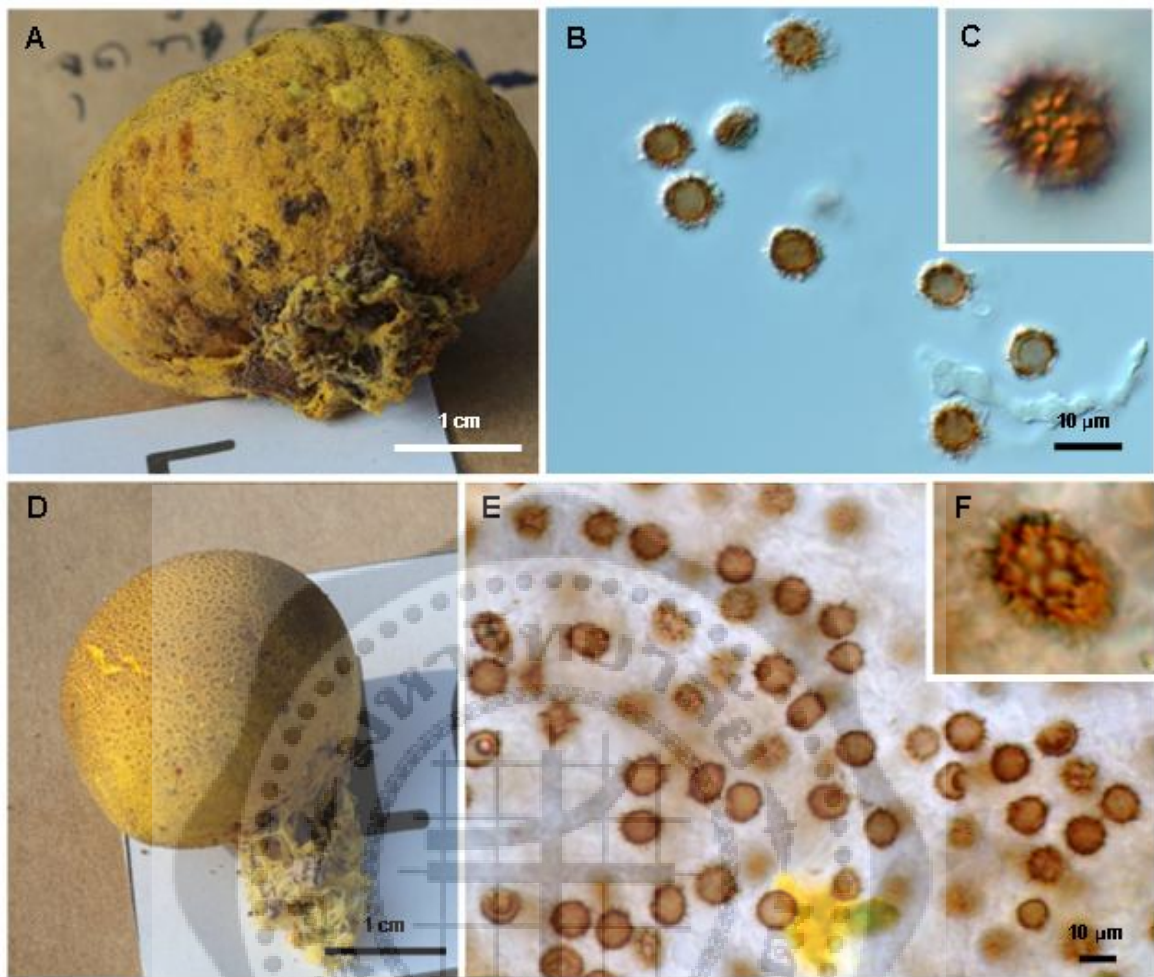
ดอกเห็ด = มีลักษณะค่อนข้างกลม ผิวขรุขระ มีสีเหลืองสด และมีตุ่มสีน้ำตาลเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป
 ฝัก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 2.4-5 เซนติเมตร ตรงโคนมีเส้นใยสีเหลืองรวมตัวอยู่ สปอร์ =
 รูปร่างกลม สีน้ำตาล มีหนวอยู่รอบๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 4-7 ไมโครเมตร
 หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้

***Tricholoma* sp. (วงศ์ Tricholomataceae)**

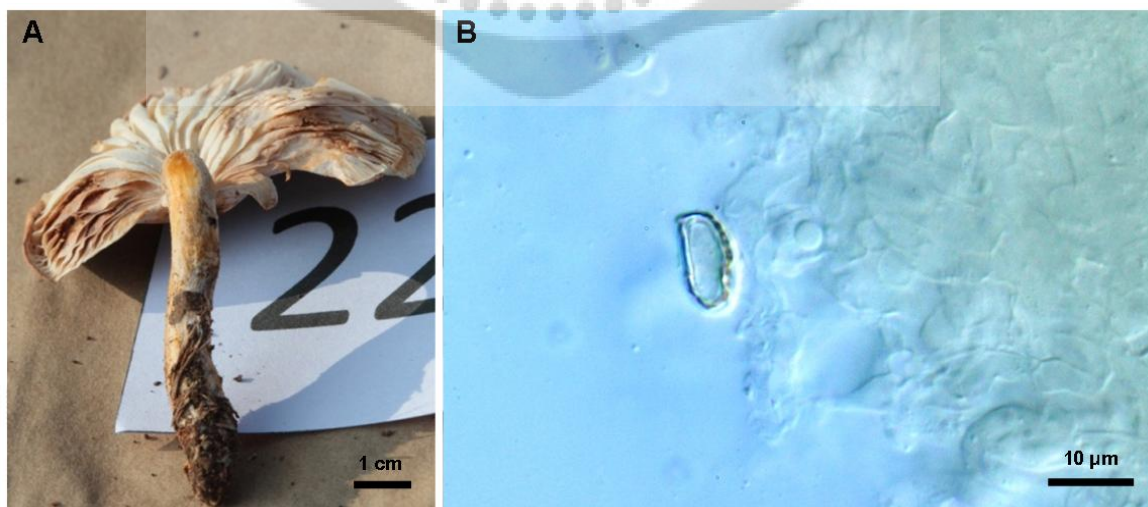
ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP22 (ภาพประกอบ 41)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

หมวก = รูปร่างทรงกลม สีเทา ตรงกลางสีดำ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 4.5 เซนติเมตร
 ดอกเห็ดมีผิวเรียบ ครีบ = เรียงตัวห่างกัน ติดกับก้าน สีขาว ก้าน = ทรงกระบอกสั้นมีสีขาว ฝัก
 เรียบ มีขนาดกว้าง × ยาวเท่ากับ 0.6 × 4 เซนติเมตร สปอร์ = สีใส รูปร่างทรงรี ผิวขรุขระ ปลาย
 ด้านหนึ่งมีติ่ง ขนาดกว้าง × ยาวเท่ากับ 4.8 × 9 ไมโครเมตร
 หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้



ภาพประกอบ 40 ลักษณะดอกเห็ดและเบสิดิโอสปอร์ (A – B) *Scleroderma* sp. PKBP5 และ (C – D) *Scleroderma* sp. PKBP16



ภาพประกอบ 41 *Tricholoma* sp. PKBP22 (A) ลักษณะของดอกเห็ด และ (B) เบสิดิโอสปอร์

Tylopilus sp. (วงศ์ Boletaceae)

ตัวอย่างที่ศึกษา: PKBP12 (ภาพประกอบ 42)

ลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญ:

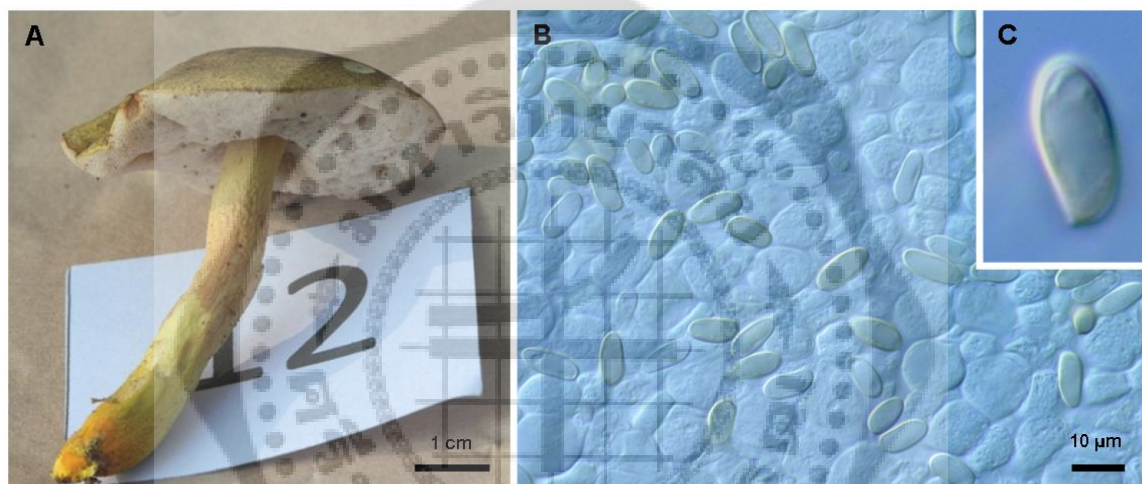
หมวก = มีรูปร่างคล้ายร่ม มีสีเหลือง พื้นผิวเรียบ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 5 เซนติเมตร

ครีบ = ไม่มี มีรูพรุนคล้ายรังผึ้ง (pores) นุ่มเหมือนฟองน้ำ ก้าน = เป็นทรงกระบอก สีเหลือง ขนาด

กว้าง × ยาวเท่ากับ 0.7 × 5.2 เซนติเมตร สปอร์ = รูปร่างทรงรียาว ผิวเรียบ สีเหลืองใส ขนาด

กว้าง × ยาวเท่ากับ 3-4 × 6-10 ไมโครเมตร

หมายเหตุ: ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้



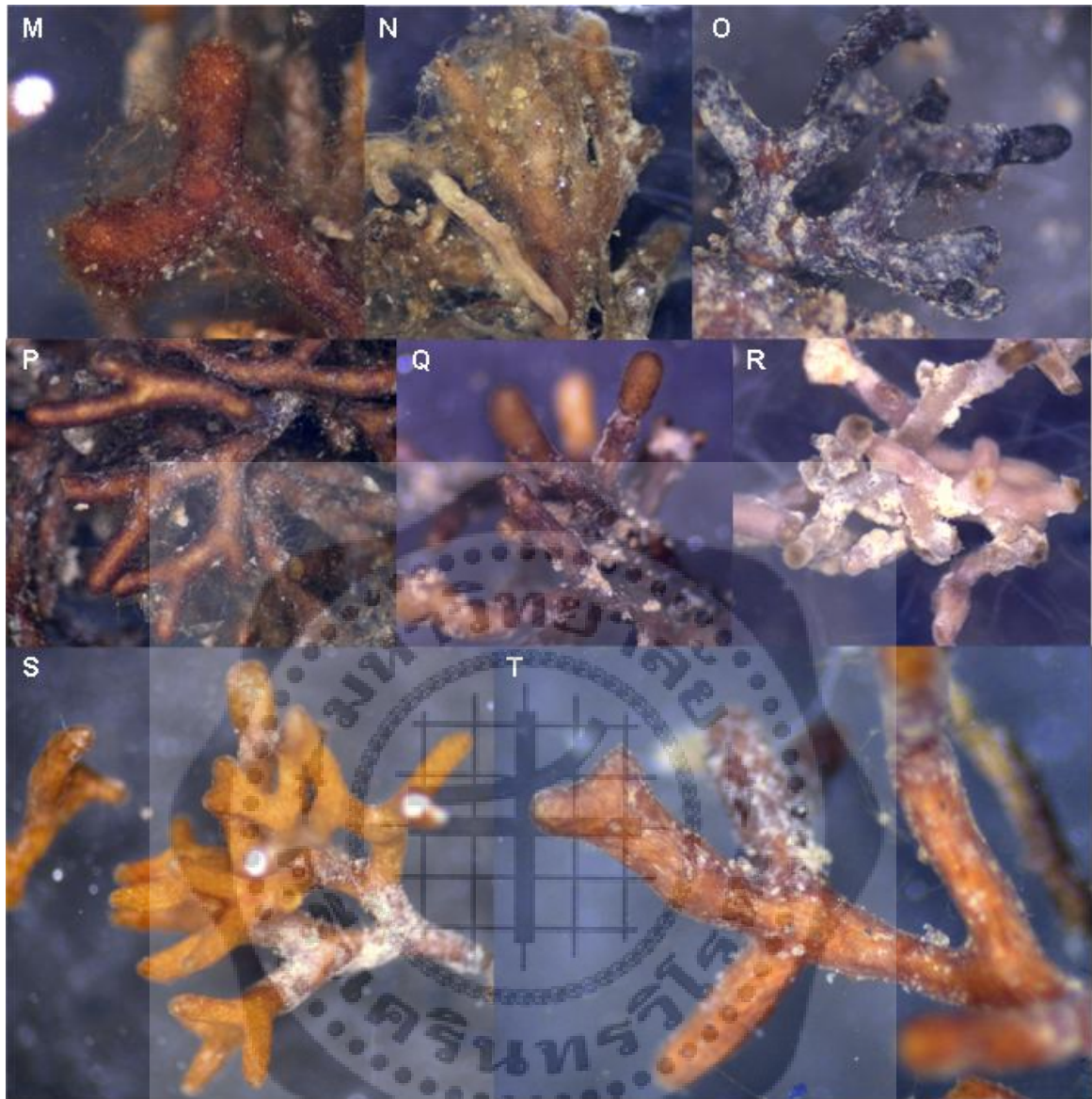
ภาพประกอบ 42 *Tylopilus* sp. PKBP12 (A) ลักษณะของดอกเห็ด และ (B-C) เบสิดิโอสปอร์

2.2 รากเอกโตไมคอร์ไรซา

ตัวอย่างรากเอกโตไมคอร์ไรซาจาก 20 จุด โดยแต่ละจุดทำการเก็บ 2 ตำแหน่ง ตามแนวรากพืช ตามที่อธิบายในวิธีการทดลองข้อ 1 ได้รากเอกโตไมคอร์ไรซาจำนวน 109 ตัวอย่าง (ตาราง 7) นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานหรือ morphotypes โดยอาศัยรูปร่าง สี การแตกกิ่ง และลักษณะของพื้นผิว ได้เท่ากับ 23 morphotypes แสดงในตาราง 9 และภาพประกอบ 43 ซึ่ง morphotype ส่วนใหญ่ที่พบคือ morphotype 14 (dichotomous, brown, smooth) รองลงมาคือ morphotype 1 (monopodial pinnate, white, smooth) และ morphotype 12 (dichotomous, orange, smooth) ตามลำดับ (ภาพประกอบ 43 และ 44) ซึ่งการจำแนกชนิดของรากเอกโตไมคอร์ไรซานี้ต้องอาศัยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเท่านั้น



ภาพประกอบ 43 ตัวอย่างรากเอกโตไมคอร์ไรซา morphotypes ต่างๆ ที่พบในพื้นที่บึงแปน (A) morphotype 1, (B) morphotype 2, (C) morphotype 4, (D) morphotype 10, (E) morphotype 17, (F) morphotype 14, (G) morphotype 12, (H) morphotype 23, (I) morphotype 12, (J) morphotype 1, (K) morphotype 2 และ (L) morphotype 12



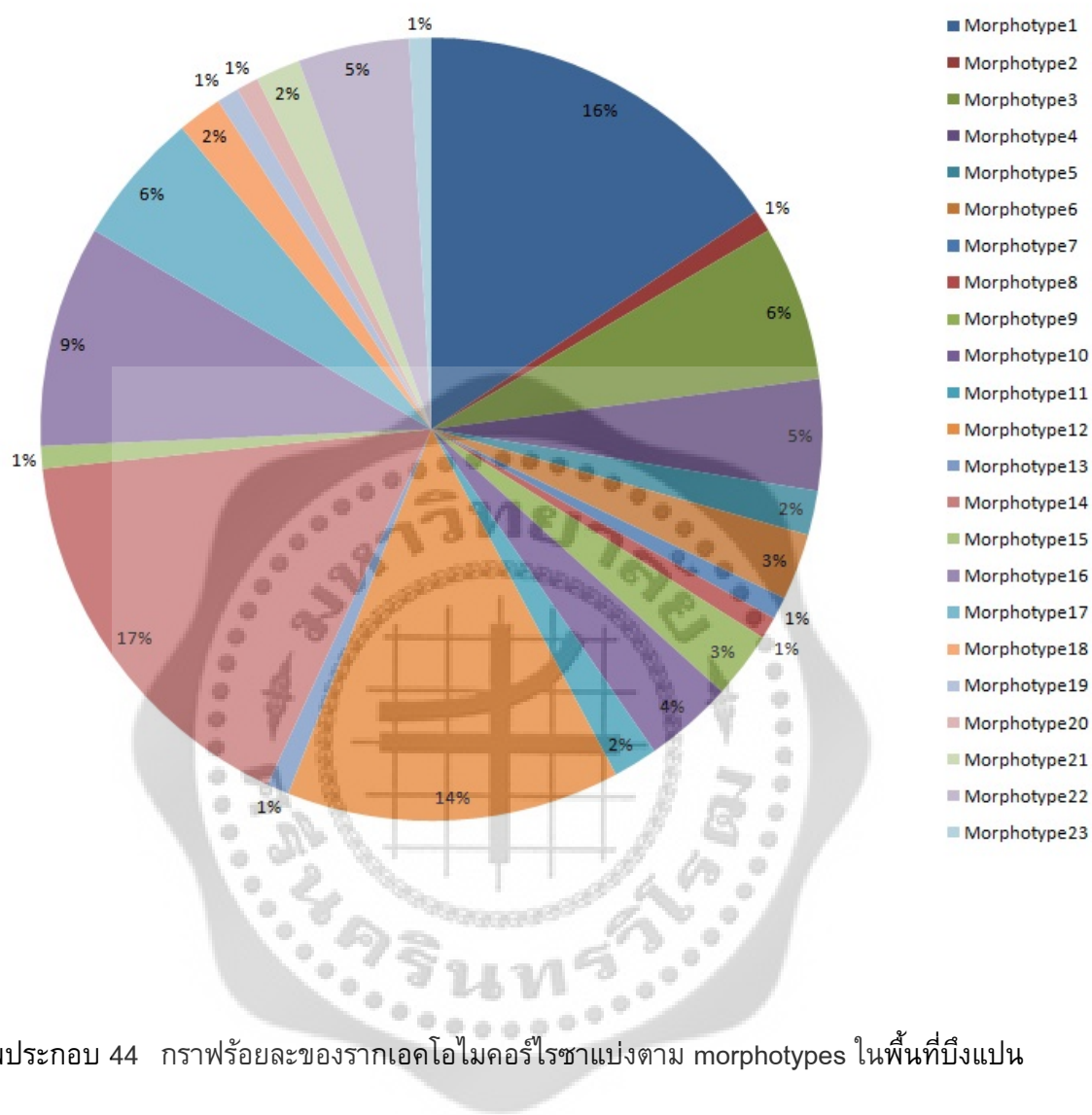
ภาพประกอบ 43 (ต่อ) (M) morphotype 15, (N) morphotype 11, (O) morphotype 16, (P) morphotype 14, (Q) morphotype 14, (R) morphotype 19, (S) morphotype 12 และ (T) morphotype 12

ตาราง 9 (ต่อ)

No.	Morphotype	จุดเก็บตัวอย่าง																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
12	Dichotomous, orange, smooth	1		2	1				1		1			3	2	1		2	1		
13	Dichotomous, pale brown, smooth	1																			
14	Dichotomous, brown, smooth	1	2	2				2			2				2	1	2	1	1	1	1
15	Dichotomous, dark brown, smooth			1																	
16	Dichotomous, black, smooth	1		1	1	1		2			1				1	1				1	
17	Dichotomous, brown with white at tip, smooth	1		2	2			1													
18	Dichotomous, brown-grey, smooth	1		1																	
19	Irregular, grey, smooth	1																			
20	Irregular, brown, smooth				1																
21	Irregular, yellow, smooth				1				1												
22	Unbranch, black, smooth					1			1	1							2				
23	Unbranch, black, hairy																1				

หมายเหตุ: * หมายถึง ตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงเส้นใยราบบริสุทธิ์ได้

พืชวงศ์ Pinaceae (จุดเก็บที่ 1, 3, 13, 14, 18), พืชวงศ์ Theaceae (จุดเก็บที่ 2), พืชวงศ์ Fagaceae (จุดเก็บที่ 4, 5, 6, 7, 9, 10, 16, 17, 20), พืชวงศ์ Euphorbiaceae (จุดเก็บที่ 8), พืชวงศ์ Dipterocarpaceae (จุดเก็บที่ 11, 12), พืชวงศ์ Ericaceae (จุดเก็บที่ 15), พืชวงศ์ Ebenaceae (จุดเก็บที่ 19)

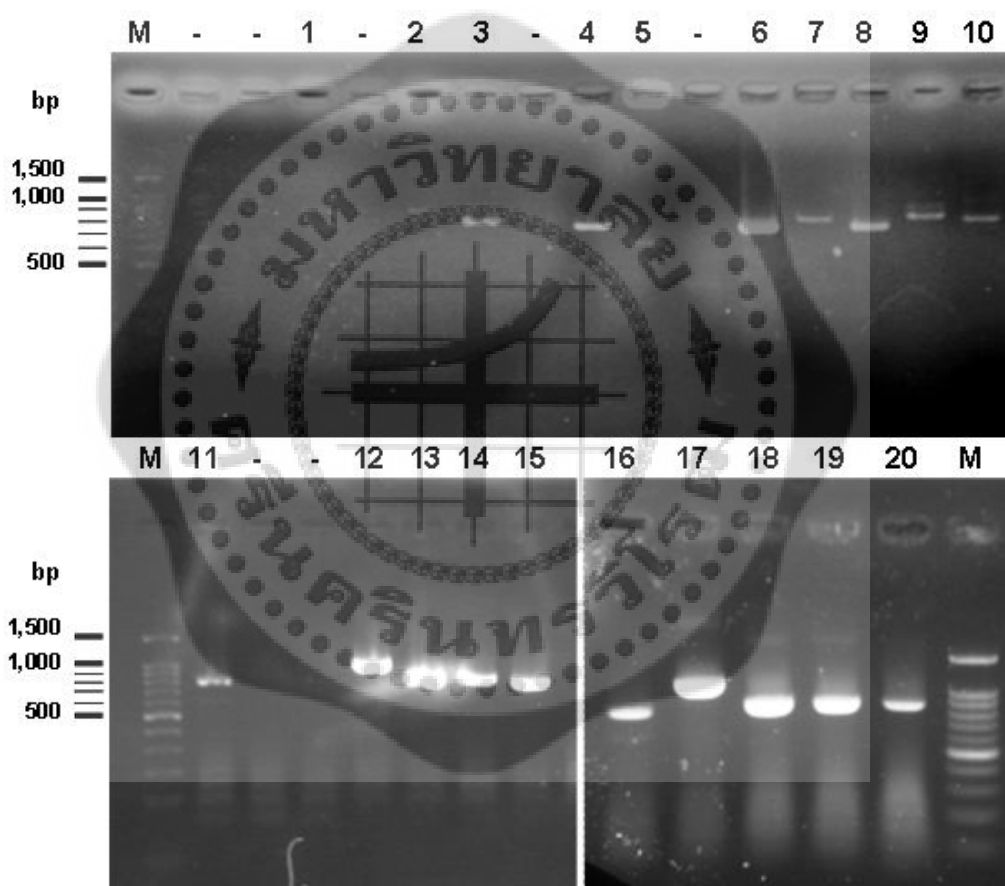


ภาพประกอบ 44 กราฟร้อยละของรากเอคโอไมคอร์ไรซาแบ่งตาม morphotypes ในพื้นที่บึงเป่น

3. การจำแนกชนิดของเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซาโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS)

3.1 เห็ดเอกโตไมคอร์ไรซา

นำเนื้อเยื่อภายในของตัวอย่างเห็ดที่เก็บรวบรวมได้จำนวน 28 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการทดลองข้อ 4.1 และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1F/ITS4B หรือ ITS1F/ITS4 หรือ ITS1/ITS4B หรือ ITS5/ITS4 รายละเอียดอธิบายในวิธีการทดลองข้อ 4.2 ซึ่งผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มีขนาดประมาณ 700-1,000 คู่เบส (ภาพประกอบ 45) จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ก่อนส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพประกอบ 45 ตัวอย่างผลอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซา (M) 100 bp DNA ladder, (1) PKBP3, (2) PKBP10, (3) PKBP11, (4) PKBP12, (5) PKBP16, (6) PKBP18, (7) PKBP19, (8) PKBP20, (9) PKBP23, (10) PKBP25, (11) PKBP27, (12) PKBP1, (13) PKBP2, (14) PKBP8, (15) PKBP14, (16) PKBP15, (17) PKBP18, (18) PKBP21, (19) PKBP26 และ (20) PKBP28

สำหรับตัวอย่างที่ไม่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ นำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์แล้วย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านก่อนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้ง ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าเห็นทั้ง 28 ตัวอย่าง จัดอยู่ใน 8 วงศ์ 13 สกุล 20 ชนิด ซึ่งวงศ์ที่พบมากที่สุดได้แก่ Gomphaceae รองลงมาคือ Boletaceae และ Russulaceae ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่ามีเพียง 5 ตัวอย่าง ที่มีค่าร้อยละความเหมือน (% similarity) สูงสุดกับเห็ดที่สามารถระบุชนิดได้มากกว่าร้อยละ 97 ได้แก่ (1) *Amanita* sp. PKBP11 ที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดกับ *Amanita fuliginea* (FJ176717) เท่ากับร้อยละ 99 (2) *Inocybe* sp. PKBP26 ที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดกับ *Inocybe ayangannae* (JN681196) เท่ากับร้อยละ 97 (3) *Ramaria* sp. PKBP18 ที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดกับ *Ramaria largentii* (KC346862) เท่ากับร้อยละ 99 (4) *Scleroderma* sp. PKBP3 ที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดกับ *Scleroderma sinnamariense* (FM213364) เท่ากับร้อยละ 97 และ (5) *Astraeus* sp. PKBP28 ที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดกับ *Astraeus sirindhorniae* (HE681772) เท่ากับร้อยละ 99 (ตาราง 10) ซึ่งเห็ดชนิดนี้เป็นเห็ดชนิดใหม่ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ พระราชทานชื่อเห็ดชนิดนี้ว่า “เห็ดเผาะสิรินธร” มีรายงานการค้นพบเพียงสองพื้นที่คือเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จ.ชัยภูมิ และ ต.ช่างเคิ่ง อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่ (Phosri; et al. 2014: 1-10) และพบว่ามี 1 ตัวอย่างของ *Tylophilus* sp. PKBP12 ที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดกับ *Tylophilus* sp. 2 CG-2012 (HE814223) เท่ากับร้อยละ 97 ซึ่งเป็นตัวอย่างของรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีรายงานจากประเทศจีน (Gao; et al. 2013: 3403-3414) ดังนั้นตัวอย่าง PKBP12 จึงยังไม่สามารถระบุชนิดในระดับสปีชีส์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีตัวอย่างถึง 5 ตัวอย่าง ที่ผลการเทียบเคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีค่าร้อยละความเหมือนน้อยกว่า 97 คืออยู่ในช่วงร้อยละ 84-92 กับเห็ดที่สามารถระบุชนิดได้ในฐานข้อมูล GenBank และ Unite (ตาราง 10) อาจเนื่องมาจากจำนวนข้อมูลที่จำกัดของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาในฐานข้อมูล ซึ่งตัวอย่างเห็ดที่ศึกษาอาจเป็นการรายงานครั้งแรกที่พบในประเทศไทยหรืออาจเป็นชนิดใหม่ ซึ่งต้องศึกษาในรายละเอียดและเทียบเคียงกับตัวอย่างเห็ดอ้างอิงต่อไป

ส่วนตัวอย่างเห็ด PKBP28 ที่แยกและเพาะเลี้ยงเส้นใยราบริสุทธิได้จากผลการทดลองในข้อ 2 ได้นำเส้นใย PKBP28-1 มาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1F/ITS4B ก่อนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าขนาดเท่ากับ 900 คู่เบส และเมื่อนำไปเทียบเคียงกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ PKBP28 ที่ได้จากเนื้อเยื่อดอกเห็ดพบว่ามีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 แสดงว่า เส้นใยราบริสุทธิที่แยกได้เป็นเส้นใยจากดอกเห็ด *A. sirindhorniae* PKBP28 จริง ซึ่งได้นำไปใช้ในการทดสอบการสร้างรากเอคโตไมคอร์ไรซาต่อไปเนื่องจาก *A. sirindhorniae* เป็นเห็ดที่สามารถรับประทานได้ (Phosri; et al. 2014: 1-10)

ตาราง 10 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซา ในฐานะข้อมูล GenBank และ Unite

วงศ์ (family)	สกุล (genus)	รหัสตัวอย่าง	จุดเก็บตัวอย่าง	ผลการเทียบเคียงความเหมือน (Blast results)	Accession No.	ร้อยละความเหมือน (% similarity)
Amanitaceae	<i>Amanita</i> sp.	PKBP11	11	<i>Amanita fuliginosa</i>	FJ176717	99%
Boletaceae	<i>Boletellus</i> sp.	PKBP23	18	<i>Boletellus</i> sp.	AM412293	84%
	<i>Mycoamanranthus</i> sp.	PKBP8	9	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Cortinarius</i>) clone SWUBC906	DQ481796	79%
	<i>Pulveroboletus</i> sp.	PKBP13	13	-	-	-
		PKBP14	14	<i>Pulveroboletus retipes</i>	HE814072	90%
		PKBP21	17	<i>Pulveroboletus retipes</i>	HE814072	90%
		PKBP12	12	<i>Tylopilus</i> sp. 2 CG-2012	HE814223	98%
Diplocystaceae	<i>Astraeus</i> sp.	PKBP28	12	<i>Astraeus sirindhorniae</i>	HE681772	99%
Gomphaceae	<i>Gomphus</i> sp. 1	PKBP1	1	<i>Gomphus</i> sp.	KC152103	84%
		PKBP7	7	<i>Gomphus bonarii</i> voucher OSC 70574	EU846244	81%
	<i>Gomphus</i> sp. 2	PKBP20	17	<i>Gomphus bonarii</i>	EU846244	92%
		PKBP27	20	<i>Gomphus bonarii</i>	EU846244	73%
		PKBP2	1	<i>Ramaria rubribrunnescens</i>	EU697262	94%
	<i>Ramaria</i> sp. 2	PKBP4	6	ND	ND	ND
	<i>Ramaria</i> sp. 3	PKBP6	7	ND	ND	ND

หมายเหตุ: “ - ” หมายถึง ไม่ทำการวิเคราะห์ “ ND ” หมายถึง “ not determined ” หรือไม่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

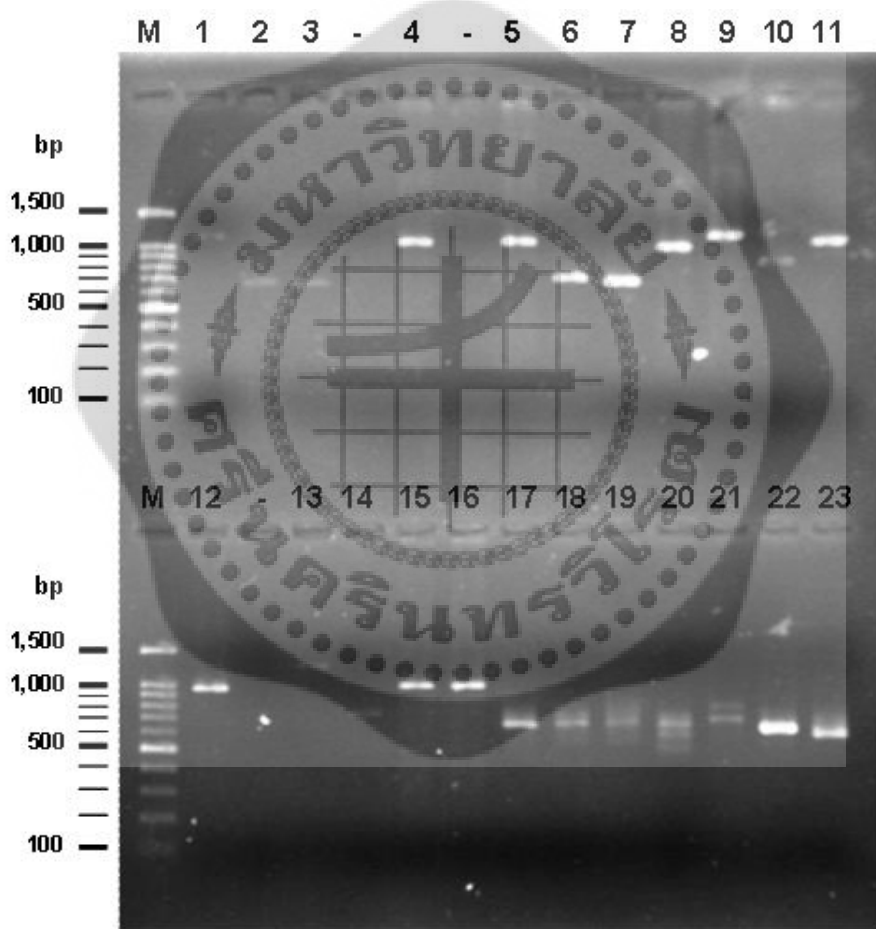
ตาราง 10 (ต่อ)

วงศ์ (family)	สกุล (genus)	รหัสตัวอย่าง	จุดเก็บตัวอย่าง	ผลการเทียบเคียงความเหมือน (Blast results)	Accession No.	ร้อยละความเหมือน (% similarity)
Gomphaceae	<i>Ramaria</i> sp. 4	PKBP15	14	<i>Ramaria gelatiniaurantia</i> var. <i>violeitingens</i>	EU697261	87%
	<i>Ramaria</i> sp. 5	PKBP18	15	<i>Ramaria largentii</i> OSC:143964	KC346862	99%
	<i>Ramaria</i> sp. 6	PKBP24	19	ND	ND	ND
	<i>Ramaria</i> sp. 7	PKBP25	19	<i>Ramaria gelatiniaurantia</i> var. <i>violeitingens</i>	EU697261	92%
Inocybaceae	<i>Inocybe</i> sp.	PKBP26	19	<i>Inocybe ayangannae</i>	JN681196	97%
Russulaceae	<i>Lactarius</i> sp.	PKBP17	15	ND	ND	ND
	<i>Russula</i> sp.	PKBP9	9	<i>Russula cascadenis</i>	FJ845426	86%
		PKBP10	11	<i>Russula cascadenis</i>	FJ845426	86%
Sclerodermataceae	<i>Scleroderma</i> sp.	PKBP3	1	<i>Scleroderma sinnamariense</i>	FM213364	97%
		PKBP5	6	-	-	-
		PKBP16	14	<i>Scleroderma sinnamariense</i>	FM21336	99%
Tricholomataceae	<i>Tricholoma</i> sp.	PKBP22	18	<i>Tricholoma saponaceum</i> var. <i>saponaceum</i> isolate OUC99343	DQ370440	96%

หมายเหตุ: “ - ” หมายถึง ไม่ทำการวิเคราะห์ “ ND ” หมายถึง “ not determined ” หรือไม่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

3.2 รากเอกโตไมคอร์ไรซา

นำตัวอย่างรากเอกโตไมคอร์ไรซาจำนวน 109 ตัวอย่าง 23 morphotypes (ตาราง 9) มาสกัดและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITSOF1/LB-W หรือ ITSOF1/ITS4 รายละเอียดอธิบายในวิธีการทดลองข้อ 4.2 พบว่าผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มีขนาดประมาณ 700-1,000 คู่เบส (ภาพประกอบ 46) จากจำนวนรากเอกโตไมคอร์ไรซาจำนวน 109 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มจำนวนได้เท่ากับ 96 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 88 และเมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และโคลนก่อนวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าจาก 96 ตัวอย่าง มีเพียง 44 ตัวอย่างที่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ และให้ผลการเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank และ Unite เป็นรากเอกโตไมคอร์ไรซาคิดเป็นร้อยละ 40.4 ผลการวิเคราะห์แสดงในตาราง 11



ภาพประกอบ 46 ตัวอย่างผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของรากเอกโตไมคอร์ไรซา (M) 100 bp DNA ladder, (1) RBP1-2, (2) RBP1-6, (3) RBP2-12, (4) RBP2-13, (5) RBP3-23, (6) RBP4-29, (7) RBP4-33, (8) RBP5-35, (9) RBP6-39, (10) RBP6-40, (11) RBP7-44, (12) RBP7-47, (13) RBP8-49, (14) RBP9-59, (15) RBP10-61, (16) RBP10-62, (17) RBP11-66, (18) RBP11-67, (19) RBP12-69, (20) RBP13-79, (22) RBP14-80 และ (23) RBP16-93

ตาราง 11 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรากเห็ดโคมะคอร์ไรซา ในฐานะข้อมูล GenBank และ Unite

วงศ์ (family)	ชนิดของราก เห็ดโคมะคอร์ไรซา	รหัสตัวอย่าง	MP	ผลการเทียบเคียงความเหมือน (Blast results)	Accession No.	ร้อยละความเหมือน (% similarity)
Amanitaceae	<i>Amanita fuliginea</i>	RBP11-66	1	<i>Amanita fuliginea</i>	FJ176717	99%
	<i>Amanita fuliginea</i>	RBP11-67b	8	<i>Amanita fuliginea</i>	FJ176717	99%
Boletaceae	<i>Xerocomus</i> sp.	RBP6-40	1	<i>Xerocomus</i> sp. UE-2006a voucher AH2005039	DQ438143	84%
Ceratobasidiaceae	<i>Ceratobasidium</i> sp.	RBP1-2	12	Ceratobasidiaceae sp.AO4-3OI	GQ175303	99%
	<i>Ceratobasidium</i> sp.	RBP4-29	20	<i>Ceratobasidium</i> sp. RGOLD2	GQ175300	93%
	<i>Ceratobasidium</i> sp.	RBP4-33	17	<i>Ceratobasidium</i> sp. RGOLD2	GQ175300	90%
Inocybaceae	<i>Inocybe</i> sp.	RBP14-80	12	<i>Inocybe jacobii</i> isolate 2000603-023 voucher UBC F19045	HQ604803	87%
Russulaceae	<i>Lactarius friabilis</i>	RBP1-6	3(14)	<i>Lactarius friabilis</i>	EF141553	99%
	<i>Lactarius hatsudake</i>	RBP3-23	12	<i>Lactarius hatsudake</i> isolate sp159	EF685098	99%
	<i>Lactarius</i> sp.1	RBP6-39a	1	<i>Lactarius</i> sp. IH2011 isolate LM4719	HQ168368	89%
	<i>Lactarius</i> sp.2	RBP7-43	1	Uncultured <i>Lactarius</i>	JF519291	95%
	<i>Lactarius</i> sp.2	RBP7-44b	14	Uncultured <i>Lactarius</i>	JF519291	95%
	<i>Lactarius</i> sp.2	RBP7-44a	14	<i>Lactarius fulvissimus</i> Estonia	UDB011533	93%

ตาราง 11 (ต่อ)

วงศ์ (family)	ชนิดของรากล เห็ดโตไมคอร์ไรซา	รหัสตัวอย่าง	MP	ผลการเทียบเคียงความเหมือน (Blast results)	Accession No.	ร้อยละความเหมือน (% similarity)
Russulaceae	<i>Lactarius</i> sp.3	RBP9-59	22	<i>Lactarius</i> sp. EMF29	JF273531	97%
	<i>Lactarius</i> sp.4	RBP16-93a	6	<i>Lactarius zonarius</i> Estonia	UDB011468	94%
	<i>Lactarius</i> sp.5	RBP16-93b	6	<i>Lactarius scrobiculatus</i>	EF530942	95%
	<i>Lactarius</i> sp.6	RBP10-61	3(10)	<i>Lactarius subdulcis</i> voucher BB45	HM189800	93%
	<i>Russula</i> aff. <i>compacta</i>	RBP10-61	3(10)	<i>Russula</i> aff. <i>compacta</i> AV04130	DQ422001	99%
	<i>Russula</i> sp.1	RBP2-12	10	<i>Russula</i> cf. <i>pectinata</i> 001114-28	HQ604835	87%
	<i>Russula</i> sp.1	RBP8-49b	21	Uncultured <i>Russula</i>	HQ021946	95%
	<i>Russula</i> sp.2	RBP5-35	16(22)	<i>Russula</i> sp. ECM9	GQ900533	98%
	<i>Russula</i> sp.3	RBP6-39b	1	<i>Russula aeruginea</i>	UDB011310	93%
	<i>Russula</i> sp.4	RBP7-46a	14	<i>Russula parazurea</i> voucher MF01.10.2003	DQ422007	85%
	<i>Russula</i> sp.4	RBP7-46b	14	<i>Russula parazurea</i> voucher MF01.10.2003	DQ422007	87%
	<i>Russula</i> sp.5	RBP7-47	16	<i>Lactarius cinereus</i>	FJ348708	85%
	<i>Russula</i> sp.6	RBP10-62	12	<i>Russula</i> aff. <i>compacta</i> AV04130	DQ422001	94%
	<i>Russula</i> sp.6	RBP10-63	3(10)	<i>Russula</i> aff. <i>compacta</i> AV04130	DQ422001	93%
	<i>Russula</i> sp.7	RBP13-79a	9	<i>Russula pallescens</i>	FJ627038	90%
	<i>Russula</i> sp.8	RBP13-79b	9	<i>Russula japonica</i>	AB509603	93%

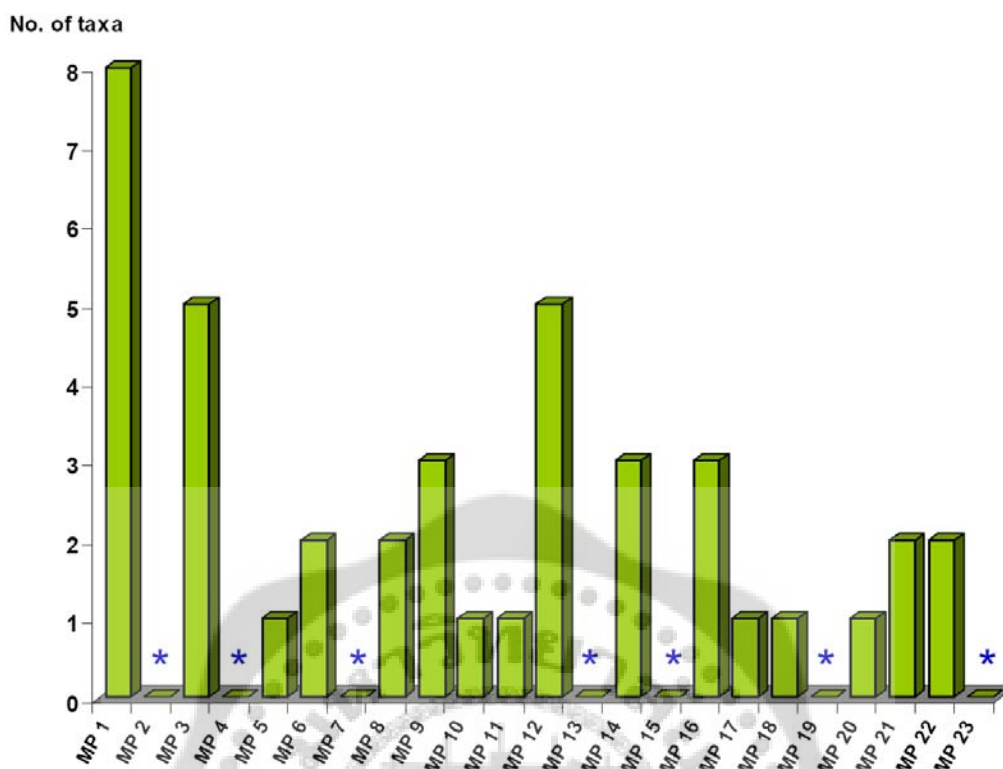
ตาราง 11 (ต่อ)

วงศ์ (family)	ชนิดของราก เอคโตไมคอร์ไรซา	รหัสตัวอย่าง	MP	ผลการเทียบเคียงความเหมือน (Blast results)	Accession No.	ร้อยละความเหมือน (% similarity)
Sclerodermataceae	<i>Scleroderma sinnamariense</i>	RBP1-1	11	<i>Scleroderma sinnamariense</i>	HQ687222	91%
	<i>S. sinnamariense</i>	RBP2-13	11	<i>Scleroderma sinnamariense</i>	HQ687222	100%
	<i>S. sinnamariense</i>	RBP8-49a	21	<i>Scleroderma sinnamariense</i>	HQ687222	99%
	<i>S. sinnamariense</i>	RBP17-99	5	<i>Scleroderma sinnamariense</i>	FM213364	99%
Sebacinaceae	<i>Sebacina</i> sp.	RBP9-57	3	uncultured <i>Sebacina</i>	HQ154281	96%
Thelephoraceae	Thelephoraceae sp.1	RBP1-3	1(10)	Thelephoraceae sp. EMF48	JF273548	94%
	Thelephoraceae sp.1	RBP1-4	18(19)	Thelephoraceae sp. EMF48	JF273548	94%
	Thelephoraceae sp.2	RBP9-59	22	uncultured Thelephoraceae	JQ991859	91%
	Thelephoraceae sp.3	RBP12-69	1	uncultured Thelephoraceae	JF519275	96%
	<i>Tomentella</i> sp.1	RBP4-30	12	uncultured Thelephoraceae	AB839400	99%
	<i>Tomentella</i> sp.2	RBP6-38	1	uncultured <i>Tomentella</i>	FR852183	98%
	<i>Tomentella</i> sp.2	RBP10-60	3(10)	uncultured <i>Tomentella</i>	FR852183	98%
	<i>Tomentella</i> sp.3	RBP11-67a	8	uncultured <i>Tomentella</i>	FJ827249	94%
	<i>Tomentella</i> sp.4	RBP15-87	16	uncultured <i>Tomentella</i>	EF218838	96%
	<i>Tomentella</i> sp.4	RBP15-89	9	uncultured Thelephoraceae	AJ893316	97%
Dothideomycetes	<i>Cenococcum geophilum</i>	RBP2-16	14	<i>Cenococcum geophilum</i>	AB089816	98%

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ารากเอกโตไมคอร์ไรซาที่พบจัดอยู่ใน 9 วงศ์ 10 สกุล มากกว่า 30 ชนิด ซึ่งวงศ์ที่พบมากที่สุดได้แก่ Russulaceae รองลงมาคือ Thelephoraceae และผลการเทียบเคียงค่าร้อยละความเหมือนกับฐานข้อมูล GenBank และ Unite พบว่ามีจำนวนตัวอย่างเพียง 10 ตัวอย่าง (จาก 44 ตัวอย่าง) ที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดกับรากเอกโตไมคอร์ไรซาที่สามารถระบุชนิดได้มากกว่าร้อยละ 97 ทำให้สามารถระบุชนิดได้ในระดับสปีชีส์ ได้แก่ *Amantita fuliginea* (RBP11-66, RBP11-67a), *Lactarius friabilis* (RBP1-6, RBP2-23), *Russula aff. compacta* (RBP10-61), *Scleroderma sinamariense* (RBP1-1, RBP2-13, RBP8-49a, RBP17-99) และ *Cenococcum geophilum* (RBP2-16) (ตาราง 11) ทั้งนี้มีตัวอย่างที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดกับรากเอกโตไมคอร์ไรซาที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ หรือมีค่าร้อยละความเหมือนต่ำกว่า 97 มากถึง 34 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงถึงความหลากหลายของชนิดรากเอกโตไมคอร์ไรซาที่เจริญร่วมกับรากพืชอาศัยใต้ดินอีกด้วย

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานของรากเอกโตไมคอร์ไรซาซึ่งพบทั้งหมด 23 morphotypes ร่วมกับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งสามารถจัดจำแนกชนิดได้มากกว่า 30 ชนิด มีจำนวนมากกว่า morphotype เนื่องจากรากเอกโตไมคอร์ไรซาบางชนิดมีลักษณะของ morphotype เหมือนกัน (ตาราง 11 และภาพประกอบ 47) ซึ่งลักษณะของ morphotype ที่พบว่ามี ความหลากหลายของชนิดรากเอกโตไมคอร์ไรซาสูงที่สุดคือ morphotype 1 (monopodial pinnate, white, smooth) คือพบชนิดมากถึง 8 ชนิด ได้แก่ *Amanita fuliginea*, *Xenocomus* sp., *Lactarius* sp.1, *Lactarius* sp.2, *Russula* sp.3, Thelephoraceae sp.1, Thelephoraceae sp.2 และ *Tomentella* sp.2 รองลงมาคือ morphotype 3 (monopodial pinnate, brown, smooth) และ morphotype 12 (dichotomous, orange, smooth) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ารากเอกโตไมคอร์ไรซาที่จัดอยู่ใน สกุลเดียวกันอาจมีลักษณะของ morphotype ต่างกัน เช่น *Lactarius* spp. ที่มีลักษณะของ morphotype ถึง 6 ลักษณะ ได้แก่ morphotype 1, 6, 12, 14 และ 22 เป็นต้น ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับชนิดของราและพืชอาศัยที่พบรากเอกโตไมคอร์ไรซา (ตาราง 7)

ส่วนตัวอย่างรากเอกโตไมคอร์ไรซา RBP1-1 (จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ RBP1-1a, RBP1-1b, RBP1-1c และ RBP1-1d) ที่แยกและเพาะเลี้ยงเส้นใยราบริสุทธิได้จากผลการทดลองใน ข้อ 2 ได้นำเส้นใยของไอโซเลท RBP1-1a มาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มจำนวนบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS0FT/LB-W และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำไปเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน ฐานข้อมูล GenBank และ Unite พบว่ามีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ *Scleroderma sinnamariense* (HQ687222) ถึงร้อยละ 100 ทั้งนี้เส้นใยราบริสุทธิที่ได้ไม่ได้นำไปศึกษาต่อในการ ทดสอบการสร้างรากเอกโตไมคอร์ไรซาเนื่องจาก *S. sinnamariense* เป็นเห็ดที่ไม่สามารถ รับประทานได้



ภาพประกอบ 47 จำนวนชนิดของราเอกโตไมคอร์ไรซาที่พบใน 23 morphotype (MP) ของรากพืชอาศัย * หมายถึง morphotype ที่ไม่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ได้

3.3 ความสัมพันธ์ของเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซา

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดและรากเอกโตไมคอร์ไรซาจำนวน 12 และ 35 ตัวอย่าง ตามลำดับ ได้นำมาจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนสูงที่สุดกับตัวอย่างที่ศึกษาจากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 28 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม MUSCLE จากนั้นสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (phylogenetic tree) ตามที่อธิบายไว้ในวิธีการทดลองข้อ 4.6 ผลแสดงในภาพประกอบ 48

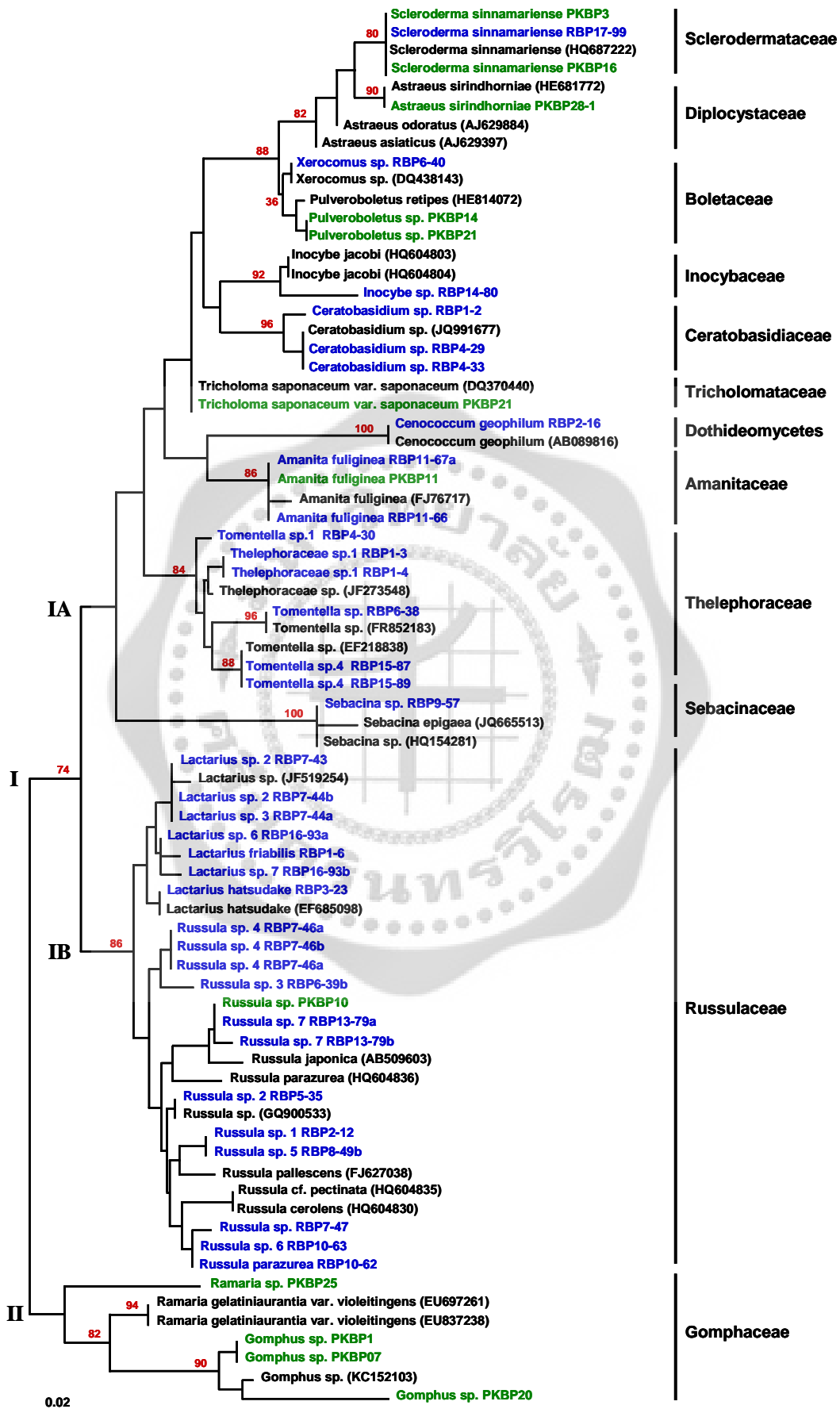
จากแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่ม (clade) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่ม 1A และ 1B ซึ่งกลุ่ม 1A ประกอบด้วยรา 10 วงศ์ ได้แก่ Amanitaceae, Diplocystaceae, Boletaceae, Ceratobasidiaceae, Inocybaceae, Sclerodermataceae, Sebacinaceae, Thelephoraceae, Tricholomataceae และ Dothideomycetes ในวงศ์ Amanitaceae พบเห็ด *Amanita fuliginea* PKBP11 และรากเอกโตไมคอร์ไรซา *A. fuliginea* RBP11-66 และ RBP11-67a ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันถึงร้อยละ 99

ซึ่งจัดอยู่ในกิ่งเดียวกัน รวมทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank (*A. fuliginea* FJ176717) และราในวงศ์ Sclerodermataceae พบเห็ด *Scleroderma sinnamariense* PKBP3 และ PKBP16 และรากเห็ดโตไมคอร์ไรซา *S. sinnamariense* RBP17-99 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันถึงร้อยละ 100 จัดอยู่ในกิ่งเดียวกัน ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ของเห็ดและรากเห็ดโตไมคอร์ไรซาที่พบในแปลงศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเห็ดโตไมคอร์ไรซาจำนวน 1 ตัวอย่างคือ *Cenococcum geophilum* RBP2-16 ที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงที่สุดกับ *C. geophilum* AB089816 จากฐานข้อมูล GenBank เท่ากับร้อยละ 100 ทั้งนี้มีรากเห็ดโตไมคอร์ไรซาจำนวน 12 ตัวอย่าง ที่จัดกลุ่มร่วมกับราที่ไม่สามารถระบุชนิดได้จากฐานข้อมูล GenBank หรือแยกออกจากราชนิดอื่น ดังนั้นรากลุ่มนี้จึงยังไม่สามารถระบุชนิดได้ในระดับสปีชีส์

ส่วนกลุ่ม 1B ประกอบด้วยราเพียง 1 วงศ์ ได้แก่ Russulaceae ซึ่งเป็นรากลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบในการศึกษานี้ มี 2 สกุลคือ *Lactarius* และ *Russula* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราสกุล *Lactarius* ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ได้จากรากเห็ดโตไมคอร์ไรซา ซึ่งในจำนวนนี้เป็นชนิดที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ในระดับสปีชีส์จำนวน 3 ชนิด ส่วนราสกุล *Russula* เป็นตัวอย่างที่ได้จากเห็ดและรากจำนวน 1 และ 8 ตัวอย่าง ตามลำดับ ตัวอย่างเห็ดคือ *Russula* sp. PKBP10 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับรากเห็ดโตไมคอร์ไรซา *Russula* sp.7 RBP13-79a เท่ากับร้อยละ 97 เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม pairwise ซึ่งจัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างอีก 14 ตัวอย่าง จากรากเห็ดโตไมคอร์ไรซาที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ และไม่พบการสร้างดอกเห็ด

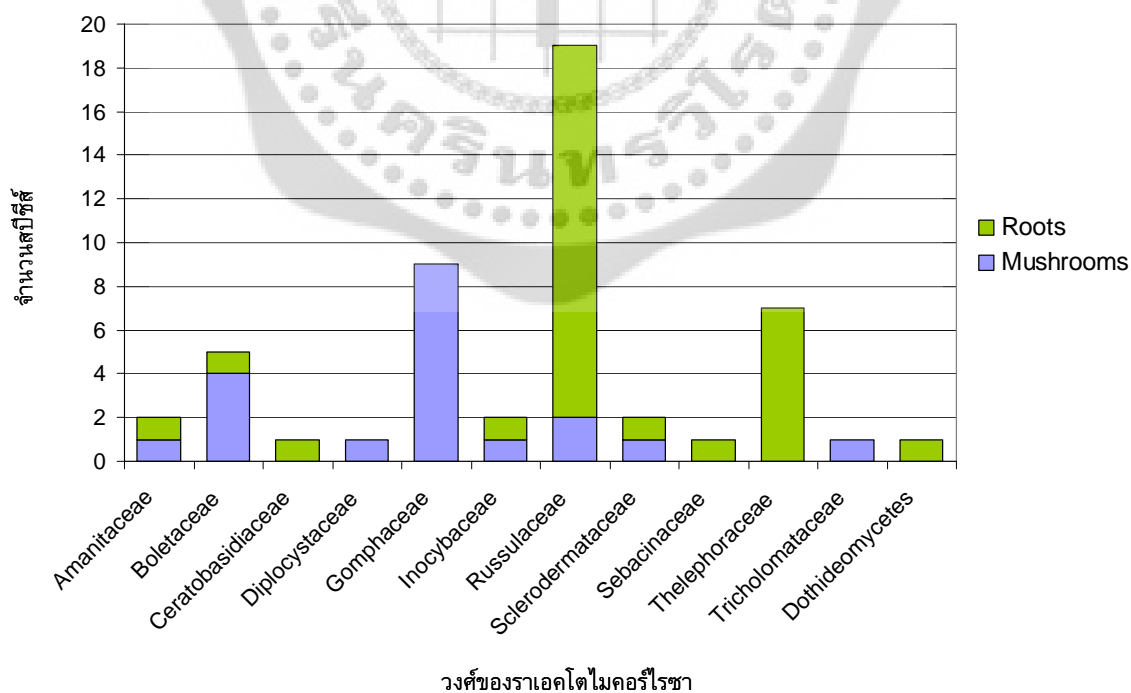
กลุ่มที่ 2 คือราวงศ์ Gomphaceae ประกอบด้วยรา 2 สกุล คือ *Ramaria* และ *Gomphus* ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้จากเห็ดทั้งหมด และไม่พบรากเห็ดโตไมคอร์ไรซาในกลุ่มนี้ ทั้งนี้เห็ด *Ramaria* sp.7 (PKBP25) ซึ่งมีค่าร้อยละความเหมือนสูงที่สุดกับ *Ramaria gelatiniaurantia* var. *violettingens* (EU697261) เท่ากับร้อยละ 92 และแยกกิ่งออกจากรากลุ่มดังกล่าวอย่างชัดเจน รวมทั้งรา *Gomphus* sp.1 (PKBP1) และ *Gomphus* sp.2 (PKBP20) ที่แยกกิ่งออกจากกันและจากราตัวอย่างราในฐานข้อมูล GenBank สอดคล้องกับค่าร้อยละความเหมือนที่มีค่า 92



ภาพประกอบ 48 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของเห็ดและรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โปรแกรม MEGA กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

หมายเหตุ: ตัวอักษรสีเขียวคือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเห็ดตัวอักษรสีน้ำเงินคือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากรากเอคโตไมคอร์ไรซา และตัวอักษรสีดำคือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank

นอกจากนี้เมื่อนำจำนวนชนิดเห็ดและรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่ได้จากการจำแนกชนิดโดยอาศัยข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานและข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS โดยการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ของวงศ์เห็ดและรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบ (ภาพประกอบ 49) ทั้งนี้พบว่ามี 5 วงศ์ ของ Amanitaceae, Boletaceae, Inocybaceae, Russulaceae และ Sclerodermataceae (จาก 12 วงศ์) ที่พบทั้งเห็ดและรากเอคโตไมคอร์ไรซา ในขณะที่มี 3 วงศ์ ของ Diplocystaceae, Gomphaceae และ Tricholomataceae ที่พบเฉพาะเห็ด และมี 4 วงศ์ ของ Ceratobasidiaceae, Sebacinaceae, Thelephoraceae และ Dothideomycetes ที่พบเฉพาะรากเอคโตไมคอร์ไรซา เท่านั้น



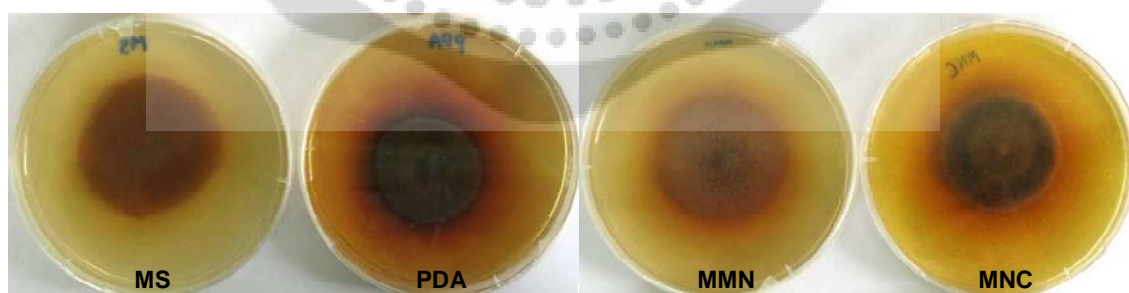
ภาพประกอบ 49 กราฟแสดงจำนวนชนิดของเห็ดและรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบในวงศ์ต่างๆ

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของราเอกโตไมคอร์ไรซาบริสุทธิ์

เนื่องจากราเอกโตไมคอร์ไรซาที่สามารถแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ได้มีจำนวน 2 ตัวอย่าง เป็นเห็ด 1 ตัวอย่าง คือ *Astraeus sirindhorniae* PKBP28 (4 ไอโซเลท ได้แก่ PKBP28-1, PKBP28-2, PKBP28-3 และ PKBP28-4) ราเอกโตไมคอร์ไรซา 1 ตัวอย่าง คือ *Scleroderma sinnamariense* (4 ไอโซเลท ได้แก่ RBP1-1a, RBP1-1b, RBP1-1c และ RBP1-1d) ดังแสดงในผลการทดลองข้อ 1 และ 3 ซึ่งในการทดลองนี้ได้เลือกเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยราบริสุทธิ์ เนื่องจากเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae*) เป็นเห็ดที่สามารถนำมารับประทานได้ แต่ *S. sinnamariense* ไม่สามารถรับประทานได้ เพื่อการเตรียมหัวเชื้อทดสอบการสร้างราเอกโตไมคอร์ไรซาในรากพืชอาศัยต่อไป ซึ่งปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่า pH และอุณหภูมิ

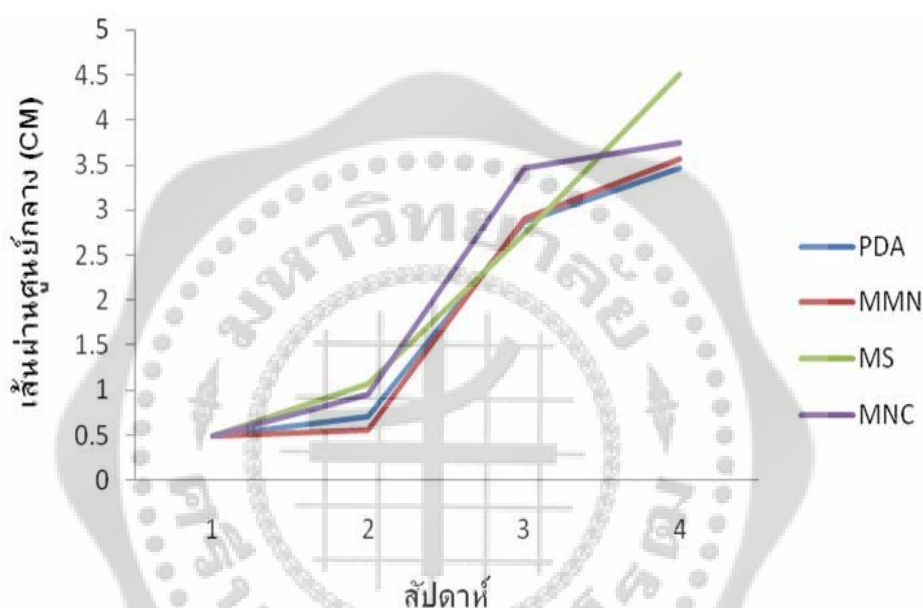
4.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 4 ชนิด ได้แก่ PDA MMN MS และ MNC ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ รายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 5.1 ผลการทดลองพบว่าลักษณะการเจริญของเส้นใยราบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด มีลักษณะคล้ายกัน คือมีสีน้ำตาลทอง เส้นใยละเอียดขนาดเล็ก มีลักษณะฟูหนา เจริญขึ้นด้านบนมากกว่าแผ่ออกมาด้านข้าง สร้างสารสีน้ำตาลออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเฉพาะบนอาหาร PDA และ MNC (ภาพประกอบ 50)

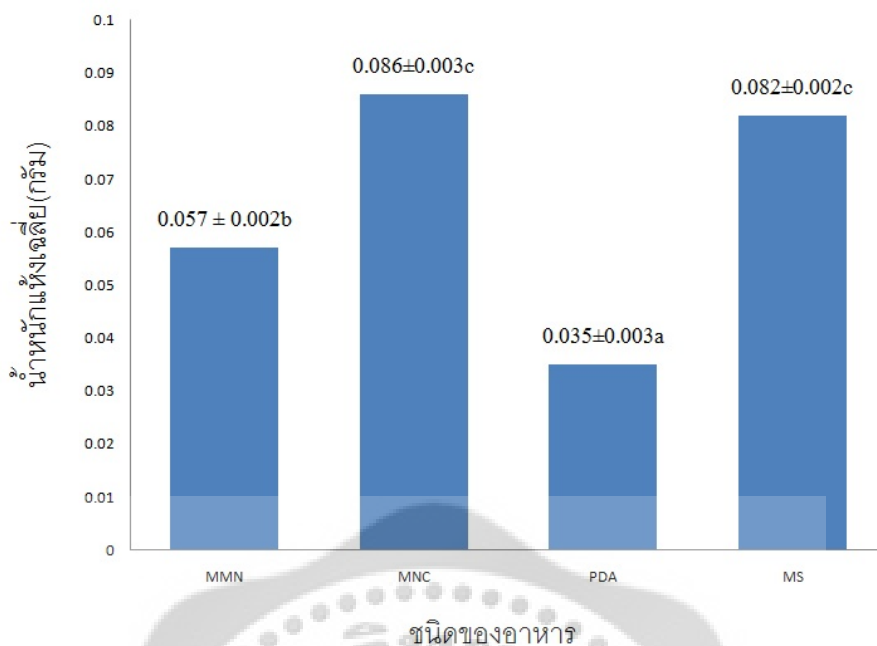


ภาพประกอบ 50 ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MS, PDA, MMN และ MNC ค่า pH เท่ากับ 6 ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 4 สัปดาห์

ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราทุกสัปดาห์นาน 4 สัปดาห์ พบว่าอาหาร MS ที่มีการเจริญแผ่ของเส้นใยรากว้างที่สุดคือมีขนาดเท่ากับ 4.51 ± 0.82 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 4 (อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) (ภาพประกอบ 51 ภาคผนวก ง) และเมื่อนำเส้นใยมาหามวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) พบว่าเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหาร MNC และ MS มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 0.086 ± 0.003 กรัม และ 0.082 ± 0.002 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเลี้ยงบนอาหาร MMN และ PDA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาพประกอบ 52 ภาคผนวก ง)



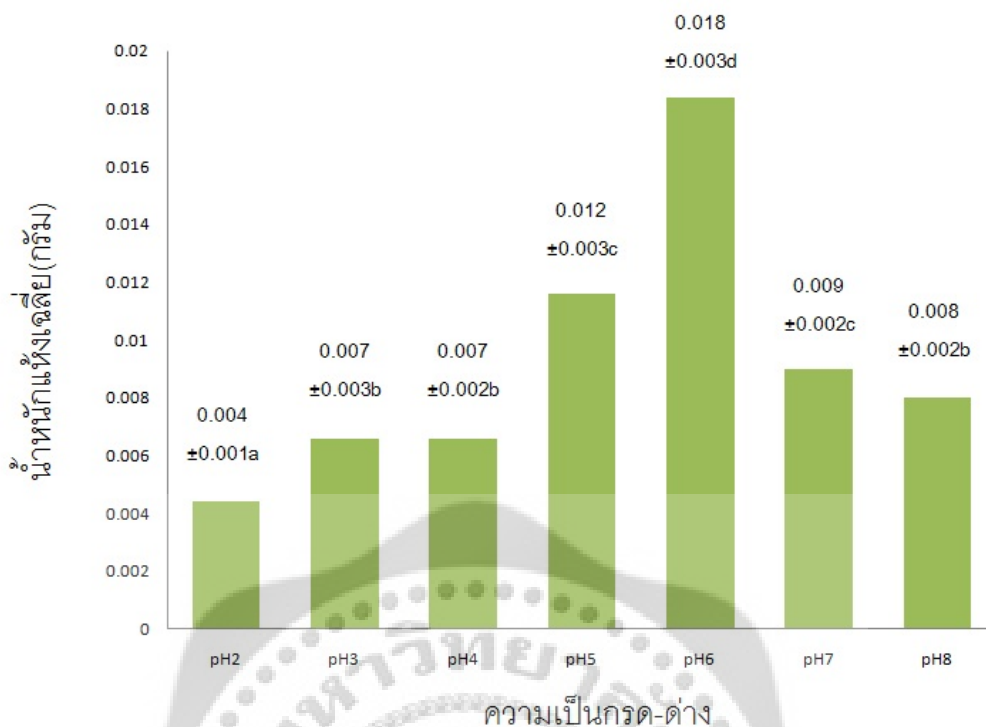
ภาพประกอบ 51 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดอาหารและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการเจริญเส้นใยเห็ดเพาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 30°C นาน 4 สัปดาห์



ภาพประกอบ 52 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดอาหารและมวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) ของเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 4 สัปดาห์

4.2 ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH)

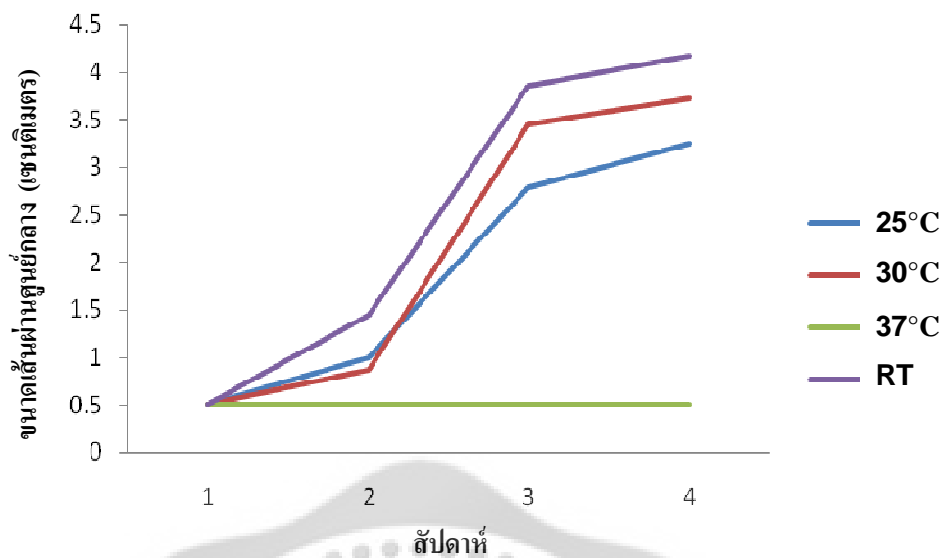
การศึกษาผลของค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) ในอาหารเหลว MNC โดยปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ รายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 5.2 ผลการทดลองพบว่าในอาหารที่มีค่า pH เท่ากับ 6 มีการเจริญของเส้นใยมากที่สุด คือมีค่ามวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) ของเส้นใยเท่ากับ 0.018 ± 0.003 กรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 รองลงมาคือ pH 5 และ 7 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 53 ภาคผนวก ง)



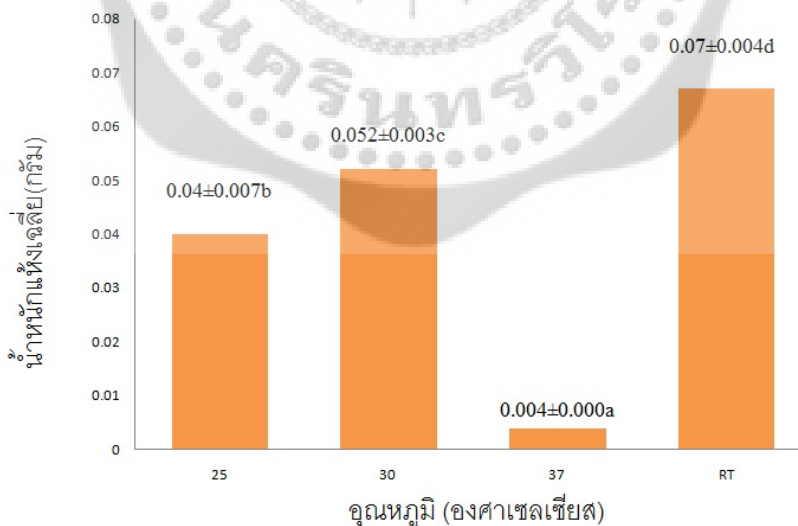
ภาพประกอบ 53 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และมวลชีวภาพ (น้ำหนักแห้ง) ของเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 30°C นาน 4 สัปดาห์

4.3 ผลของอุณหภูมิ

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) โดยการเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MNC (pH 6) ที่อุณหภูมิ 25°C, 30°C, 37°C และอุณหภูมิห้อง (30-32°C) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ รายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 5.3 ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิห้องเส้นใยรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุดเท่ากับ 4.17 ± 0.10 เซนติเมตร และมีน้ำหนักแห้งมากที่สุดเท่ากับ 0.07 ± 0.004 กรัม รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30°C และ 25°C ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 37°C พบว่าไม่มีการเจริญของเส้นใย (ภาพประกอบ 54 และ 55 ภาคผนวก ง)



ภาพประกอบ 54 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการเจริญเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) บนอาหาร MNC (pH 6) นาน 4 สัปดาห์



ภาพประกอบ 55 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) บนอาหาร MNC (pH 6) นาน 4 สัปดาห์

5. การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัย

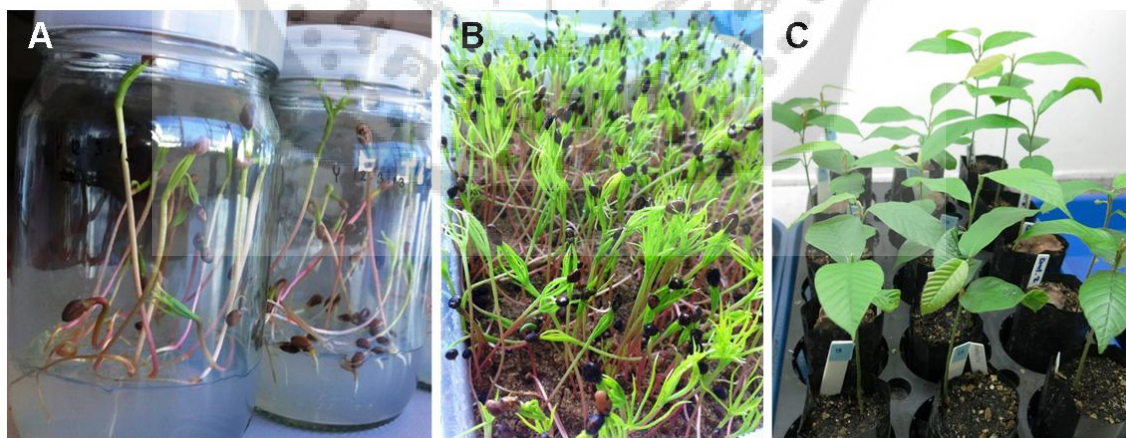
การทดลองนี้ได้เลือกเห็ดเผาะสิรินธร (*Astraeus sirindhorniae* PKBP28-1) มาใช้ในการทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัย ซึ่งแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ (1) การทดสอบกับกล้าไม้สนสามใบ (*Pinus kesiya* Royle ex Gordon; Pinaceae) ในจานเลี้ยงเชื้อ และ (2) การทดสอบกับกล้าสนสามใบและกล้ายางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb. Ex G.Don; Dipterocarpaceae) ในถุงเพาะชำ

5.1 การเตรียมกล้าไม้สนสามใบและกล้าไม้ยางนา

เมล็ดสนสามใบสำหรับการทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมล็ดสนเกิดการงอกภายใน 2 สัปดาห์ เมื่อกล้าไม้สนอายุครบ 1 เดือน ย้ายกล้าไม้ไปทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในจานเลี้ยงเชื้อ (ภาพประกอบ 56A)

สำหรับการทดสอบในวัสดุปลูก พบว่าเมล็ดสนงอกภายใน 2 สัปดาห์ จึงย้ายต้นกล้าออกมาเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง รดด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อจนอายุครบ 1 เดือน จึงนำไปทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในถุงเพาะชำ (ภาพประกอบ 56B)

ส่วนเมล็ดยางนา พบว่าเริ่มงอกในสัปดาห์ที่ 1-2 จึงย้ายลงถุงปลูกที่บรรจุดินและวัสดุปลูกที่ปราศจากเชื้อ ในสภาวะที่มีการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง จนต้นกล้าอายุครบ 1 เดือน จึงนำไปทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในถุงเพาะชำ (ภาพประกอบ 56C)



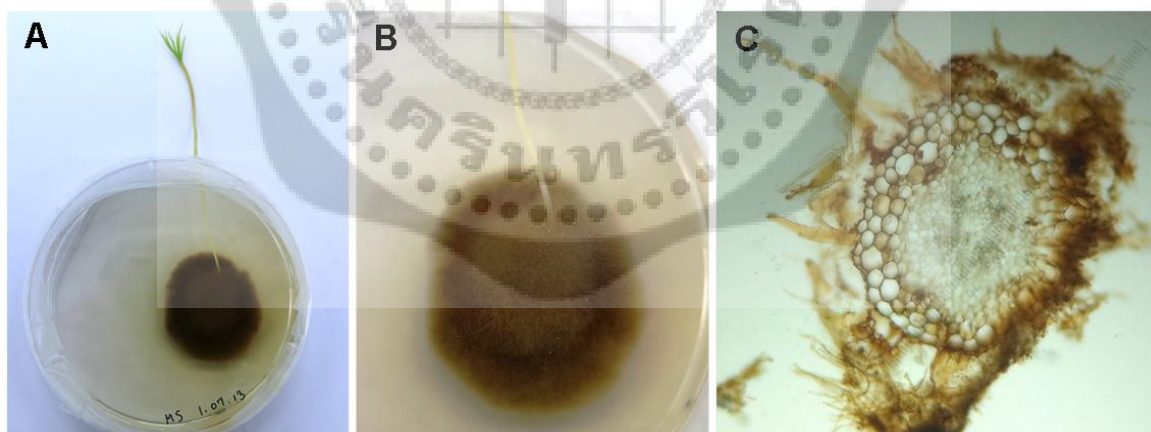
ภาพประกอบ 56 การเตรียมกล้าไม้สนสามใบและกล้าไม้ยางนา (A) ต้นกล้าไม้สนสามใบในขวดบรรจุอาหาร water agar (B) ต้นกล้าไม้สนสามใบในกระบะทราย และ (C) ต้นกล้าไม้ยางนาในถุงปลูกอายุ 1 เดือน

5.2 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในจานเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในจานเลี้ยงเชื้อทดสอบกับกล้าไม้สนสามใบ โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดแรกทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MNC และ MS ส่วนชุดที่ 2 ทดสอบในวัสดุปลูก

5.2.1 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MNC และ MS

ผลการทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาของเส้นใยราเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) กับกล้าไม้สนสามใบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MNC และ MS (ภาพประกอบ 57A-B) พบว่า เมื่อครบ 1 เดือน เส้นใยของราเจริญคลุมบริเวณรากของกล้าไม้สนสามใบจนเกือบเต็มจานเลี้ยงเชื้อ และกล้าไม้สนสามใบมีอาการเหี่ยวและตายในที่สุด เมื่อนำรากมาตรวจการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์ พบว่าไม่มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซา และเมื่อตัดเนื้อเยื่อรากตามขวางก็ไม่พบโครงสร้างของชั้นแมนเทิลหรือโครงสร้างของเส้นใยที่เข้าไปเจริญภายในเซลล์รากพืชของฮาติกเนท (ภาพประกอบ 57C) และเมื่อทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MS ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแทนการใช้ MNC พบว่าให้ผลเช่นเดียวกัน คือกล้าไม้สนสามใบสามารถเจริญได้บนจานเลี้ยงเชื้อนานสูงสุดไม่เกิน 1 เดือน และไม่พบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซา



ภาพประกอบ 57 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาของราเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) กับกล้าไม้สนสามใบบนจานเลี้ยงเชื้อ MS นาน 4 สัปดาห์ (A-B) การเลี้ยงราเห็ดเผาะสิรินธรร่วมกับกล้าไม้สนสามใบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และ (C) ภาพตัดตามขวางของรากสนสามใบที่เลี้ยงร่วมกับรา

5.2.2 การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในวัสดุปลูก

ผลการนำกล้าไม้สนสามใบที่เพาะในสภาวะปลอดเชื้ออายุ 1 เดือน มาเลี้ยงในวัสดุปลูกที่ปราศจากเชื้อคือ เวอร์มิคูไลท์และพีทมอส ร่วมกับเส้นใยราเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) พบว่ากล้าไม้สนสามใบมีอาการเหี่ยว เมื่อนำรากสนมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์ พบว่าไม่มีการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซา และเมื่อตัดเนื้อเยื่อรากตามขวางก็ไม่พบโครงสร้างของชั้นแมนเทิลหรือโครงสร้างของเส้นใยที่เข้าไปเจริญภายในเซลล์รากพืชของฮาติกเนท เช่นเดียวกับผลการทดลองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.3 การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในถุงเพาะชำ

การทดลองนี้แบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ชุด คือการทดสอบโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมจากเส้นใยราเห็ดสิรินธร (*A. sirinthoniae* PKBP28-1) และการทดสอบโดยใช้สปอร์ราเห็ดเผาะสิรินธร

5.3.1 การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาโดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมจากเส้นใยราเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1)

การทดสอบนี้ได้ทดลองกับพืชสองชนิดคือ กล้าไม้สนสามใบ และกล้าไม้ยางนา โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อที่เตรียมจากเส้นใยรา

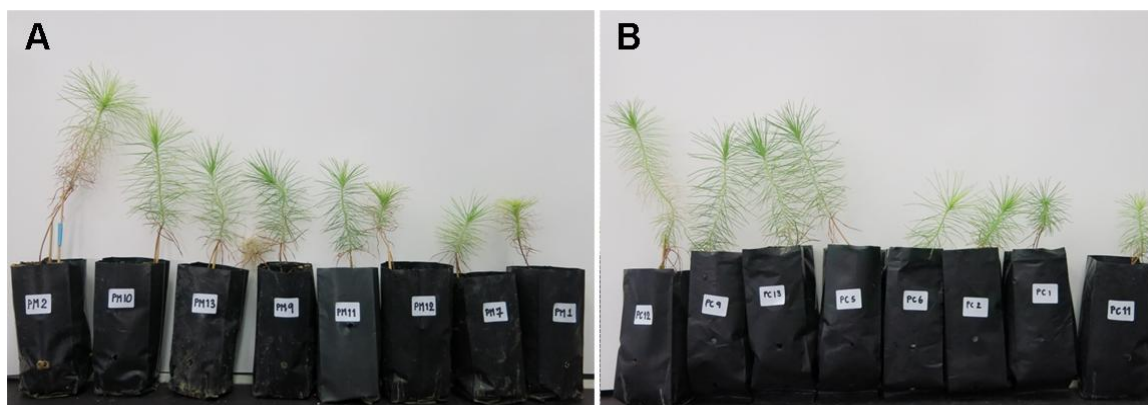
ก) การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซากับกล้าไม้สนสามใบ

การเตรียมหัวเชื้อเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 1 เดือน เส้นใยรามีการเจริญทั่ววัสดุปลูก โดยลักษณะของเส้นใยมีสีน้ำตาลทองฟูละเอียด เมื่อใช้เข็มเขี่ยมาศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์พบโครงสร้างของ clamp connection จากนั้นจึงนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อผสมปลูกกับดินในอัตราส่วน 1:8 (ปริมาตร:ปริมาตร) โดยนำกล้าไม้สนสามใบที่เพาะไว้ มาปลูกในถุงเพาะชำ เช่นเดียวกับชุดควบคุมที่ปลูกกล้าสนสามใบจำนวน 10 ต้น โดยไม่ได้ใส่หัวเชื้อรา ปลูกนานเป็นระยะเวลา 6 เดือน (ภาพประกอบ 58)

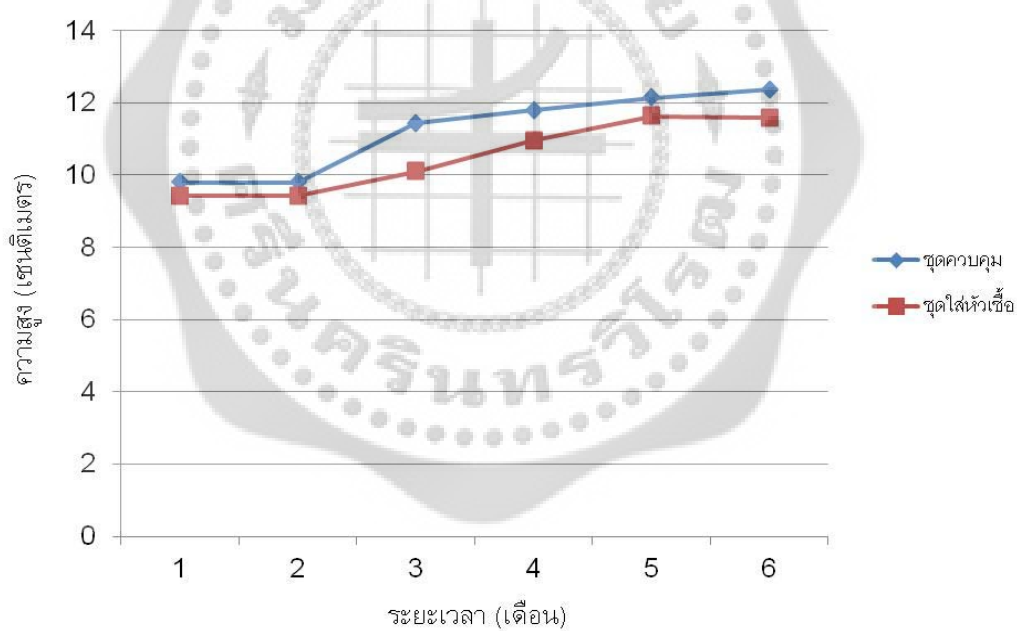
การตรวจวัดการเจริญเติบโตของพืช

ผลการเปรียบเทียบการเติบโตทางความสูงของกล้าไม้สนสามใบ

ผลการเปรียบเทียบความสูงของกล้าไม้สนสามใบ อายุ 6 เดือน พบว่าความสูงเฉลี่ยของกล้าไม้สนสามใบที่ใส่หัวเชื้อและกล้าไม้สนสามใบที่ไม่ใส่หัวเชื้อ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.52 ± 1.011 และ 11.22 ± 1.144 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าชุดที่เติมหัวเชื้อราและชุดควบคุมมีความสูงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาพประกอบ 59 และภาคผนวก ง)



ภาพประกอบ 58 การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้สนสามใบ อายุ 6 เดือน (A) ชุดทดสอบที่เติมหัวเชื้อเส้นใยราเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) และ (B) ชุดควบคุม



ภาพประกอบ 59 การเปรียบเทียบการเติบโตทางความสูงของกล้าไม้สนสามใบที่เติมหัวเชื้อเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) กับชุดควบคุม เมื่อปลูกลานาน 6 เดือน

มวลชีวภาพส่วนเหนือดินของกล้าไม้สนสามใบ (น้ำหนักแห้งของใบ และ ลำต้น)

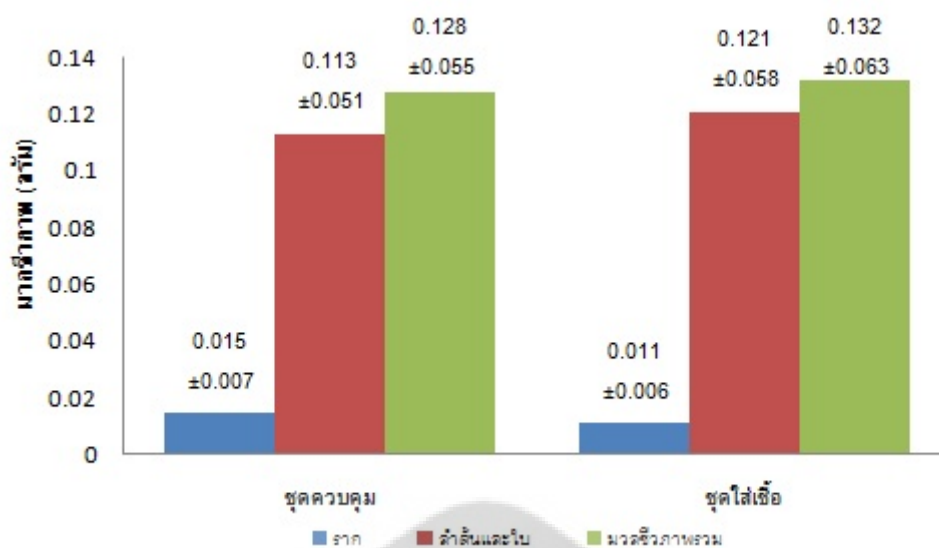
ผลการเปรียบเทียบมวลชีวภาพเหนือดินของกล้าไม้สนสามใบ อายุ 6 เดือน พบว่ามวลชีวภาพส่วนเหนือดินเฉลี่ยของกล้าไม้สนสามใบที่ใส่หัวเชื้อ และกล้าไม้สนสามใบที่ไม่ใส่หัวเชื้อ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.121 ± 0.058 และ 0.113 ± 0.051 ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า มวลชีวภาพส่วนเหนือดินของกล้าไม้สนสามใบที่ใส่หัวเชื้อและกล้าไม้สนสามใบที่ไม่ใส่หัวเชื้อไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาพประกอบ 60)

มวลชีวภาพส่วนใต้ดินของกล้าไม้สนสามใบ (น้ำหนักแห้งของราก)

ผลการเปรียบเทียบมวลชีวภาพใต้ดินของกล้าไม้สนสามใบ อายุ 6 เดือน พบว่ามวลชีวภาพส่วนใต้ดินเฉลี่ยของกล้าไม้สนสามใบที่ใส่หัวเชื้อ และกล้าไม้สนสามใบที่ไม่ใส่ หัวเชื้อ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.011 ± 0.006 และ 0.015 ± 0.007 ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า มวลชีวภาพส่วนใต้ดินของกล้าไม้สนสามใบที่ใส่หัวเชื้อและกล้าไม้สนสามใบที่ไม่ใส่หัวเชื้อ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาพประกอบ 60)

มวลชีวภาพรวมส่วนเหนือดินของกล้าไม้สนสามใบ (น้ำหนักแห้งของใบ ลำต้น และราก)

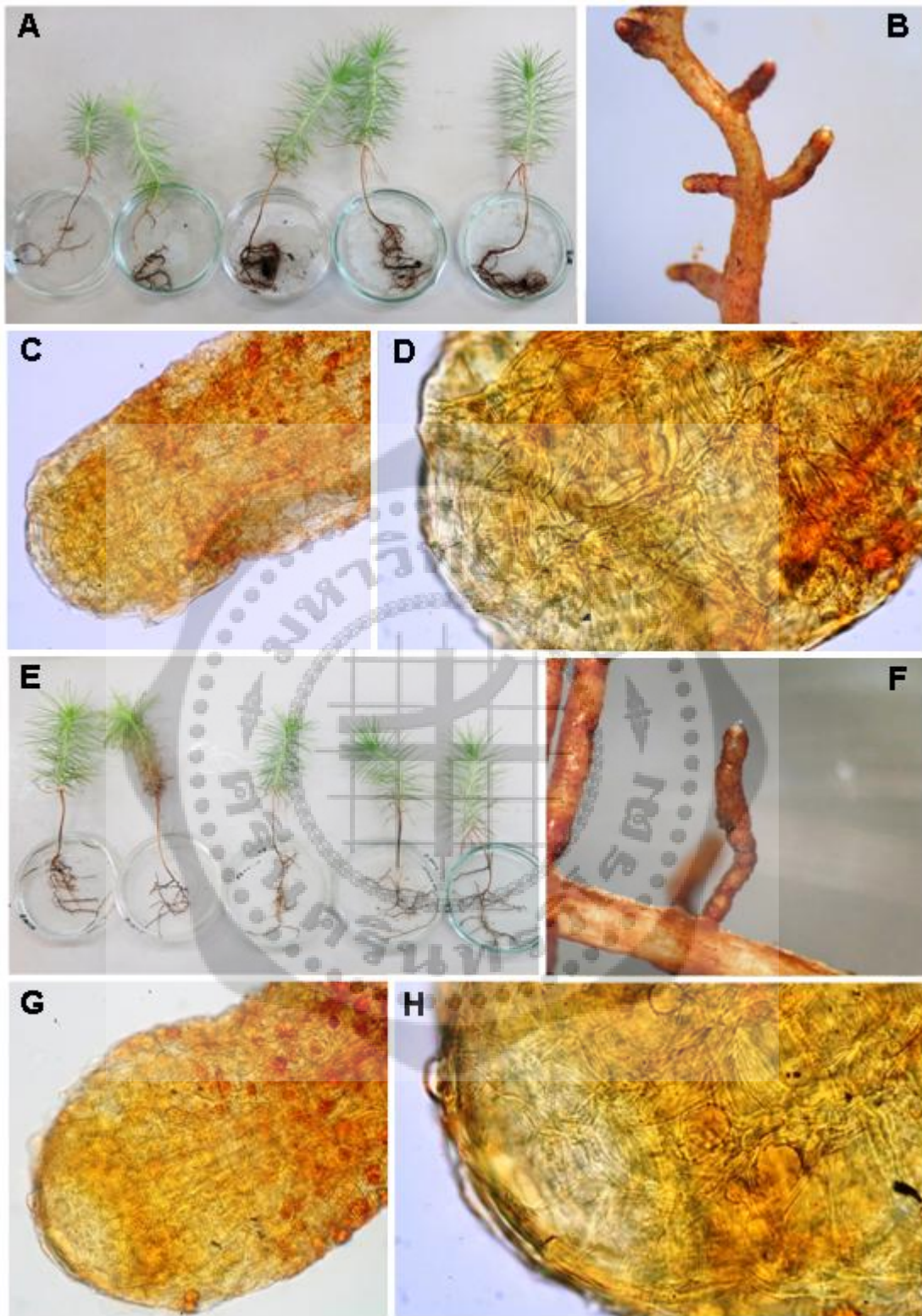
ผลการเปรียบเทียบมวลชีวภาพรวมของกล้าไม้สนสามใบ อายุ 6 เดือน พบว่ามวลชีวภาพรวมเฉลี่ยของกล้าไม้สนสามใบที่ใส่หัวเชื้อ และกล้าไม้สนสามใบที่ไม่ใส่หัวเชื้อ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.132 ± 0.063 และ 0.128 ± 0.055 ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามวลชีวภาพรวมของกล้าไม้สนสามใบที่ใส่หัวเชื้อและกล้าไม้สนสามใบที่ไม่ใส่หัวเชื้อ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาพประกอบ 60)



ภาพประกอบ 60 การเปรียบเทียบมวลชีวภาพของกล้าสนสามใบที่เติมหัวเชื้อเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) กับชุดควบคุม เมื่อปลูกลานาน 6 เดือน

การตรวจสอบลักษณะของเอกโตไมคอร์ไรซา

เมื่อนำรากต้นกล้าไม้สนสามใบจากชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อราเห็ดเผาะสิรินธรจำนวน 8 ต้น มาตรวจพบว่าไม่มีการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซา และเมื่อนำรากที่มีลักษณะบวม สีน้ำตาล มาตัดตามแนวขวาง และแนวยาวไม่พบโครงสร้างของชั้นแมนเทิล ฮาทิกเนท หรือเส้นใยราที่สร้างออกมาภายนอกราก รวมทั้งโครงสร้างของ clamp connection (ภาพประกอบ 61) ดังนั้นร้อยละการติดเชื้อเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) ในรากกล้าไม้สนสามใบมีค่าเท่ากับศูนย์ เช่นเดียวกับรากกล้าไม้สนสามใบในชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ



ภาพประกอบ 61 รากกล้าไม้สนสามใบอายุ 6 เดือน (A-D) จากชุดการทดลองควบคุม และ (E-H) ชุดที่เติมหัวเชื้อเห็ดเพาะสิรินธร (*A. sirindhorniae*) (A, B, E, F) รากสนสามใบ (C, D, G, H) เซลล์ปลายรากสนสามใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ข) การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับกล้าไม้ยางนา

นำเส้นใยราเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) ที่เจริญในวัสดุปลูกเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส ไปผสมกับดินปลูกในอัตราส่วน 1:8 (ปริมาตร:ปริมาตร) จากนั้นนำกล้าไม้ยางนาอายุ 1 เดือน มาปลูกในถุงเพาะชำ เช่นเดียวกับชุดควบคุมที่ปลูกกล้ายางนาจำนวน 10 ต้น โดยไม่ได้ใส่หัวเชื้อรา ปลูกนานเป็นระยะเวลา 6 เดือน (ภาพประกอบ 62)

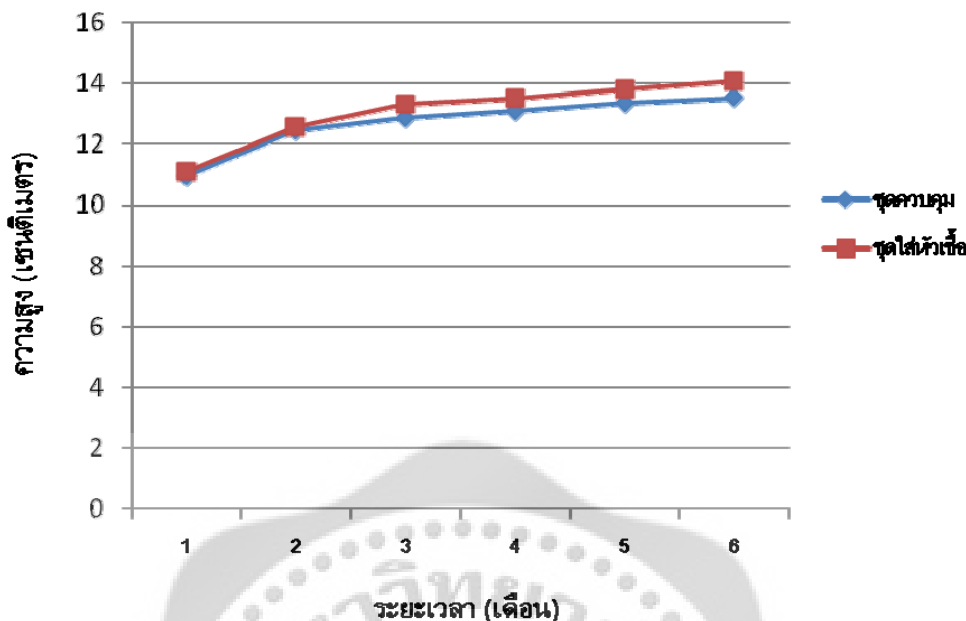


ภาพประกอบ 62 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ยางนา อายุ 6 เดือน (A) ชุดควบคุม และ (B) ชุดทดสอบที่เติมหัวเชื้อเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1)

การตรวจวัดการเจริญเติบโตของพืช

ผลการเปรียบเทียบการเติบโตทางความสูงของกล้าไม้ยางนา

ผลการเปรียบเทียบความสูงของกล้าไม้ยางนา อายุ 6 เดือน พบว่าความสูงเฉลี่ยของกล้าไม้ยางนาที่ใส่หัวเชื้อและกล้าไม้ยางนาที่ไม่ใส่หัวเชื้อ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.23 ± 1.101 และ 12.85 ± 0.933 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ชุดที่เติมหัวเชื้อราและชุดควบคุมมีความสูงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาพประกอบ 63 และภาคผนวก ง)



ภาพประกอบ 63 การเปรียบเทียบการเติบโตทางความสูงของกล้าไม้อย่างนาที่เติมหัวเชื้อเห็ดเผาะสีรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) กับชุดควบคุม เมื่อปลูกนาน 6 เดือน

มวลชีวภาพส่วนเหนือดินของกล้าไม้อย่างนา (น้ำหนักแห้งของใบ และลำต้น)

ผลการเปรียบเทียบมวลชีวภาพเหนือดินของกล้าไม้อย่างนา อายุ 6 เดือน พบว่ามวลชีวภาพส่วนเหนือดินเฉลี่ยของกล้าไม้อย่างนาที่ใส่หัวเชื้อ และกล้าไม้อย่างนาที่ไม่ใส่หัวเชื้อ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.101 ± 0.227 และ 0.981 ± 0.288 ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า มวลชีวภาพส่วนเหนือดินของกล้าไม้อย่างนาที่ใส่หัวเชื้อและกล้าไม้อย่างนาที่ไม่ใส่หัวเชื้อ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาพประกอบ 64)

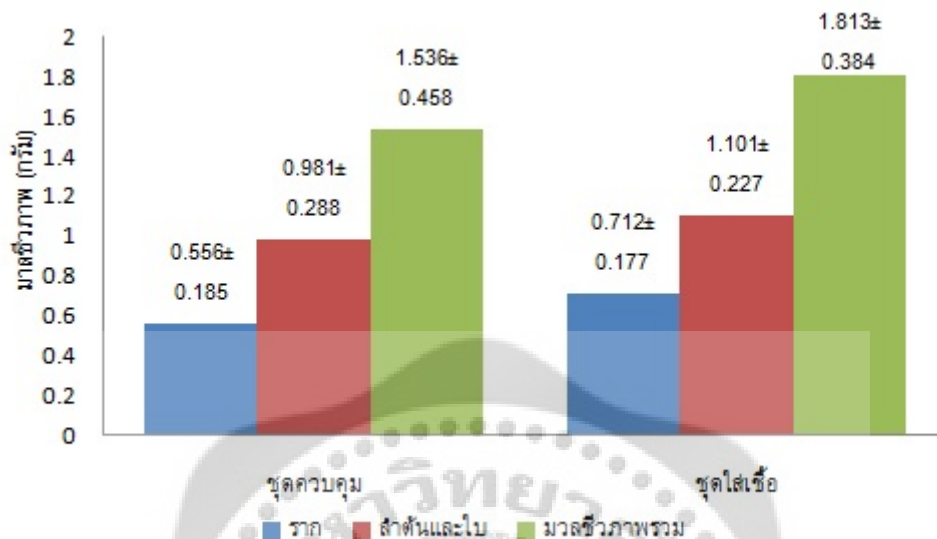
มวลชีวภาพส่วนใต้ดินของกล้าไม้อย่างนา (น้ำหนักแห้งของราก)

ผลการเปรียบเทียบมวลชีวภาพใต้ดินของกล้าไม้อย่างนา อายุ 6 เดือน พบว่ามวลชีวภาพส่วนใต้ดินเฉลี่ยของกล้าไม้อย่างนาที่ใส่หัวเชื้อ และกล้าไม้อย่างนาที่ไม่ใส่หัวเชื้อ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.712 ± 0.177 และ 0.556 ± 0.185 ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า มวลชีวภาพส่วนใต้ดินของกล้าไม้อย่างนาที่ใส่หัวเชื้อและกล้าไม้อย่างนาที่ไม่ใส่หัวเชื้อ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาพประกอบ 64)

มวลชีวภาพรวมของกล้าไม้อย่างนา (น้ำหนักแห้งของใบ ลำต้น และราก)

ผลการเปรียบเทียบมวลชีวภาพรวมของกล้าไม้อย่างนา อายุ 6 เดือน พบว่ามวลชีวภาพรวมเฉลี่ยของกล้าไม้อย่างนาที่ใส่หัวเชื้อ และกล้าไม้อย่างนาที่ไม่ใส่หัวเชื้อ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.813 ± 0.384 และ 1.536 ± 0.458 ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า

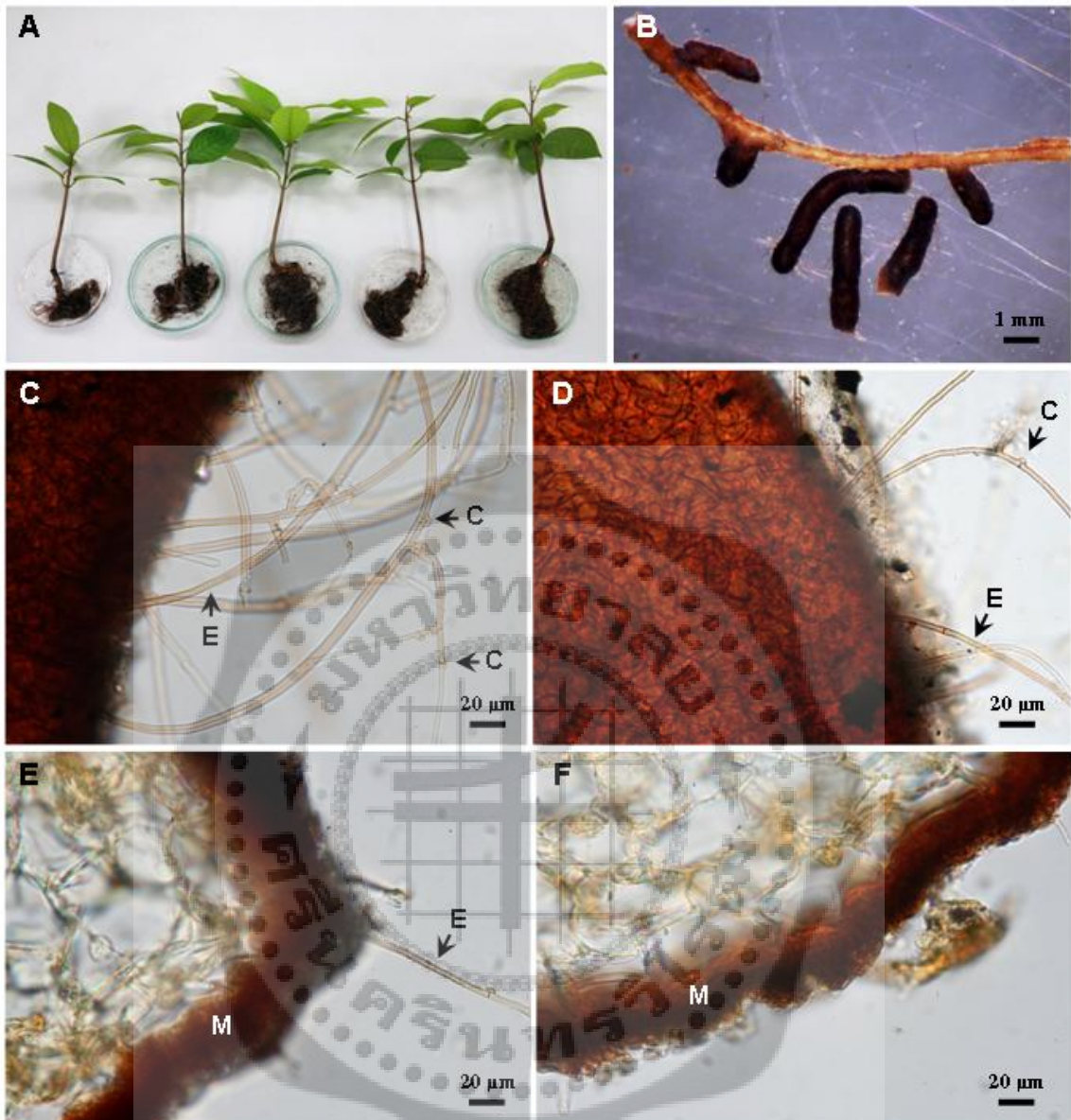
มวลชีวภาพรวมของกล้าไม้ยางนาที่ใส่หัวเชื้อและกล้าไม้ยางนาที่ไม่ใส่หัวเชื้อ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาพประกอบ 64)



ภาพประกอบ 64 การเปรียบเทียบมวลชีวภาพของกล้าไม้ยางนาที่เติมหัวเชื้อเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) กับชุดควบคุม เมื่อปลูกนาน 6 เดือน

การตรวจสอบลักษณะของรากเอกโตไมคอร์ไรซา

เมื่อสุ่มรากต้นกล้าไม้ยางนาจากชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) จำนวน 10 ต้น มาตรวจในเดือนที่ 3 ไม่พบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซา แต่เมื่อสุ่มรากมาตรวจในเดือนที่ 6 พบว่ารากมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป คือ มีลักษณะบวมกว่ารากปกติ สีน้ำตาลดำ ผิวเรียบ แตกกิ่งแบบ monopodial pinnate มีเส้นใยพันอยู่โดยรอบเมื่อนำมาตัดตามแนวขวางและยาว พบโครงสร้างของชั้นแมนเทิลที่ปลายรากซึ่งมีความหนาเท่ากับ 7-10 ไมโครเมตรและเส้นใยที่เจริญเข้าไปภายในเซลล์รากหรือฮาร์ทิกเนท รวมทั้งเส้นใยที่สร้างออกมาภายนอกราก ที่มีโครงสร้างของ clamp connection (ภาพประกอบ 65) ซึ่งเป็นลักษณะของรากเอกโตไมคอร์ไรซา ทั้งนี้ไม่พบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในชุดควบคุมทั้ง 10 ต้น เมื่อนำรากของกล้ายางนาที่ตรวจพบเอกโตไมคอร์ไรซาแต่ละต้นมาหาค่าร้อยละการติดเชื้อ พบว่ามีการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาคิดเป็นร้อยละ 6.25



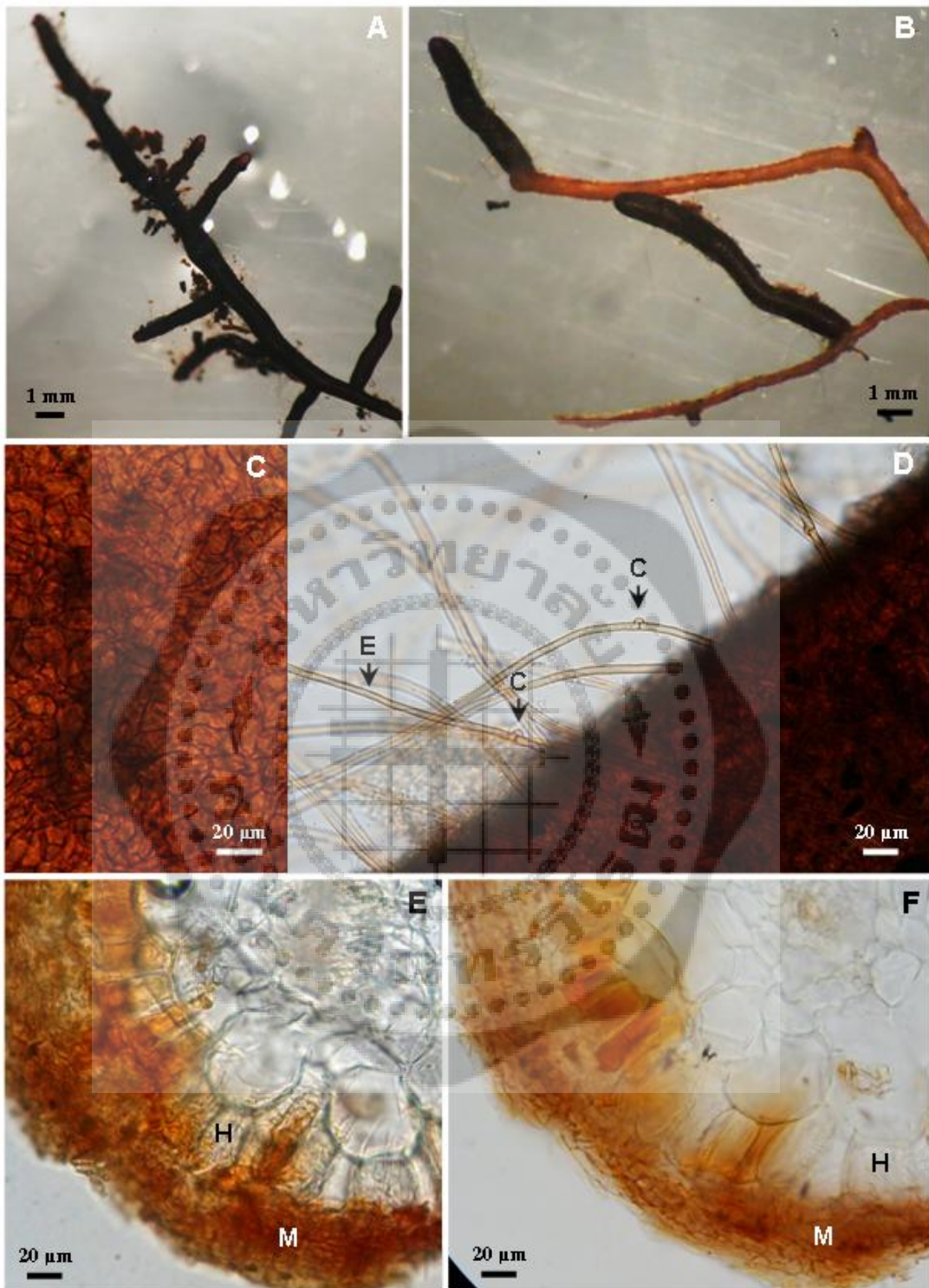
ภาพประกอบ 65 รากยางนาจากชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อราเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae* PKBP28-1) (A) ต้นกล้าไม้ยางนาอายุ 6 เดือน (B) ลักษณะการแตกแขนงของราก monopodial pinnate (C) การสร้างเส้นใยราออกมาภายนอกราก และโครงสร้างของ clamp connection (ลูกศร) (D) การเรียงตัวของชั้นแมนเทิล
 หมายเหตุ: C = clamp connection, E= external hyphae, M = mantle

5.3.2 การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาโดยใช้สารแขวนลอยของสปอร์ราเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae*)

การทดสอบนี้ได้ทำเพิ่มเติมเนื่องจากผลการสุ่มรากยางนาในเดือนที่ 3 มาตรฐานไม่พบการสร้างรากเอกโตไมคอร์ไรซาในต้นกล้าไม้ยางนาที่ใส่หัวเชื้อ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเพิ่มโดยใช้สารแขวนลอยสปอร์ของเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae*) แทนการใช้หัวเชื้อผสมในวัสดุปลูก ทดสอบกับพีชอายุ 2 ชนิด คือ กล้าไม้สนสามใบ และกล้าไม้ยางนา ปลูกนานเป็นระยะเวลา 6 เดือน จากนั้นสุ่มตัวอย่างรากมาตรวจหาการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซา

ผลการทดสอบในต้นกล้าไม้สนสามใบ พบว่าไม่มีการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซา และโครงสร้างใดๆ ดังนั้นร้อยละการติดเชื้อรามีค่าเท่ากับศูนย์ ในขณะที่ต้นกล้าไม้ยางนา พบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซา โดยมีชั้นแมนเทิลหนา 11-15 ไมโครเมตร (ภาพประกอบ 66) คิดค่าร้อยละของการติดเชื้อเท่ากับ 36.77

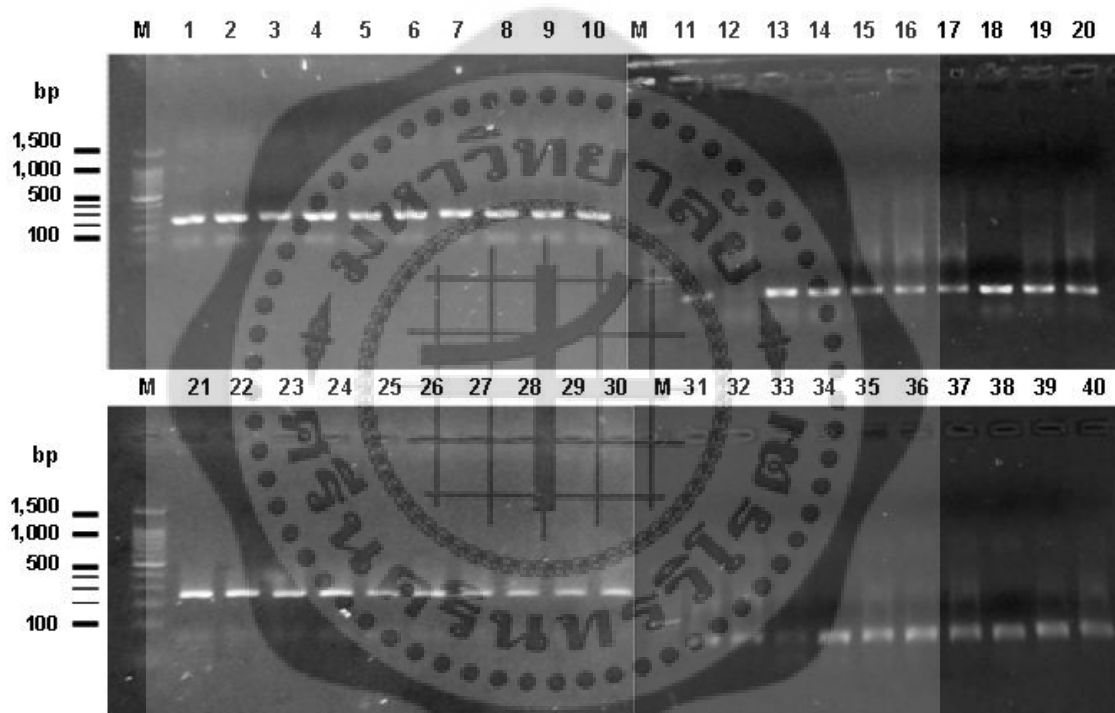




ภาพประกอบ 66 รากกล้าไม้ยางนาจากชุดการทดลองที่เติมสปอร์เห็ดเผาะสิรินธร (*Sirindhornia*) (A-B) ลักษณะการแตกแขนงของราก (C) การเรียงตัวของชั้นแมนเทิลแบบ pseudoparenchymatous (D) การสร้างเส้นใยราออกมาภายนอกรากและโครงสร้างของ clamp connection (ลูกศร) (E-F) การเรียงตัวของชั้นแมนเทิลและฮาติกเนท
 หมายถึง: C = clamp connection, E = external hyphae, M = mantle

6. การตรวจพิสูจน์รากเอกโตไมคอร์ไรซาด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

รากเอกโตไมคอร์ไรซาจากผลการทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในข้อ 5.3 จำนวน 160 ตัวอย่าง (root tips) (จากการทดสอบด้วยหัวเชื้อราจำนวน 40 ตัวอย่าง และจากการทดสอบด้วยสปอร์จำนวน 120 ตัวอย่าง) นำมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS3/ITS4B รายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 7.5 พบว่าจาก 40 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้แบบขนาดประมาณ 250-300 คู่เบส เท่ากับ 37 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 92.5) และจาก 120 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เท่ากับ 106 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 88.33) (ภาพประกอบ 67)



ภาพประกอบ 67 ตัวอย่างผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 ของรากเอกโตไมคอร์ไรซาที่ได้จากการทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาด้วยรา *A. sirindhorniae* (M) 100 bp DNA ladder, (1-10) ตัวอย่างปลายรากจากการทดสอบด้วยหัวเชื้อรา และ (11-40) ตัวอย่างปลายรากจากการทดสอบด้วยสปอร์รา

จากนั้นสุ่มตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ 15 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. sirindhorniae* พบว่ามีร้อยละความเหมือนเท่ากับร้อยละ 100 กับ *A. sirindhorniae*

(HE681772) (ตาราง 13 ภาคผนวก จ) แสดงว่าตัวอย่างปลายารากเอกโตไมคอร์ไรซาทั้ง 15 ตัวอย่าง เป็นเชื้อ *A. sirindhorniae*

ตาราง 12 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของรากเอกโตไมคอร์ไรซาที่สร้างจากราก *A. sirindhorniae* PKBP28-1

No.	ID	ชุดการทดลอง	ผลการเทียบเคียง	Accession No.	ร้อยละความเหมือน (% similarity)
1	PA33-14-1	หัวเชื้อรา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
2	PA33-14-2	หัวเชื้อรา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
3	PA33-14-3	หัวเชื้อรา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
4	PA33-14-4	หัวเชื้อรา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
5	PA33-14-5	หัวเชื้อรา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
6	PA33-14-6	สปอร์รา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
7	PA33-14-7	สปอร์รา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
8	PA33-14-8	สปอร์รา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
9	PA33-14-9	สปอร์รา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
10	PA33-14-10	สปอร์รา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
11	PA33-14-11	สปอร์รา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
12	PA33-14-12	สปอร์รา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
13	PA33-14-13	สปอร์รา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
14	PA33-14-14	สปอร์รา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100
15	PA33-14-15	สปอร์รา	<i>Astraeus sirindhorniae</i> GAPK1	HE681772	100

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดและรากเอคโตไมคอร์ไรซาจากพื้นที่ป่าสนผสมเต็งรัง ณ เขต
รักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จ.ชัยภูมิ ช่วงเดือนพฤษภาคม ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2556 จากการวางแปลง
ขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 100 x 100 เมตร พืชที่พบในพื้นที่ส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Fagaceae
(*Lithocarpus truncatus* Rehd. & Wils. (ก้อดำ) *Castanopsis argentea* (Blume) A. DC. (ก้อขาว)
และ *Lithocarpus ceriferus* A. Camus (มะก้อ)) และวงศ์ Pinaceae (*Pinus kesiya* Royle ex
Gordon. (สนสามใบ)) พบดอกเห็ดจำนวน 28 ตัวอย่าง และรากเอคโตไมคอร์ไรซาจำนวน 109
ตัวอย่าง ผลการจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์
บริเวณ ITS สามารถจัดจำแนกชนิดได้ดังนี้

ดอกเห็ดจำนวน 28 ตัวอย่างสามารถจัดจำแนกได้ 8 วงศ์ 13 สกุล 20 ชนิด คือ
Amanitaceae (*Amanita fuliginea*), *Astraeaceae* (*Astraeus sirindhorniae*), *Boletaceae*
(*Boletellus* sp., *Mycoamanranthus* sp., *Pulveroboletus* sp., *Tylopilus* sp.), *Gomphaceae*
(*Gomphus* sp.1, *Gomphus* sp.2, *Ramaria largentii*, *Ramaria* sp.1, *Ramaria* sp.2, *Ramaria*
sp.3, *Ramaria* sp.4, *Ramaria* sp.6, *Ramaria* sp.7), *Inocybaceae* (*Inocybe ayangannae*),
Russulaceae (*Lactarius* sp., *Russula* sp.), *Sclerodermataceae* (*Scleroderma sinnamariense*)
และ *Tricholomataceae* (*Tricholoma* sp.) ซึ่งวงศ์ที่พบมากที่สุดได้แก่ *Gomphaceae* (ร้อยละ
39.3) รองลงมาคือ *Boletaceae* (ร้อยละ 21.4) และ *Russulaceae* (ร้อยละ 14.3) ตามลำดับ
นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวอย่างเห็ดที่ศึกษา มีเพียง 5 ตัวอย่าง ที่มี
ค่าร้อยละความเหมือน (% similarity) สูงสุดกับเห็ดที่สามารถระบุชนิดได้มากกว่าร้อยละ 97 (ซึ่งเป็น
ค่าที่ยอมรับว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน) ในขณะที่มีถึง 15 ตัวอย่าง ที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดกับ
ตัวอย่างเห็ดที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ หรือมีค่าร้อยละความเหมือนต่ำกว่า 97 กับตัวอย่างเห็ดที่ระบุ
ชนิดได้ ทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้ในระดับสปีชีส์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากข้อมูลที่จำกัดของลำดับ
นิวคลีโอไทด์ของรากเอคโตไมคอร์ไรซาในฐานข้อมูล โดยเฉพาะข้อมูลจากประเทศในเขตร้อนชื้นซึ่งมี
ความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดราสูง ทั้งนี้บางตัวอย่างอาจเป็นข้อมูลใหม่ ซึ่งต้องทำการศึกษา
ในรายละเอียดโดยการเทียบเคียงกับตัวอย่างเห็ดอ้างอิงต่อไป

รากเอคโตไมคอร์ไรซาจำนวน 109 ตัวอย่าง สามารถแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา
หรือ morphotypes ได้เท่ากับ 23 morphotypes ซึ่ง morphotype ส่วนใหญ่ที่พบคือ morphotype
14 (dichotomous, brown, smooth) รองลงมาคือ morphotype 1 (monopodial pinnate, white,
smooth) และ morphotype 12 (dichotomous, orange, smooth) ตามลำดับ ซึ่งการจำแนกชนิด
ของรากเอคโตไมคอร์ไรซานี้ต้องอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นหลัก รากเอคโตไมคอร์
ไรซาจำนวน 109 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้เท่ากับ 96 ตัวอย่าง (คิดเป็น

ร้อยละ 88) แต่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียง 44 ตัวอย่าง ที่เป็นราเอกโตไมคอร์ไรซา (คิดเป็นร้อยละ 40.4) เหตุผลที่การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีค่าร้อยละความสำเร็จค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องจากช่วงแรกของการทดลองได้ทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR โดยตรง (direct sequencing) พบว่าไม่สามารถอ่านผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้หลายตัวอย่าง หรือบางตัวอย่างอ่านได้แต่ผลการเทียบเคียงในฐานข้อมูล GenBank ที่ได้ไม่ใช่ราเอกโตไมคอร์ไรซา เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากกรากเอกโตไมคอร์ไรซาบางตัวอย่างเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบการเจริญของเส้นใยมากกว่า 1 ลักษณะ จึงอาจเป็นไปได้ที่ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ อาจมีรามากกว่า 1 ชนิด จึงทำให้การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงไม่สามารถอ่านได้ ทั้งนี้ในการทดลองต่อมาจึงทำการเชื่อมต่อผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้กับเวกเตอร์แล้วย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านก่อน จึงนำรีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่ให้ผลที่ถูกต้อง ประกอบกับผู้วิจัยไม่ได้ทำการทดลองซ้ำ ดังนั้นจึงมีค่าร้อยละการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำในการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดของราเอกโตไมคอร์ไรซาโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ในประเทศไทยยังมีอยู่น้อย (Yuwa-Amornpitak; et al. 2006: 1059-1064; Phosri; et al. 2012: 2287-2298) โดยเฉพาะป่าสนผสมเต็งรัง ซึ่งผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้ง 44 ตัวอย่างที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank และ Unite พบว่าสามารถจัดจำแนกได้ 9 วงศ์ 10 สกุล 30 ชนิด คือ Amanitaceae (*Amanita fuliginea*), Boletaceae (*Xerocomus* sp.), Ceratobasidiaceae (*Ceratobasidium* sp.), Inocybaceae (*Inocybe* sp.), Russulaceae (*Lactarius friabilis*, *Lactarius hatsudake*, *Lactarius* sp.1, *Lactarius* sp.2, *Lactarius* sp.3, *Lactarius* sp.4, *Lactarius* sp.5, *Lactarius* sp.6, *Russula* aff. *compacta*, *Russula* sp.1, *Russula* sp.2, *Russula* sp.3, *Russula* sp.4, *Russula* sp.5, *Russula* sp.6, *Russula* sp.7, *Russula* sp.8), Sclerodermataceae (*Scleroderma sinnamariense*), Sebacinaceae (*Sebacina* sp.), Thelephoraceae (*Thelephoraceae* sp.1, *Thelephoraceae* sp.2, *Thelephoraceae* sp.3, *Tomentella* sp.1, *Tomentella* sp.2, *Tomentella* sp.3, *Tomentella* sp.4) และ Dothideomycetes (*Cenococcum geophilum*) ซึ่งในจำนวนนี้ *C. geophilum* เป็นเพียงชนิดเดียวที่จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota นอกนั้นจัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota ทั้งนี้วงศ์ที่พบมากที่สุดได้แก่ Russulaceae (ร้อยละ 50) รองลงมาคือ Thelephoraceae (ร้อยละ 22.7) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ โอะบะสะ; และคนอื่นๆ (Obase; et al. 2011: 383-391) ที่รายงานว่าราเอกโตไมคอร์ไรซาที่พบมากที่สุดที่สน (*Pinus thunbergii*) อยู่ในวงศ์ Russulaceae รวมทั้งรายงานของ พีย์; และคนอื่นๆ (Peay; et al. 2009: 529-542) ที่ศึกษาสังคมราเอกโตไมคอร์ไรซาป่าแถบร้อนพบว่าชนิดราที่พบมากที่สุดอยู่ในอันดับ Russulales (30 สปีชีส์), Boletales (17 สปีชีส์), Agaricales (18 สปีชีส์), Thelephorales (13 สปีชีส์) และ Cantharellales (12 สปีชีส์) ตามลำดับ เช่นเดียวกับผลการศึกษาในประเทศแอฟริกาที่พบราเอกโตไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ russula-lactarius และ tomentella-thelephora จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Bâ; et al. 2012: 1-29) จากผลการเทียบเคียงค่าร้อยละความเหมือนกับฐานข้อมูล GenBank

และ Unite พบว่ามีจำนวนตัวอย่างเพียง 10 ตัวอย่าง ที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดกับราเอกโตไมคอร์ไรซาที่สามารถระบุชนิดได้มากกว่าร้อยละ 97 ทั้งนี้มีตัวอย่างที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดกับราเอกโตไมคอร์ไรซาที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ หรือมีค่าร้อยละความเหมือนต่ำกว่า 97 มากถึง 34 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงถึงความหลากหลายของชนิดราเอกโตไมคอร์ไรซาที่เจริญร่วมกับรากพืชอาศัยใต้ดินอีกด้วย และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานของรากเอกโตไมคอร์ไรซาทั้ง 23 morphotypes กับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งพบว่ามีมากถึง 30 ชนิด ซึ่งมีจำนวนมากกว่า morphotype เนื่องจากราเอกโตไมคอร์ไรซาบางชนิดมีลักษณะของ morphotype เหมือนกัน ลักษณะของ morphotype ที่พบว่ามี ความหลากหลายของชนิดราเอกโตไมคอร์ไรซาสูงที่สุดคือ morphotype 1 (monopodial pinnate, white, smooth) คือพบชนิดรามากถึง 8 ชนิด รองลงมาคือ morphotype 3 (monopodial pinnate, brown, smooth) และ morphotype 12 (dichotomous, orange, smooth) ตามลำดับ ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าลักษณะของ morphotype เพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอในการจัดจำแนกชนิดราเอกโตไมคอร์ไรซา และลักษณะการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซากับรากพืชต่างชนิดกันอาจมีลักษณะของ morphotype ต่างกัน (Wurzburger; Bidartondo; & Bledsoe. 2001: 1211-1216) ดังนั้นการศึกษานิวคลีโอไทด์ของราเอกโตไมคอร์ไรซาจึงต้องศึกษาร่วมกันระหว่างลักษณะ morphotype และข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Tedersoo; et al. 2006: 734-748, Tedersoo; et al. 2008: 479-490, Phosri; et al. 2012: 2287-2298)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดและราเอกโตไมคอร์ไรซาโดยอาศัยแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (phylogenetic tree) ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS จำนวน 47 ตัวอย่าง (เห็ด 12 ตัวอย่าง และราเอกโตไมคอร์ไรซา 35 ตัวอย่าง) ร่วมกับตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 28 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างที่เป็นเห็ดและราเอกโตไมคอร์ไรซาที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันและจัดอยู่ในกิ่งความสัมพันธ์เดียวกันเพียง 3 ตัวอย่าง ได้แก่ *Amanita fuliginosa* (PKBP11, RBP11-66 และ RBP11-67a), *Scleroderma sinnamariense* (PKBP3, PKBP16, RBP17-99) และ *Russula* sp. (PKBP10, RBP13-79a) นอกจากนี้ยังพบอีกว่ามีรา 5 วงศ์ ของ Amanitaceae, Boletaceae, Inocybaceae, Russulaceae และ Sclerodermataceae (จาก 12 วงศ์) ที่พบทั้งเห็ดและราเอกโตไมคอร์ไรซา ในขณะที่มี 3 วงศ์ ของ Astraeaceae, Gomphaceae และ Tricholomataceae ที่พบเฉพาะเห็ด และมี 4 วงศ์ ของ Ceratobasidiaceae, Sebacinaceae, Thelephoraceae และ Dothideomycetes ที่พบเฉพาะราเอกโตไมคอร์ไรซาเท่านั้น เหตุที่การพบราเอกโตไมคอร์ไรซาระยะที่เป็นดอกเห็ดแต่ไม่พบราก หรือพบรากแต่ไม่พบดอกเห็ดนั้นอาจเนื่องจากช่วงระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง ความถี่ในการเก็บตัวอย่าง รวมทั้งฤดูกาลที่มีการเปลี่ยนแปลงในแต่ละปี ปัจจุบันเหล่านี้ล้วนแต่มีความสำคัญต่อการพัฒนาของดอกเห็ดและราเอกโตไมคอร์ไรซาในธรรมชาติ (Chi; et al. 2013: 879-890)

จากตัวอย่างเห็ดและราเอกโตไมคอร์ไรซาที่เก็บรวบรวมได้ เมื่อนำมาแยกเพาะเลี้ยงเส้นใยราบริสุทรีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Norkrans's C (MNC) ที่อุณหภูมิ 30°C พบว่ามีเพียง 1 ตัวอย่างของเห็ดเพาะเลี้ยง *Astraeus sirindhorniae* PKBP28 (4 ไอโซเลท ของ PKBP28-1,

PKBP28-2, PKBP28-3, PKBP28-4) และ 1 ตัวอย่างของรากเอกโตไมคอร์ไรซา RBP1-1 (4 ไอโซเลท ของ RBP1-1a, RBP1-1b, RBP1-1c และ RBP1-1d) ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งลักษณะเส้นใยเห็ดเพาะสิรินธร (*A. sirindhorniae*) มีสีน้ำตาลทอง ละเอียด ซ่อนกันแน่น เจริญขึ้นด้านบนมากกว่าด้านล่าง สร้างเม็ดสีน้ำตาลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนรากเอกโตไมคอร์ไรซา RBP1-1 ทั้ง 4 ไอโซเลท มีลักษณะเหมือนกันคือ เส้นใยมีสีเหลือง ละเอียดเหมือนขนนก เมื่อตรวจสอบลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบโครงสร้างของ clamp connection ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของราในกลุ่ม Basidiomycetes จากนั้นได้พิสูจน์เอกลักษณ์ทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเส้นใยที่แยกจากเห็ดเพาะสิรินธร (*A. sirindhorniae*) ไอโซเลท PKBP28-1 มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. sirindhorniae* PKBP28 ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเส้นใยบริสุทธิ์ที่ได้เป็นเส้นใยจากดอกเห็ดจริง ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเส้นใยที่แยกจากรากเอกโตไมคอร์ไรซา RBP1-1a พบว่ามีความเหมือนสูงที่สุดกับ *Scleroderma sinnamariense* (HQ687222) เท่ากับร้อยละ 100 ทั้งนี้การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยได้เลือกเห็ดเพาะสิรินธร (*A. sirindhorniae*) ไอโซเลท PKBP28-1 ในการศึกษาต่อไปเนื่องจากเป็นเห็ดชนิดใหม่ที่รับประทานได้ (Phosri; et al. 2014: 1-10) และไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อน

เส้นใยบริสุทธิ์ *A. sirindhorniae* ไอโซเลท PKBP28-1 นำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเพื่อการผลิตหัวเชื้อ โดยศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่า pH และอุณหภูมิ ซึ่งตรวจวัดจากการหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยและขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง นาน 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราเจริญได้ดีที่สุดคือ MNC และ MS ทั้งนี้อาจเนื่องจากอาหารทั้ง 2 ชนิด มีสารอาหารและแร่ธาตุต่างๆ รวมทั้งวิตามิน ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. sirindhorniae* มากกว่า PDA และ MMN นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเห็ด *Psathyrella atroumbonata* พบว่าเห็ดเจริญได้ดีบนอาหารที่มีส่วนผสมของแหล่งคาร์บอนที่มาจากน้ำตาลกลูโคส (Jonathan; & Fasidi. 2001: 479-483) ในขณะที่เห็ดหัวหรือ *Phlebopus portentosus* มีรายงานว่าสามารถเจริญได้ดีบนอาหาร MS ซึ่งมี malt extract เป็นแหล่งคาร์บอน (Thongklang; et al. 2010: 413-425) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า NH_4 tartrate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับ *Boletinus* sp. (Hatakeyama; & Ohmasa. 2004: 169-176) ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักของ MNC ส่วนค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ *A. sirindhorniae* มีค่าเท่ากับ 6 ที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) ซึ่งอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมนั้น มีการรายงานว่าขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด เช่น *Volvariella volvacea* เจริญดีที่อุณหภูมิ 35°C, *Pleurotus eryngii* ที่อุณหภูมิ 25°C, *Pleurotus ostreatus* และ *Pleurotus pulmonarius* ที่อุณหภูมิ 30°C, *Agrocybe aegerita* ที่อุณหภูมิ 25°C หรือ 30°C, *Lentinus strigosus* ที่อุณหภูมิ 35°C และ *Lentinula edodes* at 20°C หรือ 30°C เป็นต้น (Thongklang; et al. 2010: 413-425) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเห็ดส่วนใหญ่มีการสร้างดอกเห็ดใน pH ที่เป็นกลางและค่อนข้างเป็นกรด (pH 6-7) อีกด้วย (Kues; & Liu. 2000:

141-152) จากนั้นเพาะเลี้ยงเส้นใยในสภาวะที่เหมาะสมให้ได้เส้นใยจำนวนมากเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดสอบการสร้างเโคโตไมคอร์ไรซา

ในการทดสอบการสร้างเโคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัย 2 ชนิด ได้แก่ กล้าสนสามใบ (*Pinus kesiya* Royle ex Gordon) ซึ่งเป็นตัวแทนของพืชวงศ์ Pinaceae และ กล้ายางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb. Ex G.Don) ซึ่งเป็นตัวแทนของพืชวงศ์ Dipterocarpaceae โดยแบ่งการทดสอบเป็นสองชุดการทดลอง คือ การทดสอบในจานเพาะเชื้อ และการทดสอบในถุงเพาะชำ ซึ่งการทดสอบในจานเพาะเชื้อได้เลือกทดสอบกับกล้าสนสามใบเพียงอย่างเดียวโดยทดสอบบนอาหารแข็ง MNC และ MS นาน 4 สัปดาห์ ไม่พบการสร้างเโคโตไมคอร์ไรซาที่รากกล้าสนสามใบ ซึ่งการทดลองนี้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงกล้าสนสามใบได้นานเกิน 4 สัปดาห์ เนื่องจากต้นกล้ามีอาการเหี่ยวและตายในที่สุด แม้ว่าจะได้ลองเปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MS และ MNC เป็นวัสดุปลูกเวอร์มิคูไลท์และพีทมอส ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกัน

ส่วนการทดสอบในถุงเพาะชำได้ทดสอบกับพืชสองชนิดคือกล้าสนสามใบและกล้ายางนา โดยการเตรียมหัวเชื้อราในวัสดุปลูกเวอร์มิคูไลท์และพีทมอสที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MNC (pH 6) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30-32°C) นาน 4 สัปดาห์ หรือจนเส้นใยเจริญเต็มวัสดุปลูก จึงนำมาผสมดินปลูกในอัตราส่วนของหัวเชื้อราต่อดินปลูกเท่ากับ 1:8 (ปริมาตร:ปริมาตร) ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน โดยปลูกนาน 6 เดือน ซึ่งได้วัดการเจริญคือความสูงทุกเดือน และหามวลชีวภาพรวม (น้ำหนักแห้งของลำต้น ใบ และราก) ในเดือนที่ 6 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อ พบว่าค่าเฉลี่ยความสูงของกล้าสนสามใบที่เติมหัวเชื้อมีค่าเท่ากับ 10.52 ± 1.011 เซนติเมตร และมวลชีวภาพรวมเท่ากับ 0.132 ± 0.063 กรัม ในขณะที่ชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยความสูงเท่ากับ 11.22 ± 1.144 เซนติเมตร และมวลชีวภาพรวมเท่ากับ 0.128 ± 0.055 กรัม ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 นอกจากนี้ได้สุ่มรากพืชมาตรวจหาเโคโตไมคอร์ไรซา พบว่าไม่มีการสร้างเโคโตไมคอร์ไรซา ทั้งนี้ได้สุ่มรากที่มีลักษณะบวม สีน้ำตาล มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลคือไม่พบโครงสร้างของชั้นเมนเทิลที่ปลายราก ฮาร์ทิกเนท หรือโครงสร้างของ clamp connection ดังนั้นร้อยละการติดเชื้อรา *A. sirindhorniae* PKBP28-1 ในรากสนสามใบมีค่าเท่ากับศูนย์ นอกจากนี้ยังได้เพิ่มชุดการทดลองโดยการใส่สารแขวนลอยสปอร์รา *A. sirindhorniae* ในกล้าสนสามใบ โดยปลูกนาน 6 เดือน และให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อครบกำหนดได้สุ่มรากมาตรวจหาเโคโตไมคอร์ไรซา พบว่าไม่มีการสร้างเโคโตไมคอร์ไรซาเช่นกัน จากผลการทดลองอาจเป็นไปได้ว่าสนสามใบไม่ใช่พืชอาศัยของรา *A. sirindhorniae* ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้าของ ฟังก์ฟุก; และคนอื่นๆ (Fungfuk; et al. 2010: 234-241) ได้ทดสอบการสร้างเโคโตไมคอร์ไรซาของรา *Astraeus* 2 สายพันธุ์ คือ *A. odoratus* และ *A. hygrometricus* กับกล้าสนแดงญี่ปุ่น *Pinus densiflora* ในสภาวะปลอดเชื้อพบว่ารา *A. hygrometricus* สามารถสร้างเโคโตไมคอร์ไรซากับรากสนได้ ซึ่งตรวจพบครั้งแรกภายใน 6-8 สัปดาห์ เมื่อใส่เชื้อในรูปของเส้นใย และภายใน 8-10 สัปดาห์เมื่อใส่เชื้อในรูปของสารแขวนลอยสปอร์ ในขณะที่รา *A. odoratus* ไม่พบการสร้างเโคโตไมคอร์ไรซาแม้จะทำการทดสอบนาน 6 เดือน ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *A. odoratus* และ *A. sirindhorniae* เป็นเห็ดที่พบใน

ประเทศไทย และมีรายงานว่าพบในป่าเต็งรัง (dry dipterocarp forests) (Petcharat. 2004: 499-503, Phosri; et al. 2004: 453-463, Phosri; et al. 2014: 1-10) ส่วนรา *A. hygrometricus* นั้นไม่พบในประเทศไทย (Phosri; et al. 2007: 275-286)

จากเหตุผลข้างต้นจึงได้ทำการทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาของรา *A. sirindhorniae* กับกล้ายางนาซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Dipterocarpaceae แทนการทดสอบกับกล้ายางเหียง ซึ่งเป็นบริเวณที่พบเห็ดดังกล่าว (ตาราง 7) เนื่องจากไม่สามารถหากกล้ายางเหียงได้ แต่อย่างไรก็ตามพืชทั้งสองสายพันธุ์เป็นพืชในวงศ์และสกุลเดียวกัน ซึ่งการทดสอบได้ทำเช่นเดียวกับในกล้าสนสามใบ พบว่าในชุดทดสอบที่ผสมหัวเชื้อเส้นใยรา *A. sirindhorniae* PKBP28-1 นาน 6 เดือน มีค่าเฉลี่ยความสูงของกล้ายางนาที่เติมหัวเชื้อมีค่าเท่ากับ 13.23 ± 1.101 เซนติเมตร และมวลชีวภาพรวมเท่ากับ 1.813 ± 0.384 กรัม ในขณะที่ชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยความสูงเท่ากับ 12.85 ± 0.933 เซนติเมตร และมวลชีวภาพรวมเท่ากับ 1.536 ± 0.458 กรัม ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับชุดควบคุม

เมื่อสุ่มรากมาตรวจ พบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซา รูปร่างของรากเปลี่ยนแปลงไป โดยมีลักษณะบวมกว่ารากปกติ สีน้ำตาลดำ ผิวเรียบ ลักษณะการแตกกิ่งแบบ monopodial pinnate มีเส้นใยพันอยู่โดยรอบ เมื่อนำมาตัดตามแนวขวาง พบโครงสร้างของชั้นเมนเทิลที่ปลายรากซึ่งมีความหนาเท่ากับ 7-10 ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังพบเส้นใยราที่เจริญเข้าไปภายในเซลล์รากหรือฮาร์ทิกเนท รวมทั้งเส้นใยราที่สร้างออกมาภายนอกราก ซึ่งมีโครงสร้างของ clamp connection เมื่อคำนวณร้อยละของการติดเชื่อพบว่ามีค่าเท่ากับ 6.25 ส่วนผลการทดสอบโดยการใส่สารแขวนลอยสปอร์รา *A. sirindhorniae* กับกล้ายางนา พบว่ามีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาเฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 36.77 จากผลการทดลองพบว่าการทดสอบโดยการใส่สารแขวนลอยสปอร์รา มีค่าร้อยละการติดเชื่อมากกว่าการใส่หัวเชื้อ อาจเนื่องจากสปอร์ที่ใช้เป็นสปอร์ที่ได้จากดอกเห็ดสดที่เก็บภายใน 7 สัปดาห์จึงเป็นไปได้ที่มีอัตราการงอกของสปอร์สูงจึงติดเชื่อได้ดี ส่วนผลการทดสอบที่ใส่หัวเชื้อเส้นใยรา มีร้อยละการติดเชื่อต่ำเท่ากับ 6.25 ซึ่งในงานวิจัยนี้อาจใช้ปริมาณของหัวเชื้อที่ผสมปลูกน้อยเกินไปหรือหัวเชื้อที่ใช้มีอายุมากเกินไปคือ 4 สัปดาห์ ทำให้เส้นใยราบางส่วนตาย ทั้งนี้ต้องศึกษาเพิ่มเติมถึงอัตราส่วนและอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผสมปลูกต่อไป จากผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่าเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorinae*) มียางนาเป็นพืชอาศัย ทั้งนี้ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยนั้นพบว่าพืชหนึ่งชนิดสามารถมีความสัมพันธ์กับราเอคโตไมคอร์ไรซาได้หลายชนิด (Borowicz; & Juliano. 1991: 385-392; Molina; Massicotte; & Trappe. 1992: 357-423) โดยความจำเพาะของราเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของราและพืช รวมทั้งลักษณะนิเวศวิทยา (Galan; & Moreno. 1998: 265-271) จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorinae*) มีความจำเพาะกับยางนาแต่ไม่จำเพาะกับสนสามใบ

นอกจากนี้เพื่อการยืนยันชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่รากพืชทดสอบว่าเกิดจากเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorinae*) จริง จึงได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 โดยใช้ไพรเมอร์ ITS3/ITS4B จากรากเอคโตไมคอร์ไรซาที่ได้จากการทดสอบก่อนหน้าจำนวน 160 ตัวอย่าง (root

tips) สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 250 คู่เบส ได้จำนวน 143 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 89.38 จากนั้นได้สุ่มผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ 15 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง (direct sequencing) และเทียบกับฐานข้อมูล GenBank, Unite และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. sirindhorniae* พบว่าทุกตัวอย่างสามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ชัดเจน และมีร้อยละความเหมือนเท่ากับร้อยละ 100 กับ *A. sirindhorniae* (HE681772) แสดงว่าตัวอย่างรากเอกโตไมคอร์ไรซาทั้ง 15 ตัวอย่าง เป็น *A. sirindhorniae* ซึ่งเป็นการยืนยันการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาของเห็ดเผาะ สิริन्छกับกล้วยนาอีกด้วย





บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กิตติมา ด้วงแค. (2548). *ไมคอร์ไรซา: ความหลากหลายและแนวทางการพัฒนา*. ในรายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้และสัตว์ป่า “ความก้าวหน้าของผลงานวิจัยและกิจกรรมปี 2548”. 21-24 สิงหาคม 2548; โรงแรมรีเจนท์ ชะอำ: เพชรบุรี. หน้า 187-201.
- กิตติมา ด้วงแค; วินันท์ดา หิมะมาน; จันจิรา อายะวงศ์; กฤษณา พงษ์พานิช; และ จิรพรรณ โสภี. (2550). *ความหลากหลายของเห็ดราไมคอร์ไรซาในระบบนิเวศป่าไม้เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว*. หน้า. 1-16.
- กรมป่าไม้. (2555). *เนื้อที่ป่าไม้ของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2516 - 2551*. สืบค้นเมื่อ 8 มีนาคม 2555, จาก <http://forestinfo.forest.go.th/55/Content.aspx?id=1>
- จินตนา บุพบรรพต; และ ศิริภา โพธิ์พินิจ. (2545). *การใช้ประโยชน์ของเชื้อราเคโตไมคอร์ไรซากับกล้าไม้วงศ์ไม้อย่าง 1. ความหลากหลายของเชื้อราเคโตไมคอร์ไรซาในสวนป่าไม้วงศ์ยางบางชนิดและการแยกเชื้อรา*. ใน รายงานการประชุมวิชาการป่าไม้ ศักยภาพของป่าไม้ต่อการฟื้นฟูเศรษฐกิจไทย. หน้า 394-406. กรุงเทพฯ: กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.
- เชิดชัย โพธิ์ศรี. (2548). *การสร้างเคโตไมคอร์ไรซาของรากกลุ่ม Gasteromycetes ในกล้าไม้ป่า*. รายงานการวิจัย. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม. ถ่ายเอกสาร.
- ธารรัตน์ แก้วกระจ่าง. (2551). *การเติบโตและการใช้น้ำของกล้าไม้อย่างนา (Dipterocarpus alatus Roxb. Ex G. Don) ที่อยู่ร่วมกับเห็ดเผาะหนัง (Astraeus odoratus C. Phosri, R. Watling, M.P. Martin & A.J.S. Whalley) แบบเคโตไมคอร์ไรซา*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยาป่าไม้). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.
- พรรณพร กุลมา; มณูศิลป์ ศิริมาตย์; และ สายสมร ล้ายอง. *การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดระโงกเพื่อการจำแนกแยกชนิดที่รับประทานไม่ได้*. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 ; 1-4 กุมภาพันธ์ 2554; กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2554 หน้า. 273-280.
- มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร. (2552). *พืชกู่พาน*. สืบค้นเมื่อ 15 พฤศจิกายน 2555, จาก <http://pineapple-eyes.snru.ac.th/animal/pupan/index.php?q=node/202>
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.). (2550). *เห็ดในป่าสะแกราช*. หน้า. 1-154. กรุงเทพฯ: อรุณการพิมพ์.
- สุนัดดา โยมญาติ. (2551). *โครงสร้างสังคมของราเคโตไมคอร์ไรซาและการประยุกต์เพื่อการปลูกป่าไม้วงศ์ไม้อย่าง*. วิทยานิพนธ์ วท.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

- สุรเชษฐ์ พัฒนพานิชสวัสดิ์. (2551). การทดสอบการสร้างเคโดไมคอร์ไรซากับรากพืชทดสอบ โดยราเห็ดตับเต่าดำ. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อนงค์ จันทรศรีกุล; พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์; อุทัยวรรณ แสงวณิช; Morinaga, Tsutomu; Nishzawa, Yoshinori; & Murakami, Yasuaki. (2551). ความหลากหลายของเห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. หน้า 1-256. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อนงค์ จันทรศรีกุล. ความหลากหลายของเห็ดราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. ใน รายงานการประชุม เรื่องการจัดทำทะเบียนรายการชนิดเห็ดในประเทศไทย; 12 กุมภาพันธ์ 2552; กรุงเทพฯ: กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม; 2552. หน้า 10-19.
- อนิวรรณ เฉลิมพงษ์; และ ธีรวัฒน์ บุณฑวิคุณ. (2525). การสำรวจเคโดไมคอร์ไรซาในระบบนิเวศน์ป่าดิบแล้ง. ใน รายงานผลการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 1-29. กรุงเทพฯ: ฝ่ายแผนที่ภาพถ่ายทางอากาศและดาวเทียม กองจัดการป่าไม้ กรมป่าไม้.
- Abarenkov, Kessy; Tedersoo, Leho; Nilsson, Henrik R.; Vellak, Kai; Saar, Irja; Veldre, Vilmar; Parmasto, Erast; Proust, Marko; Aan, Anne; Ots, Margus; Kurina, Olavi; Ostonen, Ivika; Janno, Jõgeva; Halapuu, Siim; Põldmaa, Kadri; Toots, Märt; Truu, Jaak; Larsson, Karl-Henrik; & Kõljalg, Urmas. (2010). PlutoF—a Web Based Workbench for Ecological and Taxonomic Research, with an Online Implementation for Fungal ITS Sequences. *Evolutionary Bioinformatics*. 6: 189-196.
- Agarwal, Pragya; & Sah, Pankaj. (2009). Ecological Importance of Ectomycorrhizae in World Forest Ecosystems. *Nature and Science*. 7(2): 107-116.
- Agerer, Reinhard. (1991). Characterization of Ectomycorrhiza. In *Methods in Microbiology*, pp. 25-74. San Diego: Academic Press.
- Alexander, Ian J.; & Hogberg, Peter. (1986). Ectomycorrhizas of Tropical Angiosperms. *New Phytologist*. 102: 541-549.
- Allen, Michael F.; Swenson, William; Querejeta, Jose I.; Egerton-Warburton, Louise M.; & Treseder, Kathleen K. (2003). Ecology of Mycorrhizae: a Conceptual Rramework for Complex Interactions Among Plants and Fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 41: 217–303.
- Amaranthus, Michael P. (1998). *The Importance and Conservation of Ectomycorrhizal Fungal Diversity in Forest Ecosystems: Lessons from Europe and the Pacific Northwest*. pp. 1-17. Portland: Pacific Northwest Research Station.
- Arpha, Kittibhorn; Phosri, Cherdchai, Suwannasai, Nuttika; Mongkolthanaruk, Wiyada; & Sodngam, Sirirath. (2012). Astraodoric Acids A-D: New Lanostane Triterpenes

- from Edible Mushroom *Astraeus odoratus* and their Anti-*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra and Cytotoxic Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(39): 9834-9841.
- Aungaudchariya, Amornrat; Bangrak, Phuwadol; Dell, Bernard; Lumyong, Saisamorn; & Kamlangdee, Niyom. (2012). Preliminary Molecular Identification of *Boletus griseipurpureus* Corner from Thailand and its Nutritional Value. *Journal of Agricultural Technology*. 8(6): 1991-1998.
- Bâ, Amadou M; Duponnois, R; Moyersoën, B; Diedhiou, Abdala G. (2012) Ectomycorrhizal symbiosis of tropical African trees. *Mycorrhiza*. 22: 1-29.
- Badalyan, Susanna. (2012). Medicinal Aspects of Edible Ectomycorrhizal Mushrooms. In *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms*. pp. 317-334. Heidelberg: Acid-Free Paper
- Bahram, Mohammad; Po~lme, Sergei; Ko~ljalg, Urmas; & Tedersoo, Leho. (2011). A Single European aspen (*Populus tremula*) Tree Individual May Potentially Harbour Dozens of *Cenococcum geophilum* ITS Genotypes and Hundreds of Species of Ectomycorrhizal Fungi. *FEMS Microbiology Ecology*. 75: 313-320.
- Bahram, Mohammad; Kõljalg, Urmas; Kohout, Petr; Mirshahvaladi, Shahab; & Tedersoo, Leho. (2013). Ectomycorrhizal Fungi of Exotic Pine Plantations in Relation to Native Host Trees in Iran: Evidence of Host Range Expansion by Local Symbionts to Distantly Related Host Taxa. *Mycorrhiza*. 23: 11–19.
- Baker, Belinda; Bandara, Veronika; Bizilis, Josh; Blias, Peter; Chippillo, Marina; Horwood, Rebecca K.; Mayes, Phil; Misso, Genaya; Staples, Alan; & Thabthiang, Joanna. (2013). Mushroom Terms Glossary. Retrieved November 15, 2012, from http://www.toxinology.com/fusebox.cfm?staticaction=poisonous_mushrooms/mushrooms_glossary1.htm
- Bas, Cornelis. (1969). Morphology and Subdivision of *Amanita* and a Monograph of its Section *Lepidella*. *Persoonia*. 5: 285-579.
- Bedini, Stefano; Turrini, Alessandra; Rigo, Chiarafrancesca; Argese, Emanuele; & Giovannetti, Manuela. (2010). Molecular Characterization and Glomalin Production of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Colonizing a Heavy Metal Polluted Ash Disposal Island, Downtown Venice. *Soil Biology and Biochemistry*. 42(5): 758-765.
- Bonfante, Paola; & Genre, Andrea. (2010). Mechanisms Underlying Beneficial Plant – Fungus Interactions. *Nature Communications*. 1(48): 1-11.

- Borowicz, Victoria A.; & Juliano, Steven A. (1991). Specificity in Host Fungus Associations: Do Mutualists Differ from Antagonists?. *Evolutionary Ecology*. 5: 385–392.
- Brundrett, Mark C., Melville, Lewis H.; Peterson, Larry R. (1994). Practical Methods in Mycorrhizal Research: Based on a Workshop Organized in Conjunction with the Ninth North American Conference on Mycorrhizae, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. pp. 1-161. Canada: Mycologue Publications.
- Brundrett, Mark C.; Bougher, Neale; Dell, Bernie; Grove, Tim; & Malajczuk, Nick. (1996). *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. pp. 1-734. Canberra: Pirie.
- Brundrett, Mark C. (2004). Diversity and Classification of Mycorrhizal Associations. *Biological Reviews*. 79(3): 473–495.
- Brundrett, Mark C. (2008). Mycorrhizal Associations: The Web Resource. Retrieved November 15, 2012, from <http://mycorrhizas.info/index.html>
- Brundrett, Mark C. (2009). Mycorrhizal Associations and Other Means of Nutrition of Vascular Plants: Understanding the Global Diversity of Host Plants by Resolving Conflicting Information and Developing Reliable Means of Diagnosis. *Plant Soil*. 320: 37-77.
- Bruns, Thomas D.; Bidartondo, Martin I.; & Taylor, Lee D. (2002). Host Specificity in Ectomycorrhizal Communities: What Do the Exceptions Tell Us?. *Integrative and Comparative Biology*. 42(2): 352–359.
- Burgess, Treena; Dell, Bernie; & Malajczuk, Nick. (1994). Variations in Mycorrhizal Development and Growth Stimulation by 20 *Pisolithus* isolates Inoculated on to *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden. *New Phytologist*. 127: 731–739.
- Chakravarty, P.; & Hwang, S.F. (1991). Effect of an Ectomycorrhizal Fungus, *Laccaria laccata*, on *Fusarium* Damping-off in *Pinus banksiana* Seedlings. *European Journal of Forest Pathology*. 21(2): 97-106.
- Chi, D.D.; Guo, S.J.; Sun, X.B.; Qin, T.T. (2013). The major factors affecting ectomycorrhizal fungi diversity in the forest ecosystem. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 5(7): 879-890.
- Crane, Sharron; Barkay, Tamar; & Dighton, John. (2012). The Effect of Mercury on the Establishment of *Pinus rigida* Seedlings and the Development of their Ectomycorrhizal Communities. *Fungal Ecology*. 5(2): 245-251.
- Deborah, Hill. (2012). Truffles & Other Edible Mycorrhizal Mushrooms. Retrieved November 15, 2012, from <http://www.uky.edu/Ag/NewCrops/introsheets/truffles.pdf>

- Dell, Bernard; Sanmee, Rarunee; Lumyong, Pipob; & Lumyong, Saisamorn. (2005) Ectomycorrhizal Fungi in Dry and Wet Dipterocarp Forests in Northern Thailand - Diversity and Use as Food. Proceedings of the 8th Round Table Conference on Dipterocarps, 2005 Nov 15-17; Ho Chi Minh City, Vietnamese.
- Dery, Bernard. (2011). Vegetal Biology. Retrieved November 15, 2012, from http://www.infovisual.info/01/024_en.html.
- Doyle, John J.; & Doyle, Jane L. (1990). Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus*. 12: 13–15.
- Duddridge, J.A. (1986). The Development and Ultrastructure of Ectomycorrhizas: III Compatible and Incompatible Interactions between *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing. And 11 Species of Absence of Exogenous Carbohydrate. *New Phytologist*. 103(3): 457-464.
- Egger, Keith N.; & Fortin, Andre J. (1988). Ectendomycorrhizae: Diversity and Classification. In: Lalonde, M; Piché, Y. Editors. Proceeding of the Canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry; 1988; C.R.B.F., Université Laval, Ste-Foy, Canada, pp. 113–114.
- Egli, Simon; Hutter, Sylvia; & Peter, Martina. (2010). Fundiv - Functional Diversity. Retrieved November 15, 2012, from http://www.wsl.ch/fe/walddynamik/projekte/fundiv/index_EN.
- Elsen, Annemie; Gervacio, Dennice; Swennen, Rony; & Waelé, Dirk De. (2008). AMF-Induced Biocontrol Against Plant Parasitic Nematodes in *Musa* sp.: A Systemic Effect. *Mycorrhiza*. 18(5): 251-256.
- Felsenstein, J. (1989). PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- Fungfuk, Wanwisa; Okada, Keiichi; Petchang, Ratchanee; Ta-anun, Chaiwat; Fukuda, Masiki; & Yamada, Akiyoshi. (2010). In vitro Mycorrhization of Edible *Astraeus* Mushrooms and their morphological characterization. *Mycoscience*. 51: 234–241.
- Fungfuk, Wanwisa; Petchang, Ratchanee; Ta-anun, Chaiwat; Fukuda, Masiki; Yamada, Akiyoshi. (2010). Identification of Japanese *Astraeus*, Based on Morphological and Phylogenetic Analyses. *Mycoscience*. 51: 291-199.
- Galan, R.; & Moreno, G. (1998). *Ruhlandiella berolinensis*, an Exotic Species in Europe. *Mycotaxon*. 68: 265-271.
- Gao, Cheng; Shi, Nan-Nan; Liu Yue-Xing; Peay, Kabir G; Zheng, Yong; Ding, Qiong; Mi, Xiang-Cheng; Ma, Ke-Ping; Wubet, Tesfaye; Buscot, Francois; & Guo, Liang-Dong.

- (2013). Host plant genus-level diversity is the best predictor of ectomycorrhizal fungal diversity in a Chinese subtropical forest. *Molecular Ecology*. 22(12): 3403-3414.
- Gardes, Monique; & Bruns, Thomas D. (1993). ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes—Application to the Identification of Mycorrhizas and Rusts. *Molecular Ecology*. 2: 113–118.
- Goodman, Doug; Durall, Dan; & Trofymow, Tony. (2008). *Morphology of Ectomycorrhizal System (Dissection Microscope)*. Retrieved November 15, 2012, from http://forestry-dev.org/biodiversity/bcern/glossary/glossary_system-tips_e.html.
- Hacskeylo, Edward. (1953). Pure Culture Synthesis of Pine Mycorrhizae in Terralite. *Mycologia*. 45: 971-975.
- Hall, Ian R.; Yun, Wang; & Amicucci, Antonella. (2003). Cultivation of Edible Ectomycorrhizal Mushrooms. *Trends in Biotechnology*. 21(10): 433-438.
- Hatakeyama, Tomoyuki; & Ohmasa, Masatake. (2004). Mycelial growth of strains of the genera *Suillus* and *Boletinus* in media with a wide range of concentrations of carbon and nitrogen sources. *Mycoscience*. 45(2): 169-176.
- Hirose, Dai; Shirouzu, Takashi; & Tokumasu, Seiji. (2010). Host Range and Potential Distribution of Ectomycorrhizal Basidiomycete *Suillus pictus* in Japan. *Fungal Ecology*. 3(3): 255-260.
- Horton, Thomas R.; & Bruns, Thomas D. (1998). Multiple Host Fungi are the Most Frequent and Abundant Ectomycorrhizal Types in a Mixed Stand of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* D. Don) and Bishop Pine (*Pinus muricata* D. Don). *New Phytologist*. 139(2): 331-339.
- Huelsenbeck, J. P.; & F. Ronquist. (2001). MRBAYES: Bayesian Inference of Phylogeny. *Bioinformatics*. 17: 754-755.
- Ianson, David; & Smeenk, Jeff. (2010). Mycorrhizae in the Alaska Landscape. *Cooperative Extension Service*. 26: 1-7.
- Jordache, Virgil; Gherghel, Felicia; & Kothe, Erika. (2009). Assessing the Effect of Disturbances on Ectomycorrhiza Diversity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 6(2): 414-432.
- Jonathan, Segun G.; & Fasidi, Isola O. (2001). Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), a Nigerian edible mushroom. *Food Chem*. 72: 479-483.

- Kottke, Ingrid; & Oberwinkler, Franz. (1986). Mycorrhiza of Forest Trees - Structure and Function. *Trees*. 1(1): 1-24.
- Kues, Ursula; & Liu, Yi. (2000). Fruiting Body Production in Basidiomycetes. *Applied Microbiology Biotechnology*. 54(2): 141-152.
- Largent, David L.; Johnson, David; & Watling, Roy. (1977). *How to Identify Mushrooms to Genus III: Microscopic Features*. pp. 1-148. Eureka, California.: Mad River Press.
- Largent, David L.; Stuntz, Daniel E.; & Hadley, Sharon. (1986). *How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic Features*. pp. 1-166. Eureka, California.: Mad River Press.
- Marx, Donald H.; & Zak, Bratislav. (1965). Effect of pH on Mycorrhizal Formation of Slash Pine in Asepticulture. *Forest Science*. 11: 66-75.
- Massicotce, Hugues B.; Ackerley, C.A.; & Peterson, Larry R. (1986). Localization of Three Sugar Residues in the Interface of Ectomycorrhizae Synthesized between *Alnus crispa* and *Alpova diplophloeus* as Demonstrated by Lectin Binding. *Canadian Journal of Botany*. 65(6): 1127-1132.
- Massicotte, Hugues B.; Melville, Lewis H.; & Peterson, Larry R. (2005). Building a Basidiocarp: a Case Study of *Laccaria* spp. Fruitbodies in the Extraradical Mycelium of *Pinus* ectomycorrhiza. *Mycologist*. 19: 141-149.
- Melin, Elias. (1922). Untersuchungen über die Larix-Mykorrhiza. I. Synthese der Mykorrhiza in Reinkultur. *Svensk Botanisk Tidskrift*. 16: 161-196.
- Molina, Randy.; Massicotte, Hugues B.; & Trappe, James M. (1992). Specific Phenomena in Mycorrhizal Symbiosis; Community Ecological Consequences and Practical Implications. In *Mycorrhizal Functioning*. pp. 357-423. New York: Chapman and Hall.
- Moore, Devid. (2012). *Nutrient Exchange*. Retrieved November 15, 2012, from http://www.davidmoore.org.uk/assets/mostly_myecology/diane_howarth/nutrients.htm
- Moro, Carlos.; Palacios, Irene.; Lozano, Miguel.; D'Arrigo, Matilde.; Guillamon, Eva.; Villares, Ana.; Martinez, Jose A.; & Garcia-Lafuente, Ana. (2012). Anti-Inflammatory Activity of Methanolic Extracts from Edible Mushrooms in LPS Activated RAW 264.7 Macrophages. *Food Chemistry*. 130(2): 350-355.
- Norikura, Toshio.; Fujiwara, Kenshu.; Narita, Takanobu.; Yamaguchi, Shinya.; Morinaga, Yae.; Iwai, Kunihsa.; & Matsue, Hajime. (2011). Anticancer Activities of Thelephantin O and Vialinin A Isolated from *Thelephora aurantiotincta*. *Agricultural and Food Chemistry*. 59(13): 6974-6979.

- Obase, Keisuke; Tamai, Yutaka; Yajima, Takashi; & Miyamoto, Toshizumi. (2007). Mycorrhizal Associations in Woody Plant Species at the Mt. Usuvolcano, Japan. *Mycorrhiza*. 17(3): 209-215.
- Obase, Keisuke; Tamai, Yutaka; Yajima, Takashi; & Miyamoto, Toshizumi. (2009). Mycorrhizal Synthesis of Four Ectomycorrhizal Fungi in Potted *Populus maximowiczii* Seedlings. *Mycoscience*. 50(2): 143-145.
- Obase, Keisuke; Lee, Jong Kyu; Lee, Sang Yong; & Chun, Kun Woo. (2011). Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in *Pinus thunbergii* coastal forest in the eastern region of Korea. *Mycoscience*. 52: 383-391.
- Obase, Keisuke; Cha, Joo Young; Lee, Jong Kyu; Lee, Sang Yong; & Chun, Kun Woo. (2012). Ectomycorrhizal Fungal Community Associated with Naturally Regenerating *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. Seedlings on Exposed Granite Slopes along Woodland Paths. *Journal of Forest Research*. 17(4): 388-392.
- Oliveira, Rui S.; Franco, Albina R.; & Castro, Paula M.L. (2012). Combined use of *Pinus pinaster* Plus and Inoculation with Selected Ectomycorrhizal Fungi as an Ecotechnology to Improve Plant Performance. *Ecological Engineering*. 43: 95-103.
- Peay, Kabir G; Kennedy, Peter G; Davies, Stuart J; Tan, Sylvester; & Bruns, Thomas D. (2009). Potential link between plant and fungal distributions in a dipterocarp rainforest: community and phylogenetic structure of tropical ectomycorrhizal fungi across a plant and soil ecotone. *New Phytologist*. 185: 529-542.
- Petcharat, Vasun. (2004). Edible *Astraeus* (Basidiomycota) from Thailand. *Nordic Journal of Botany*. 23: 499-503.
- Peterson, Larry R.; & Chakravarty, P. (1991). Techniques in Synthesizing Ectomycorrhiza. *Methods in Microbiology*, pp. 75-105. Ottawa: NRC Research.
- Peterson, Larry R.; Massicotte, Hugues B.; & Melville, Lewis H. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. pp. 1-173. Ontario: The National Research Council of Canada.
- Phillips, J.M.; & Hayman, D.S. 1970. Improved Procedures for Clearing Roots and Staining Parasitic and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Rapid Assessment of Infection. *Transaction of British Mycological Society*. 55: 158-161.
- Phosri, Cherdchai; Watling, Roy; Martin, Maria P.; & Whalley, Anthony J.S. (2004). The Genus *Astraeus* in Thailand. *Mycotaxon*. 89(2): 453-463.

- Phosri, Cherdchai; Martin, Maria P.; Sihanonth, Prakitsin; Whalley, Anthony J. S.; & Watling, Roy. (2007). Molecular Study of the Genus *Astraeus*. *Mycological Research*. 3: 275-286.
- Phosri, Cherdchai; Suwannasai, Nuttika; Sihanonth, Prakitsin; Martin, Maria P.; Jeffries Peter; Whalley, Anthony J. S.; & Watling, Roy. (2010). *Fungal Diversity Using Molecular Based Techniques From Field to Laboratory*. *International Seminar Biotechnology*. pp. 1-7.
- Phosri, Cherdchai; Martin, Maria P.; Suwannasai, Nuttika; Sihanonth, Prakitsin; Watling, Roy. (2012). *Pisolithus*: A New Species from Southeast Asia and a New Combination. *Mycotaxon*. 120: 195-208.
- Phosri, Cherdchai; Polme, Sergei; Taylor, Andy F. S.; Koljalg, Urmas; Suwannasai, Nuttika; & Tedersoo, Leho. (2012). Diversity and Community Composition of Ectomycorrhizal Fungi in a Dry Deciduous Dipterocarp Forest in Thailand. *Biodiversity and Conservation*. 21(9): 2287-2298.
- Phosri, Cherdchai; Watling, Roy; Suwannasai, Nuttika; Wilson, Andrew; & Martin, Maria P. (2014). A New Representative of Star-Shaped Fungi: *Astraeus sirindhorniae* sp. nov. from Thailand. *PLoS ONE* 9(5): 1-10.
- Redecker, Dirk; & Raab, Philipp. (2006). Phylogeny of the Glomeromycota (Arbuscular Mycorrhizal Fungi): Recent Developments and New Gene Markers. *Mycologia*. 98(6): 885–895.
- Rinaldi, Andrea C.; Comandini, Ornella; & Kuyper, Thomas W. (2008). Ectomycorrhizal Fungal Diversity: Separating the Wheat from the Chaff. *Fungal Diversity*. 33: 1-45.
- Royal Botanic Garden Edinburgh. 1969. *Flora of British Fungi [Chart] : colour identification chart*. Edinburgh: Crown.
- Sambrook, Joseph; Fritsch, Edward F.; & Maniatis, Thomas. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. pp. 1-2344. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanmee, Rarunee; Dell, Bernard; Lumyong, Pipob; Izumori, Ken; & Lumyong, Saisamorn. (2003). Nutritive Value of Popular Wild Edible Mushrooms from Northern Thailand. *Food Chemistry*. 82(4): 527-532.
- Sanmee, Rarunee. (2004). *Biodiversity, Host Range, and Growth of Edible Ectomycorrhizal Fungi in Upper Northern Thailand*. Thesis Doctor of Philosophy. Chiang Mai: Chiang Mai University: copy. pp. 1-282

- Sanmee, Rarunee; Tulloss, Rodham E.; Lumyong, Pipob; Dell, Bernard; & Lumyong, Saisamorn. (2008). Studies on *Amanita* (*Basidiomycetes: Amanitaceae*) in Northern Thailand. *Fungal Diversity*. 32: 97-123.
- Sanmee, Rarunee; Lumyong, Pipob; Dell, Bernard; & Lumyong, Saisamorn. (2010). In Vitro Cultivation and Fruit Body Formation of the Black Bolete, *Phlebopus portentosus*, a Popular Edible Ectomycorrhizal Fungus in Thailand. *Mycoscience*. 51(1): 15-22.
- Seehanan, Sirilak; & Petcharat, Vasan. (2008). Some Species of Wild Boletes in Thailand. *Journal of Agricultural Technology*. 4(1): 109-118.
- Selosse, Marc-André; & Tacon, Francois Le. (1998). The Land Flora: A Phototroph–Fungus Partnership?. *Trends in Ecology & Evolution*. 13(1): 1-20.
- Shimomura, Norihiro; Matsuda, Miyuki; Aritoshi, Kunio; Yi, Ruirong; & Aimi, Tadanori. (2011). *Mycelial Slurries as Spawn for Cultivation of the Edible Ectomycorrhizal Mushroom Rhizapogon roseolus*. In Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7). pp. 529-536.
- Smith, Sally E.; & Read, David J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd ed. pp. 1-605. London: Academic Press.
- Smith, Sally E.; & Read, David J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd ed. pp. 1-787. London: Academic Press.
- Suz, Laura M.; Azul, Anabela M.; Morris, Melissa H.; Bledsoe, Caroline S.; & Martin, Maria P. (2008). Morphotyping and Molecular Methods to Characterize Ectomycorrhizal Roots and Hyphae in Soil. In *Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence*, V.15. pp. 437-474. Heidelberg: WMXdesign GmbH.
- Swofford, David L. (2003). PAUP*, Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Sunderland: Massachusetts, Sinauer Association Inc.: 303-324.
- Tamura, Koichiro; Peterson, Daniel; Peterson, Nicholas; Stecher, Glen; Nei, Masatoshi; & Kumar, Sudhir. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28(10): 2731-2739.
- Tang, M.; Sheng, M.; Chen, H.; & Zhang, F.F. (2009). In Vitro Salinity Resistance of Three Ectomycorrhizal Fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. 41(5): 948–953.

- Taylor, Lee D.; & McCormick, Melissa K. (2008). Internal Transcribed Spacer Primers and Sequences for Improved Characterization of Basidiomycetous Orchid Mycorrhizas. *New Phytologist*. 177: 1020–1033.
- Tedersoo, Leho; Suvi, Triin; Larsson, Ellen; & Kõljalg, Urmas. (2006). Diversity and Community Structure of Ectomycorrhizal Fungi in a Wooded Meadow. *Mycological Research*. 110: 734-748.
- Tedersoo, Leho; Jairus, Teele; Horton, Bryony M.; Abarenkov, Kessy; Suvi, Triin; Saar, Irja; & Kõljalg, Urmas. (2008). Strong Host Preference of Ectomycorrhizal Fungi in a Tasmanian Wet Sclerophyll Forest as Revealed by DNA Barcoding and Taxon-Specific Primers. *New Phytologist*. 180: 479–490.
- Thongklang, Naritsada; Hyde, Kevin D.; Bussaban, Boonsom; & Lumyong, Saisamorn. (2010). Culture Condition, Inoculum Production and Host Response of a Wild Mushroom, *Phlebopus portentosus* Strain CMUHH121-005. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 5(3): 413-425.
- Trappe, James M. (1967). Pure Culture Synthesis of Douglas-fir Mycorrhizae with Species of *Hebeloma*, *Suillus*, *Rhizopogon* and *Astraeus*. *Forest Science*. 13: 121-130.
- Turjaman, Maman; Tamai, Yutaka; & Segah, Hendrik. (2005). Inoculation with the Ectomycorrhizal Fungi *Pisolithus arhizus* and *Scleroderma* sp. Improves Early Growth of *Shorea pinanga* Nursery Seedlings. *New Forests*. 30(1): 67-73.
- White, Taylor J.; Bruns, Thomas D.; Lee, Steven B.; & Taylor, John W. (1990). *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Eds. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J.). pp. 315-322. New York: Academic Press.
- Wurzburger, Nina; Bidartondo, Martin I.; & Bledsoe, Caroline S. (2001). Characterization of *Pinus* ectomycorrhizas from mixed conifer and pygmy forests using morphotyping and molecular methods. *Canadian Journal of Botany*. 79: 1211-1216.
- Yamada, Akiyoshi; & Katsuya, Keizo. 1995. Mycorrhizal association of isolates from sporocarps and ectomycorrhizas with *Pinus densiflora* seedlings. *Mycoscience*. 36: 315-323.
- Yamada, Akiyoshi; Ogura, Takeo; Degawa, Yosuke; & Ohmasa. (2001). Isolation of *Tricholoma matsutake* and *T. bakamatsutake* Cultures from Field-Collected Ectomycorrhizas. *Mycoscience*. 42: 43-50.

- Yamada, Akiyoshi; Ogura, Takeo; & Ohmasa, Masatake. (2001). Cultivation of Mushrooms of Edible Ectomycorrhizal Fungi Associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal Synthesis. *Mycorrhiza*. 11: 59-66.
- Yang, Shuang; Ren, Xiaodong; Sheng, Jingxue; Lu, Jiahui; Li, Tingting; Tang, Fangrong; Wang, Yanfeng; Meng, Lingjun; Meng, Qingfan; & Lirong Teng. (2010). Preparation and the Antitumor Activity in Vitro of Polysaccharides from *Tricholoma matsutake*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26(3): 497-503.
- Yang, Zong Liang. (1997). Die *Amanita*-Arten von Südwestchina. *Bibliotheca Mycologica*.170: 1-240.
- Yu, Trevor E. J-C.; Egger, Keith N.; & Peterson, Larry R. (2001). Ectendomycorrhizal Associations – Characteristics and Functions. *Mycorrhiza*. 11: 167–177.
- Yuwa-Amornpitak, Thalisa; Vichitsoonthonkul, taweerat, Tanticharoen Morakot; Cheevadhanarak, Supaporn; & ratchadawong, sansnarak. (2006). Diversity of ectomycorrhizal fungi on dipterocarpaceae in Thailand. *Journal of Biological Sciences* 6: 1059–1064.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียม

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. Miller Luria-Bertani agar (LBA)

Miller Luria-Bertani (LB)	25.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Miller Luria-Bertani (LB) broth

Miller Luria-Bertani (LB)	25.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Modified Norkrans's C (MNC)

NH ₄ -tartate	500	มิลลิกรัม
KH ₂ PO ₄	1,000	มิลลิกรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	500	มิลลิกรัม
Glucose	10	กรัม
Casein hydrolysate	0.23	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Thiamine HCl	50	ไมโครกรัม
FeCl ₃ 0.5 โมลาร์	1	มิลลิลิตร
ZnSO ₄ 0.5 โมลาร์	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH 5.6-5.8 จากนั้นเติมวุ้นลงไป 15 กรัม ในกรณีที่ต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในการทดสอบหา pH ที่เหมาะสมโดยการปรับ pH ของ MNC ให้ได้ pH ตามที่ต้องการ และต้มให้วุ้นละลายจนหมด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม Streptomycin โดยปรับให้มี

ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tetracycline ปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อลิตร

4. Modified Melin-Norkrans (MMN)

$(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$	250	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	500	มิลลิกรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	150	มิลลิกรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50	มิลลิกรัม
NaCl	25	มิลลิกรัม
FeEDTA	20	มิลลิกรัม
Glucose	10	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Thiamine HCl	0.1	ไมโครกรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.8 จากนั้นใส่วุ้น 15 กรัม ต้มจนวุ้นละลายจนหมดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Potato Dextrose Agar (PDA)

PDA	39	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมไปต้มจนวุ้นละลายจนหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Murashige and Skoog medium

NH_4NO_3	1,650	มิลลิกรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	มิลลิกรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	170	มิลลิกรัม
KNO_3	1,900	มิลลิกรัม
H_3BO_3	6.2	มิลลิกรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	มิลลิกรัม

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	มิลลิกรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	มิลลิกรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	มิลลิกรัม
KI	0.83	มิลลิกรัม
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	มิลลิกรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	มิลลิกรัม
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.2	มิลลิกรัม
Inositol	100	มิลลิกรัม
Glycine	2	มิลลิกรัม
Nicotinic acid	0.5	มิลลิกรัม
Pyridoxine HCl	0.5	มิลลิกรัม
Thiamine HCl	0.1	มิลลิกรัม
Sucrose	30	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.6-5.8 จากนั้นใส่รุ้น 15 กรัม ต้มจนรุ้นละลายจนหมดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. SOC medium

Tryptone	20.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
1 M Glucose	20.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	950	มิลลิลิตร

ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงเติม

250 mM KCl	10.0	มิลลิลิตร
------------	------	-----------

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเติม 2 M MgCl_2 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5.0 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น	1000	มิลลิลิตร
-------------------------------------	------	-----------



ภาคผนวก ข

บัพเพอร์และวิธีการเตรียมสาร

บัฟเฟอร์และสารเคมีที่ใช้

1. 1% Agarose

agarose	1	กรัม
0.5x TBE buffer	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจากนั้นนำไปต้มให้ agarose ละลายจนหมด

2. Ampicillin Solution

Ampicillin	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

เขย่าให้สารละลายเข้ากันจากนั้นนำไปกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เก็บสารที่ได้ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) Buffer

1M Tris HCl pH 8	20	มิลลิลิตร
5M Sodium Chloride	56	มิลลิลิตร
0.5M Ethylenediaminetetraacetic acid	4	มิลลิลิตร
CTAB	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Isopropylthiogalactoside (IPTG) Solution

IPTG	2	กรัม
น้ำกลั่น	8	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เก็บสารที่ได้ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. X-Gal Solution

X-Gal	20	มิลลิกรัม
Dimethylformamide	1	มิลลิลิตร

เขย่าให้สารละลายเข้ากัน โดยสารละลายที่ได้ต้องใสไม่มีสีเหลือง ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นห่อหลอดที่เก็บสารด้วยฟรอย เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. Melzer's reagent

Iodine	1.5	กรัม
Potassium-Iodide	5	กรัม
Chloral Hydrate	100	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดไปอุ่นแต่ห้ามเดือด

7. Rnase A

ชั่ง Rnase A 100 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มี 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl (pH 7.5) และ 15 ไมโครโมลาร์ NaCl ผสมอยู่จากนั้นนำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนเป็นเวลา 15 นาที (อย่างให้สารละลายอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำ) ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แบ่งใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรประมาณ 100-500 ไมโครลิตร เก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20°C

8. 3M Sodium acetate (NaOAc)

sodium acetate	408.3	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

โดยปรับ pH ให้เท่ากับ 5.2 ด้วย glacial acetic acid จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. 0.5X TBE

TBE	17	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันคนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

10. Tissue Embedding Medium

นำ Tissue Embedding Medium ที่แข็งไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 60°C เพื่อให้หลอมละลาย จากนั้นจึงนำมาใช้ในการทดลอง

11. Ethidium Bromide Solution

Ethidium Bromide	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ข้อควรระวัง เนื่องจาก ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นขณะเตรียมสารควรสวมถุงมือพลาสติก และห่อขวดด้วย aluminum foil เพื่อป้องกันแสง เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

12. 50 mM CaCl₂

CaCl ₂	7.4	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาคผนวก ค

วิธีการทดลองชุดสำเร็จ (kit) การเตรียมเซลล์ และการวัด pH

วิธีการทดลองชุดสำเร็จ (kit) การเตรียมเซลล์ และการวัด pH

1. การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ FavorPrep™ GEL/PCR Purification mini Kit

นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย PCR วัดปริมาตรและเติม FADF ในปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรของดีเอ็นเอ จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง votex จากนั้นดูดสารละลายใส่ลงใน FADF column ที่ประกอบอยู่กับ microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำที่ผ่าน column ทิ้ง จากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 1 นาที เทน้ำที่ผ่าน column ทิ้ง และปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าอีกครั้งที่ 13,000 rpm 3 นาที เพื่อให้แอลกอฮอล์ที่ยังค้างอยู่ใน column ออกให้หมด ย้าย FADF column ไปยังหลอด microcentrifuge tube ใหม่ เติม elution buffer ปริมาตร 40 – 50 ไมโครลิตร โดยหยดลงบริเวณตรงกลางของแผ่นเมมเบรนของ column ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายที่ได้เป็น DNA บริสุทธิ์ครั้งแรกในอุณหภูมิ -20 °C จากนั้นนำ FADF column ย้าย ไปยัง microcentrifuge tube ใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับการทำในครั้งแรก

2. การเตรียม competent cell

นำแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ TOP10 streak บนอาหาร LB agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นเชยโคลนนี้เดี่ยวของ *E. coli* จุ่มลงไปในการอาหารเหลว LB ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว LB บรรจุอยู่ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 2 – 2.30 ชั่วโมง ระหว่างช่วงเวลาที่บ่มให้ทำการวัดค่าความทึบแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀) ค่าที่ได้ต้องเท่ากับ 0.3 ไม่ควรเกิน เพราะจะทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อรับพลาสมิดได้ไม่ดี) เมื่อได้ค่า OD ที่ต้องการแล้ว แบ่งเชื้อใส่ในหลอด centrifuge tube ที่ปราศจากเชื้อและเย็น (ข้อสำคัญ: ขั้นตอนถัดจากนี้หลอด centrifuge tube ต้องแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนสารละลาย ทิ้ง เติม 50 mM CaCl₂ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เติม 50 mM CaCl₂ ที่ผสม glycerol 15 % ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง เบาๆ จากนั้นแบ่งส่วนผสมของ competent cell ใส่ใน microcentrifuge tube หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บเซลล์ไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ -70°C



ข้อมูลทางสถิติ

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาบริสุทธิ์
ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Descriptives

dryweight

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
MMN	3	.0567	.00208	.00120	.0515	.0618	.06	.06
MNC	3	.0860	.00300	.00173	.0785	.0935	.08	.09
PDA	3	.0353	.00306	.00176	.0277	.0429	.03	.04
MS	3	.0820	.00200	.00115	.0770	.0870	.08	.08
Total	12	.0650	.02152	.00621	.0513	.0787	.03	.09

Test of Homogeneity of Variances

dryweight

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.284	3	8	.836

ANOVA

dryweight

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.005	3	.002	251.933	.000
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.005	11			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: dryweight

	(I) medium	(J) medium	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Bonferroni	MMN	MNC	-.02933 [*]	.00211	.000	-.0367	-.0220
		PDA	.02133 [*]	.00211	.000	.0140	.0287
		MS	-.02533 [*]	.00211	.000	-.0327	-.0180
	MNC	MMN	.02933 [*]	.00211	.000	.0220	.0367
		PDA	.05067 [*]	.00211	.000	.0433	.0580
		MS	.00400	.00211	.566	-.0033	.0113
	PDA	MMN	-.02133 [*]	.00211	.000	-.0287	-.0140
		MNC	-.05067 [*]	.00211	.000	-.0580	-.0433
		MS	-.04667 [*]	.00211	.000	-.0540	-.0393
	MS	MMN	.02533 [*]	.00211	.000	.0180	.0327
		MNC	-.00400	.00211	.566	-.0113	.0033
		PDA	.04667 [*]	.00211	.000	.0393	.0540
Dunnnett T3	MMN	MNC	-.02933 [*]	.00211	.001	-.0392	-.0195
		PDA	.02133 [*]	.00213	.004	.0113	.0313
		MS	-.02533 [*]	.00167	.000	-.0326	-.0181
	MNC	MMN	.02933 [*]	.00211	.001	.0195	.0392
		PDA	.05067 [*]	.00247	.000	.0399	.0615
		MS	.00400	.00208	.445	-.0058	.0138
	PDA	MMN	-.02133 [*]	.00213	.004	-.0313	-.0113
		MNC	-.05067 [*]	.00247	.000	-.0615	-.0399
		MS	-.04667 [*]	.00211	.000	-.0567	-.0366
	MS	MMN	.02533 [*]	.00167	.000	.0181	.0326
		MNC	-.00400	.00208	.445	-.0138	.0058
		PDA	.04667 [*]	.00211	.000	.0366	.0567

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

dryweight

medium		N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	PDA	3	.0353		
	MMN	3		.0567	
	MS	3			.0820
	MNC	3			.0860
	Sig.		1.000	1.000	.094

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ผลของความเป็นกรด-ด่าง

Descriptives

dryweight

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
2	5	.00440	.001140	.000510	.00298	.00582	.003	.006
3	5	.00660	.002966	.001327	.00292	.01028	.002	.010
4	5	.00660	.001673	.000748	.00452	.00868	.004	.008
5	5	.01160	.002510	.001122	.00848	.01472	.009	.014
6	5	.01840	.003435	.001536	.01413	.02267	.015	.024
7	5	.00900	.001581	.000707	.00704	.01096	.007	.011
8	5	.00800	.002449	.001095	.00496	.01104	.004	.010
Total	35	.00923	.004851	.000820	.00756	.01090	.002	.024

Test of Homogeneity of Variances

dryweight

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.896	6	28	.512

ANOVA

dryweight

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	6	.000	18.967	.000
Within Groups	.000	28	.000		
Total	.001	34			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: dryweight

	(I) PH	(J) PH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Bonferroni	2	3	-.002200	.001502	1.000	-.00722	.00282
		4	-.002200	.001502	1.000	-.00722	.00282
		5	-.007200*	.001502	.001	-.01222	-.00218
		6	-.014000*	.001502	.000	-.01902	-.00898
		7	-.004600	.001502	.101	-.00962	.00042
		8	-.003600	.001502	.493	-.00862	.00142
	3	2	.002200	.001502	1.000	-.00282	.00722
		4	.000000	.001502	1.000	-.00502	.00502
		5	-.005000	.001502	.052	-.01002	.00002
		6	-.011800*	.001502	.000	-.01682	-.00678
		7	-.002400	.001502	1.000	-.00742	.00262
		8	-.001400	.001502	1.000	-.00642	.00362
	4	2	.002200	.001502	1.000	-.00282	.00722
		3	.000000	.001502	1.000	-.00502	.00502
		5	-.005000	.001502	.052	-.01002	.00002
		6	-.011800*	.001502	.000	-.01682	-.00678
		7	-.002400	.001502	1.000	-.00742	.00262
		8	-.001400	.001502	1.000	-.00642	.00362
	5	2	.007200*	.001502	.001	.00218	.01222
		3	.005000	.001502	.052	-.00002	.01002
		4	.005000	.001502	.052	-.00002	.01002
		6	-.006800*	.001502	.002	-.01182	-.00178
		7	.002600	.001502	1.000	-.00242	.00762
		8	.003600	.001502	.493	-.00142	.00862
6	2	.014000*	.001502	.000	.00898	.01902	
	3	.011800*	.001502	.000	.00678	.01682	
	4	.011800*	.001502	.000	.00678	.01682	
	5	.006800*	.001502	.002	.00178	.01182	
	7	.009400*	.001502	.000	.00438	.01442	
	8	.010400*	.001502	.000	.00538	.01542	
7	2	.004600	.001502	.101	-.00042	.00962	
	3	.002400	.001502	1.000	-.00262	.00742	
	4	.002400	.001502	1.000	-.00262	.00742	
	5	-.002600	.001502	1.000	-.00762	.00242	
	6	-.009400*	.001502	.000	-.01442	-.00438	
	8	.001000	.001502	1.000	-.00402	.00602	
8	2	.003600	.001502	.493	-.00142	.00862	
	3	.001400	.001502	1.000	-.00362	.00642	
	4	.001400	.001502	1.000	-.00362	.00642	
	5	-.003600	.001502	.493	-.00862	.00142	
	6	-.010400*	.001502	.000	-.01542	-.00538	
	7	-.001000	.001502	1.000	-.00602	.00402	

Dunnett T3	2	3	-.002200	.001421	.861	-.00900	.00460
		4	-.002200	.000906	.421	-.00604	.00164
		5	-.007200*	.001233	.017	-.01290	-.00150
		6	-.014000*	.001619	.004	-.02195	-.00605
		7	-.004600*	.000872	.015	-.00826	-.00094
		8	-.003600	.001208	.254	-.00916	.00196
	3	2	.002200	.001421	.861	-.00460	.00900
		4	.000000	.001523	1.000	-.00671	.00671
		5	-.005000	.001738	.242	-.01215	.00215
		6	-.011800*	.002030	.007	-.02013	-.00347
		7	-.002400	.001503	.846	-.00911	.00431
		8	-.001400	.001720	.999	-.00849	.00569
	4	2	.002200	.000906	.421	-.00164	.00604
		3	.000000	.001523	1.000	-.00671	.00671
		5	-.005000	.001349	.095	-.01074	.00074
		6	-.011800*	.001709	.007	-.01958	-.00402
		7	-.002400	.001030	.459	-.00660	.00180
		8	-.001400	.001327	.991	-.00702	.00422
	5	2	.007200*	.001233	.017	.00150	.01290
		3	.005000	.001738	.242	-.00215	.01215
		4	.005000	.001349	.095	-.00074	.01074
		6	-.006800	.001903	.106	-.01477	.00117
		7	.002600	.001327	.664	-.00311	.00831
		8	.003600	.001568	.477	-.00280	.01000
6	2	.014000*	.001619	.004	.00605	.02195	
	3	.011800*	.002030	.007	.00347	.02013	
	4	.011800*	.001709	.007	.00402	.01958	
	5	.006800	.001903	.106	-.00117	.01477	
	7	-.009400*	.001691	.022	.00160	.01720	
	8	.010400*	.001887	.012	.00246	.01834	
7	2	.004600*	.000872	.015	.00094	.00826	
	3	.002400	.001503	.846	-.00431	.00911	
	4	.002400	.001030	.459	-.00180	.00660	
	5	-.002600	.001327	.664	-.00831	.00311	
	6	-.009400*	.001691	.022	-.01720	-.00160	
	8	.001000	.001304	1.000	-.00459	.00659	
8	2	.003600	.001208	.254	-.00196	.00916	
	3	.001400	.001720	.999	-.00569	.00849	
	4	.001400	.001327	.991	-.00422	.00702	
	5	-.003600	.001568	.477	-.01000	.00280	
	6	-.010400*	.001887	.012	-.01834	-.00246	
	7	-.001000	.001304	1.000	-.00659	.00459	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

dryweight

PH	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a	2	.00440			
	3	.00660	.00660		
	4	.00660	.00660		
	8		.00800		
	7		.00900	.00900	
	5			.01160	
	6				.01840
Sig.		.177	.155	.095	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

ผลของอุณหภูมิ

Descriptives

dryweight

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
25	3	.0403	.00681	.00393	.0234	.0572	.04	.05
30	3	.0520	.00265	.00153	.0454	.0586	.05	.06
37	3	.0040	.00000	.00000	.0040	.0040	.00	.00
RT	3	.0670	.00361	.00208	.0580	.0760	.06	.07
Total	12	.0408	.02455	.00709	.0252	.0564	.00	.07

Test of Homogeneity of Variances

dryweight

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.088	3	8	.029

ANOVA

dryweight

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.006	3	.002	130.633	.000
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.007	11			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: dryweight

	(I) Temperature	(J) Temperature	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Bonferroni	25	30	-.01167*	.00332	.048	-.0232	-.0001
		37	.03633*	.00332	.000	.0248	.0479
		RT	-.02667*	.00332	.000	-.0382	-.0151
	30	25	.01167*	.00332	.048	.0001	.0232
		37	.04800*	.00332	.000	.0364	.0596
		RT	-.01500*	.00332	.012	-.0266	-.0034
	37	25	-.03633*	.00332	.000	-.0479	-.0248
		30	-.04800*	.00332	.000	-.0596	-.0364
		RT	-.06300*	.00332	.000	-.0746	-.0514
	RT	25	.02667*	.00332	.000	.0151	.0382
		30	.01500*	.00332	.012	.0034	.0266
		37	.06300*	.00332	.000	.0514	.0746
Dunnett T3	25	30	-.01167	.00422	.261	-.0365	.0131
		37	.03633*	.00393	.035	.0063	.0664
		RT	-.02667*	.00445	.033	-.0497	-.0036
	30	25	.01167	.00422	.261	-.0131	.0365
		37	.04800*	.00153	.003	.0363	.0597
		RT	-.01500*	.00258	.023	-.0268	-.0032
	37	25	-.03633*	.00393	.035	-.0664	-.0063
		30	-.04800*	.00153	.003	-.0597	-.0363
		RT	-.06300*	.00208	.003	-.0789	-.0471
	RT	25	.02667*	.00445	.033	.0036	.0497
		30	.01500*	.00258	.023	.0032	.0268
		37	.06300*	.00208	.003	.0471	.0789

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

dryweight

Temperature	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a 37	3	.0040			
25	3		.0403		
30	3			.0520	
RT	3				.0670
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2. การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัย

2.1 การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซากับกล้าไม้สนสามใบโดยใส่เส้นใยรา

เห็ดเผาะสีรินทร์ (*A. sirindhorniae*)

2.1.1 ผลการเปรียบเทียบการเติบโตทางความสูง

Group Statistics

ความสูงของสนสามใบ	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ความสูง กล้าไม้สนควบคุม	6	11.2188	1.14403	.46705
ความสูง กล้าไม้สนใส่เชื้อ	6	10.5193	1.01116	.41280

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
ความสูง	Equal variances assumed	.100	.758	1.122	10	.288	.69940	.62333	-.68946	2.08827
	Equal variances not assumed			1.122	9.851	.288	.69940	.62333	-.69231	2.09112

2.1.2 ผลการเปรียบเทียบมวลชีวภาพส่วนเหนือดิน (น้ำหนักแห้งของ ใบ และลำต้น)

Group Statistics

มวลชีวภาพเหนือดิน	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
มวลชีวภาพ กล้าไม้สนควบคุม	8	.1133	.05068	.01792
มวลชีวภาพ กล้าไม้สนใส่เชื้อ	8	.1211	.05833	.02062

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
มวลชีวภาพ	Equal variances assumed	.116	.739	-.285	14	.780	-.00778	.02732	-.06637	.05082
	Equal variances not assumed			-.285	13.732	.780	-.00778	.02732	-.06647	.05092

2.1.3 ผลการเปรียบเทียบมวลชีวภาพใต้ดิน (น้ำหนักแห้งของราก)

Group Statistics

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
มวลชีวภาพ	กล้าไม้สนคาบคุม	8	.0146	.00670	.00237
	กล้าไม้สนใส่เชื้อ	8	.0110	.00616	.00218

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
มวลชีวภาพ	Equal variances assumed	.263	.616	1.127	14	.279	.00362	.00322	-.00328	.01053
	Equal variances not assumed			1.127	13.905	.279	.00362	.00322	-.00328	.01053

2.1.4 ผลการเปรียบเทียบมวลชีวภาพรวม (น้ำหนักแห้งของ ใบ ลำต้นและราก)

Group Statistics

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
มวลชีวภาพรวม	กล้าไม้สนคาบคุม	8	.1280	.05490	.01941
	กล้าไม้สนใส่เชื้อ	8	.1321	.06325	.02236

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
มวลชีวภาพรวม	Equal variances assumed	.061	.808	-.140	14	.891	-.00415	.02961	-.06766	.05936
	Equal variances not assumed			-.140	13.728	.891	-.00415	.02961	-.06778	.05948

2.2 การทดสอบการสร้างเอดโตไมคอร์ไรซากับกล้าไม้อย่างหาโดยใส่เส้นใยราเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae*)

2.2.1 ผลการเปรียบเทียบการเติบโตทางความสูง

Group Statistics

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ความสูงของกล้าไม้	กล้าไม้อย่างนาคาบคุม	7	12.8457	.93325	.35274
	กล้าไม้อย่างนาใส่เชื้อ	7	13.2314	1.10166	.41639

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
คามสูง	Equal variances assumed	.187	.673	-.707	12	.493	-.38571	.54571	-1.57472	.80329
	Equal variances not assumed			-.707	11.684	.494	-.38571	.54571	-1.57829	.80686

2.2.2 ผลการเปรียบเทียบมวลชีวภาพส่วนเหนือดิน (น้ำหนักแห้งของ ใบ และลำต้น)

Group Statistics

มวลชีวภาพเหนือดิน		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
มวลชีวภาพ	กล้าไม่ยวบยาบควบคุม	10	.9806	.28790	.09104
	กล้าไม่ยวบยาบใส่เชื้อ	10	1.1013	.22668	.07168

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
มวลชีวภาพ	Equal variances assumed	.769	.392	-1.042	18	.311	-.12070	.11587	-.36414	.12274
	Equal variances not assumed			-1.042	17.061	.312	-.12070	.11587	-.36511	.12371

2.2.3 ผลการเปรียบเทียบมวลชีวภาพใต้ดิน (น้ำหนักแห้งของราก)

Group Statistics

มวลชีวภาพใต้ดิน		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
มวลชีวภาพ	กล้าไม่ยวบยาบควบคุม	10	.5555	.18512	.05854
	กล้าไม่ยวบยาบใส่เชื้อ	10	.7118	.17688	.05593

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
มวลชีวภาพ	Equal variances assumed	.086	.773	-1.930	18	.069	-.15630	.08097	-.32641	.01381
	Equal variances not assumed			-1.930	17.963	.069	-.15630	.08097	-.32643	.01383

2.1.4 ผลการเปรียบเทียบมวลชีวภาพรวม (น้ำหนักแห้งของ ไบโกลัมและราก)

Group Statistics

มวลชีวภาพรวม		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
มวลชีวภาพ	กล้าไม้ยางนาควบคุม	10	1.5361	.45772	.14474
	กล้าไม้ยางนาใส่เชื้อ	10	1.8131	.38373	.12135

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
มวลชีวภาพ	Equal variances assumed	.568	.461	-1.467	18	.160	-.27700	.18888	Lower	Upper
	Equal variances not assumed								-1.467	17.468





ภาคผนวก จ

ผลลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Astraeus sirindhorn* PKBP28 บริเวณ ITS และ 5.8S rDNA

CATTAGGAAGAAGGTAGTCTAGCGGCTGTAATGGCCCTAAACTCGGGAATGCGAGGCG
GTTGCTCTCAGCGGAAACTGTCCATTAGTGCGCTGGTTCAAGACTGTCCCCTCCAGAA
AACTTGGTAGTCAATTGTCCTTCGACACGCAAGTGTTGTCTGGACTTGAATAATCGGTC
CTTGA CTGGTCAGGGAAGCAATTCCGCATCCAGCAGGACCTACCGAGTTAGTCGTAGGA
GATCGGGGCATGTCGTGCGCCGCGCTGTGGATCGCGCCTCTCGCAAACCCTACCTCTC
CGAAGTGTCTGTACCCTAATCCAAACACCTGTGTGCACCCGTTGTAGGTCCTAGGACC
TATGTTATTCCTTTGTAAACCCTTGCATGTATACAGAACGTTGTCCACAGAAATAAATAAA
ATATGATAACTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAT
CGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTT
GCGCTCCTCGGTATTCCAAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTGAAATCTCAAAACCCT
AGCTTCGCTCTGTGCGAGTCCGGTTTTGGACTTTGGGAGTGTGTGCGGACCCCTCTGCT
TCGGGATGTCGGCTCTCCTCAAATGCATTAGCGGTGGGCTTGAGTCTTTGCATGGCACG
GCCTGTTGACGTCGTAGTGATCGTCGCGGGCTGGAAGTGCTCGGCTCGGGATCGACT
TGTTTCATGCTTTCCACTTCCGGGGGGCCGGTCCGGTCCGGTGCTGCAACTCCGG
CCGGGTTTTGGCCCCCTTTGAATGGCTTGACCTCCAAATCAGGTAGGACTACCCCTGA
ACTTAAGCTATCT



ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล นางสาวปรียาภรณ์ ดอกไม้
 วันเดือนปีเกิด วันพฤหัสบดีที่ 19 พฤษภาคม พ.ศ. 2531
 สถานที่เกิด อ. เมือง จ. สุพรรณบุรี
 สถานที่อยู่ปัจจุบัน 5 หมู่ 2 ต. บ้านสระ อ. สามชุก จ. สุพรรณบุรี 72130

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2549 จบการศึกษาในระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย
 จากโรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัย สุพรรณบุรี
- พ.ศ. 2553 จบการศึกษาในระดับปริญญาตรี สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
 จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
- พ.ศ. 2557 จบการศึกษาในระดับปริญญาโทสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
 จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผลงาน

Preeyaporn Dokmai, Cherdchai Phosri, Rungpetch Khangrang, Nuttika Suwansai., 2014. Above-and below-ground ectomycorrhizal diversity in a pine-oak forest in northeastern Thailand. Chiang Mai Journal of Science. (accepted)

Preeyaporn Dokmai, Cherdchai Phosri, Nutthaporn Ruchikachorn, Onanong Pringsulaka, Siriruk Sarawaneeyaruk, Nuttika Suwannasai., 2013. Ectomycorrhizal composition and theirs relationships in remote pine-oak forest, Thailand. Abstract in Asian Mycological Congress 2013 & the 13th International Marine and Freshwater Mycology Symposia, 19-24 August 2013 in Beijing, China.

Preeyaporn Dokmai, Nuttika Suwannasai, Siriruk Sarawaneeyaruk and Cherdchai Phosri., 2012. A first snapshot view into the belowground ectomycorrhizal composition of pine-oak forest in Thailand. Proceeding in International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology, 4-6 October, 2012 at Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand.

ประสบการณ์	ฝึกงานทางด้านราไมคอร์ไรซา ณ Laboratory of Applied Mycology (Mycorrhizology), Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University, Japan (ภายใต้การดูแลของ Associate Professor Dr. Akiyoshi Yamada) ระหว่างเดือน กันยายน ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2556
ทุนที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนนิสิตแลกเปลี่ยน (Postgraduate Student Exchange) ทุนรหัส GRAD S-4-57 ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

