การศึกษาชนิดของพืชอาศัยและปริมาณเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา (เห็ดเผาะ) ที่เหมาะสมในการส่งเสริมการเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้วงศ์ยางภายใต้สภาวะเรือนปลูกพืช

Examination of Host Plants and Quantity of Ectomycorrhiza (*Astraeus odoratus*) Suitable for Promoting Ectomycorrhiza Rooting of Dipterocarpaceae Seedlings under Greenhouse Conditions

ธนภักษ์ อินยอด[1*] ธนากร ลัทธิถีระสุวรรณ[2] ธนภัทร เติมอารมย์[1] ชาตรี กอนี[1] สุริมา ญาติโสม[1] ปิยะดา เอี่ยมประสงค์[1] ณัฐพัชร์ ศรีหะนัลต[3] และอนุพงศ์ กาบจันทร์[4]
Tanapak Inyod[1*], Thanakorn Lattirasuvan[2], Thanapat Termarom[1], Chatree Konee[1], Surima Yatsom[1], Piyada Eamprasong[1], Natthapach Srihanant[3] and Anupong Gabjun[4]

บทคัดย่อ

เห็ดป่าไมคอร์ไรซา (Mycorrhiza) เป็นราที่เจริญร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) กับรากพืชชั้นสูง การศึกษาชนิดของพืชอาศัยและปริมาณเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา (เห็ดเผาะ) ในการนำมาใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าไม้วงศ์ยาง ได้แก่ ยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don), เต็ง (*Shorea obtusa* Wall. ex Blume) และรัง (*Shorea siamensis* Miq.) อายุ 3 เดือน โดยปลูกถ่ายเชื้อลงในต้นกล้า 1 และ 2 ครั้ง แต่ละครั้งระยะเวลาห่างกัน 1 เดือน ปริมาณแตกต่างกัน 2 ระดับ คือ 20 และ 30 มิลลิลิตรต่อต้น เปรียบเทียบกับต้นชุดควบคุม ผลการทดลองพบว่า ต้นเต็งที่มีการปลูกถ่ายเชื้อเห็ดเผาะ 2 ครั้ง ในปริมาณครั้งละ 20 มิลลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการส่งเสริมการเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้วงศ์ยางภายใต้สภาวะเรือนปลูกพืชมากที่สุด โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในด้านความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก ความยาวราก จำนวนรากแขนง และปริมาณมวลชีวภาพส่วนเหนือดิน มีค่าเท่ากับ 15.83 เซนติเมตร, 1.72 มิลลิเมตร, 853 มิลลิเมตร, 990 ราก และ 7.36 กรัม ตามลำดับ รวมถึงมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซามากที่สุดถึง 81.31 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของ DNA ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดเผาะในรากพืชอาศัย ด้วยชุดไพรเมอร์ GAPK126F และ GAPK379R พบว่าเกิดแถบ DNA ขนาดประมาณ 250 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ (ชุดควบคุม) จะไม่ปรากฏแถบ DNA ดังกล่าว ซึ่งแสดงถึงความสามารถของเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาในการเข้ากันได้กับรากพืชอาศัย เพื่อให้การเพาะเห็ดเผาะมีโอกาสประสบความสำเร็จมากขึ้นในอนาคต

คำสำคัญ: เห็ดเผาะ เอคโตไมคอร์ไรซา พืชอาศัย ไม้วงศ์ยาง

Abstract

Mycorrhiza are a type of fungus that arise from the symbiosis between fungi and plant roots. This study examined optimal ectomycorrhizal mushroom (*Astraeus odoratus*) inoculation volume promoting growth in 3 month seedlings of Dipterocarpaceae: *Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don, *Shorea obtusa* Wall. ex Blume and *Shorea siamensis* Miq.,. The seedlings were inoculated either 1 or 2 times, separated by one month, at two different dosage levels: 20 and 30 ml/seedling, and compared with non-innoculated control. The results indicate that *S. obtusa* that were inoculated twice with 20 ml each time showed optimum condition to promote the root ectomycorrhiza of Dipterocarpaceae seedlings under greenhouse conditions. The height of seedling, stem diameter at root neck level, root length, the number of lateral root and biomass of the aboveground part were evaluated approximately, 15.83

[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]มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90110
[3]Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkla 90110
[4]สถานีวิจัยต้นน้ำน่าน อ. เวียงสา จ. น่าน 55110
[4]Nan Watershed Research Station, Wiang Sa, Nan 55110
*corresponding author, E-mail: Tanapuk@tistr.or.th

cm, 1.72 mm, 853 mm, 990 roots and 7.36 gram, respectively. In addition, the highest percentage of ectomycorrhiza root was 81.31 percent. The presence of DNA specific to *A. odoratus* in root hosts was ascertained using the GAPK126F and GAPK379R primer combinations, DNA bands representing approximately 250 base pairs , compared to the untreated plants (control) which did not exhibit the DNA band.. This study may be of use in optimizing the production of *A. odoratus* for promoting growth in Dipterocarpaceae.

Keywords: *Astraeus odoratus*, ectomycorrhiza, host plants, Dipterocarpaceae

คำนำ

ปัจจุบันป่าไม้ในประเทศไทยถูกทำลายและลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการเผาป่าเพื่อทำไร่ หรือหาของป่า และการลักลอบตัดไม้ทำลายป่า กิจกรรมนี้ส่งผลกระทบต่อความสมดุลของระบบนิเวศเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ดังนั้นการปลูกป่าในพื้นที่ป่าเสื่อมโทรมหรือไม่เคยเป็นพื้นที่ป่ามาก่อน โดยเฉพาะการปลูกพืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) มีลักษณะลำต้นตรง สูงเด่นกว่าไม้ต้นอื่น ๆ จนได้รับฉายาว่าเป็น ''ราชาแห่งไพรพฤกษ์'' (King of the forest of asia) (สมศักดิ์ สุขวงศ์, 2542) โดยเฉพาะพื้นที่ป่าเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีพรรณไม้วงศ์ยางมากถึง 470 ชนิด ใน 13 สกุล มีเรือนยอดปกคลุม 40-100 เปอร์เซ็นต์ของเรือนยอดต้นไม้ในป่า (Lyal and Curran, 2000) ในประเทศไทยมีรายงานพบ 8 สกุล 79 ชนิด กระจายทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ เนื้อไม้ของพืชหลายชนิดในวงศ์นี้นิยมใช้สำหรับสร้างสิ่งก่อสร้าง และเป็นไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เพราะนิยมใช้สร้างบ้านเรือน (สำนักงานหอพรรณไม้, 2555)

ไมคอร์ไรซา (Mycorrhiza) เป็นราที่เกิดขึ้นจากการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) ระหว่างรากับรากพืชชั้นสูง (พืชมีท่อลำเลียง) โดยเส้นใยราที่อาศัยอยู่ช่วยดูดซับสารอาหาร แร่ธาตุกลุ่มฟอสฟอรัสที่อยู่ในดิน จากนั้นจึงลำเลียงสู่รากพืช ในขณะเดียวกันรากพืชปลดปล่อยสารบางชนิด (root exudates) คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และกรดอะมิโน ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของรา ดังนั้นพืชที่มีราไมคอร์ไรซาอาศัย จึงมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีกว่าพืชที่ไม่มีไมคอร์ไรซา ดังรายงานของ ทนุวงศ์ แสงเทียน และอุทัยวรรณ แสงวานิช (2537) ทดสอบการเจริญเติบโตของยางนา ด้วยการปลูกเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา 3 ชนิด กล้าไม้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อมีการเจริญเติบโตดีในทุกด้าน และ Noori et al. (2014) ยังพบว่าการใส่เชื้อไมคอร์ไรซาร่วมกับการใช้ปุ๋ยหมักช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวโพด รวมทั้งสามารถเจริญได้ในสภาพพื้นที่แห้งแล้ง มีความเป็นกรดสูง และทนทานต่อโรคพืช โดยทั่วไปเห็ดป่าไมคอร์ไรซามีราคาสูง และพบมากในช่วงฤดูฝน ได้แก่ เห็ดตับเต่า [*Phlebopus portentosus* (Berk. and Broome) Boedijn], เห็ดระโงกเหลือง [*Amanita hemibapha* (Berk. and Broome) Sacc.], เห็ดตะไคเขียว [*Russula virescens* (Schaeff.) Fr.] และเห็ดเผาะ [*Astraeus. odoratus* C. Phosri, R.Watling, M.P. Martin and A.J.S. Whalley] เป็นต้น (Harley and Smith, 1983; อนิวรรตน์ เฉลิมพงษ์ และธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ, 2525) เห็ดเผาะ เป็นเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดหนึ่ง มีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย โดยพบมากในพื้นที่ป่าสนและป่าเต็งรัง ลักษณะดอกเดี่ยวไม่มีก้านดอก สีน้ำตาลอ่อน เมื่อแก่สีน้ำตาลเข้มถึงดำ ผนังดอกแบ่งออกเป็น 2 ชั้น ภายในประกอบด้วยสปอร์จำนวนมาก เมื่อแก่ดอกเห็ดจะปริแตกออกเป็นแฉก 7-11 แฉก และปล่อยสปอร์ออกมาในอากาศ (ราชบัณฑิตยสถาน, 2550; เกษม สร้อยทอง, 2537)

การปลูกป่าร่วมกับการเพาะเห็ด เป็นการปลูกโดยใช้ระบบวนเกษตรแบบผสมผสาน สามารถให้ผลผลิตในระยะสั้น คือ เห็ดป่ากินได้ ซึ่งในสภาพแวดล้อมเหมาะสมสามารถเกิดดอกเห็ดหลังจากปลูกร่วมกับพืชอาศัย และได้ผลผลิตจากไม้ผล พืชไร่ พืชสวน ส่วนผลผลิตในระยะยาวคือเนื้อไม้ ขึ้นอยู่กับชนิดของต้นไม้ที่ปลูก ซึ่งมีรายงานการนำเชื้อเห็ดเผาะมาใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และมีความจำเพาะต่อไม้วงศ์ยาง ดังงานวิจัยของ Tharnrat et al. (2019) ศึกษาการใส่เชื้อเห็ดเผาะลงใน ต้นพลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb) และต้นพะยอม (*Shorea roxburghii* G.Don) พบรากเอคโตไมคอร์ไรซา 30-60 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตทางด้านความสูงมากกว่าต้นควบคุม แต่การนำกล้าที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อเหล่านี้ไปปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่ามีข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ ชนิดของกล้าไม้ที่แตกต่างกัน ปริมาณเชื้อที่เหมาะสม และจำนวนครั้งของการปลูกถ่ายเชื้อ ทั้งนี้หากมีการศึกษาสภาวะแบบเรือนเพาะชำให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ก่อนการนำกล้าไม้ไปปลูกในสภาพป่าธรรมชาติ จึงจำเป็นต้องทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อเห็ดกับชนิดของกล้าไม้

ดังนั้นการศึกษาชนิดของพืชอาศัยและปริมาณเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา (เห็ดเผาะ) ที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมการการเจริญเติบโต และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซามากที่สุด ในไม้วงศ์ยาง 3 ชนิด ได้แก่ ยางนา (*D. alatus*), เต็ง (*S. obtusa*) และรัง (*S. siamensis*) เพื่อใช้ทดสอบการเป็นพืชอาศัยที่เหมาะสม งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาข้างต้นก่อนการนำกล้า

ไม้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อเห็ดไมคอร์ไรซาไปปลูกในธรรมชาติ ซึ่งในอนาคตการปลูกป่าปลูกเห็ดจะเป็นประโยชน์ในการแก้ปัญหาเศรษฐกิจชุมชนอย่างยั่งยืน

วิธีการศึกษา

การเตรียมเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา (เห็ดเผาะ) ในอาหารเหลว

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อเห็ดเผาะ ใช้อาหาร Potato Dextrose Broth -PDB (Difco, France) ปริมาณ 24 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ระดับ pH 5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นลง ตัดเส้นใยเชื้อเห็ดเผาะที่เลี้ยงในอาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Broth) โดยคัดเลือกแม่เชื้อเห็ดเผาะอายุประมาณ 30 วัน และไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่น โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะบริเวณรัศมีรอบนอกของเส้นใยบนจานอาหาร ใช้เข็มเขี่ยเชื้อตัดชิ้นวุ้นจำนวน 3 ชิ้น ใส่ลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ตรวจวัดปริมาณมวลชีวภาพ (biomass) ของเส้นใยเห็ดเผาะเมื่ออายุครบ 20 วัน ก่อนนำไปปลูกถ่ายลงพืชอาศัย (Figure 1)

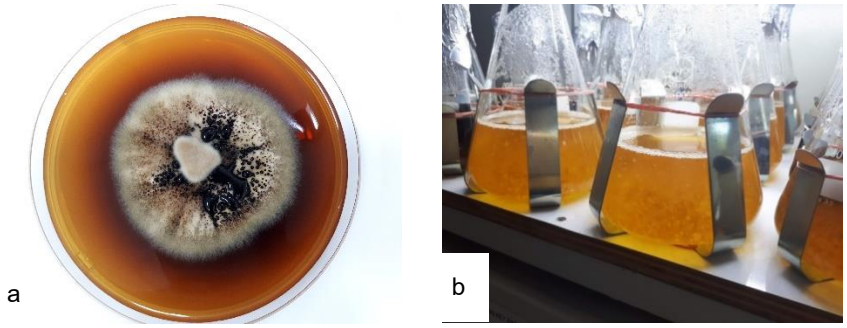


Figure 1 Mycelium density of *A. odoratus* in PDA media for 30 days (a) and mycelium in PDB medium for 20 days (b).

การทดสอบชนิดพืชอาศัยและปริมาณเชื้อเห็ดเผาะที่เหมาะสมภายใต้สภาวะเรือนปลูกพืช

เตรียมกล้าไม้เพื่อศึกษาชนิดของพืชอาศัยที่เหมาะสมสำหรับการเข้าอาศัยของเชื้อเห็ดเผาะ เตรียมวัสดุที่ใช้เพาะโดยนำทรายผสมกับขุยมะพร้าว และหน้าดิน (top soil) ด้วยอัตราส่วน 2:1:1 และปรับ pH ของวัสดุเพาะเท่ากับ 5 (ใช้ปูนขาวเพิ่มค่า pH ให้ดิน และใช้ซัลเฟอร์ลดค่า pH ในดิน) นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บรรจุลงในถุงเพาะชำขนาด 6X10 นิ้ว นำเมล็ดไม้วงศ์ยาง ได้แก่ ยางนา (*D. alatus*), เต็ง (*S. obtusa*) และ รัง (*S. siamensis*) มาปลูกบนวัสดุที่เตรียมข้างต้น โดยปลูกและดูแลภายใต้สภาพโรงเรือน หลังจากต้นกล้าไม้มีอายุ 3 เดือน จึงนำมาใช้ทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ชนิดของกล้าไม้พืชอาศัย จำนวนครั้งในการใส่เชื้อ และปริมาณเชื้อที่แตกต่างกัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ตำรับ ดังนี้ ตำรับ 1 (T1) ต้นที่ไม่ใส่เชื้อเห็ดเผาะ (ชุดควบคุม), ตำรับ 2 (T2) ใส่เชื้อเห็ดเผาะปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อต้น, ตำรับ 3 (T3) ใส่เชื้อเห็ดเผาะปริมาณ 30 มิลลิลิตรต่อต้น, ตำรับ 4 (T4) ใส่เชื้อเห็ดเผาะ 2 ครั้ง ปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อต้น และตำรับ 5 (T5) ใส่เชื้อเห็ดเผาะ 2 ครั้ง ปริมาณ 30 มิลลิลิตรต่อต้น (ปรับมวลชีวภาพของสารแขวนลอยเชื้อเห็ดที่ใส่ต้นพืชในแต่ละครั้งให้มีปริมาณมวลชีวภาพของเส้นใยเห็ด 4 กรัม/1 ลิตร) ขั้นตอนการใส่เชื้อบีบดินที่ถุงเพาะเพื่อให้ดินแยกออกจากกัน เมื่อใส่เชื้อเห็ดทำให้สามารถไหลผ่านไปยังรากได้สะดวก เพื่อป้องกันการชะล้างควรงดให้น้ำเป็นเวลา 2 วัน หลังจากใส่เชื้อเห็ดเป็นเวลา 1 เดือน วัดอัตราการเจริญเติบโตทางความสูงของลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางทางคอรากของลำต้น มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน (น้ำหนักแห้งในส่วนของใบและลำต้น) มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน (น้ำหนักแห้งของราก) จำนวนรากแขนง ความยาวราก และจำนวนใบ วางแผนการทดลองแบบสุ่มแบบสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ประกอบด้วย 5 ตำรับ 6 ซ้ำต่อตำรับ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS version 9.1 โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีทางสถิติ Duncan's new multiple range test ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

การตรวจหาการเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาในรากพืชอาศัย

ตรวจติดตามการเจริญอยู่ร่วมกันของเชื้อเห็ดเผาะกับรากพืชอาศัย ด้วยการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) และย้อมรากพืชอาศัยแล้วตรวจวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การติด

เชื้อ (percent infection) ของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา ตามวิธีของ Phillips and Hayman (1970) โดยตัดรากออกเป็นชิ้นความยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้ง เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที ล้างตัวอย่างรากด้วยน้ำกลั่น ย้อมรากด้วยสี Trypan Blue ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บตัวอย่างรากในกลีเซอรอล ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ สุ่มชิ้นส่วนรากที่ย้อมสีจำนวน 50 ชิ้น วางบนแผ่นสไลด์ครั้งละ 5 ชิ้น นับจำนวนชิ้นส่วนของรากที่พบว่ามีเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแต่ละชุดการทดลอง เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ

การตรวจสอบการมีอยู่ของ DNA ของเห็ดเผาะในรากพืชอาศัยโดยวิธีพีซีอาร์

เตรียมเนื้อเยื่อปลายรากแขนงของกล้าไม้พืชอาศัยได้แก่ ยางนา เต็ง และรัง ภายหลังการใส่เชื้อเห็ดเผาะ 1 เดือน ทั้งหมด 5 ตำรับ ๆ ละ 1 ต้น และต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ (control) รวมถึงเส้นใยเห็ดเผาะบนอาหารแข็ง PDA (positive control) ปริมาณ 40-50 มิลลิกรัม บดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวและสกัดแยก DNA ตามวิธีการของ Doyle and Dickson (1987) ละลายตะกอนด้วย TE-buffer นำไปตรวจสอบด้วยวิธีการ gel electrophoresis วัดปริมาณและคุณภาพ DNA ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เก็บรักษา DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณ DNA ของยีนที่มีความจำเพาะต่อเห็ดเผาะ โดยใช้ DNA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH_2O ปริมาตร 12.8 ไมโครลิตร, 10X *Taq* buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, forward primer (GAPK126F 5'- TCAAGACTGTCCCCTCCAGA-3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, reverse primer (GAPK379R 5'- CTAGGACCTACAACGGGTGC-3') (Suwannasai et al., 2020) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ 5 U *Taq* DNApolymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA) ทำปฏิกิริยาในเครื่องพีซีอาร์ (Bio-Rad, T100 thermal cycler) 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ 3) ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีการ gel electrophoresis เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNAladder (Fermentas, USA)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดสอบชนิดและปริมาณเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซา (เห็ดเผาะ) ที่เหมาะสมภายใต้สภาวะเรือนปลูกพืช

จากการทดลองชนิดและปริมาณเชื้อเห็ดเผาะที่เหมาะสมภายใต้สภาวะเรือนปลูกพืช ในพืชอาศัย 3 ชนิด ได้แก่ ยางนา เต็ง และรัง แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ตำรับ ตามจำนวนครั้งที่ปลูกถ่ายเชื้อ และปริมาตรการใส่เชื้อ 20 และ 30 มิลลิลิตรต่อต้น เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ใส่เชื้อเห็ดเผาะ (ชุดควบคุม) เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าการเจริญทางความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางคอรากของลำต้น มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน จำนวนรากแขนง และความยาวราก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนี้

ผลการเจริญทางความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นที่ระดับคอราก ความยาวราก และจำนวนใบ ภายหลังการปลูกถ่ายเชื้อเห็ดเผาะลงในกล้าไม้วงศ์ยาง

ผลการเจริญทางด้านความสูงของยางนา เต็ง และรัง พบว่ากล้าไม้ทุกชนิดที่ใส่เชื้อเห็ดเผาะให้การเจริญทางด้านความสูงมากกว่าต้นชุดควบคุม โดยเฉพาะเต็งที่ใส่เชื้อเห็ดเผาะ 2 ครั้ง ระยะห่างกัน 1 เดือน ปริมาตรเชื้อ 20 และ 30 มิลลิลิตรต่อต้น มีการเจริญทางด้านความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 15.83 และ 15.50 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ต้นชุดควบคุมมีความสูงเฉลี่ยเพียง 3.80 เซนติเมตร เช่นเดียวกับผลการเจริญทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก พบว่าต้นกล้าเต็ง และยางนา ที่ใส่เชื้อ 2 ครั้ง ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อต้น มีการเจริญทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นมากที่สุดเฉลี่ย 1.72 และ 1.57 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือต้นกล้าเต็ง และยางนา ที่ได้รับการใส่เชื้อ 2 ครั้ง ปริมาณ 30 มิลลิลิตรต่อต้น มีเส้นผ่านศูนย์กลางคอรากของลำต้นเฉลี่ย เท่ากับ 1.42 และ 1.14 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าที่ไม่ได้ใส่เชื้อมีเส้นผ่านศูนย์กลางคอรากเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.52-0.71 มิลลิเมตร (Table 1) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li-Hui and Qiang-Sheng (2017) ได้ศึกษาเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของต้น *Trifolium repens* L. พบว่าต้นที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อ *Rhizoglomus intraradices* ให้ความสูง และเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นเฉลี่ย 16.78 เซนติเมตร และ 3.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นชุด

ควบคุม มีความสูงเพียง 9.14 เซนติเมตร เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sreedhar and Mohan (2016) ทดสอบการเจริญเติบโตของต้น *Neolamarckia cadamba* ด้วยการปลูกถ่ายเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (*Glomus fasciculatum*) พบว่าภายหลังการปลูกถ่ายเชื้อ 180 วัน มีอัตราการเจริญทางด้านความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น และน้ำหนักแห้ง เท่ากับ 25.61 เซนติเมตร, 6.80 มิลลิเมตร และ 6.53 กรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อมีค่าเฉลี่ยเพียง 19.33 เซนติเมตร, 4.53 มิลลิเมตร และ 4.24 กรัม ตามลำดับ

Table 1 Height seedling and stem diameter of *D. alatus*, *S. obtusa* and *S. siamensis* were compare with inoculated mycorrhiza (*A. odoratus*) and non-inoculated seedlings for 4 months.

Treatment	Height seedling (cm)			Stem diameter (cm)		
	D. alatus	*S. obtusa*	*S. siamensis*	*D. alatus*	*S. obtusa*	*S. siamensis*
T1 control	5.52±0.10d	3.80±0.30d	4.35±0.35d	0.52±0.04d	0.71±0.05d	0.53±0.10b
T2 20 ml inoculation	6.48±0.30c	5.32±0.26c	10.83±0.40a	0.83±0.15c	0.90±0.03c	0.78±0.02a
T3 30 ml inoculation	5.25±0.25d	6.97±0.20b	6.18±0.22c	0.57±0.12d	1.02±0.07c	0.84±0.16a
T4 20 ml inoculation for 2 time	8.69±0.20a	15.83±0.30a	8.18±0.35b	1.57±0.24a	1.72±0.20a	0.90±0.17a
T5 30 ml inoculation for 2 time	7.54±0.40b	15.50±1.50a	5.95±0.40c	1.14±0.16b	1.42±0.05b	0.82±0.10a
F-test	**	**	**	**	**	*
CV (%)	4.02	7.51	4.93	16.86	8.76	15.81

Mean in the same column followed by the same latter are not significantly different by DMRT at P=0.05.
**,* Significant at 0.01and 0.05 probability levels, respectively.

Table 2 Leave numbers and Roots length of *D. alatus*, *S. obtusa* and *S. siamensis* were compare with inoculatedmycorrhiza (*A. odoratus*) and non-inoculated seedlings for 4 months.

Treatment	Leave numbers (per plant)			Roots length (mm)		
	D. alatus	*S. obtusa*	*S. siamensis*	*D. alatus*	*S. obtusa*	*S. siamensis*
T1 control	11.00±2.00	8.00±1.00	7.00±1.00	265±28b	282±20c	65±5c
T2 20 ml inoculation	13.00±1.00	9.00±2.00	8.00±0.00	270±19b	323±22c	129±8b
T3 30 ml inoculation	12.00±1.00	9.00±1.00	9.00±1.00	294±26ab	331±16c	137±14b
T4 20 ml inoculation for 2 time	10.00±2.00	8.00±2.00	7.00±2.00	309±18ab	853±48a	145±10b
T5 30 ml inoculation for 2 time	11.00±2.00	7.00±0.00	1.00±1.00	326±24a	585±32b	182±18a
F-test	ns	ns	ns	*	**	**
CV (%)	14.42	17.24	15.16	7.95	6.28	9.01

Mean in the same column followed by the same latter are not significantly different by DMRT at P=0.05.
**,* Significant at 0.01and 0.05 probability levels, respectively. ,ns non-significant

ผลการตรวจนับจำนวนใบของต้นยางนา เต็ง และรัง พบว่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติ (P≤0.05) โดยต้นกล้ายางนาที่ใส่เชื้อ 1 ครั้ง ปริมาณ 20 และ 30 มิลลิลิตรต่อต้น มีจำนวนใบมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 13 และ 12 ใบ ตามลำดับ ในขณะที่ต้นเต็ง และรังมีจำนวนใบมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 9 ใบ เมื่อเปรียบเทียบกับยางนา เต็ง และรัง ที่ไม่ได้ใส่เชื้อเห็ดเผาะ (ชุดควบคุม) มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 11, 8 และ 7 ใบ ตามลำดับ และผลการตรวจวัดความยาวราก พบว่าต้นกล้าเต็งที่ใส่เชื้อ 2 ครั้งปริมาตร 20 และ 30 มิลลิลิตรต่อต้น มีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 853 และ 585 มิลลิเมตร รองลงมาคือยางนา และรัง ที่ได้รับการใส่เชื้อ 2 ครั้ง ปริมาตร 30 มิลลิลิตรต่อต้น 326 และ 182 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับยางนา เต็ง และรังที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อมีผลความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับเพียง 265, 282 และ 65 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Table 2) จากผลการทดลองพบว่า กล้าไม้ที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดเผาะมีการเจริญในทุกด้านดีกว่าต้นควบคุม เนื่องจากกล้าไม้ที่ได้รับการใส่เชื้อราไมคอร์ไรซาจะเข้าไปกระตุ้นและส่งเสริมในการดูดซับธาตุอาหารได้ดี ทำให้ต้นพืชนำสารอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้ง่ายขึ้น ส่งผลให้ต้นที่ใส่เชื้อไมคอร์ไรซามีการเจริญเติบโตดีกว่า และยังมีความสามารถปรับปรุงดินที่มีฟอสฟอรัสอยู่ในระดับต่ำ โดยเส้นใยไมคอร์ไรซาที่อยู่ในดินมีเอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase) ทำให้ฟอสเฟตถูกปล่อยออกมาจากสารประกอบอินทรีย์ และถูกดูดซับโดยเส้นใยของไมคอร์ไรซาที่อยู่ในดิน ทำให้พืชสามารถนำฟอสฟอรัสที่ย่อยสลายแล้วไปใช้ได้มากกว่าต้นที่ไม่ได้ใส่เชื้อเห็ดไมคอร์ไรซา

(Nuangmek et al., 2016; Nopamornbodi, 1995) สอดคล้องกับงานวิจัยของ วิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก และมนัส ทิตย์วรรณ (2563) วิเคราะห์อินทรียวัตถุ และปริมาณธาตุอาหารในดิน หลังการใส่เชื้อเห็ดเผาะ 6 เดือน พบว่าตัวอย่างดินที่ปลูกต้นพะยอมในตำรับที่ปลูกถ่ายเชื้อมีปริมาณอินทรียวัตถุและฟอสฟอรัสเท่ากับ 2.94 และ 2.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ต้นชุดควบคุม มีปริมาณอินทรียวัตถุและฟอสฟอรัสเพียง 2.61 และ 2.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ สุพัตรา เจริญภักดี บดีรัฐ (2561) ศึกษานิเวศวิทยาของเห็ดเผาะในมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พบว่าจำนวนดอกเห็ดที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับ ปริมาณฝน ความชื้นในดิน และปริมาณธาตุอาหารในดินที่เหมาะสมโดยมีปริมาณไนโตรเจน 0.21 เปอร์เซ็นต์ และฟอสฟอรัส 3.19 เปอร์เซ็นต์

ผลของปริมาณมวลชีวภาพส่วนเหนือดิน และส่วนใต้ดิน ภายหลังการปลูกถ่ายเชื้อเห็ดเผาะลงในกล้าไม้วงศ์ยาง

ผลของปริมาณมวลชีวภาพส่วนเหนือดิน (น้ำหนักแห้งส่วนของใบและลำต้น) ในกล้าไม้วงศ์ยางได้แก่ ยางนา เต็ง และรัง พบว่าพืชทั้ง 3 ชนิด ที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดเผาะมีปริมาณมวลชีวภาพส่วนเหนือดินสูงกว่าต้นควบคุม โดยเฉพาะเต็งที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดเผาะ 2 ครั้ง ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อต้น มีปริมาณมวลชีวภาพสูงสุด 7.36 กรัม รองลงมาคือยางนา ที่ได้รับการใส่เชื้อ 1 ครั้ง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.25 กรัม ในขณะที่ต้นกล้าที่ไม่ได้ปลูกเชื้อเห็ดเผาะมีมวลชีวภาพส่วนเหนือดินน้อยที่สุดคือต้นรัง เท่ากับ 2.60 กรัม (Table 3) ส่วนปริมาณมวลชีวภาพส่วนใต้ดิน (น้ำหนักแห้งของราก) พบว่าต้นกล้าเต็งที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดเผาะ 1 ครั้ง ปริมาตร 30 มิลลิลิตรต่อต้น มีอัตรามวลชีวภาพส่วนใต้ดินมากที่สุดเท่ากับ 7.95 กรัม เปรียบเทียบกับต้นกล้ายางนา เต็ง และรัง ที่ไม่ได้ใส่เชื้อมีมวลชีวภาพส่วนใต้ดินเพียง 2.30, 3.06 และ 2.69 กรัม ตามลำดับ (Table 3) สอดคล้องกับงานวิจัยของ ธนภักษ์ อินยอด และคณะ (2564) ทดสอบใส่เชื้อเห็ดตับเต่า (*P. portentosus*) โดยใช้เส้นใย (mycelium inoculum) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อต้น พบว่าต้นหว้าที่ได้รับการใส่เชื้อ มีมวลชีวภาพส่วนเหนือดิน 5.20 กรัม และมวลชีวภาพส่วนใต้ดิน 2.90 กรัม ในขณะที่ต้นควบคุมมีค่าเพียง 3.10 และ 0.70 กรัม ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kaewgrajang et al. (2013) ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นยางนาภายหลังการปลูกถ่ายเชื้อเห็ดเผาะโดยใช้สปอร์แขวนลอย (spore suspension) ปริมาตร 10, 25 และ 50 มิลลิลิตรต่อต้น และใช้เส้นใย (mycelium) 25 มิลลิลิตรต่อต้น พบว่าการใช้สปอร์ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ให้ปริมาณมวลชีวภาพส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินมากที่สุด

Table 3 Biomass of aboveground part and underground part of *D. alatus*, *S. obtusa* and *S. siamensis* were compare with inoculated mycorrhiza (*A. odoratus*) and non-inoculated seedlings for 4 months.

Treatment	Aboveground by biomass (g)			Underground by biomass (g)		
	D. alatus	*S. obtusa*	*S. siamensis*	*D. alatus*	*S. obtusa*	*S. siamensis*
T1 control	5.68±0.60a	3.20±0.70	2.60±0.28b	2.30±0.41b	3.06±0.63b	2.69±0.58
T2 20 ml inoculation	6.25±1.00a	3.53±0.75	4.27±0.89a	2.53±0.38b	4.37±0.87b	2.92±0.74
T3 30 ml inoculation	6.13±0.13a	4.22±0.87	2.84±0.39b	3.40±0.77b	7.95±1.24a	2.92±0.82
T4 20 ml inoculation for 2 time	4.27±0.27b	7.36±0.56	4.16±0.67a	5.32±0.96a	6.45±1.02a	3.14±0.69
T5 30 ml inoculation for 2 time	3.95±0.44b	6.72±0.58	3.15±0.76ab	5.19±0.84a	6.46±0.79a	2.33±0.41
F-test	**	**	*	**	**	ns
CV (%)	10.90	14.01	18.80	18.98	16.49	23.68

Mean in the same column followed by the same latter are not significantly different by DMRT at P=0.05.
ns non-significant, **,* Significant at 0.01and 0.05 probability levels, respectively.

ผลการตรวจนับจำนวนราก และเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาภายหลังการปลูกถ่ายเชื้อเห็ดเผาะลงในกล้าไม้วงศ์ยาง

ผลการตรวจนับจำนวนรากแขนงโดยเครื่อง Epson Perfection V700 Photo ในกล้าไม้วงศ์ยาง ได้แก่ ยางนา เต็ง และรัง หลังจากใส่เชื้อเห็ดแล้ว 1 เดือน พบว่าต้นกล้าทั้ง 3 ชนิด ที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดเผาะมีจำนวนรากมากกว่าต้นควบคุม ซึ่งชนิดต้นกล้าที่ใส่เชื้อมีจำนวนรากมากที่สุด คือ เต็ง มีจำนวนรากเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 896-990 รากต่อต้น รองลงมาคือ ยางนา มีจำนวนรากอยู่ระหว่าง 709-892 รากต่อต้น และรังมีจำนวนรากอยู่ระหว่าง 316-474 รากต่อต้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดเผาะ (ชุดควบคุม) ในเต็ง ยางนา และรัง พบว่ามีจำนวนรากเฉลี่ยเพียง 692, 696 และ 253 รากต่อต้น ตามลำดับ (Table 4) ลักษณะรากของต้นเต็งที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดเผาะ มีรากแก้วขนาดใหญ่ (tap root) ช่วงโคนรากใหญ่แล้วเรียวไปจนถึงปลายราก และรากแขนง

(lateral root) เจริญแตกออกไปจากรากแก้วมีขนาดเล็กจำนวนมาก (Figure 2B) เมื่อเปรียบเทียบกับรากของต้นชุดควบคุม รากแก้วที่เจริญออกมามีขนาดเล็ก และเรียว มีการเจริญของรากแขนงไม่สมบูรณ์ จำนวนรากน้อย และแห้ง (Figure 2a) ส่งผลต่อการดูดซึมน้ำและธาตุอาหารของพืช ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตต่ำกว่าต้นที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อเห็ดเผาะ (Brundrett, 2006)

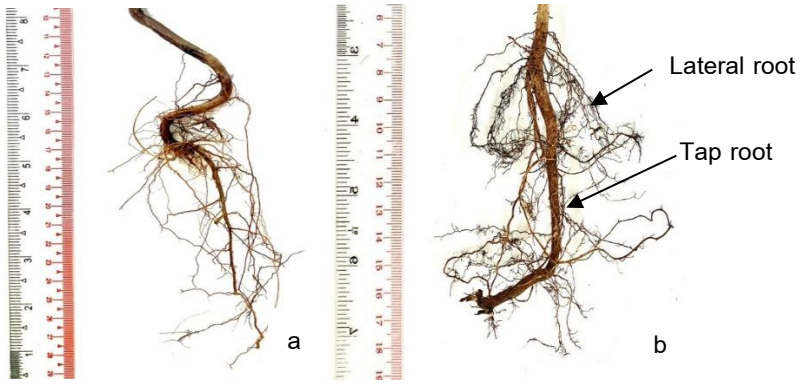


Figure 2 Characteristics of the lateral root numbers of *Shorea obtusa* seedlings for 5 months; (a) non- inoculated and (b) inoculated with mycorrhiza 20 ml/plants.

Table 4 Lateral root numbers and percentages of ectomycorrhizal roots of *D. alatus*, *S. obtusa* and *S. siamensis* were compare with inoculated mycorrhiza (*A. odoratus*) and non-inoculated seedlings for 4 months.

Treatment	Lateral root numbers (per plant)			percentages of ectomycorrhizal		
	D. alatus	*S. obtusa*	*S. siamensis*	*D. alatus*	*S. obtusa*	*S. siamensis*
T1 control	696±88b	692±69b	253±48c	36.45±4.28b	34.27±3.56b	36.48±5.70b
T2 20 ml inoculation	720±96b	990±48a	474±68a	76.28±8.54a	80.56±9.57a	60.47±8.20a
T3 30 ml inoculation	892±24a	979±98a	425±63ab	73.93±7.26a	71.03±5.70a	60.20±4.90a
T4 20 ml inoculation for 2 time	709±78b	990±89a	316±52bc	76.71±6.98a	81.31±7.80a	54.03±6.10a
T5 30 ml inoculation for 2 time	883±38a	896±82a	414±85ab	77.99±7.21a	78.04±8.20a	58.93±3.90a
F-test	**	**	**	**	**	*
CV (%)	9.07	8.98	17.14	10.24	10.58	10.97

Mean in the same column followed by the same latter are not significantly different by DMRT at P=0.05.
**,* Significant at 0.01and 0.05 probability levels, respectively.

ผลของเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาของกล้าไม้วงศ์ยาง หลังการใส่เชื้อเห็ดเผาะลงกล้าไม้ทั้ง 3 ชนิด อัตราการเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซามีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยต้นกล้าเต็งที่ใส่เชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 20 มิลลิลิตรต่อต้น มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซามากที่สุดเฉลี่ย 81.31 เปอร์เซ็นต์ ส่วนต้นกล้ายางนาที่ใส่เชื้อ 2 ครั้งปริมาตร 30 มิลลิลิตรต่อต้น มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาเฉลี่ยมากที่สุด 77.99 เปอร์เซ็นต์ และต้นกล้ารังที่ใส่เชื้อ 1 ครั้ง ในปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อต้นเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาเฉลี่ยมากที่สุด 60.47 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าที่ไม่ได้ใส่เชื้อเห็ดเผาะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 34.27-36.48 เปอร์เซ็นต์ (Table 4) สอดคล้องกับงานวิจัยของCharoenpakdee et al. (2010) ศึกษาการเกิดรากไมคอร์ไรซาในต้นสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) จำนวน 10 พื้นที่ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากไมคอร์ไรซา อยู่ระหว่าง 37.7-94.3 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Hanmoungiai (2014) ศึกษาการเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาของต้นกล้าก่อแป้นภายใต้สภาพโรงเรือน พบว่าเส้นใยของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซามีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงถึง 97.78 เปอร์เซ็นต์ ผลการตรวจสอบรากพืชทั้ง 3 ชนิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลักษณะรากต้นเต็งที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดเผาะเกิดการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาลักษณะเส้นใยเกาะบริเวณผิวรากพืช (external hyphae) และสานรวมตัวเป็นกระจุกของเส้นใย (rhizomorph) ชัดเจน (Figure 3b) ซึ่งไม่พบลักษณะดังกล่าวในต้นที่ไม่ใส่เชื้อ (Figure 3a) ส่วนการตรวจสอบด้วยการย้อมสีรากตามวิธีของ Phillips and Hayman (1970) โดยลักษณะรากต้นที่ได้รับการใส่เชื้อเมื่อตัดตามแนวขวางพบเส้นใยติดสีของ Trypan Blue มีลักษณะยื่นหรือห่อหุ้ม และเจริญหนาแน่นคลุมผิวรากพืช เรียกว่า แมนเทิล (mantle) (Figure

3d) สอดคล้องกับงานวิจัยของ ธนิตา อาสว่าง และคณะ (2558) พบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาของเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae*) หลังการใส่หัวเชื้อ และพบกลุ่ม rhizomoph ลักษณะสีน้ำตาลดำรอบ ๆ ราก

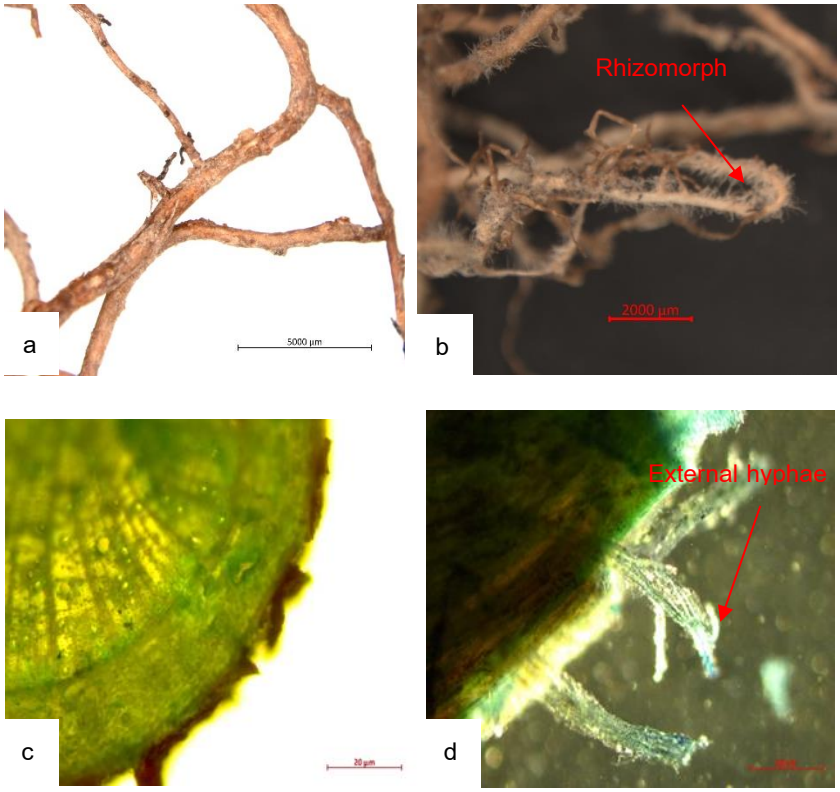


Figure 3 Characteristics of the creation of ectomycorrhizal in the root of *S. obtusa* ; (a) plant root (control), (b) plant root covered by rhizomorph, (c) transverse section of the non- mycorrhiza (control) and (d) inoculated roots with mycorrhiza.

ผลตรวจสอบการมีอยู่ของ DNA ของเห็ดเผาะในรากพืชอาศัยโดยวิธีพีซีอาร์

ภายหลังการใส่เชื้อเห็ดเผาะลงในกล้าไม้พืชอาศัยทั้ง 3 ชนิด เลือกต้นที่มีความสมบูรณ์สามารถเจริญเติบโตได้ ตำรับละ 1 ต้น และต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ (control) รวมถึงเส้นใยเห็ดเผาะบนอาหารแข็ง PDA (positive control) จากผลการตรวจสอบการมีอยู่ของ DNA ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดเผาะในรากพืชอาศัย ด้วยชุดไพรเมอร์ GAPK126F และ GAPK379R ซึ่งมีความจำเพาะกับ DNA ของเส้นใยเห็ดเผาะ พบว่าเกิดแถบ DNA ของเส้นใยเห็ดเผาะขนาด 250 คู่เบส ในช่องที่ P เป็นเส้นใยเห็ดเผาะ (positive control) และกล้าไม้ที่มีการใส่เชื้อเห็ดเผาะจะปรากฏแถบ DNA ในช่องที่ 1-4 ของต้นยางนา เต็ง และรัง ที่มีขนาดของแถบ DNA เท่ากับ positive control เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ (control) พบว่าไม่ปรากฏแถบ DNA ดังกล่าว (Figure 4) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Suwannasai et al. (2020) ศึกษาการสร้างรากเอคโตไมคอร์ไรซาของเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae*) ในต้นยางนา (*D. alatus*) โดยการสกัด DNA จากรากต้นยางนา จำนวน 143 ตัวอย่าง ตรวจสอบด้วยชุดไพรเมอร์ GAPK126F และ GAPK379R ซึ่งมีความจำเพาะกับเห็ดเผาะ พบแถบ DNA มีขนาด 250 คู่เบส คิดเป็น 89.4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบการเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาในรากพืชอาศัยที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดเผาะ

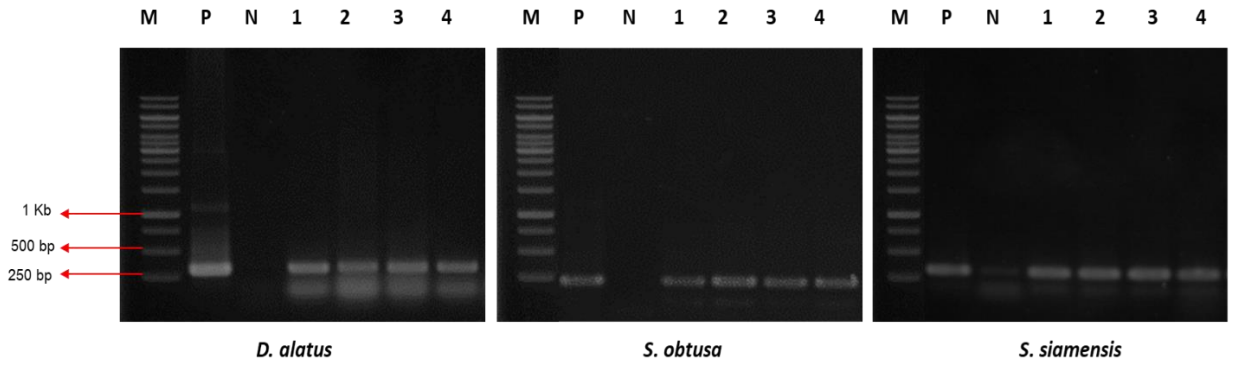


Figure 4 Gel electrophoresis of selected *A. odoratus* ectomycorrhizal roots amplifled using GAPK126F/ GAPK379R primers; M= 1Kb DNA ladder marker, Lane P= mycelium of *A. odoratus* (positive control), Lane N= T1 non-inoculated (negative control), Lane 1= T2 20 ml inoculation, Lane 2= T3 30 ml inoculation, Lane 3= T4 20 ml inoculation for 2 times and Lane 4= T5 30 ml inoculation for 2 times.

สรุปผลการศึกษา

การทดสอบการใส่เชื้อเห็ดเผาะลงในกล้าไม้วงศ์ยาง 3 ชนิด ได้แก่ ยางนา (*D. alatus*) เต็ง (*S. obtusa*) และรัง (*S. siamensis*) อายุ 3 เดือน โดยปลูกถ่ายเชื้อลงในต้นกล้า 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 เดือน ปริมาตรแตกต่างกัน 2 ระดับ คือ 20 และ 30 มิลลิลิตรต่อต้น เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ใส่เชื้อเห็ดเผาะ (ชุดควบคุม) พบว่าการใส่เชื้อ 2 ครั้ง ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อต้น ต้นเต็งมีคุณสมบัติเป็นกล้าไม้พืชอาศัยในการส่งเสริมการเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาของไม้วงศ์ยางภายใต้สภาวะเรือนปลูกพืชมากที่สุด โดยส่งเสริมให้กล้าไม้มีความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางระดับคอราก ความยาวราก จำนวนรากแขนง และปริมาณมวลชีวภาพส่วนเหนือดิน รวมถึงมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซามากที่สุดถึง 81.31 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันผลการเกิดรากเอคโตไมคอร์ไรซาโดยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยชุดไพรเมอร์ GAPK126F และ GAPK379R พบแถบ DNA ขนาด 250 คู่เบส ที่มีความจำเพาะต่อ DNA ของเส้นใยเห็ดเผาะ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ (control) ซึ่งไม่ปรากฏแถบ DNA ดังกล่าว การศึกษาข้างต้นเต็งเป็นพืชที่เหมาะสมที่สุดสามารถใช้เป็นข้อมูลให้เกษตรกรเลือกก่อนนำไปปลูกในป่าหรือในพื้นที่ของเกษตรกร ซึ่งจะช่วยให้การผลิตเห็ดป่าไมคอร์ไรซา (เห็ดเผาะ) ประสบความสำเร็จมากขึ้น และเกิดการพัฒนาเศรษฐกิจของชุมชนให้ยั่งยืนในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (สวก.) ในการสนับสนุนทุนวิจัยเรื่องการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเห็ดไมคอร์ไรซา (เห็ดตับเต่า เห็ดเผาะ เห็ดระโงก) และเห็ดตีนแรดเพื่อสร้างต้นแบบสวนป่าสวนเห็ดครัวเรือนเพื่อการพัฒนาเศรษฐกิจชุมชนอย่างยั่งยืน ประจำปีงบประมาณ 2563

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2537. *เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย*. พิมพ์ครั้งที่ 1. อุบลราชธานี: ศิริธรรม ออฟเซ็ท.

ทนุวงศ์ แสงเทียน และอุทัยวรรณ แสงวณิช. 2537. การเจริญเติบโตของยางนาที่ได้รับการปลูกเชื้อเอ็คโตไมคอร์ไรซา. *วารสารวนศาสตร์* 13: 22-28.

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

ธนภักษ์ อินยอด, ธนากร ลัทธิถีระสุวรรณ, ขนิษฐา ชวนะนรเศรษฐ์, ธนภัทร เติมอารมย์, ชาตรี กอนี, สุริมา ญาติโสม, สุจิตรา บัวลอย และปิยะดา เอี่ยมประสงค์. 2564. การศึกษาอายุของต้นหว้าที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อเห็ดตับเต่าภายใต้สภาวะโรงปลูกพืช. *วารสารเกษตรนเรศวร* 18(1): 1-13.

ราชบัณฑิตยสถาน. 2550. *เห็ดในประเทศไทย*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ราชบัณฑิตยสถาน.

วิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก และมนัส ทิตย์วรรณ. 2563. วัสดุผลิตหัวเชื้อเห็ดเผาะและผลต่อการเจริญเติบโตของพืชอาศัย. *วารสารแก่นเกษตร* 48(1): 1173-1180.

สมศักดิ์ สุขวงศ์. 2542. *วัฒนธรรมไทยกับไม้ในวงศ์ยาง*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักพิพิธภัณฑ์และวัฒนธรรมการเกษตร.

สำนักงานหอพรรณไม้. 2555. *คู่มือเลือกชนิดพรรณไม้เพื่อปลูกป่าป้องกันอุทกภัย*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

สุพัตรา เจริญภักดี บดีรัฐ. 2561. นิเวศวิทยาของเห็ดเผาะในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี* 20(3): 124-133.

อนิวรรตน์ เฉลิมพงษ์ และธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ. 2525. *การสำรวจเอคโตไมคอร์ไรซาในระบบนิเวศวิทยาป่าดิบแล้ง*. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. https://www.tistr.or.th/sakaerat/project/ASRCT%20pdf/3/006.pdf (15 สิงหาคม 2564).

Brundrett, MC. 2006. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. *Soil Biology Journal* 38(9): 281-298.

Charoenpakdee, S., Phosri, C., Dell, B., and Lumyong, S. 2010. The mycorrhizal status of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi of physic nut (*Jatropha curcas*) in Thailand. *Mycosphere* 1(2): 167-181.

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

Hanmoungiai, W. 2014. Factors affecting on the growth of mycelium Hed-Pho (*Astreaus hygrometricus* Morgan) on agar medium and cereal grain medium. *Naresuan University Journal Science and Technology* 22(3): 1-9.

Harley, J. L., and Smith, S. E. 1983. Mycorrhizal symbiosis. In *Scientific Research,* J. Dighton, ed. pp 483. London: Academic Press.

Kaewgrajang, T., Sangwanit, U., Iwase, K., Kodama, M., and Yamato, M. 2013. Effects of ectomycorrhizal fungus *Astraeus odoratus* on Dipterocarpus *alatus* seedlings. *Journal of Tropical Forest Science* 25(2): 200-205.

Li-Hui, L., and Qiang-Sheng, W. 2017. Mycorrhizas promote plant growth, root morphology and chlorophyll production in white clover. *Biotechnology* 16(1): 34-39.

Lyal, C. H. C., and Curran, L. M. 2000. Seed-feeding beetles of the weevil tribe Mecysolobini (Insecta: Coleoptera: Curculionidae) developing in seeds of trees in the Dipterocarpaceae. *Journal of Natural* 34:1743-1847.

Noori, M., Mobasser, H. R., Rigi, K., Heidari, M., and Keykha, A. 2014. Effects of mycorrhiza and nitrogen fertilizer on quantitative traits of wheat. *Journal of Novel Applied Sciences* 3(3): 295-297.

Nopamornbodi, O. 1995. Effect of mycorrhizae on plant growth and soil fertility. In *International Training Course on Soil Management* Technique *"Fertility Improvement"*, ADRC, ed. Khonkaen: JICAS ADRC.

Nuangmek, W., Saenmuangma, R., 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(1): 960- 964.

Phillips, J. M., and Hayman, D. S. 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.

Sreedhar, S. S., and Mohan, V. 2016. Effects of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as bio-fertilizers on growth enhancement of economically important native tree species, *Neolamarckia cadamba* seedlings. *KAVAKA* 47: 125-133.

Suwannasai, N., Dokmai, P., Yamada, A., Watling, R., and Phosri, C. 2020. First ectomycorrhizal syntheses between *Astraeus sirindhorniae* and Dipterocarpus *alatus* (Dipterocarpaceae), pure culture characteristics, and moiecular detection. *Biodiversitas* 21(1): 231-238.

Tharnrat, K., Baramee, S., and Uthaiwan, S. 2019. Growth response of *Dipterocarpus tuberculatus* and *Shorea roxburghii* Seedlings to *Astraeus odoratus*. *Environment and Natural Resources Journal* 17(3): 80-88.

วันรับบทความ (Received date) : 22 *ก.ย.* 64

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 26 *ม.ค.* 65

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 29 *มี.ค.* 65