วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



การตรวจพิสูจน์และยืนยันการอาศัยอยู่ของเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาบริเวณรากพืชอาศัยและเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซา หลังใส่เชื้อและออกปลูกในสภาพแปลงธรรมชาติ

The verification and confirmation of ectomycorrhizal mushroom colonize the roots of their hosts and percentages of ectomycorrhizal after inoculating and planting in natural conditions

ธนภักษ์ อินยอด[1]*, ธนากร ลัทธิ์ถีระสุวรรณ[2], ขนิษฐา ชวนะนรเศรษฐ์[1], ธนภัทร เติมอารมย์[1], ชาตรี กอนี[3], ณัฐพัชร์ ศรีหะนัลต[4] และ ปิยะดา เอี่ยมประสงค์[1]

Tanapak Inyod[1]*, Thanakorn Lattirasuvan[2], Khanittha Chawananorasest[1], Thanapat Termarom[1], Chatree Konee[3], Natthapach Srihanant[4] and Piyada Eamprasong[1]

[1] *สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120*
[1] *Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR), Khlong Luang, Pathum Thani 12120*
[2] *มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ อ.ร้องกวาง จ.แพร่ 54140*
[2] *Maejo University, Phrae Campus, Rong Kwang, Phrae 54140*
[3] *สถานีวิจัยและพัฒนาอาชีพแก่เกษตรกร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.โคกสำเริง จ.ลพบุรี 15250*
[3] *Farming Research and Development Station, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kok Sumrong, Lop Buri, 15250*
[4] *มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110*
[4] *Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkla 90110*

บทคัดย่อ: การศึกษานี้ตรวจสอบการอาศัยอยู่ของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาบริเวณรากพืชอาศัยและวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาหลังการใส่เชื้อและปลูกในสภาพแปลงธรรมชาติพื้นที่แปลงธรรมชาติ โดยทดลองกับเห็ดตับเต่า (*Phlebopus portentosus*) เห็ดเผาะ (*Astraeus odoratus*) และเห็ดระโงกเหลือง (*Amanita hemibapha*) ใส่เชื้อปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อต้น หลังปลูกเป็นเวลา 1 ปี พบว่ารากพืชที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดตับเต่าและเห็ดเผาะมีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาโดยมีเส้นใยเกาะที่ผิวรากและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาเฉลี่ยระหว่าง 66.24% และ 63.79% และ 50.40-63.86% ตามลำดับ สำหรับเห็ดระโงกเหลืองที่ปลูกเป็นเวลา 6 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาเฉลี่ย 31.60-39.24% ซึ่งสูงกว่าต้นควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การตรวจสอบการมีอยู่ของ DNA เห็ดเผาะ เห็ดตับเต่า และเห็ดระโงกเหลืองในรากพืชอาศัยโดยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดทั้ง 3 ชนิด ซึ่งพบแถบ DNA ที่สามารถยืนยันพิสูจน์ได้ว่าในรากพืชอาศัยมีเชื้อเห็ดไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ชนิดนี้อยู่ในรากพืชจริง การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้วิธีการทางชีวโมเลกุล สามารถยืนยันชนิดของเห็ดไมคอร์ไรซาได้อย่างแม่นยำ และเหมาะสมสำหรับระบุชนิดของตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกด้วยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้

คำสำคัญ: เห็ดตับเต่า; เห็ดเผาะ; เห็ดระโงกเหลือง; นิวคลีโอไทด์; เอคโตไมคอร์ไรซา; ไพร์เมอร์จำเพาะ

* Corresponding author: tanapuk@tistr.or.th

Received: date; July 21, 2025 Revised: date; December 18, 2025

Accepted: date; December 30, 2025 Published: date; April 9, 2026

ABSTRACT: This study aimed to examine the ectomycorrhizal fungi colonization on host plant roots, and the percentage of ectomycorrhizal root formation after inoculation and planting in natural field conditions. The experiment was conducted with *Phlebopus portentosus*, *Astraeus odoratus*, and *Amanita hemibapha* on various host plants. After planting for a year period, the roots inoculated with *P. portentosus* and *A. odoratus* exhibited ectomycorrhizal structures with hyphae attached to the root surface, accounting for an average ectomycorrhizal formation rate between 66.24%-63.79% and 50.40%-63.86%, respectively. Those of *A. hemibapha* after a six-month planting period presented the percentage of ectomycorrhizal root formation on average of 31.60%-39.24%, it was considered significantly higher amount than the control plants. In addition, the molecular biological techniques using specific primers revealed the DNA bands that confirmed the presence of all three mushroom species in the host plant roots. This experiment demonstrates that the use of biomolecular methods can accurately confirm the type of mycorrhizal fungus, and it is suitable for identifying specimens that cannot be classified using morphological characteristics.

Keywords: *Phlebopus portentosus*; *Astraeus odoratus; Amanita hemibapha*; nucleotide sequences; ectomycorrhiza; specific primers

บทนำ

ไมคอร์ไรซา (Mycorrhiza) เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช มีความสัมพันธ์กันแบบ mutualism เชื้อราไมคอร์ไรซาจะได้รับอาหารจากพืชที่หลั่งออกมาทางระบบราก ส่วนพืชจะได้รับประโยชน์ เนื่องจากเชื้อราที่เจริญอยู่ภายนอกรากและภายในรากจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมธาตุอาหารให้แก่พืช ทำให้พืชมีความสามารถในการทนแล้งได้ดีขึ้น ทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเป็นด่างได้ดี ทนต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชและสามารถดูดซับธาตุอาหารได้ดีขึ้น เป็นต้น Brundrett and Tedersoo (2018) รายงานว่าความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซามีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชในระบบนิเวศป่าไม้ ปัจจุบันเห็ดราไมคอร์ไรซาที่พบอยู่ทั่วโลกมีมากกว่า 5,000 ชนิด พืชหรือต้นไม้ที่สัมพันธ์กับรากลุ่มนี้ มีอย่างน้อย 2,000 ชนิด หรือประมาณ 10-20% ของพืชชั้นสูง เห็ดเอคไมคอร์ไรซา คือ เห็ดที่อยู่ร่วมกับรากแขนงเล็กๆ ของพืช ในแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน โดยเส้นใยเห็ดส่วนหนึ่งจะพันอยู่รอบๆ รากแขนง ซึ่งเห็นเป็นชั้นหรือเป็นแผ่นบางห่อหุ้มราก และอีกส่วนหนึ่งแทงผ่านรากเข้าไปเจริญอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ของเซลล์ผิว (epidermis) และเซลล์คอร์เท็กซ์ (cortex) มีลักษณะคล้ายร่างแห ตามธรรมชาติเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาจะไม่สามารถเจริญได้หากปราศจากพืชอาศัย ต้นไม้ที่มีค่าทางเศรษฐกิจชนิดที่สำคัญในทางป่าไม้ส่วนใหญ่ต้องการเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา เนื่องจากหลายรายงานการวิจัยยืนยันว่าพืชที่มีเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญร่วมด้วย จะมีอัตราการรอดชีวิตและการเจริญที่มากกว่าต้นที่ไม่มีเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา ซึ่งทั่วโลกพบว่าเห็ดที่กินได้ส่วนใหญ่เป็นเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา ในแถบ West Africa พบว่าร้อยละ 42 ของเห็ดกินได้ทั้งหมดเป็นเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา ซึ่งได้แก่ เห็ดในสกุล *Amanita* spp. (เห็ดระโงก) *Lactarius* (เห็ดขิงเห็ดข่า) *Russula* (เห็ดตะไคล) *Cantharelloid* (เห็ดมันปู) เป็นต้น (Yorou et al., 2014) ในประเทศไทยพบเห็ดประมาณ 2,500 ชนิด ซึ่งเป็นเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา 907 ชนิดหรือคิดเป็น 35% ของเห็ดที่พบทั้งหมด และในจำนวนเห็ดเหล่านี้เป็นเห็ดกินได้ 336 ชนิด (อุทัยวรรณ และคณะ 2556)

การระบุชนิดของเชื้อรา หรือเห็ดป่าไมคอร์ไรซาในระดับสกุล (genus) ระดับสปีชีส์ (species) และสายพันธุ์ (strain) ทำได้ด้วยการจัดจำแนก 2 วิธีการ คือ การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) และวิธีทางโมเลกุล (molecular method) ปัจจุบันมีวิธีทางโมเลกุลหลายวิธีที่สามารถระบุชนิดของเห็ดรา โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของชิ้นดีเอ็นเอบางตำแหน่งที่มีในฐานข้อมูลสากล (ปิยวรรณ และคณะ, 2557) หรือบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีน (noncoding sequence) ที่อยู่ในบริเวณ rRNA (ribosomal RNA) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไรโบโซม (ribosome) มีความจำเพาะในแต่ละชนิดของสิ่งมีชีวิต ทำให้สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ (Lafontaine and Tollervey, 2001) ดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer นี้ถูกใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อรามากที่สุด เนื่องจากเป็นบริเวณอนุรักษ์นิยม (conservative region) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไพรเมอร์สามารถเข้าคู่เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต และมีความยาวเหมาะสมในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (วิกานดา, 2560) ปัจจุบันมีรายงานว่าบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่มีศักยภาพและเป็นที่ยอมรับในการพัฒนาเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ของเชื้อราและสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต ซึ่งการตรวจสอบแบบดั้งเดิม โดยการสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ อาจไม่สามารถแยกแยะชนิดของเชื้อราได้อย่างแม่นยำ การนำเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยเฉพาะการตรวจสอบ DNA โดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับไพรเมอร์จำเพาะ มาใช้ใน

การตรวจติดตามและยืนยันการติดเชื้อในรากพืชในสภาพแวดล้อมจริง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความถูกต้อง ในการจำแนกชนิดและความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดป่าในธรรมชาติ (Blackwell, 2011; Mora et al., 2011; Schocha et al., 2012)

การมีชีวิตอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อเห็ดราไมคอร์ไรซากับรากของต้นไม้ มีความสำคัญยิ่งต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและการเจริญเติบโตของต้นไม้ ทำให้ระบบนิเวศน์ป่าไม้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และสามารถพัฒนาการสร้างสวนป่าสวนเห็ดไมคอร์ไรซาในอนาคตได้ ดังนั้น หลังจากที่มีการใส่เชื้อเห็ดลงในต้นกล้าไม้แล้ว จำเป็นต้องมีการตรวจสอบเพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าในรากของพืชอาศัยนั้นมีเชื้อเห็ดไมคอรร์ไรซาอยู่จริง วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อตรวจพิสูจน์และยืนยันการมีอยู่ของเชื้อเห็ดตับเต่า เห็ดเผาะ และเห็ดระโงก ที่เกาะอยู่บริเวณรากพืชอาศัยโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกใช้กล้าไม้ที่เหมาะสมสำหรับเป็นพืชอาศัยที่ดีของเห็ดไมคอร์ไรซา เป็นการเพิ่มโอกาสในการเกิดดอกเห็ดไมคอร์ไรซาดังกล่าวและการบริหารจัดการสิ่งแวดล้อมในอนาคต เพื่อให้การนำองค์ความรู้การเพาะกล้าไม้ร่วมกับเห็ดไมคอร์ไรซานี้ไปใช้ได้มีประสิทธิภาพและประสบความสำเร็จ

วิธีการศึกษา

การเตรียมเชื้อเห็ดและชนิดของกล้าไม้พืชอาศัย

การเตรียมเชื้อเห็ดตับเต่า (*Phlebopus portentosus*) เห็ดเผาะ (*Astraeus odoratus*) และเห็ดระโงก (*Amanita hemibapha*) (เป็นเชื้อไอโซเลตจาก ห้องปฏิบัติการเห็ดรา ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมเกษตรสร้างสรรค์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแหล่งประเทศไทย) เริ่มจากชั่งอาหาร Modified Melin-Norkrans Medium (MMN) (Molina and Palmer, 1982) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C แรงดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทใส่จานเพาะเลี้ยงปริมาตร 25 มล. การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดอกเห็ดเริ่มจากคัดเลือกดอกที่สะอาดและสมบูรณ์ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อกรีดเนื้อเห็ดตรงกลางดอกออกเป็นชิ้นเล็กนำไปวางบนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 วัน จากนั้นนำมาเลี้ยงขยายเพื่อเพิ่มปริมาณเส้นใยในอาหาร MMN ชนิดเหลว เริ่มจากนำ cork borer เจาะบริเวณรัศมีรอบนอกของเส้นใยแม่เชื้อ เปิดจุกสำลีลนไฟบริเวณปากขวดก่อนและหลังลงเชื้อ ใช้เข็มเขี่ยปลายงอเกี่ยวชิ้นวุ้นที่ตัดจำนวน 3 ชิ้น ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเขย่า 150 รอบ/นาที เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 วัน ก่อนนำไปทำการทดลองปลูกถ่ายลงพืชอาศัย (ปรับมวลชีวภาพของสารแขนลอยเชื้อเห็ดที่ใส่ต้นพืชในแต่ละครั้งให้มีปริมาณมวลชีวภาพของเส้นใยเห็ด 4 กรัม/1ลิตร) ขั้นตอนการใส่เชื้อบีบดินที่ถุงเพาะเพื่อให้ดินแยกออกจากกัน เมื่อใส่เชื้อเห็ดปริมาณ 25 มล./ต้น ต้นยางนา (*Dipterocarpus alatus*), ตะเคียนทอง (*Hopea odorata*), มะค่าโมง (*Afzelia xylocarpa*), พะยอม (*Shorea roxburghii*) ใส่เชื้อเห็ดเผาะ ส่วน ต้นหางนกยูงไทย (*Caesalpinia pulcherrima*), แคบ้าน (*Sesbania grandiflora*) ใส่เชื้อเห็ดตับเต่า และเห็ดระโงกเหลืองใส่พืชอาศัย ได้แก่ ยางนา, ตะเคียนทอง, รัง (*Shorea siamensis*) และพะยอม เพื่อป้องกันการชะล้างควรงดให้น้ำเป็นเวลา 2 วัน เพาะเลี้ยงในสภาพโรงเรือนรดน้ำทุก 1 วัน หลังจากใส่เชื้อเห็ดเป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นนำกล้าไม้ไปปลูกในสภาพแปลงธรรมชาติ ในระยะการปลูก 4x4 ม.

การตรวจสอบการสร้างรากเอคโตไมคอร์ไรซาและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซาในรากไม้พืชอาศัย ภายหลังการใส่เชื้อเห็ดและปลูกในสภาพแปลงธรรมชาติ

นำรากของพืชอาศัยของเห็ดเผาะ ได้แก่ ยางนา (*D. alatus*), ตะเคียนทอง (*H. odorata*), มะค่าโมง (*A. xylocarpa*), พะยอม (*S. roxburghii*) และพืชอาศัยของเห็ดตับเต่า ได้แก่ ต้นหางนกยูงไทย (*C. pulcherrima*), แคบ้าน (*S. grandiflora*) ภายหลังการปลูกระยะเวลา 1 ปี ในพื้นที่บ้านปางมอญ จังหวัดน่าน จำนวน 8 แปลง (PM1-PM10) และบ้านวังหงส์ จังหวัดแพร่ 4 แปลง (WH1-WH4) และเห็ดระโงกเหลือง (*A. hemibapha*) ในพืชอาศัย ได้แก่ ยางนา, ตะเคียนทอง, รัง (*S. siamensis*) และพะยอม ภายหลังการปลูกระยะเวลา 6 เดือน ในพื้นที่บ้านปางมอญ (PM) บ้านห้วยน้ำอุ่น (HN) และบ้านส้านนาหนองใหม่ (SN) จังหวัดน่าน ทำการตรวจสอบการสร้างรากเอคโตไมคอร์ไรซา โดยสุ่มตัวอย่างรากกล้าไม้ชนิดละ 3 ต้น ตัดรากจำนวน 5 รากต่อต้น ให้มีความยาวประมาณชิ้นละ 10 ซม. คำนวนหาเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซา โดยการนับจำนวนชิ้นส่วนของรากที่พบว่ามีเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องสเตอริโอของแต่ละพื้นที่แปลงต้นแบบ จากนั้นย้อมสีรากพืชอาศัยตามวิธีของ Phillips and Hayman (1970) โดยตัดรากออกเป็นชิ้นความยาวประมาณ 1-1.5 ซม. เติมสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10% ต้มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 30-60 นาที

จากนั้นเทสารละลายทิ้ง เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3% ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที ล้างตัวอย่างรากด้วยน้ำกลั่น ย้อมรากด้วยสี Trypan Blue ความเข้มข้น 0.25% ต้มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 5 นาที เก็บตัวอย่างรากในกลีเซอรอล ความเข้มข้น 20% สุ่มชิ้นส่วนรากที่ย้อมสี นับจำนวนชิ้นส่วนของรากที่พบว่ามีเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า

การศึกษานี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA บริเวณ ITS ของเห็ดตับเต่า (KJ439037.1) มาออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะ ซึ่งพบว่าตำแหน่ง ITS เป็นบริเวณที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ จึงนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการระบุชนิด และสายพันธุ์ ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า แล้วเลือกตำแหน่งที่เบสต่างกันมากที่สุดจึงจะสามารถแยกชนิดได้ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดตับเต่ามาใช้ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะโดยใช้โปรแกรม Primer – BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi) (Ye et al., 2012) และกำหนดเงื่อนไขในการออกแบบคือ ความยาวของไพรเมอร์ระหว่าง 18-22 bp มี GC content อยู่ในช่วง 40-60% และมีอุณหภูมิที่ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน (annealing temperature) อยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส และขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมาย อยู่ในช่วง 150-300 bp หลังจากออกแบบไพรเมอร์ได้ตามเงื่อนไขแล้ว นำไปสังเคราะห์ไพรเมอร์ตามที่ออกแบบ

การตรวจสอบการมีอยู่ของ DNA ของเห็ดเผาะ เห็ดตับเต่า และเห็ดระโงกเหลืองในรากพืชอาศัยโดยวิธีพีซีอาร์ หลังปลูกในสภาพแปลงธรรมชาติ

การสกัดดีเอ็นเอจากรากพืชอาศัยของเห็ดเผาะ เห็ดตับเต่า และเห็ดระโงกขาว ภายหลังการใส่เชื้อเห็ดเผาะทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ต้นยางนา ตะเคียนทอง มะค่าโมงและต้นพะยอม ส่วนกล้าไม้ที่เป็นพืชอาศัยของเห็ดตับเต่า จำนวน 3 ชนิด คือ ต้นหางนกยูง ต้นแคบ้าน และต้นหว้า และรากพืชอาศัยของเห็ด ระโงก 4 ชนิด ได้แก่ ยางนา ตะเคียนทอง รัง และพะยอม และต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ (control) รวมถึงเส้นใยเห็ดเผาะ เห็ดตับเต่า และเห็ดระโงก บนอาหารแข็ง PDA (positive control) ดัดแปลงวิธีการของ CTAB/Chloroform-Isoamyl Alcohol ดีเอ็นเอ Extraction Protocol (Doyle and Dickson, 1987; Cullings, 1992) ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโพรีซิส ความเข้มข้น 1% โดยใช้ดีเอ็นเอ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อมนิวคลีอิก (Novel Juice/GeneDireX) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร บรรจุส่วนผสมลงในช่อง (well) แยกชิ้นของดีเอ็นเอ ด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอ มาตรฐาน 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA)

การทดสอบความจำเพาะของดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 12 ไมโครลิตร ประกอบด้วย deonized dH_2O 6.6 ไมโครลิตร, 10X buffer Taq (Vivantis, USA) ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร, forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร **(Table 1)**, 2 มิลลิโมลาร์ dNTP (Vivantis, USA) ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร, 25 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, Taq DNA (Vivantis, USA) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ 10 นาโนกรัม ดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีจำนวนรอบ เวลา และอุณหภูมิของแต่ละช่วงเวลาดังนี้ denaturation ที่ 94 °C 30 วินาที, annealing 55 °C 30 วินาที, extension 72 °C 1 นาที ทั้งหมด 30 รอบ เมื่อจบปฏิกิริยาทำการตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโพรีซิส เปรียบเทียบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA)

Table 1 Primers in the PCR reaction to detect the presence of mycorrhizal mushrooms DNA in host plant roots

Mycorrhizal mushrooms	Primer	Nucleotide sequence (5' - 3')	Size of PCR product	Ref.
Astraeus odoratus	GAPK126F	5'- TCAAGACTGTCCCCTCCAGA-3'	250 bp	(Suwannasai et al., 2020)
	GAPK379R	5'-CTAGGACCTACAACGGGTGC-3'		
Phlebopus portentosus	Ppo-03 forward	5'-ACGCAGCGAATTGCGATAAG-3'	351 bp	(ธนภักษ์ และคณะ, 2568)
	Ppo-03 reverse	5'-GCCCCTCGCCTTTGATTAGA-3'		
	Primer_pair_6F	5'-CCCTACGAGCAGTAGGAGGA-3'	254 bp	
	Primer_pair_6R	5'-GCATGCTCCTCGGAATACCA-3'		
	Primer_pair_9F	5'-CGCAGCGAATTGCGATAAGT-3'	260 bp	
	Primer_pair_9R	5'-CAGTTCATGCGACGAACACG-3'		
Amanita hemibapha	Ap-forward primers	5'-ATGTCNGAYATYAAYGCNACNCG-3'	430 bp	(Peng Li et al., 2014)
	Ap-reverse primers	5'-CCAAGCCTRAYAWRGTCMACAAC-3'		

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบการสร้างรากเอคโตไมคอร์ไรซาและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซาในรากไม้พืชอาศัย ภายหลังการใส่เชื้อเห็ดและปลูกในสภาพแปลงธรรมชาติ

การตรวจสอบการสร้างรากเอคโตไมคอร์ไรซาและหาเปอร์เซ็นต์รากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้หลังการใส่เชื้อเห็ดเผาะ ได้แก่ ต้นยางนา, มะค่าโมง, ตะเคียนทอง, พะยอม และกล้าไม้ ได้แก่ แคบ้าน และหางนกยูง ใส่เชื้อเห็ดตับเต่า ที่ปลูกในพื้นที่บ้านปางมอญ จังหวัดน่าน จำนวน 8 แปลง ประกอบด้วย แปลง PM2, PM3, PM4, PM5, PM7, PM8, PM9 และ PM10 และบ้านวังหงส์ จังหวัดแพร่ จำนวน 4 แปลง ประกอบด้วย แปลง WH1, WH2, WH3 และ WH4 ภายหลังการปลูกในสภาพแปลงธรรมชาติ เป็นเวลา 1 ปี โดยนำรากมาตรวจการสร้างรากเอคโตไมคอร์ไรซาและหาเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาภายในห้องปฏิบัติการ พบว่าลักษณะรากกล้าไม้ที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดเผาะ และเห็ดตับเต่าเกิดการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาลักษณะเส้นใยเกาะบริเว ณผิวรากพืช (external hyphae) และสานกันไปมารวมตัวเป็นกระจุกของเส้นใย (rhizomorph) มีสีน้ำตาลดำรอบๆ รากเห็นได้ชัดเจน ซึ่งจะไม่พบลักษณะดังกล่าวในต้นที่ไม่ใส่เชื้อ (ต้นควบคุม) **(Figure 1)** และตรวจสอบด้วยการย้อมสีรากตามวิธีของ Phillips and Hayman (1970) โดยลักษณะรากต้นที่ได้รับการใส่เชื้อ เมื่อตัดตามแนวขวางพบเส้นใยติดสีของ Trypan Blue มีลักษณะยื่นหรือห่อหุ้ม และเจริญหนาแน่นคลุมผิวรากพืช เรียกว่า แมนเทิล (mantle) **(Figure 2)** สอดคล้องกับงานวิจัยของ ธนิตา และคณะ (2558) พบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาของเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae*) หลังการใส่หัวเชื้อ และพบกลุ่ม rhizomorph ลักษณะสีน้ำตาลดำรอบๆ ราก ซึ่งพบว่าอัตราการเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาในทุกแปลงที่ทำการตรวจสอบ และมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อแตกต่างกัน โดยแปลงพื้นที่บ้านวังหงส์ทุกแปลงมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ซามากกว่า 60% ในทุกแปลง และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ซามากที่สุด ได้แก่ แปลง WH2 และ WH3 เฉลี่ยเท่ากับ 69.69% และ 68.13% ตามลำดับ ส่วนในพื้นที่บ้านปางมอญ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ซามากที่สุด คือแปลง PM7, PM3 และ PM9 เฉลี่ยเท่ากับ 67.80%, 65.84% และ 64.29% ตามลำดับ และแปลงที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ซาต่ำที่สุดเพียง 41.10% คือแปลง PM4 **(Table 2)** ในขณะที่ชนิดของพืชอาศัยกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงสุด คือ *H. odorata* (ตะเคียนทอง) มีค่าเฉลี่ยการติดเชื้อสูงสุด 66.24% ตามด้วย *D. alatus* (ยางนา) เท่ากับ 63.86% และ *C. pulcherrima* (หางนกยูงไทย) เท่ากับ 63.79% แสดงให้เห็นว่าพืชกลุ่มนี้มีความเหมาะสมสูงในการเป็นพืชอาศัยสำหรับเชื้อราทั้งสองชนิด (*A. odoratus* และ *P. portentosus*) ส่วนพืชอาศัยที่ตอบสนองน้อยคือ *A. xylocarpa* (มะค่าโมง) มีอัตราการติดเชื้อเฉลี่ย

ต่ำสุดเท่ากับ 50.40% อาจเนื่องมาจากลักษณะทางสรีรวิทยาของรากหรือสารคัดหลั่งจากราก (Root Exudates) ที่ส่งผลต่อการกระตุ้นการงอกของสปอร์เชื้อราได้น้อยกว่าพืชชนิดอื่น ในส่วนของความผันแปรในพื้นที่แปลง PM พบว่ามีช่วงการติดเชื้อที่กว้างมาก (เช่น ในพืช *A. xylocarpa* มีตั้งแต่ 25.84% ใน PM8 ไปจนถึง 79.56% ในแปลง PM7) สิ่งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของ สมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน ในแต่ละจุด เช่น ค่า pH ความชื้น หรือปริมาณฟอสฟอรัสในดิน ซึ่งหากดินมีฟอสฟอรัสสูง พืชอาจลดความจำเป็นในการพึ่งพาไมคอร์ไรซาลง (Nuangmek et al., 2016; วิพรพรรณ์ และ มนัส, 2563; สุพัตรา, 2561) ในกลุ่มชุดควบคุม (Non-inoculated) พบการติดเชื้อธรรมชาติ 12.50%-19.56% แสดงว่าในพื้นที่มีเชื้อราไมคอร์ไรซาท้องถิ่นอยู่แล้ว ซึ่งอาจเกิดการแข่งขัน (Competition) กับเชื้อที่ใส่ลงไปในบางแปลง ส่งผลให้อัตราการติดเชื้อไม่สม่ำเสมอ

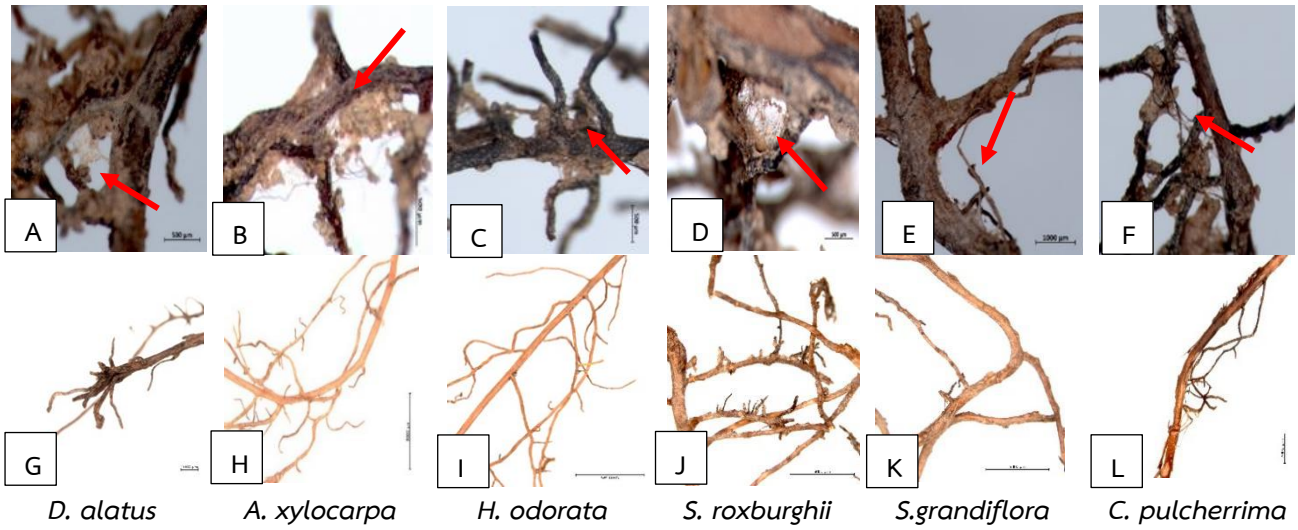


Figure 1 The roots characteristics of *D. alatus*, *A. xylocarpa*, *H. odorata*, *S. roxburghii*, *S. grandiflora* and *C. pulcherrima* seedling after inoculated by mycorrhiza including *A. odoratus*, (A-D) and *P. portentosus*, (E-F) for 12 months of planting in the natural condition, the appearance of rhizomorph around the root of plants compared to control plants (G-L).

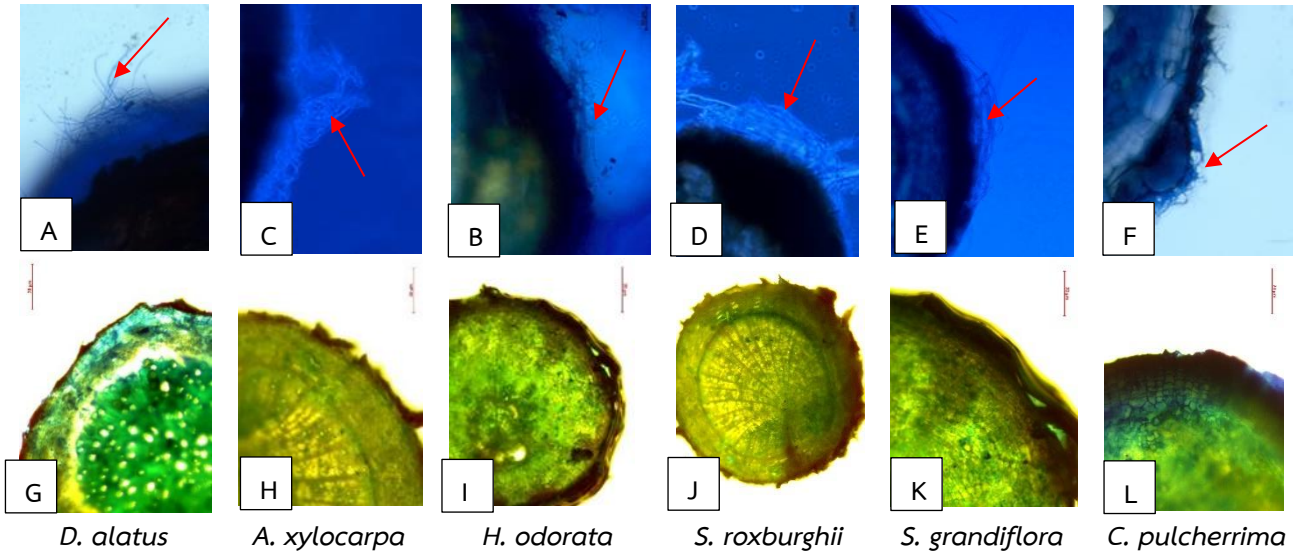


Figure 2 The characteristics of mycorrhiza mycelium from roots tip cross-section of *D. alatus*, *A. xylocarpa, H. odorata S. roxburghii*, *S. grandiflora* and *C. pulcherrima* seedling in the period of 12 months of planting in the natural condition compared between inoculating and non-inoculated (control) mycorrhiza treatment, inoculated with *A. odoratus* (A-D), inoculated with *P. portentosus* (E-F) which filamentous roots covered outer root surface and G-L) non-inoculated mycorrhiza (control)

ในส่วนของต้นกล้าที่ได้รับการใส่เชื้อไมคอร์ไรซา พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 50.40%-63.86% ในขณะที่ต้นควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 12.50%-19.56% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อตามชนิดของกล้าไม้ พบว่าต้นกล้าที่ได้ปลูกถ่ายเชื้อเห็ดเผาะ ได้แก่ ต้นยางนา ตะเคียนทอง พะยอม และมะค่าโมง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาเฉลี่ยเท่ากับ 63.86%, 58.39%, 55.58% และ 50.40% ตามลำดับ ส่วนต้นแคบ้าน และหางนกยูงไทย ที่ใส่เชื้อเห็ดตับเต่าพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซามากสุด เท่ากับ 66.24% และ 63.79% ตามลำดับ **(Table 2)** จากเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซากล้าไม้ระหว่างการใส่และไม่ใส่หัวเชื้อ พบว่าต้นที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การติดรากเอคโตไมคอร์ไรซาสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ

Table 2 Percentage of ectomycorrhizal on seedlings inoculated with *A. odoratus* and *P. portentosus* in Ban Pang Mon (PM) and Ban Wang Hong (WH) areas compared with the control for 12 months

Planting codes	Percentages of ectomycorrhizal						Percentages of infection in each area
	A. odoratus				*P. portentosus*		
	D. alatus	*A. xylocarpa*	*H. odorata*	*S. roxburghi*	*S.grandiflora*	*C. pulcherrima*	
PM2	-	75.65	63.50	-	56.50	57.19	**63.21**
PM3	68.66	51.28	-	-	73.58	69.84	**65.84**
PM4	52.78	32.16	48.65	30.82	-	-	**41.10**
PM5	-	33.29	44.89	59.64	-	56.74	**48.64**
PM7	68.95	79.56	62.50	-	-	60.20	**67.80**
PM8	73.93	25.84	37.52	76.28	-	-	**53.39**
PM9	59.76	60.47	60.56	-	-	76.37	**64.29**
PM10	65.84	44.98	69.47	-	-	39.81	**55.03**
WH1	44.56	-	58.43	-	58.67	79.65	**60.33**
WH2	76.71	-	54.03	-	71.03	77.99	**69.94**
WH3	59.87	-	75.67	-	78.04	58.93	**68.13**
WH4	67.54	-	67.12	-	59.67	61.23	**63.89**
Percentages of ectomycorrhizal seedlings	**63.86**	**50.40**	**58.39**	**55.58**	**66.24**	**63.79**	**-**
non-inoculated seedlings	**12.50**	**19.56**	**13.50**	**17.19**	**15.65**	**16.50**	**-**

Note: (-) indicates the type of seedlings that were not planted in the experimental plot.

ผลของเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้หลังการใส่เชื้อเห็ดระโงก ในพื้นที่บ้านปางมอญ จำนวน 3 แปลง (PM4, PM7 และ PM8) พื้นที่บ้านห้วยน้ำอุ่น จำนวน 8 แปลง (HN1, HN2, HN3, HN4, HN5, HN6, HN7 และ HN8) และพื้นที่บ้านส้านนาหนองใหม่ จำนวน 2 แปลง (SN1 และ SN2) ระยะเวลา 6 เดือน หลังปลูกในพื้นที่แปลงธรรมชาติ โดยทำการขุดรากนำมาตรวจหาเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาภายในห้องปฏิบัติการ พบว่าลักษณะรากกล้าไม้ที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดระโงกเกิดการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาลักษณะเส้นใยเกาะบริเวณผิวรากพืช (external hyphae) และสานกันไปมารวมตัวเป็นกระจุกของเส้นใย (rhizomorph) มีสีขาวรอบๆ รากเห็นได้ชัดเจน ซึ่งจะไม่พบลักษณะดังกล่าวในต้นที่ไม่ใส่เชื้อ (ต้นควบคุม) **(Figure 3 และ Figure 4)** ซึ่งพบว่าอัตราการเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาในทุกแปลงที่ทำการตรวจสอบ และมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อแตกต่างกัน

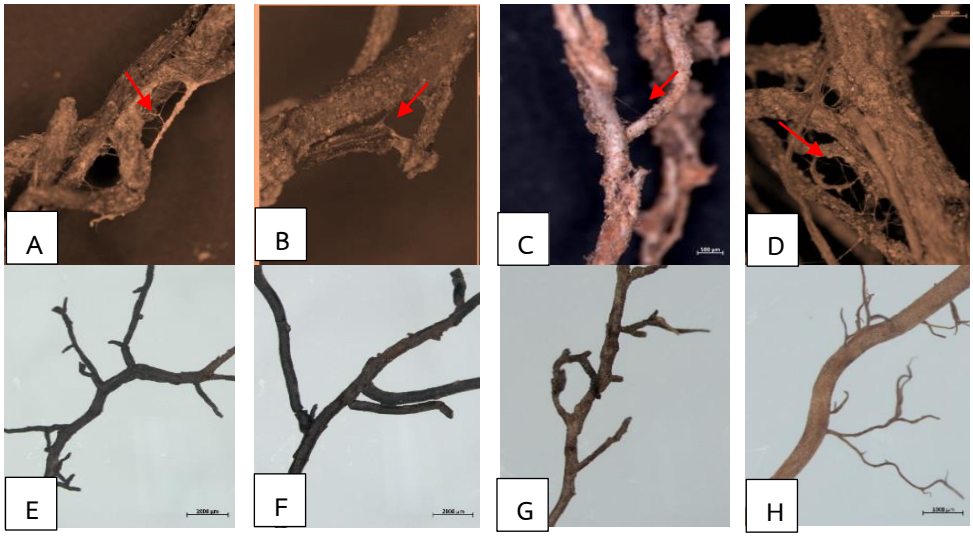


Figure 3 The roots characteristics of *D. alatus*, *H. odorata*, *S. siamensis* and *S. roxburghii* seedling after inoculated by mycorrhiza (*A. hemibapha*), (A-D) for 6 months of planting in the natural condition, the appearance of rhizomorph around the root of plants compared to control plants (E-H).

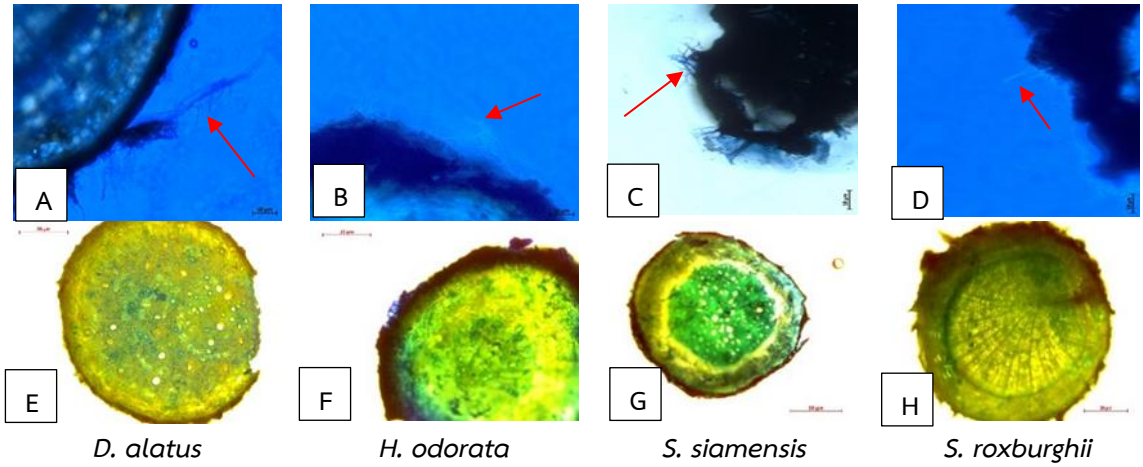


Figure 4 Characteristics of mycorrhiza mycelium from roots tip cross-section of *D. alatus*, *H. odorata*, *S. siamensis*, and *S. roxburghii* seedling during six months of planting in the natural condition, compared between inoculating and non-inoculated (control) mycorrhiza treatment, A-D) inoculated with *A. hemibapha* which filamentous roots covered outer roots surface and (E-H) non-inoculated mycorrhiza (control)

จากการตรวจติดตามการเกิดเอคโตไมคอร์ไรซากับรากไม้ระยะ 6 เดือนหลังปลูก พบว่าต้นกล้าไม้ที่มีการใส่เชื้อเห็ดมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเอคโตไมคอร์ไรซา (% การติดเชื้อแต่ละพื้นที่) เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 31.60%-39.24% และแปลงที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ซามากที่สุด คือพื้นที่บ้านส้านนาหนองใหม่ แปลง SN1 เฉลี่ยเท่ากับ 39.24% รองลงมาคือพื้นที่บ้านปางมอญ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ซามากที่สุด คือแปลง PM8 เฉลี่ยเท่ากับ 37.58% ในขณะที่แปลง HN4 ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาต่ำที่สุดเพียง 31.60% **(Table 3)** ในส่วนของต้นกล้าที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดระโงกเหลือง พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 30.86%-38.53% ในขณะที่ต้นควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาเฉลี่ยอยู่

ระหว่าง 10.70%-12.20% เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อตามชนิดของกล้าไม้ พบว่าต้นกล้าที่ได้ปลูกถ่ายเชื้อเห็ดระโงกเหลือง ได้แก่ ต้นยางนา ตะเคียนทอง พะยอม และรัง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาเฉลี่ยเท่ากับ 38.53%, 34.15%, 32.93% และ 30.86% ตามลำดับ จากเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซากล้าไม้ระหว่างการใส่และไม่ใส่หัวเชื้อ ระยะเวลา 6 เดือนหลังปลูก พบว่าต้นที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การติดรากเอคโตไมคอร์ไรซาสูงกว่าไม่ได้ใส่เชื้ออย่างชัดเจน และต้นยางนาเป็นกล้าไม้ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซามากที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ ธนภักษ์ และคณะ (2564) ศึกษาการใส่เชื้อเห็ดระโงกอัตรา 0, 25 และ 50 มล./ต้น ผลการทดลองพบว่าอัตราการใส่เชื้อที่ 25 มล./ต้น เป็นอัตราที่เหมาะสมที่สุด และต้นยางนาเป็นกล้าไม้พืชอาศัยที่เหมาะสมของเชื้อเห็ดระโงกขาว โดยส่งผลต่อการเจริญเติบโตมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกล้าไม้ชนิดอื่นและต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาพบลักษณะการสร้างโครงสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาที่ชัดเจน ได้แก่ เส้นใยภายนอก (external hyphae) และการสานตัวเป็นกระจุกของเส้นใย (rhizomorph) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา (Peterson et al., 2004) โดยเห็ดเผาะและเห็ดตับเต่ามีเส้นใยสีน้ำตาลดำ ในขณะที่เห็ดระโงกเหลืองมีเส้นใยสีขาว สอดคล้องกับรายงานของ Sanmee et al. (2010) ที่ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาในประเทศไทย

Table 3 Percentage of ectomycorrhizal on seedlings inoculated with *A. hemibapha* in Ban Pang Mon (PM), Ban Huai Nam Un (HN) and Ban Sanna Nong Mai (SN) areas were compared with the control for 12 months

Planting codes	Percentages of ectomycorrhizal				Percentages of infection in each area
	D. alatus	*H. odorata*	*S. siamensis*	*S. roxburghii*	
PM4	38.63	33.65	30.16	31.36	33.45
PM7	35.78	32.20	30.31	29.74	32.01
PM8	40.61	38.97	34.19	36.54	37.58
HN1	39.47	29.43	28.40	32.47	32.44
HN2	42.16	39.18	32.56	33.67	36.89
HN3	33.34	33.72	30.67	34.58	33.08
HN4	34.13	29.25	29.44	33.56	31.60
HN5	36.74	30.16	32.53	29.85	32.32
HN6	37.83	34.81	30.56	32.44	33.91
HN7	35.67	33.64	31.85	32.56	33.43
HN8	37.88	31.76	30.53	31.77	32.99
SN1	45.66	39.81	35.62	35.87	39.24
SN2	42.95	37.35	24.42	33.68	34.60
Percentages of ectomycorrhizal seedlings	**38.53**	**34.14**	**30.86**	**32.93**	-
non-inoculated seedlings	**11.80**	**10.70**	**12.20**	**11.10**	-

ผลการสกัด DNA ของเห็ดไมคอร์ไรซาจากรากพืชอาศัยตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโพรีซิส

จากการนำรากของกล้าไม้ภายหลังการใส่เชื้อเห็ดเผาะลงในพืชอาศัยทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ต้นยางนา ตะเคียนทอง มะค่าโมงและต้นพะยอม รวมถึงเส้นใยเห็ดเผาะบนอาหารแข็ง PDA (positive control) ส่วนกล้าไม้ที่เป็นพืชอาศัยของเห็ดตับเต่า จำนวน 3 ชนิด คือ ต้นหางนกยูง ต้นแคบ้าน และต้นหว้า และรากพืชอาศัยของเห็ดระโงก 4 ชนิด ได้แก่ ยางนา ตะเคียนทอง รัง และพะยอม และต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ (control) จากตัวอย่างรากของกล้าไม้ทั้งหมด ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโพรีซิส เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีแถบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ขนาดใหญ่ที่ชัดเจน และมีขนาดแถบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน **(Figure 5)**

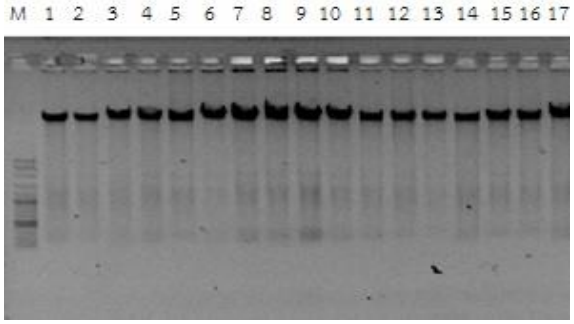


Figure 5 The examination of mycorrhiza DNA from roots of four host plants by gel electrophoresis.

- Lane M; 1Kb DNA ladder
- Lane 1; mycelium of *A.odoratus* on PDA (positive control), Lane 2; DNA from *D. alatus*, Lane 3; DNA from *H. odorata*, Lane 4-; DNA from *A. xylocarpa* and Lane 5; DNA from *S. roxburghii*.
- Lane 6; mycelium of *P. portentosus* on PDA (positive control), Lane 7; DNA from *C. pulcherrima*, Lane 8; DNA from *S. grandiflora* and Lane 9; DNA from *S. cumini*.
- Lane 10; mycelium of *A. hemibapha* on PDA (positive control), Lane 11; DNA from *D. alatus*, Lane 12; DNA from *H. odorata*, Lane 13; DNA from *S. siamensis* and Lane 14; DNA from *S. roxburghii*.
- Lane 15-17; non- inoculated seedlings (control).

ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของ DNA ของเห็ดไมคอร์ไรซาในรากพืชอาศัย

การตรวจสอบการมีอยู่ของ DNA ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดเผาะในรากพืชอาศัยทั้ง 4 ชนิด ด้วยชุดไพรเมอร์ GAPK126F และ GAPK379R ผลการตรวจสอบพบว่าเกิดแถบ DNA ของเส้นใยเห็ดเผาะขนาด 250 คู่เบส ในช่อง Positive control (เส้นใยเห็ดเผาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA) และกล้าไม้ที่มีการใส่เชื้อเห็ดเผาะจะปรากฏแถบ DNA ดังกล่าว (ช่องที่ 1-2 ของต้นยางนา, ช่อง 3-4 ต้นตะเคียน, ช่อง 5-6 ต้นมะค่าโมง และช่อง 7-8 ต้นพะยอม) ที่มีขนาด 250 คู่เบส เท่ากับแถบ DNA ของ Positive control เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ (control) พบว่าไม่ปรากฏแถบ DNA ดังกล่าว **(Figure 6)**

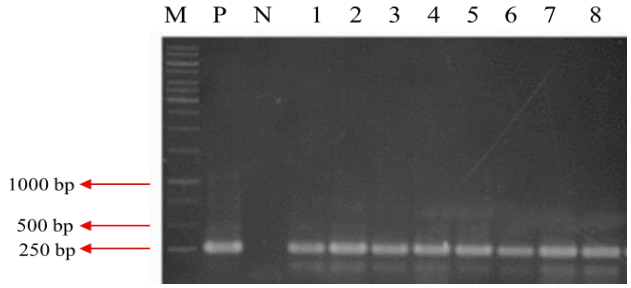


Figure 6 The presence of *A. odoratus*-specific DNA in host plant roots was examined using primer sets GAPK126F and GAPK379R (size 250 bp) by gel electrophoresis.

Lane M; 1Kb DNA ladder

Lane P; mycelium of *A. odoratus* on PDA (positive control)

Lane N; non-inoculated seedlings (control)

Lane 1-2; DNA is specific to *A. odoratus* in the roots of *D. alatus*

Lane 3-4; DNA is specific to *A. odoratus* in the roots of *H. odorata*

Lane 5-6; DNA is specific to *A. odoratus* in the roots of *A. xylocarpa*

Lane 7-8; DNA is specific to *A. odoratus* in the roots of *S. Roxburghii*

ผลทดสอบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่าในรากพืชอาศัยซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาออกแบบชุดไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับกับ DNA เฉพาะเส้นใยของเห็ดตับเต่า จากผลการทดลองนำ DNA จากรากพืชอาศัยทั้ง 3 ชนิด คือรากต้นหางนกยูง รากต้นแคบ้าน และรากต้นหว้า ที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดตับเต่า เปรียบเทียบกับต้นควบคุม เมื่อมาสกัดเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณแถบ DNA เพียงแถบเดียว ซึ่งให้ขนาดของแถบ ดังนี้ ไพร์เมอร์ Ppo_03 (ขนาด 351 คู่เบส), Primer_Pair_6 (ขนาด 254 คู่เบส) และ Primer_Pair_9 (ขนาด 260 คู่เบส) ดังนั้นจากผลการทดสอบยืนยันได้ว่าบนรากพืชอาศัยมีเส้นใยของเห็ดตับเต่าเกาะอยู่ เนื่องจากไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบเป็นไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่าเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ (control) พบว่าไม่ปรากฏแถบ DNA ดังกล่าว (**Figure 7)** ส่วนผลการตรวจสอบเห็ดระโงก เมื่อนำ DNA จากรากพืชอาศัยทั้ง 4 ชนิด คือ รากต้นยางนา รากต้นตะเคียนทอง รากต้นรัง และรากต้นพะยอม ที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดระโงก รวมถึงเส้นใยเห็ดระโงกบนอาหารแข็ง PDA (positive control) เปรียบเทียบกับต้นควบคุม เมื่อทำการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดระโงก ด้วยชุดไพรเมอร์ Ap-forward primers และ Ap-reverse primers (Peng Li et al., 2014) พบว่าเกิดแถบ DNA เพียงแถบเดียว ซึ่งให้ขนาดของแถบ ขนาด 430 คู่เบส ในกล้าไม้พืชอาศัยของเห็ดระโงกทั้ง 4 ชนิด รวมถึงเส้นใยเห็ดระโงกบนอาหารแข็ง ในขณะที่ต้นควบคุมจะไม่ปรากฏแถบ DNA ดังกล่าว (**Figure 8)** จากผลการนำดีเอ็นเอที่สกัดจากรากพืชอาศัยที่มีการปลูกเชื้อเห็ดเผาะ เห็ดตับเต่า และเห็ดระโงก มาตรวจสอบ และยืนยันด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าสามารถยืนยันได้ว่าในรากพืชอาศัยมีเชื้อเห็ดทั้ง 3 ชนิดเกาะอยู่ที่รากพืชจริง การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลสามารถระบุยืนยันชนิดของเห็ดป่าได้อย่างแม่นยำ และเหมาะสมสำหรับระบุชนิดของตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกด้วยการใช้ลักษณะ ทางสัณฐานวิทยา หรือกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของของ Suwannasai et al. (2020) ที่ศึกษาการสร้างรากเอคโตไมคอร์ไรซาของเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae*) ในต้นยางนา (*D. alatus*) โดยการสกัดดีเอ็นเอจากรากต้นยางนา ตรวจสอบด้วยชุดไพรเมอร์ GAPK126F และ GAPK379R ซึ่งมีความจำเพาะกับเห็ดเผาะ พบแถบดีเอ็นเอ มีขนาด 250 คู่เบส คิดเป็น 89.40% จากจำนวนรากต้นยางนา 143 ตัวอย่าง ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบการเกิดรากเอคโตไมคอ ร์ไรซาในรากพืชอาศัยที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดเผาะ และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Adams et al. (2005) ศึกษาการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเป็นเครื่องมือใน

การจำแนกเห็ดสกุล Amanita โดยใช้จีโนมของ *A. bisporigera* มาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมายของดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อใช้ในการจำแนกระดับชนิดของเห็ดได้อย่างแม่นยำ

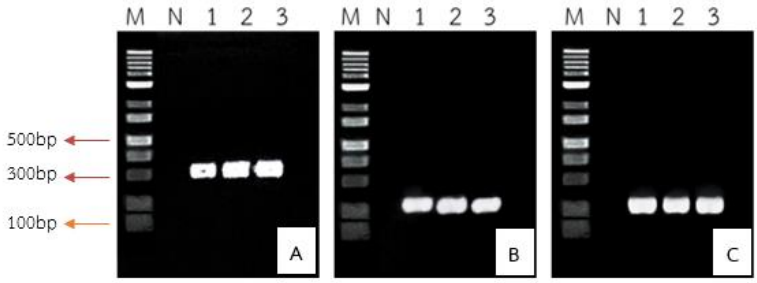


Figure 7 The presence of *P. portentosus* with specific DNA in host plant roots was examined using primer A; Ppo_03 (size 351 bp), B; Primer_Pair_6 (size 254 bp) and C; Primer_Pair_9 (size 260 bp) by gel electrophoresis.

Lane M; 100bp DNA ladder

Lane N; non-inoculated seedlings (control)

Lane 1; DNA is specific to *P. portentosus* in the roots of *C. pulcherrima*

Lane 2; DNA is specific to *P. portentosus* in the roots of *S. grandiflora*

Lane 3; DNA is specific to *P. portentosus* in the roots of *S. cumini*

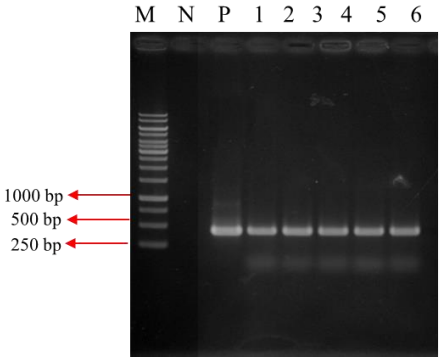


Figure 8 The presence of *A. hemibapha*-specific DNA in host plant roots was examined using primer Ap-forward primers and Ap-reverse primers (size 430 bp) (Peng Li et al., 2014) by gel electrophoresis.

Lane M; 1Kb DNA ladder

Lane 1 non-inoculated seedlings (control)

Lane 2; mycelium of *A. odoratus* on PDA (positive control)

Lane 3; DNA is specific to *A. hemibapha* in the roots of *D. alatus*

Lane 4; DNA is specific to *A. hemibapha* in the roots of *H. odorata*

Lane 5; DNA is specific to *A. hemibapha* in the roots of *S. siamensis*

Lane 6; DNA is specific to *A. hemibapha* in the roots of *S. Roxburghii*

สรุป

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการใส่เชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้หลายชนิดและการตรวจสอบความสำเร็จของการอยู่ร่วมกันระหว่างเห็ดกับรากพืชอาศัย ผลการทดลองพบว่าเชื้อเห็ดทั้งสามชนิดสามารถเกิดความสัมพันธ์แบบเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาแสดงให้เห็นถึงลักษณะการสร้างโครงสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาที่ชัดเจน คือ เส้นใยภายนอก (external hyphae) และการสานตัวเป็นกระจุกของเส้นใย (rhizomorph) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา อีกทั้งการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้ที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดเผาะและเห็ดตับเต่า (50.40%-63.86%) และเห็ดระโงกเหลือง (31.60%-39.24%) สูงกว่าต้นควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบการมีอยู่ของ DNA เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาในรากพืชอาศัยด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อเห็ดแต่ละชนิด พบแถบ DNA ที่มีขนาดจำเพาะสำหรับเห็ดเผาะ (250 คู่เบส), เห็ดตับเต่า (351, 254 และ 260 คู่เบส) และเห็ดระโงกเหลือง (430 คู่เบส) ซึ่งยืนยันการมีอยู่ของเชื้อเห็ดในรากพืชอาศัย ในขณะที่ต้นควบคุมไม่ปรากฏแถบ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิคการใส่เชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาในกล้าไม้มีประสิทธิภาพในการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดและพืชอาศัย โดยเฉพาะเห็ดเผาะและเห็ดระโงก ต้องอาศัยพืชวงศ์ยางและวงศ์ก่อเป็นหลัก ในขณะที่เห็ดตับเต่าจะอาศัยไม้ผลและไม้ยืนต้น ซึ่งการใส่เชื้อเห็ดป่าในพืชอาศัยที่ถูกต้อง จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการปลูกป่าและการเพาะเห็ดป่าเศรษฐกิจในอนาคต

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (สวก.) ในการสนับสนุนทุนวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตพืชป่าไมคอร์ไรซาในสภาพพื้นที่ไร่ป่าแบบธรรมชาติ (ปีที่ 2) ประจำปีงบประมาณ 2565

เอกสารอ้างอิง

ธนภักษ์ อินยอด, ธนากร ลัทธิ์ถีระสุวรรณ, ขนิษฐา ชวนะนรเศรษฐ์, ธนภัทร เติมอารมณ์, ชาตรี กอนี, สุริมา ญาติโสม, สุจิตรา บัวลอย และปิยะดา เอี่ยมประสงค์. 2564. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารเกษตรนเรศวร. 18: 1-13.

ธนภักษ์ อินยอด, ขนิษฐา ชวนะนรเศรษฐ์, ธนภัทร เติมอารมณ์, ธนากร ลัทธิ์ถีระสุวรรณ, อลิษา อินจันทร์, ณัฐพัชร์ ศรีหะนัลต, จุฬามณี พละสุข และชาตรี กอนี. 2568. การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribed spacer ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า (*Phlebopus portentosus* (Berk. and Broome) Boedijn). วารสารวิชชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช. 44: 91-108.

ธนิตา อาสว่าง, อุไรวรรณ วิจารณกุล, รุ้งเพชร แข็งแรง, ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย และเชิดชัย โพธิ์ศรี. 2558. เอคโตไมคอร์ไรซาของเห็ดเผาะสิรินธรในกล้าไม้ยางนา. ใน: การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิชาการเครือข่ายงานวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 4. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

ปิยวรรณ กลมเกลี้ยง, ธีระชัย ธนานันต์ และนิรมล ศากยวงศ์. 2557. การจำแนกราด้วยวิธีไอทีเอสพีซีอาร์และความสามารถในการบำบัดสีรีแอคทีฟ RR141. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22: 684-694.

วิกานดา พรหมณี. 2560. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสกุลมะเขือในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.

วิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก และมนัส ทิตย์วรรณ. 2563. วัสดุผลิตหัวเชื้อเห็ดเผาะและผลต่อการเจริญเติบโตของพืชอาศัย. วารสารแก่นเกษตร. 48: 1173-1180.

สุพัตรา เจริญภักดี บดีรัฐ. 2561. นิเวศวิทยาของเห็ดเผาะในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 20: 124-133.

อุทัยวรรณ แสงวณิช. 2547. ศักยภาพของเห็ดป่าในการเพิ่มรายได้ของเกษตรกรในระบบวนเกษตร. ใน: เอกสารประกอบการบรรยายในการประชุมวิชาการวนเกษตร ครั้งที่ 1 “มิติของระบบวนเกษตร สำหรับชุมชนอนาคต” วันที่ 1-3 กรกฎาคม 2547. พิษณุโลก.

Adams, R. I., H. E. Hallen, and A. Pringle. 2005. Using the incomplete genome of the ectomycorrhizal fungus *Amanita bisporigera* to identify molecular polymorphisms in the related Amanita phalloides. Molecular Ecology Notes. 6: 218-220.

Appiah, T., C. Agyare, and Y. Luo. 2017. Molecular identification of some Ghanaian mushrooms using internal transcribed spacer regions. Molecular Biology. 6: 1-5.

Blackwell, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. American Journal of Botany. 98: 426-438.

Brundrett, M. C., and L. Tedersoo. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. New Phytologist. 220: 1108-1115.

Cullings, K. W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. Molecular Ecology. 1: 233-240.

Doyle, J. J., and E. E. Dickson. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. Taxon. 36: 715-722.

Lafontaine, D. L. J., and D. Tollervey. 2001. The function and synthesis of ribosomes. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2: 514-520.

Mora, C., D. P. Tittensor, S. Adl, A. G. B. Simpson, and B. Worm. 2011. How many species are there on Earth and in the Ocean. Biology. 9: 1-8.

Nuangmek, W., R. Saenmuangma, and M. Titayavan. 2016. Ecology and distribution of earthstars in plant genetic conservation project under the royal initiative of her royal highness princess Maha Chakri Sirindhorn at University of Phayao. Khon Kaen Agriculture Journal. 40: 960-964.

Peng Li, Z., C. C. Shen, S. F. Xu, F. W. Wang, Q. G. Zhang, and Z. W. Zhao. 2014. Development of a specific PCR for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. Mycosystema. 33: 1106-1116.

Peterson, R. L., H. B. Massicotte, and L. H. Melville. 2004. Mycorrhizas: Anatomy and cell biology. Mycologist. 19: 133.

Phillips, J. M., and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society. 55: 158-161.

Sanmee, R., B. Dell, P. Lumyong, K. Izumori, and S. Lumyong. 2010. Nutritive value of popular wild edible mushrooms from northern Thailand. Food Chemistry. 122: 479-487.

Suwannasai, N., P. Dokmai, A. Yamada, R. Watling, and C. Phosri. 2020. First ectomycorrhizal syntheses between *Astraeus sirindhorniae* and *Dipterocarpus alatus* (Dipterocarpaceae), pure culture characteristics, and molecular detection. Biodiversitas. 21: 231-238.

Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, and T. L. Madden. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 13: doi: https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134.

Yorou, N. S., A. Koné, M. Guissou, N. Guelly, D. Maba, M. Ekué, and A. De Kesel. 2014. Biodiversity and sustainable use of wild Edible fungi in the Sudanian centre of endemism: A Plea for Valorisation. In: Ectomycorrhizal Symbioses in Tropical and Neotropical Forests. CRC Press, New York.