



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาหัวเชื้อไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมเพื่อส่งเสริมการเจริญของ
ยูคาลิปตัสที่ปลูกเป็นการค้า

**Development of Mycorrhiza Inoculum for Use in Commercial
Eucalyptus Production**

โดย ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ลำยอง และคณะ

มิถุนายน 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาหัวเชื้อไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมเพื่อส่งเสริม

การเจริญของยูคาลิปตัสที่ปลูกเป็นการค้า

Development of Mycorrhiza Inoculum for Use in

Commercial Eucalyptus Production

คณะผู้วิจัย

1. ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ลำยอง
2. อาจารย์ พิภพ ลำยอง
2. ดร. รารุณี แสนหมี

สังกัด

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
บริษัท ทรีเทค จำกัด

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

บริษัท ทรี เทค จำกัด เป็นบริษัทสาขาของบริษัท ดับเบิลเอ จำกัด ซึ่งเป็นผู้ผลิตกระดาษจากยูคาลิปตัสรายใหญ่ของประเทศไทย บริษัทต้องการส่งเสริมการเกษตรแบบยั่งยืนและให้ผลประโยชน์มากที่สุดจากการปลูกยูคาลิปตัส ดังนั้นบริษัทจึงต้องการใช้เทคนิคหัวเชื้อไมคอร์ไรซาร่วมกับต้นกล้า ปัญหาที่เกิดขึ้นคือสายพันธุ์ไมคอร์ไรซาที่บริษัทใช้เป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังมีรูปแบบหัวเชื้อและวิธีการปลูกเชื้อที่ไม่แน่นอน นอกจากนี้ยังต้องการการยืนยันผลการปลูกเชื้อด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* spp. และ *Scleroderma* spp. และอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีประสิทธิภาพ นำมาเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการและเรือนเพาะชำเพื่อการประยุกต์ใช้กับโรงเรือนบริษัท ทรี เทค และเพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อต่อการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้ายูคาลิปตัสในเรือนเพาะชำ

ในปี 2553 ได้เก็บตัวอย่างและแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดกรวด *Pisolithus albus*, *P. orientalis* และเห็ดลูกฝู่น *Scleroderma sinnamariense* จากจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยเลือกเชื้อบริสุทธิ์ของ *P. albus* CMU005, *P. orientalis* CMU010 และ *S. sinnamariense* CMUSC001 มาใช้ในการศึกษา การสำรวจจำนวนและชนิดของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินรอบรากต้นยูคาลิปตัสในพื้นที่จังหวัดลำปาง และจังหวัดปราจีนบุรี พบอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดเด่น ได้แก่ *Acaulospora* sp., *A. spinosa*, *A. mellae*, *A. scrobiculata* และ *Gigaspora pellucida*

ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยของเชื้อที่เลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 ชนิด พบว่า modified Melin-Norkans medium ที่ pH 6.0 และ fungal-host agar ที่ pH 5.0 เป็นอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของเส้นใย *P. albus* CMU005 และ *S. sinnamariense* CMUSC001 ตามลำดับ ส่วน *P. orientalis* CMU010 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีมากที่สุดบนอาหาร modified Melin-Norkans medium ที่ pH 6.0 แต่ มีน้ำหนักแห้งสูงที่สุดบนอาหาร modified Murashige and Skoog medium อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30 องศาเซลเซียส การทดลองประยุกต์ใช้สปอร์สดที่เก็บจากดอกเห็ดกรวด *Pisolithus* sp. ที่เจริญร่วมกับยูคาลิปตัสตามธรรมชาติ มาปลูกให้กับยูคาลิปตัสในระยะต้นกล้าเป็นวิธีการที่ง่ายต่อการจัดการมากที่สุด ส่วนการเพิ่มจำนวนสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินรอบรากยูคาลิปตัสในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ด้วยวิธี Trap culture สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ *Acaulospora* AG และ *Glomus* AK ได้มากและถูกคัดเลือกเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อปลูกทดสอบให้กับต้นกล้ายูคาลิปตัสร่วมกับ *G. etunicatum*, *G. mosseae* และ *Entrophospora colombiana* ที่มีในห้องปฏิบัติการ

ราเอคโตไมคอร์ไรซาที่เจริญบนเวอร์มิคูไลท์ผสมพีทถูกใช้เป็นหัวเชื้อ การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับต้นยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camadulensis*) ของเชื้อรา *P. albus* CMU005 และ *P. orientalis* CMU010 ภายในห้องปฏิบัติการ พบการสร้าง mantle sheath และ Hartig net ในระยะเวลา 3 เดือน เมื่อปลูกหัวเชื้อสด *P. albus* ที่พบบริเวณสวนป่ายูคาลิปตัส บริษัท ตรีเพค ให้กับกล้าจากการปักชำของยูคาลิปตัสสายพันธุ์ PT48 ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้นและราก ความสูงของลำต้น รวมถึงปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมต่อต้นมีค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกด้วยอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและชุดควบคุม การปลูกเชื้อดังกล่าวให้ผลเช่นเดียวกันกับการเจริญของกล้าจากการปักชำของยูคาลิปตัสสายพันธุ์ K7 นอกจากนี้ยังพบการสร้าง mantle sheath และ Hartig net ในระยะเวลา 4 เดือนในสภาพโรงเรือนบริษัท ตรีเพค จำกัด และในระยะเวลา 7 เดือนของการทดสอบในสภาพโรงเรือนมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยต้นกล้ายูคาลิปตัสที่ปลูกเชื้อเห็ดกรวดทั้งสองชนิดมีความสูงมากกว่าต้นกล้าที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ส่วนการปลูกด้วยเชื้อ *S. sinnamariense* CMUSC001 ไม่พบการสร้าง mantle sheath และ Hartig net กับต้นยูคาลิปตัสทั้งการทดสอบในห้องปฏิบัติการและโรงเรือน ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ K7 และ PT48 มีการเจริญในด้านความสูงดีที่สุดหลังจากการปลูกเชื้อร่วมของเอคโตไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา รองลงมาคือ การปลูกด้วยเชื้อเพียงอย่างเดียวของสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา, *P. albus*, *S. sinnamariense* และชุดควบคุม ตามลำดับ ส่วนการทดลองปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ดพบว่ากระถางที่ปลูกด้วย *G. etunicatum* มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการส่งเสริมความสูง น้ำหนักแห้งของลำต้นและราก การปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับยูคาลิปตัสปักชำสายพันธุ์ PT48 พบว่า *G. etunicatum* ให้ผลดีที่สุดในการส่งเสริมด้านความสูงและน้ำหนักสดของลำต้นในทุกชุดการทดลอง ส่วนการปลูกเชื้อให้กับกล้ายูคาลิปตัสปักชำสายพันธุ์ K7 ต้นที่ปลูกด้วยเชื้อ *E. colombiana* มีความสูงของลำต้นและเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากมากที่สุด การใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในทุกความเข้มข้นของปุ๋ยไม่ทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา แต่มีผลให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้นและรากมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของปุ๋ย

Abstract

Tree-Tech Company is a subsidiary company of Double A which is a major paper producer from eucalyptus in Thailand. The Company would like to promote sustainable agriculture and obtain maximum benefit for eucalyptus plantation. The Company therefore wants to use technique of mycorrhiza inoculum with the seedlings. The problem is that the mycorrhiza strain used by the Company is the non-effective strains with no pattern of inoculum and proper cultivation. Moreover, efficient method is required for the confirmation of cultivation. Therefore, this research was aimed to selected effective ectomycorrhizal strains from *Pisolithus* spp. and *Scleroderma* spp. and endomycorrhiza, multiplied in the laboratory and nursery for Tree Tech's nursery application and tested for their ability to promote the growth of eucalyptus seedlings in the nursery.

Basidiomes of *Pisolithus albus*, *P. orientalis* and *Scleroderma sinnamariense* were collected from Chiang Mai and Chiang Rai provinces, northern Thailand. Pure cultures were isolated from each basidiome, *P. albus* CMU005, *P. orientalis* CMU010 and *S. sinnamariense* CMUSC001 were selected to investigate their suitable growth conditions. Arbuscular mycorrhiza diversity study in rhizosphere soils of eucalyptus in Lumpang and Prachinburi provinces revealed dominant arbuscular mycorrhiza including: *Acaulospora* sp., *A. spinosa*, *A. mellae*, *A. scrobiculata* and *Gigaspora pellucida*.

Among ten culture media, modified Melin-Norkans medium at pH 6.0 and fungal-host agar at pH 5.0 are the best media for the mycelial growth of *P. albus* CMU005 and *S. sinnamariense* CMUSC001, respectively. *P. orientalis* CMU010 showed the highest colony diameter on modified Melin-Norkans medium at pH 6.0, while the highest biomass yield was found on modified Murashige and Skoog medium. All fungi were able to grow with an optimal growth temperature of 30°C. Application of fresh *Pisolithus* sp. spores naturally associate with eucalyptus is the easiest method for inoculating in eucalyptus seedlings. Propagation of arbuscular mycorrhizal spores from rhizosphere soils of eucalyptus in Chiang Mai plantations increased spore number of *Acaulospora* AG and *Acaulospora* AK. These spores were used for inoculation in

eucalyptus seedlings in complement to *G. etunicatum*, *G. mosseae* and *E. colombiana* from laboratory.

The fungus grown on vermiculite/peat medium was used as inocula. The results of *in vitro* experiments showed that *P. albus* CMU005 and *P. orientalis* CMU010 formed mantle sheet and Hartig net structure in *E. camadulansis* roots *in vitro* experiments after three months. Inoculation with fresh inoculum of *P. albus* at Tree Tech's eucalyptus plantations increased wet weight and dry weight of shoot and root, height, as well as nitrogen, phosphate and potassium contents of the plants compared to arbuscular mycorrhiza inoculation and control. Similar results were found with K7 eucalyptus strain. Mantle sheath and Hartig net forming were observed after four months in Tree-Tech Company nursery. At Faculty of Science, Chiang Mai University nursery experiment, the mycorrhizal formation of both *P. albus* CMU005 and *P. orientalis* CMU010 were observed at seven months after inoculation. The shoots of eucalyptus plants inoculated with both fungi were longer than non-inoculated plants. *Scleroderma sinnamariense* CMUSC001 showed no ectomycorrhizal formation on *E. camadulansis* both *in vitro* and in nursery experiments. K7 and PT48 eucalyptus strains gave the highest plant height after inoculation with ectomycorrhiza and arbuscular mycorrhiza followed by *P. albus*, *S. sinnamariense* and control, respectively. Arbuscular mycorrhiza inoculation of eucalyptus seedlings showed that *G. etunicatum* was the most effective to enhance plant height and dry weight of shoot and root. *G. etunicatum* inoculated in PT48 eucalyptus was promoted height and shoot wet weight in all treatment. K7 eucalyptus gave the highest plant height and percentage of root colonization when inoculated with *E. colombiana*. Different concentration of phosphorus fertilizer did not affect colonization of arbuscular mycorrhiza. Wet weight and dry weight of shoot and root trended to increase with increasing fertilizer concentration.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	ณ
เนื้อหางานวิจัย	1
- บทนำ	1
- ทบทวนเอกสาร	3
- วิธีการวิจัย	19
- ผลการวิจัย	30
- อภิปรายผลการวิจัย	78
- สรุปผลการวิจัย	84
- เอกสารอ้างอิง	85
- อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	95
ผลผลิตที่ได้จากโครงการ	102
ภาคผนวก	102
- ประวัติผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์	102

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 ลักษณะรากพืชที่มีเอคโตไมคอร์ไรซา	6
ภาพ 2 ลักษณะของดอกเห็ดกรวด <i>Pisolithus</i> spp.	9
ภาพ 3 ลักษณะของดอกเห็ดฝุ่น <i>Scleroderma</i> spp.	10
ภาพ 4 ลักษณะอาร์บัสคูลภายในรากพืชอาศัย	13
ภาพ 5 ลักษณะของเวสิเคิลและสปอร์ภายในรากพืชอาศัย	13
ภาพ 6 การนับโครงสร้างของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์	22
ภาพ 7 ขั้นตอนการปลูกเชื้อเห็ดกรวด และเห็ดลูกฝุ่นให้กับพืช	26
ภาพ 8 ขั้นตอนการปลูกเชื้อบริสุทธิ์ ให้กับต้นกล้ายูคาลิปตัส	27
ภาพ 9 ขั้นตอนการปลูกเชื้อสด ให้กับต้นกล้ายูคาลิปตัส	27
ภาพ 10 การบรรยายให้ความรู้แก่เจ้าหน้าที่และนักวิชาการบริษัท ทรี เทค จำกัด	30
ภาพ 11 สัณฐานวิทยาของดอกเห็ด <i>P. orientalis</i>	31
ภาพ 12 สัณฐานวิทยา ของดอกเห็ด <i>P. albus</i>	32
ภาพ 13 สัณฐานวิทยา ของดอกเห็ด <i>S. sinnamariense</i>	33
ภาพ 14 ลักษณะสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบในดินตัวอย่าง	36
ภาพ 15 ลักษณะของเส้นใยและสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	37
ภาพ 16 ต้นยูคาลิปตัสอายุ 3 เดือน หลังการเพิ่มจำนวนสปอร์โดยวิธี Trap culture	38
ภาพ 17 ลักษณะสปอร์ <i>Glomus</i> AK จากดินหัวเชื้อหมักบ้านอ่างแก้ว	40
ภาพ 18 ลักษณะสปอร์ <i>Acaulospora</i> GL จากดินหัวเชื้อ Green lake resort	40
ภาพ 19 ลักษณะสปอร์ <i>Glomus</i> K จากดินหัวเชื้อแหล่งท่องเที่ยวเชิงเกษตรฝั่ง	40
ภาพ 20 ลักษณะสปอร์ <i>Acaulospora</i> AG01 จากดินหัวเชื้อคณะอุตสาหกรรมเกษตร	41
ภาพ 21 ลักษณะสปอร์ของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินจากบริเวณต่างๆ	41
ภาพ 22 การเจริญของ <i>P. albus</i> CMU 005 บนอาหารวุ้นแต่ละชนิด	43
ภาพ 23 การเจริญของ <i>P. orientalis</i> CMU010 บนอาหารวุ้นแต่ละชนิด	45
ภาพ 24 การเจริญของ <i>S. sinnamariense</i> CMUSC001 บนอาหารวุ้นแต่ละชนิด	46
ภาพ 25 เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยเห็ดกรวดและเห็ดลูกฝุ่นบนอาหารวุ้นแต่ละชนิด	47
ภาพ 26 อัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดกรวดและเห็ดลูกฝุ่นบนอาหารวุ้นแต่ละชนิด	49
ภาพ 27 การเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด <i>P. orientalis</i> CMU010 ที่อุณหภูมิต่างๆ	49
ภาพ 28 การเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด <i>P. albus</i> CMU005 ที่อุณหภูมิต่างๆ	49
ภาพ 29 การเจริญของเส้นใยเห็ดลูกฝุ่น <i>S. sinnamariense</i> CMUSC001 ที่อุณหภูมิต่างๆ	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพ 30 เส้นผ่าศูนย์กลางกลางของเส้นใยเห็ดกรวดและเห็ดลูกฟุ้ง บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ	51
ภาพ 31 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดกรวดและเห็ดลูกฟุ้ง บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ	52
ภาพ 32 การเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด <i>P. orientalis</i> CMU010 ที่ค่า pH ต่างๆ	54
ภาพ 33 การเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด <i>P. albus</i> CMU005 ที่ค่า pH ต่างๆ	55
ภาพ 34 การเจริญของเส้นใยเห็ดลูกฟุ้ง <i>S. sinnamariense</i> CMUSC001 ที่ค่า pH ต่างๆ	56
ภาพ 35 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเห็ดกรวดและเห็ดลูกฟุ้ง บ่มที่ pH ต่างๆ	57
ภาพ 36 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดกรวดและเห็ดลูกฟุ้ง บ่มที่ pH ต่างๆ	58
ภาพ 37 หัวเชื้อเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดกรวด และเห็ด ในเวอร์มิคูไลท์: พีท	59
ภาพ 38 ลักษณะสปอร์ที่คัดเลือกมาทดสอบใน PVLG	60
ภาพ 39 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในห้องปฏิบัติการ	62
ภาพ 40 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในสภาวะโรงเรือน	65
ภาพ 41 ลักษณะภายในถุงลี้ยงของรากยูคาลิปตัส	67
ภาพ 42 ลักษณะรากต้นกล้ายูคาลิปตัส หลังจากการปลูกเชื้อด้วยสปอร์สด	68
ภาพ 43 ยูคาลิปตัสหลังการปลูกเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	68
ภาพ 44 ยูคาลิปตัสปักชำสายพันธุ์ K7 อายุ 4 เดือนหลังการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซา	73
ภาพ 45 ยูคาลิปตัสปักชำ สายพันธุ์ PT48 อายุ 4 เดือนหลังการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซา	73
ภาพ 46 ลักษณะต้นยูคาลิปตัสปักชำหลังการทดสอบผลของการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส	74
ภาพ 46 การเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากยูคาลิปตัส	75
ภาพ 48 ยูคาลิปตัสปักชำ สายพันธุ์ K7 หลังการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	76
ภาพ 49 ยูคาลิปตัสปักชำ สายพันธุ์ PT48 หลังการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	76
ภาพ 50 ลักษณะสวนป่าของทางบริษัทที่ออกเก็บตัวอย่าง	77

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 สถานที่เก็บและการบ่งบอกชนิดของเห็ดกรวดและเห็ดลูกฟุ้ง	34
ตาราง 2 จำนวนและชนิดเด่นของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในแต่ละพื้นที่	35
ตาราง 3 เปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	36
ตาราง 4 ผลการเพิ่มจำนวนสปอร์ โดยวิธี Trap culture	39
ตาราง 5 ผลของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อยูคาลิปตัสที่ได้จากการเพาะเมล็ด	61
ตาราง 6 ผลของเชื้อบริสุทธิ์เอคโตไมคอร์ไรซาต่อความสูงของต้นกล้ายูคาลิปตัส	64
ตาราง 7 ผลการปลูกเชื้อสเตรกโตไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ให้กับยูคาลิปตัสปักชำ	66
ตาราง 8 ผลของยูคาลิปตัสปักชำสายพันธุ์ PT48 ต่อการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซา ด้านการเจริญและปริมาณธาตุอาหารของลำต้น	70
ตาราง 9 ผลของยูคาลิปตัสปักชำสายพันธุ์ K7 ต่อการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซา ด้านการเจริญและปริมาณธาตุอาหารของลำต้น	71
ตาราง 10 ผลการตอบสนองด้านความสูงของลำต้นต่อการปลูกเชื้อร่วม (Co-inoculation)	72
ตาราง 11 ผลของการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสต่อการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	74
ตาราง 12 ผลของยูคาลิปตัสปักชำต่อการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	75
ตาราง 13 ผลการวิเคราะห์ธาตุอาหารในดินที่เก็บจากแปลงปลูกยูคาลิปตัส	78

1. บทนำ

ไมคอร์ไรซาคือเชื้อราที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) (Brundrett *et al.*, 1996) ไมคอร์ไรซาที่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายมีอยู่สองชนิด ได้แก่ เอคโตไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (เอนโดไมคอร์ไรซา) การอาศัยอยู่ร่วมกันนี้เป็นการอาศัยแบบเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน (mutualistic relationship) มีการแลกเปลี่ยนสารอาหารระหว่างเชื้อราและรากพืช (Dell, 2002; สมจิตร, 2549) โดยการทำงานนั้นเชื้อราไมคอร์ไรซาจะช่วยดูดธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต (Launonen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006a) และยังช่วยให้ต้นไม้ได้รับน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตได้มากกว่าปกติ (Cruz *et al.*, 2004; Rohyadi *et al.*, 2004) ส่วนรากก็จะได้รับสารอาหารที่ต้นไม้ขับออกมาทางระบบราก และนอกจากนี้ เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซายังช่วยปรับปรุงพืชให้มีความต้านทานต่อศัตรูพืชโรคพืชหรือทนต่อสภาพความแห้งแล้งได้มากขึ้นด้วย (Dell, 2002; Launonen *et al.*, 2005) ในประเทศไทย ยุคาลิปตัสมีการเจริญร่วมกับไมคอร์ไรซาตามธรรมชาติทั้งเอคโตไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ในประเทศไทยมีรายงานว่าพบเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในกลุ่ม sclerodermatoid หลายชนิดเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในพื้นที่ปลูกยูคาลิปตัส เช่น เห็ดกรวด (*Pisolithus* spp.) เห็ดลูกฝู่น (*Scleroderma* spp.) เป็นต้น ซึ่งอยู่ร่วมกับรากไม้สนสองใบ สนสามใบ สนคาร์เบีย ยูคาลิปตัส ไม้วงศ์ยาง ไม้เต็งและรัง และไม้ก้อชนิดต่างๆ ทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศ (อนิวรรต, 2525; Kanchanaprayudh *et al.*, 2003) ไม้ยูคาลิปตัสที่มีเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยร่วมอยู่ด้วยจะมีอัตราการรอดตายเพิ่มขึ้น มีการเจริญเติบโตและดูดซับธาตุอาหารได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่มีเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา (Dell, 2002) เชื้อรากกลุ่มเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถส่งเสริมการเจริญของไม้หลายชนิดทั้งในเรือนทดลองและในแปลงปลูก (Theodorou and Bowen, 1970) การใส่เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซานั้นพบในพื้นที่ปลูกหลายลักษณะตั้งแต่ดินในสภาพที่มีปัญหาต่าง ๆ เช่น เหมืองร้างและพื้นที่ที่มีสภาวะการชะล้างพังทลายอย่างรุนแรงในสภาพที่มีการปลูกสร้างสวนป่า พบว่าการเจริญสูงสุดในต้นไม้ที่ใส่เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา (Turjaman *et al.*, 2005) ปัจจุบันพบว่าเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดสามารถทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ เช่น *Amanita*, *Boletus*, *Laccaria*, *Phlebopus*, *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Suillus* และ *Tricholoma* (Sanmee, 2004; Daza *et al.*, 2006; Lumyong *et al.*, 2007; Langer *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008; Kumla *et al.*, 2011) การผลิตหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อให้มีปริมาณมากขึ้น เพื่อนำเชื้อไปปลูกให้กับพืชอาศัยต่อไปเพื่อใช้ในการเพิ่มผลผลิตของป่า

ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (AM) fungi คือเชื้อราที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชบริเวณชั้นคอร์เท็กซ์ สามารถอาศัยร่วมกับพืชได้แทบทุกชนิดในลักษณะที่ไม่ก่อให้เกิดโรค และไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้นับอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปราศจากพืชอาศัย (Harley and Smith, 1983) โดยราได้รับ

แหล่งคาร์บอนจากการสังเคราะห์แสงของพืชผ่านโครงสร้างที่เรียกว่า อาร์บัสคูล ส่วนรามีบทบาทในการช่วยดูดซึมธาตุอาหารต่าง ๆ โดยเฉพาะฟอสฟอรัสภายในดินให้กับพืช เนื่องจากเส้นใยของรามีทั้งส่วนที่เจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ และส่วนที่เจริญออกนอกกรากแพร่ขยายในดินใต้ไกลกว่าราก ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึม เส้นใยราที่มีขนาดเล็กกว่ารากช่วยให้สามารถแทรกเข้าไปในส่วนต่างๆ ของดินได้มากกว่ารากพืชเพียงอย่างเดียว (สมจิตร์, 2549) เส้นใยของรายังช่วยทำหน้าที่ย่อยสลายธาตุอาหารในดินที่ละลายได้ยาก เช่น ฟอสฟอรัส (P) และสังกะสี (Zn) ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น (Habte *et al.*, 2001) ช่วยให้พืชเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องแม้ในสภาพที่มีความแห้งแล้ง (Oehl *et al.*, 2003) ช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดินให้ดีขึ้น สามารถเก็บกักน้ำได้ดี เหมาะแก่การเจริญของพืช (Rillig and Mummey, 2006) ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสามารถเจริญร่วมกับกล้าพืชและช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้เป็นอย่างดี สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ด้วยการเพาะเลี้ยงในกระถางร่วมกับรากพืชอาศัย เพื่อให้มีหัวเชื้อเพียงพอต่อการนำไปใช้และเป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้จึงสามารถนำไปถ่ายทอดและก่อให้เกิดการนำไปประยุกต์ใช้กับการผลิตกล้าไม้ได้ เนื่องจากประโยชน์ของราไมคอร์ไรซาดังกล่าว มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการเพาะราไมคอร์ไรซาให้กับกล้าไม้ก่อนย้ายปลูก ในพื้นที่ป่าที่ถูกบุกรุกทำลาย หรือป่าเสื่อมโทรม และจำเป็นต้องมีการศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเจริญ และการรอดชีวิตของต้นกล้า รวมถึงการตรวจสอบการเข้ากันได้ของต้นพืชกับเชื้อไมคอร์ไรซาโดยการนำรากพืชมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดูโครงสร้างของเชื้อราที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์พืชในชั้นคอร์เท็กซ์และการรอดชีวิตของต้นกล้าด้วย (Guerin-Laguette *et al.*, 2000; Dell, 2002) การจะนำเชื้อดังกล่าวไปปลูกให้กับยูคาลิปตัสจำเป็นต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเห็ดกรวดและเห็ดลูกฟูก รวมถึงอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อนำไปผลิตหัวเชื้อในห้องปฏิบัติการก่อนที่จะสามารถนำไปใช้ในการปลูกเชื้อให้กับพืชอาศัยอื่น ๆ ต่อไป

บริษัท ตรีเทค จำกัด เป็นบริษัทที่ผลิตต้นกล้ายูคาลิปตัสที่มีการพัฒนาสายพันธุ์จนเป็นสายพันธุ์ลูกผสมได้แก่ *Eucalyptus camaldulensis*, *E. grandis* *E. urophylla* ซึ่งเหมาะสมแก่การปลูกสำหรับพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทยเพื่อลดการนำเข้าสายพันธุ์จากออสเตรเลียในทางการค้า ผลผลิตที่เกษตรกรได้รับจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตมีค่าเฉลี่ยที่ 18 ตันต่อไร่ และในพื้นที่แห้งแล้ง ค่าเฉลี่ยจะได้ไม้ที่ประมาณ 15 ตันต่อไร่ ราคาไม้อยู่ที่ 650-1,200 บาทต่อตัน ปีละประมาณหนึ่งร้อยกว่าล้านต้น จากกระบวนการผลิตต้นกล้าโดยวิธีปักชำหน่อ และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขายให้แก่เกษตรกรนำไปปลูกเป็นเวลา 3-4 ปี เพื่อส่งขายและนำไปผลิตเป็นเยื่อกระดาษในบริษัท Double A ซึ่งเป็นผู้ผลิตกระดาษรายใหญ่ในประเทศไทยขณะนี้ ในต่างประเทศที่มีการปลูกยูคาลิปตัสเพื่อการค้า เช่น ออสเตรเลีย จีน อินโดนีเซีย ที่เป็นผู้ผลิตรายใหญ่ในแถบเอเชีย มีการพัฒนาและใช้หัวเชื้อไมคอร์ไรซาทั้ง เอคโตไมคอร์ไรซา (ECM) และเอนโดไมคอร์ไรซา (AM) ที่จำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ของ ยูคาลิปตัสในการส่งเสริมการเจริญของต้น

ยูคาลิปตัสเพื่อให้สามารถปลูกได้ทั้งในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ตั้งแต่ขั้นตอนการย้ายปลูก ต้นทนแล้ง ทนโรค สามารถเจริญได้ดี ในพื้นที่ต่างๆ ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยมากมายเกี่ยวกับความหลากหลายของเอคโตไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในสวนป่ายูคาลิปตัส รวมถึงผลการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซาทั้งสองชนิดต่อการเจริญของยูคาลิปตัสสายพันธุ์ต่างๆ (Chen *et al.*, 2000; Pagano and Scotti, 2008; Santos *et al.*, 2001) เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นยูคาลิปตัส ดังนั้นการนำไมคอร์ไรซาทั้งสองชนิดมาประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญของยูคาลิปตัสที่ปลูกเพื่อการค้า จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิตจากการใช้ปุ๋ยเคมีและสารกำจัดศัตรูพืช ให้ผลดีต่อการผลิตกล้าไม้ในระยะยาวและเป็นวิธีการทางชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

1.1 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1.1.1. หาชนิด ECM และ AM ที่เหมาะสมในการช่วยการเจริญของกล้ายูคาลิปตัสสายพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้า ในประเทศไทย ซึ่งเป็นกล้าที่ผลิตจากการปักชำและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- 1.1.2. ผลิตหัวเชื้อจากสายพันธุ์ไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกแล้ว
- 1.1.3. หาวิธีที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อให้กับกล้ายูคาลิปตัสที่ผลิตเป็นการค้า

2. ทบทวนเอกสาร

Mycorrhiza มาจากภาษากรีกว่า Mykes ซึ่งหมายถึง fungus ซึ่งได้แก่ พวกเห็ด รวมกับคำว่า rhiza ซึ่งหมายถึง root หรือรากพืช ดังนั้นคำว่า Mycorrhiza จึงหมายถึงความสัมพันธ์ของรากพืชชั้นสูง กับเชื้อราแบบพึ่งพาอาศัย ซึ่งพบได้ทั่วไป ในพืชชั้นสูงถึง 85% (Hawksworth *et al.*, 1995) ซึ่งเส้นใยของเชื้อราจะเจริญอยู่ในชั้นคอร์เทกซ์ ของรากพืชและมีเส้นใยที่ยื่นออกมาจากรากช่วยในการดูดน้ำ และแร่ธาตุให้กับพืช ส่วนพืชก็จะให้สารอาหารกับเชื้อราจากการสังเคราะห์แสงของพืช (Brundrett *et al.*, 1996)

2.1 ชนิดของไมคอร์ไรซา (สมจิตร, 2549; Brundrett *et al.*, 1996)

ไมคอร์ไรซามี 7 ประเภท แบ่งตามความแตกต่างของกลุ่มเชื้อรา พืชอาศัย (host plant) และ ความแตกต่างทางโครงสร้างของไมคอร์ไรซา ได้แก่

2.1.1 เอคโตไมคอร์ไรซา (Ectomycorrhiza) เป็นการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อราและรากพืช โดยเส้นใยของเชื้อราจะเจริญรอบ ๆ รากและสานตัวเป็นแผ่นหรือเป็นปลอกหุ้มเรียกว่า แมนเทิลชีท (mantle sheath) ซึ่งจะมีสีและความหนาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา เส้นใยบางส่วนจากแมนเทิลจะเจริญเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิสและชั้นคอร์

เทกซ์ของรากพืช แล้วเจริญสานกันเป็นตาข่ายอยู่รอบ ๆ เซลล์ เรียกว่าฮาร์ติกเน็ต (Hartig net) เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซามีมากกว่า 5,000 ชนิดและอยู่ร่วมกับรากของพืชใบเลี้ยงคู่ที่เป็นไม้พุ่มและไม้ต้นประมาณ 8,000 ชนิด เช่น พืชในวงศ์สน (*Pinaceae*) และวงศ์ยาง (*Dipterocarpaceae*) เป็นต้น แต่ไม่พบเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาอยู่ร่วมกับรากของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

2.1.2 เอนโดไมคอร์ไรซา (Endomycorrhiza) หรือ อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Arbuscular mycorrhiza) เป็นการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อราและรากพืช โดย เส้นใยของฟังไจเจริญเข้าไปในเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ของราก และสร้างอาบัสคูล (arbuscule) ซึ่งมีลักษณะคล้ายต้นไม้ซึ่งเชื้อราใช้สะสมธาตุอาหาร และส่งธาตุอาหารไปให้กับพืช บางครั้งเชื้อราจะสร้างเวสิเคิล (vesicle) ที่บริเวณปลายหรือกลางเส้นใย ซึ่งจะมีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ผ่องใส ภายในเวสิเคิลมีหยดไขมันสีเหลือง ใช้สำหรับเก็บสะสมสารอาหารของเชื้อรา นอกจากนี้ยังพบสปอร์ที่สร้างจากเส้นใยภายนอกรากใช้สำหรับแพร่พันธุ์

2.1.3 อีริคอยด์ไมคอร์ไรซา (Ericoid mycorrhiza) เป็นไมคอร์ไรซาที่พบในพืชที่อยู่ในวงศ์ *Ericales* พืชอาศัยเป็นไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้นขนาดเล็กในวงศ์ *Ericaceae*, *Epacridaceae* และ *Empetraceae* โดยเชื้อราเจริญเข้าสู่เซลล์พืชแล้วม้วนขดเป็นวง (hyphal coil) อยู่ในเซลล์รากพืช ไม่มีการสร้าง fungal sheath และ Hartig net เชื้อราอีริคอยด์ไมคอร์ไรซามีความสามารถในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน และสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้

2.1.4 เอกเทนโดไมคอร์ไรซา (Ectendomycorrhiza) เป็นไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะคล้ายกับ เอคโตไมคอร์ไรซา แต่มีเส้นใยที่อยู่ภายในเซลล์รากได้ด้วย โดยพบเส้นใยของราเจริญอยู่รอบรากพืช และมีเส้นใยบางส่วนเจริญเข้าสู่เซลล์รากพืชในลักษณะขดเป็นวง (hyphal coils) อยู่ภายในเซลล์ราก เชื้อราในกลุ่มนี้จัดอยู่ในไฟลัม *Basidiomycota* และ *Ascomycota* พืชอาศัยของรากกลุ่มนี้ ได้แก่ บางชนิดพืชดอก (angiospermae) และ พืชเมล็ดเปลือย (gymnospermae)

2.1.5 ออรัคิโดไมคอร์ไรซา (orchid mycorrhiza) ออรัคิโดไมคอร์ไรซาพบอยู่ในพืชวงศ์ *Orchidaceae* หรือกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ มีเชื้อราบางชนิดที่อยู่ในไฟลัม *Basidiomycota* ออรัคิโดไมคอร์ไรซาหลายชนิดอยู่ในจีนัส *Rhizoctonia* อาศัยอยู่ร่วมกับรากของกล้วยไม้โดยมีลักษณะของเส้นใยขดเป็นวง (coils of hyphae หรือ peloton) อยู่ภายในเซลล์ราก ไมคอร์ไรซาชนิดนี้มีความสำคัญในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ และช่วยดูดธาตุอาหารให้แก่ต้นกล้าของกล้วยไม้

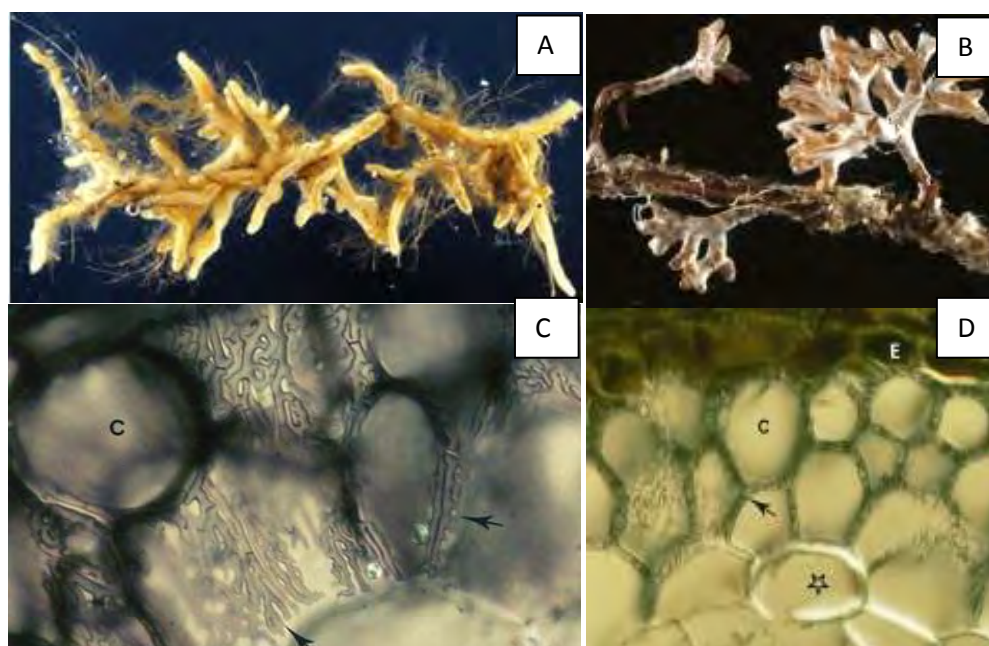
2.1.6 โมโนโทรปอยด์ไมคอร์ไรซา (Monotropoidmycorrhiza) เป็นไมคอร์ไรซาที่พบในรากพืชในอเดอร์ *Ericales* วงศ์ *Monotropaceae* ได้แก่ พืชในจีนัส *Monotropa* ซึ่งเป็นพืชที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ เส้นใยของเชื้อรามีการสร้าง fungal sheath ล้อมรอบราก และสร้าง Hartig net ในชั้นคอร์เทกซ์ของรากพืช เส้นใยบางส่วนเจริญในเซลล์ราก เป็นเชื้อราที่อยู่ในไฟลัม *Basidiomycota*

2.1.7 อาร์บุดไมคอร์ไรซา (Arbutoidmycorrhiza) อาร์บุดไมคอร์ไรซา

พบในรากพืชที่อยู่ในอเดอร์ *Ericales* วงศ์ *Ericaceae* จินัส *Arbutus* และ *Arctostaphylos* และพืชวงศ์ *Pyrolaceae* จินัส *Pyrola* โดยเชื้อราจะสร้างเส้นใยสานกันรอบราก และเส้นใยบางส่วนเจริญเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ในชั้นคอร์เทกซ์ สร้าง Hartig net และเส้นใยบางส่วนเจริญขดม้วนเป็นวงอยู่ภายในเซลล์ราก มักพบในไม้ยืนต้น และไม้พุ่มที่โตเต็มที่แล้ว เชื้อราที่ส่วนใหญ่พบอยู่ในไฟลัม *Basidiomycota*

2.2 เอกโตไมคอร์ไรซา (Ectomycorrhiza)

เอกโตไมคอร์ไรซาเป็นเชื้อไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่บริเวณเซลล์ผิวหนังด้านนอกของรากพืช เชื้อราในกลุ่มนี้จะสร้างเส้นใยเป็นแผ่นหนาประมาณ 20-40 ไมโครเมตร (Issacc, 1992; Brundrett *et al.*, 1996) ทำให้มีรูปร่างขนาดใหญ่ขึ้นและมีรูปร่างแตกต่างจากรากปกติที่ไม่มีไมคอร์ไรซา ทำหน้าที่ช่วยหาน้ำและธาตุอาหารให้แก่รากบริเวณผิวหนังดินลึกประมาณ 10-20 เซนติเมตร เส้นใยรากคลุมบริเวณผิวรากเรียกแผ่นแมนเทิล (mantle sheath) เส้นใยบางส่วนของแมนเทิลจะเข้าไปเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ผิว (epidermis) และในชั้นคอร์เทกซ์ของเซลล์รากประสานกันเป็นร่างแหเรียก ไฮฮาร์ติกเน็ต (Hartig net) แผ่นแมนเทิลจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวการดูดซึมน้ำให้แก่รากพืชและมีผลทำให้รากพืชเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานได้ เช่น รากเกิดการแตกแขนงแบบแยกสองแฉก (dichotomous branching) เส้นใยของเชื้อราจะประสานจับตัวกันแน่นภายนอกผิวรากคล้ายรากฝอย มีสีต่าง ๆ กัน เช่น สีขาว สีทอง สีเหลือง สีนํ้าตาล สีแดง สีดำ ขึ้นกับชนิดและอายุขัยของเชื้อราไมคอร์ไรซา (ภาพ 1)



ภาพ 1 ลักษณะรากพืชที่มีเอคโตไมคอร์ไรซา (Brundrett and Trappe, 1990; Brundrett et al., 1996)

A: เส้นใย *Astraeus pteridis* ที่แทรกอยู่ในราก *Eucalyptus maculate*

B: เส้นใย *Amanita muscaria* ที่แทรกอยู่ในราก *Pinus radiata*

C: แสดงภาพตัดตามขวางของราก *Pinus* sp. ที่มีการติดเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซาในชั้นคอร์เทกซ์ เรียกว่า Hartig net

D: แสดงภาพตัดตามขวางของราก *Populus* sp. ที่มีการติดเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซาในชั้นคอร์เทกซ์ เรียกว่า Hartig net

เห็ดราเอคโตไมคอร์ไรซามีมากกว่า 5,000 ชนิด พืชหรือต้นไม้ที่สัมพันธ์กับรากกลุ่มนี้มีไม่น้อยกว่า 2,000 ชนิด หรือประมาณ 10-20% ของพืชชั้นสูง ที่สำคัญได้แก่ ไม่นางศ์สนเขา (*Pinaceae*) วงศ์ไม้ยาง (*Dipterocarpaceae*) วงศ์ไม้มะค่าโมง (*Myrtaceae*) วงศ์ไม้กะบาก (*Caesalpinaceae*) วงศ์ไม้ก่อ (*Fagaceae*) วงศ์ไม้กำลังเสือโคร่ง (*Betulaceae*) วงศ์ไม้สนทะเล (*Casuarinaceae*) และวงศ์ไม้ถั่ว (*Leguminosae*) เป็นต้น การมีชีวิตร่วมกันระหว่างเชื้อรากับระบบรากของต้นไม้มีความสำคัญยิ่งต่อกระบวนการทางสรีรวิทยา และการเจริญเติบโตของต้นไม้ ทำให้ระบบนิเวศป่าไม้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ในป่าธรรมชาติ และในสวนป่า จะมีเห็ดราไมคอร์ไรซากลุ่มนี้กระจายพันธุ์อยู่ทั่วไป เช่น ป่าสนเขา ป่าดิบชื้น ป่าเต็งรัง ป่ายาง ป่าเบญจพรรณ สวนป่าสนเขา สวนป่าไม้มะค่าโมง และสวนป่าไม้มะค่าโมง เป็นต้น

2.3 บทบาทที่สำคัญของเอคโตไมคอร์ไรซาในระบบนิเวศ

2.3.1 การดูดซึมแร่ธาตุอาหารและการกระตุ้นการเจริญของพืช รากพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ด้วย จะมีขนาดใหญ่ และแตกแขนงมากขึ้น เส้นใยของราที่แผ่กระจายไปในดินทุกทิศทาง จะทำหน้าที่เสมือนรากฝอย ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมธาตุอาหาร และน้ำของราก

2.3.2 การป้องกันโรคระบบรากของพืช ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคระบบรากพืช และต้นไม้ได้โดยแผ่น *Mantle sheath* และ *Hartig net* จะทำหน้าที่เสมือนเกราะป้องกันเชื้อโรคที่จะเข้ามาทำลายราก (Marx and Davey, 1969)

2.3.3 การดูดซับความชื้น เส้นใยของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่แผ่กระจายลงไปในดินทุกทิศทาง นอกจากจะช่วยในการดูดธาตุอาหารแล้วยังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดน้ำถึง ร้อยละ 26-86 (Hadie and Leyton, 1981) แผ่นแมนเทิลของราจะทำหน้าที่เสมือนฟองน้ำที่ดูดซับความชื้นไว้ (Duddrige et al., 1980)

2.3.4 ความทนทานของต้นไม้ต่อความเป็นพิษของดิน ราเอคโตไมคอร์ไรซาช่วยให้รากพืชมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความเป็นพิษของดิน อุณหภูมิสูง โลหะหนัก หรือสารกัมมันตภาพรังสี เป็นต้น

2.3.5 หน้าที่อื่นในระบบนิเวศ การหมุนเวียนธาตุอาหาร และการอนุรักษ์ ราไมคอร์ไรซา ยังมีความสำคัญในการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม ช่วยทำให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหารในดินป่าไม้ โดยเฉพาะธาตุ N, P และ K เมื่อราไมคอร์ไรซาตายลงธาตุอาหารทั้งหลายที่สะสมอยู่ภายใน ก็จะถูกปลดปล่อยกลับสู่ดิน (Harley and Smith, 1983) ซึ่งถือว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการหมุนเวียนของธาตุอาหารในระบบนิเวศ

2.3.6 แหล่งอาหารสำหรับสัตว์นานาชนิด ราเอคโตไมคอร์ไรซา เป็นแหล่งอาหารของแมลง และสัตว์ขนาดเล็กในดิน อีกหลายชนิด เช่น *Collembola nematodes* (Warnock *et al.*, 1982) นอกจากนี้ Master *et al.* (1978) ยังตรวจพบชิ้นส่วน หรือสปอร์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาในลำไส้ของสัตว์เลื้อยคลานตัวขนาดเล็กถึงร้อยละ 79

2.3.7 คุณค่าต่อมนุษย์

2.3.7.1 แหล่งอาหารที่สำคัญ นอกจากจะช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าไม้แล้ว เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซายังสามารถสร้างดอกเห็ด ที่มีความสำคัญในแง่ของอาหารและยา และคุณค่าทางเศรษฐกิจต่อมนุษย์ (Trappe, 1977) ราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิดสามารถนำมาใช้เป็นอาหารได้ เช่น เห็ดเผาะ (*Astraeus odoratus*) เห็ดระโงกเหลือง (*Amanita hemibapha*) เห็ดระโงกเหลือง (*A. caesarea*) เห็ดน้ำหมากหรือเห็ดแดง (*Russula emetic*) เห็ดตะไคล (*R. delica*) เห็ดหล่ม (*R. virescens*) เห็ดตับเต่า (*Boletus* spp.) เห็ดเสม็ด (*Boletus griseipurpureus* Corner) (อนิวรรณ, 2539) ดอกเห็ดที่สร้างขึ้นมีคุณค่าสำคัญในทางอาหารและยาอย่างยิ่งต่อชุมชน (Chamratpan, 2003; Klinhom *et al.*, 2003) เป็นที่ยอมรับว่าเป็นแหล่งของโปรตีน วิตามิน และกรดอะมิโน ที่มีคุณค่าสำคัญในทางโภชนาการ

2.3.7.2 ตัวบ่งชี้คุณภาพสิ่งแวดล้อม ราเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นตัวชี้ถึงความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศป่าไม้ ถ้าที่ใดมีราเอคโตไมคอร์ไรซาหลากหลายชนิดแสดงว่ามีระบบป่าที่สมบูรณ์ แต่ถ้าที่ใดมีราเอคโตไมคอร์ไรซาน้อยชนิด แสดงว่าท้องที่นั้นมีการทำลายป่ามาก และมีมลพิษสูง Arnolds (1988) รายงานว่า การเกิดสภาวะฝนกรด มีผลต่อการลดลงของจำนวนชนิดราเอคโตไมคอร์ไรซาด้วย

2.4 เอคโตไมคอร์ไรซาในกลุ่มเชื้อรา **sclerodermatoid** (Sclerodermatoid fungi)

เชื้อราในกลุ่ม sclerodermatoid จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยจัดอยู่ใน order *Boletales* suborder *Sclerodermatine* ซึ่งเป็นการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางอนุชีววิทยา (เชื้อรา sclerodermatoid แบ่งออกเป็น 6 families ได้แก่ *Boletinellaceae* (*Boletinellus* and *Phlebopus*), *Gyroporaceae* (*Gyroporus*), *Pisolithaceae* (*Pisolithus*),

Astraeaceae (*Astraeus*), *Calostomataceae* (*Calostoma*) และ *Sclerodermataceae* (*Scleroderma* and *Veligaster*) (Binder and Bresinsky, 2002) เห็ดกลุ่มนี้มีความสำคัญ เช่น เห็ดเผาะ (*Astraeus odoratus*) และเห็ดห้า (*Phlebopus portentosus*) เป็นเห็ดที่นิยมนำมาบริโภคในประเทศไทย และมีราคาแพง ส่วน *Pisolithus* และ *Scleroderma* เป็นเห็ดที่มีความสำคัญในเชิงการค้า และมีการพัฒนาใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อใช้ส่งเสริมในการปลูกป่าและพืชที่มีบทบาทในเชิงการค้า (Marx *et al.*, 1992; Watling, 2006)

2.4.1 อนุกรมวิธานของเห็ดกรวด *Pisolithus* (Binder and Bresinsky, 2002)

Kingdom *Fungi*

Phylum *Basidiomycota*

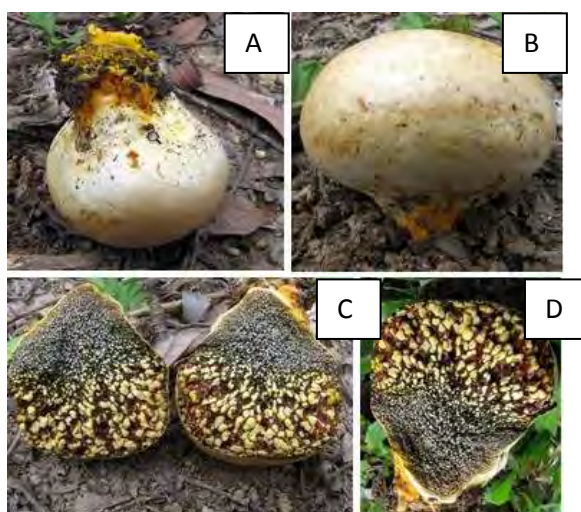
Class *Agaricomycetes*

Order *Boletales*

Family *Pisolithaceae*

Genus *Pisolithus*

เห็ดกรวด (ภาพ 2) เป็นเอคโตไมคอร์ไรซาชชนิดที่มีความสำคัญที่สุดสำหรับการปลูกป่าและได้ถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตให้กับยูคาลิปตัสที่ปลูกเป็นการค้ามานาน (Garbaye *et al.*, 1988) สามารถพบได้ในเขตร้อน และเขตอบอุ่น ทุกภาคพื้นทวีป รวม 33 ประเทศทั่วโลก (Marx 1977; Martin *et al.*, 2002) สามารถพบได้ในสภาพพื้นที่ต่าง ๆ เช่น ดินเป็นกรด ดินที่มีการพังทลายสูง ดินเหมืองแร่ ดินเหมืองถ่านหิน ดินที่มีความเป็นพิษของแมกนีเซียม และ อลูมิเนียมสูง เป็นต้น (Marx and Ruehle, 1988) เห็ดกรวดเป็นเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่เหมาะสมสำหรับเพาะให้กับกล้าไม้ เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับกล้าไม้สน และไม่ใบกว้างมากกว่า 70 ชนิด (Marx, 1977; Martin *et al.*, 2002) สามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อได้ง่าย และเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Momoh and Gbadegesin, 1980) นอกจากนี้เมื่อเกิดเอคโตไมคอร์ไรซากับรากพืชแล้ว จะสามารถสังเกตเห็น และตรวจสอบได้ง่าย ๆ เนื่องจากเส้นใยจะมีสีน้ำตาลทอง (golden brown or mustard) เด่นชัด เมื่อทำการเพาะเชื้อ *P. tinctorius* โดยใช้สปอร์ หรือเส้นใยจากการเพาะเลี้ยงในดินที่อบฆ่าเชื้อ กล้าไม้จะสร้าง ไมคอร์ไรซาขึ้น (Marx and Davey, 1969) บ่งบอกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานและอนุชีววิทยา (Phosri *et al.*, 2012) ในประเทศไทยมีรายงานว่า พบ *Pisolithus* spp. อยู่ร่วมกับรากไม้สนสองใบ สนสามใบ สนคาร์เบีย ยูคาลิปตัส ไม้วงศ์ยาง ไม้เต็งและรัง และไม้ก่อชนิดต่าง ๆ ทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย (อนิวรรณ, 2525; Kanchanaprayudh *et al.*, 2003)



ภาพ 2 ลักษณะของดอกเห็ดกรวด *Pisolithus* spp. (Munyanziza and Kuyper, 1995)

(A-B): รูปร่างดอกเห็ด

(C-D): ลักษณะสปอร์ภายในดอกเห็ด

2.4.2 อนุกรมวิธานของเห็ดลูกฟຸ່ນ *Scleroderma* (Binder and Bresinsky, 2002)

Kingdom *Fungi*

Phylum *Basidiomycota*

Class *Agaricomycetes*

Order *Boletales*

Family *Sclerodermataceae*

Genus *Scleroderma*

เห็ดลูกฟຸ່ນ (ภาพ 3) มีกระจายทั่วไปทั้งในเขตร้อนชื้นและเขตอบอุ่นซึ่งจากการตรวจสอบเอนไซม์จากเห็ดราชนิดนี้เชื่อว่าเป็นเห็ดที่สร้างไมคอร์ไรซากับพืช (Richter and Bruhn, 1989; Richter, 1992) มากกว่าที่จะเป็นซาโพรบ ดังที่มีการเสนอมาก่อน (Guzmán, 1970) เห็ดลูกฟຸ່นหลายชนิดเกิดดอกเห็ดได้ในหลายพื้นที่ที่ถูกรบกวน เช่น ป่าที่ถูกถางหรือเผา และมีศักยภาพในการช่วยปลูกป่าทั้งป่าธรรมชาติและสวนป่าไม้เศรษฐกิจ เนื่องจากเห็ดลูกฟຸ່น *Scleroderma* มีความหลากหลาย การบ่งบอกชนิดอาศัยฐานฐานวิทยาเป็นหลักร่วมกับการใช้อณูชีววิทยา จากการสำรวจในป่ายูคาลิปตัส ดั้งเดิมในออสเตรเลียพบ *Scleroderma cepa*, *S. citrinum* และ *S. areolatum* (Dell and Malajczuk, 1994; Bougher, 1995) ในประเทศจีนพบหลายชนิดที่อยู่ในป่าธรรมชาติที่มีก่อ และสน (Bi *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1997; Tan and Wang, 2000; Chen *et al.*, 2006a; 2006c) ในสวนป่ายูคาลิปตัส *Eucalyptus globules* ใน

ออสเตรเลียตะวันตกพบ กลุ่มเห็ดลูกฟูกได้ทั่วไป (Lu *et al.*, 1998) ประเทศบราซิลพบ *S. bovista* และ *S. uruguayensis* ซึ่งสัมพันธ์กับการปลูกสวนปาล์มน้ำมันและสน (Vieira and Carvalho, 1994; Coelho *et al.*, 1997; Giachini *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006a)



ภาพ 3 ลักษณะของดอกเห็ดลูกฟูก *Scleroderma* spp. (Chen *et al.*, 2006)

(A-B): รูปร่างดอกเห็ด

(C-D): ลักษณะสปอร์ภายในดอกเห็ด

2.5 การผลิตหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

การทำหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในการเพิ่มผลผลิตของป่า เนื่องจากประโยชน์ของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาดังกล่าว จะเห็นว่ามีคามจำเป็นอย่างยิ่งใน การเพาะเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาให้กับกล้าไม้ก่อนย้ายไปปลูกในพื้นที่ที่ขาดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยเฉพาะในพื้นที่ป่าที่ถูกบุกรุกทำลาย หรือป่าเสื่อมโทรม วิธีการที่นิยมใช้ในการเพาะเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา ให้กับกล้าไม้ในแปลงเพาะ มีดังต่อไปนี้

2.5.1 การใช้ดินเชื้อจากป่าธรรมชาติ (soil or humus containing natural inoculum) วิธีนี้เป็นวิธีดั้งเดิม ง่าย และสะดวกกับศูนย์เพาะชำที่ตั้งอยู่ใกล้ป่าธรรมชาติ หรือสวนป่า ที่มีเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ในดินอยู่แล้ว inoculum ชั้นดินเตรียมได้โดยขุดดิน หรือฮิวมัสจากป่า มาผสมกับดินที่ใช้ในการเพาะชำ อัตราส่วนที่ใช้ประมาณร้อยละ 10 - 20 (Mikola, 1973) ข้อเสียของวิธีนี้คือ ดินมีน้ำหนักมาก เมื่อต้องใช้ในปริมาณสูง ๆ ยุ่งยากกับการขนส่ง โดยเฉพาะการขนย้ายเป็นระยะทางไกลๆ ไม่สะดวก นอกจากนี้ในดินอาจมีศัตรูพืช หรือโรคพืช ที่อาจทำอันตรายให้เกิดความเสียหายแก่กล้าไม้ได้

2.5.2 การใช้สปอร์ (spore inoculum) เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิด เช่น *Pisolithus* spp., *Rhizopogon* spp., *Scleroderma* spp., และ *Astraeus* spp. ผลิตสปอร์ได้ปริมาณมาก สปอร์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ทราบชนิดแล้ว สามารถนำมาคลุกเคล้ากับดินที่จะ

ใช้เพาะ คลุกเคล้ากับเมล็ดก่อนนำไปเพาะ หรือฉีดพ่นให้กับกล้าไม้ได้ (Marx *et al.*, 1991) ในสหรัฐอเมริกา ได้นำเอาสปอร์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา *P. arhizus* มาเพาะให้กับกล้าสนในเรือนเพาะชำและพบว่าสปอร์เพียง 1 มิลลิกรัม (1.1×10^6 สปอร์) สามารถใช้ได้ผลดี (Marx and Bryan, 1975; Marx *et al.*, 1976) สปอร์ก่อนที่จะนำมาใช้ต้องร่อนด้วยตะแกรง (ความถี่ประมาณ 18 เปอร์เซนต์) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส จะช่วยให้เก็บไว้ได้นานหลายปี (Marx *et al.*, 1991) นอกจากนี้ในประเทศจีน มีรายงานการนำเอาสปอร์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Scleroderma* ที่รวบรวมจากพืช 4 ชนิด คือ แห้ง *Eucalyptus globules*, *E. urophylla*, *Pinus elliotii* และ *P. radiata* มาปลูกเชื่อมกับกล้าไม้ในเรือนทดลองเพาะชำโดยคลุกกับเมล็ดยูคาลิปตัสและสนก่อนนำไปปลูกเป็นสวนป่า (Chen *et al.*, 2006b)

2.5.3 การใช้หัวเชื้อจากเส้นใยบริสุทธิ์ (mycelial or vegetative inoculum) วิธีนี้เป็นที่นิยมกันมากในปัจจุบัน เพราะทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ดีได้ โดยการเลี้ยงเส้นใยจากเนื้อเยื่อดอกเห็ด หรือแยกราเอคโตไมคอร์ไรซาจากรากพืช แล้วนำไปขยายเพิ่มปริมาณโดยใช้เวอร์มิคูไลต์กับพีทมอสเป็นสับสเตรต และผสมอาหารเหลว modified Melin-Norkrans (MMN medium) เลี้ยงนานประมาณ 3-4 เดือน ก่อนนำไปผสมดินเพาะให้กับกล้าไม้ (Marx and Kenny, 1982) วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ การนำไปใช้กับศูนย์เพาะชำขนาดใหญ่ยังมีปัญหา เนื่องจากสามารถผลิตหัวเชื้อที่บริสุทธิ์ได้ในปริมาณเพียงพอที่จะใช้กับจำนวนกล้าไม้ประมาณ 10,000-20,000 ต้นเท่านั้น (Marx *et al.*, 1992)

2.5.4 การผลิตหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในทางการค้า ได้มีการพัฒนาวิธีการใช้เชื้อบริสุทธิ์ มาผลิตเป็นอุตสาหกรรมในเชิงการค้า เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่นิยมใช้เป็นหัวเชื้อและผลิตเป็นการค้า เพื่อใช้ในการปลูกป่าในต่างประเทศ คือ *Pisolithus arhizus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria bicolor* หัวเชื้อที่ผลิตขึ้นนี้ใช้ในอัตราส่วน 1 ลิตร (ราคาประมาณ 285 บาทต่อลิตร) ต่อพื้นที่ 2.7 ตารางเมตร ก็มีประสิทธิภาพเพียงพอในการทำให้เกิดเอคโตไมคอร์ไรซากับรากพืช (Marx *et al.*, 1992) ปัจจุบันมีหลายบริษัทที่ทำการผลิตหัวเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาและวางจำหน่ายในท้องตลาด เช่น Plant Health Care Inc. และ National Institute of Molecular Biology and Biotechnology ประเทศฟิลิปปินส์ เป็นต้น

2.6 ปัจจัยที่มีความสำคัญในการเจริญเติบโต ของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในห้องปฏิบัติการ

2.6.1 อาหารที่นำมาเลี้ยงเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาในห้องปฏิบัติการนั้นมีหลายชนิด นักจุลชีววิทยาได้พยายามพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญ ซึ่งสารอาหารมีผลต่อสัญญาณวิทยาและ สีของโคโลนีของเชื้อรา โดยทั่วไปเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และเซลโลไบโอส เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนน้ำตาลฟรุคโตสจะถูกใช้ได้โดยเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดหรือบางสายพันธุ์เท่านั้น

(Cao and Crawford, 1993) เช่น เส้นใยเห็ด *Morchella* sp. สามารถเจริญได้ในอาหาร potato dextrose agar (PDA) และอาหาร malt extract agar (MEA) และอาหารชนิดอื่น ๆ (Kalm and Kalyoncu, 2008) เชื้อบรืสุทธิ *P. potentosus* สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร fungal-host agar และ modified Murashige and Skoog medium (Sanmee et al., 2010; Kumla et al., 2011) นอกจากนี้ Xu et al., (2008) รายงานว่า *Laccaria insulsus* และ *Boletus edulis* เจริญได้ดีบนอาหาร potato juice iron-magnesium agar และ *Lactarius deliciosus* เจริญได้ดีบนอาหาร pine juice iron-magnesium agar

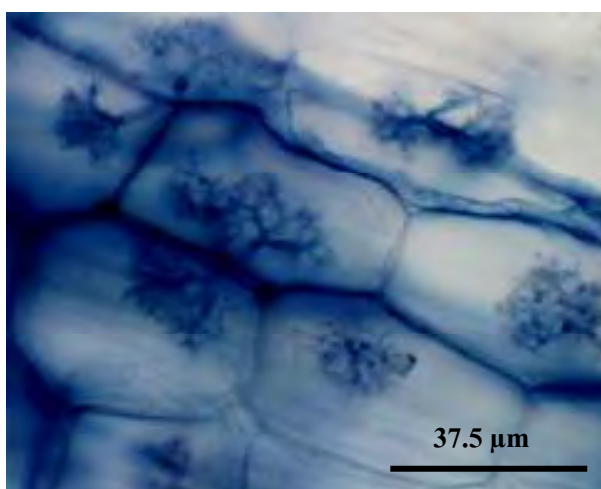
2.6.2 ความเป็นกรด-ด่าง เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ ของเส้นใยเชื้อรา เอคโตไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่จะสามารถเจริญได้ดีที่ pH 7 หรือใกล้เคียง 7 ก่อนไปทางกรดเล็กน้อย pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อราชนิดต่าง ๆ นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา กล่าวคือเชื้อรา เอคโตไมคอร์ไรซาชนิดต่าง ๆ จะสามารถเจริญได้ดีที่ pH ต่างกัน เช่น *Amanita caesarea* เจริญได้ดีที่ 6-7 (Daza et al., 2006) *Boletus edulis* เจริญได้ดีที่ pH 5 (Xu et al., 2008) *Tricholoma* spp. เจริญได้ดีที่ pH 5 และ *P. tinctorius* เจริญได้ดีที่ pH 6.6 (Hung and Chien, 1978) เส้นใยของบรืสุทธิเห็ดหำ (*Phlebopus portentosus*) เจริญได้ดีที่สุดที่ pH 4 (Sanmee, 2004; Kumla et al., 2011) นอกจากนี้ Yamanaka (2003) ศึกษาการเจริญของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา จำนวน 15 ชนิดในอาหารเหลวที่มี pH ต่าง ๆ พบว่า เส้นใยเอคโตไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ pH 5-6

2.6.3 อุณหภูมิ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเชื้อรา เชื้อราต่างชนิด จะมีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่างกัน เช่น อุณหภูมิที่มีความสำคัญในการเจริญ และการปรับตัวให้อยู่รอดของราเอคโตไมคอร์ไรซา *P. portentosus* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Sanmee et al., 2010; Kumla et al., 2011) นอกจากนี้ Sánchez et al. (2001) รายงานว่า เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา ในแถบเมดิเตอร์เรเนียน สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส *Lactarius deliciosus*, *L. insulsus* และ *B. edulis* เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วน *Amanita caesarea* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 24–28 องศาเซลเซียส (Xu et al., 2008)

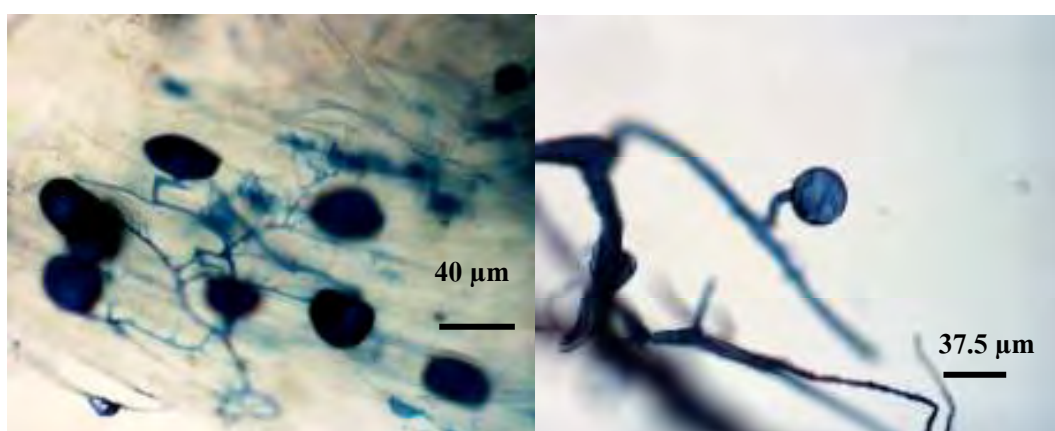
2.7 อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Arbuscular mycorrhiza)

เชื้อรา Arbuscular Mycorrhiza Fungi (AMF) เรียกอีกอย่างหนึ่งได้ว่า Endomycorrhiza เชื้อราในกลุ่มนี้มีการดำรงชีวิตแบบ Obligate symbiosis กับพืชอาศัย คือสามารถเจริญเติบโตภายในเซลล์รากของพืชอาศัยเท่านั้น ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่สำคัญคือ การสร้างเส้นใยที่เจริญเข้าไปในเซลล์ของรากโดยการสร้าง appressorium แทะผ่านผนังเซลล์รากพืชเข้าไป เส้นใยนี้จะเจริญในส่วนที่เป็นชั้นคอร์เทกซ์ของรากเท่านั้น จากนั้นจะสร้างโครงสร้างบริเวณปลายเส้นใยซึ่งมีการ

แตกแขนงแบบ dichotomous branching ที่เรียกว่า อาร์บัสคูล (arbuscule) ทำให้มีโครงสร้างคล้ายต้นไม้เล็กๆ (ภาพ 4) อาร์บัสคูลจะสัมผัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ของรากพืชเพื่อทำหน้าที่แลกเปลี่ยนสารอาหารกันระหว่างราและพืชอาศัย อาจมีการสร้างเวสิเคิล (vesicle) ที่มีลักษณะเป็นถุงอยู่ปลายเส้นใยหรือระหว่างเส้นใยทั้งภายในหรือภายนอกราก (ภาพ 5) มีหน้าที่สะสมอาหารที่มีไขมันมากจำพวกลิพิด เชื้อราจะมีการสร้างสปอร์ ซึ่งมักสร้างภายในดิน นอกรากพืชหรืออาจสร้างภายในรากได้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา นอกจากนี้ยังมีการสร้างเส้นใยยื่นออกไปภายนอกราก มีบทบาทในการดูดซับน้ำและแร่ธาตุให้แก่พืชอีกด้วย



ภาพ 4 ลักษณะอาร์บัสคูลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในรากพืชอาศัย



ภาพ 5 ลักษณะของเวสิเคิล (ขวา) และสปอร์ (ซ้าย) ภายในรากพืชอาศัย

2.8 ประโยชน์ของอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อพืชอาศัย

อาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Arbuscular Mycorrhiza) มีความสำคัญต่อการส่งเสริมการเจริญต่อพืช โดยเชื้อราจะไปเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายและดูดซึมธาตุอาหารต่างๆจากดินแร่ในดินที่สลายตัวยากรวมทั้งพวกอินทรีย์วัตถุต่างๆที่ยังสลายตัวไม่หมด ทำให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ได้ โดยเฉพาะธาตุฟอสฟอรัส (Harley and Smith, 1983) ช่วยเพิ่มปริมาณการดูดธาตุฟอสฟอรัส ในโตรเจน โพแทสเซียม และจุลธาตุอาหารให้มากขึ้น ช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดินให้จับตัวเป็นก้อนได้ดีขึ้นจึงอุ้มน้ำได้มากขึ้น (Rillig and Mummey, 2006) จากการทดลองพูนพีไลและคณะ (2549) ที่ศึกษาผลของเชื้อรา อาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญของปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* var. *altissima*) และการเข้าทำลายปอแก้วของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* พบว่าการมีไส้เดือนฝอยรากปมไม่มีผลต่อการลดจำนวนสปอร์ในดินและเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา แต่เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ส่วนใหญ่กลับมีการเข้าอยู่อาศัยในรากเพิ่มขึ้น และเชื้อ *G. fasciculatum*, *G. manihotis* และ *G. occultum* ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของปอแก้วได้ดี จากรายงานของ Schenck (1984) พบว่าเอนโดไมคอร์ไรซามีส่วนช่วยให้อัตราการรอดของพืชสูงขึ้น ภายหลังจากการเพาะเมล็ดหรือการปักชำ ในสภาวะที่อากาศแห้งแล้ง พืชที่มีเอนโดไมคอร์ไรซาจะมีการเหี่ยวเฉา น้อยกว่าพืชที่ไม่ปลูกเชื้อเอนโดไมคอร์ไรซา เพราะพืชที่มีเอนโดไมคอร์ไรซาจะมีอัตราการดูดน้ำมากกว่า นอกจากนี้เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซายังสามารถใช้ในการงานด้านนิเวศวิทยา โดยการใช้ในการเตรียมกล้าพรรณไม้เพื่อการปลูกป่า (Brundrett et al., 1996) ทำให้กล้าไม้มีชีวิตรอดได้ดีในช่วงวิกฤติจากความแห้งแล้งได้อีกด้วย

2.9 การเพิ่มจำนวนสปอร์ อาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีการดำรงชีวิตแบบ Obligate symbiosis กับพืชอาศัย ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยง แต่สามารถเจริญเติบโตภายในเซลล์รากของพืชอาศัยเท่านั้น ดังนั้นจึงต้องอาศัยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในกระถางร่วมกับพืชอาศัยหรือ pot culture เป็นวิธีการเพิ่มหัวเชื้อเพื่อนำมาใช้ในการเพาะปลูก การผลิตเชื้อบริสุทธิ์หรือเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาชนิดของเชื้อ ชนิดของพืชที่จะนำมาใช้เป็นพืชอาศัยมีผลอย่างมากในการชักจูงให้เชื้อราสร้างสปอร์ เพิ่มความสามารถและประสิทธิภาพในการเข้าสู่รากของเชื้อรา พืชที่เหมาะสมจะนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณสปอร์เป็นพืชที่มีระบบรากดี มีการแตกแขนงและแผ่ขยายของรากมาก ส่วนใหญ่นิยมใช้พืชจำพวกหญ้า เช่น ข้าวฟ่าง (sorghum), ข้าวโพด (corn), เดือด (Job's Tears), ข้าว (rice) เป็นต้น และสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมในเขตร้อนได้ดีกว่าพืชจำพวกหัวหอม กระเทียม (*Trifolium* spp.) ซึ่งมีระบบรากที่ดีเช่นกัน แต่ชอบปริมาณแสงและอุณหภูมิต่ำกว่าพืชพวกหญ้า (Brundrett et al., 1996)

2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

2.10.1 ประเภทของเชื้อตั้งต้น

เชื้อตั้งต้น (inoculum) ที่ใช้ในการขยายพันธุ์ในพืชอาศัยนั้น อาจใช้สปอร์ของเชื้อราเป็นหัวเชื้อโดยตรง มีข้อดีคือ ดินที่ได้มักจะเป็นดินที่มีเชื้อบริสุทธิ์และสปอร์จะทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าเส้นใย แต่อาจงอกเส้นใยเข้าสู่รากได้ช้ากว่า เนื่องจากสปอร์บางชนิดต้องการระยะเวลาในการพักตัวก่อนที่จะมีการงอกของสปอร์ (สมจิตร, 2549) จึงต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน ปริมาณสปอร์ที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการทำ pot culture สำหรับสปอร์ที่มีขนาดใหญ่ อาจใช้จำนวนตั้งแต่ 5 – 100 สปอร์ต่อต้น แต่ถ้าเป็นสปอร์ขนาดเล็กอาจใช้จำนวน 50 – 500 สปอร์ต่อต้น (Brundrett *et al.*, 1996) หรืออาจใช้ชิ้นส่วนของรากที่มีเส้นใยของเชื้อราเป็นหัวเชื้อ วิธีนี้จะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงไม่นาน เนื่องจากเส้นใยเชื้อราในชิ้นส่วนของรากสามารถเจริญเข้าสู่รากของพืชได้เร็วกว่าการใช้สปอร์ การใช้ดินที่มีสปอร์ของเชื้อราเป็นหัวเชื้อ (soil inoculum) จะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงไม่นาน แต่อาจได้ดินที่มีเชื้อผสม อีกวิธีคือการย้ายกล้าที่มีเชื้อราเจริญอยู่ลงปลูกในดินปลอดเชื้อ วิธีนี้จะทำให้ได้ดินที่มีเชื้อบริสุทธิ์ แต่ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนานและต้องตรวจสอบก่อนว่ารากพืชมีเชื้อราเจริญอยู่จากการทดลองของ Abbott (1999) พบว่า การใช้ดินที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในครั้งแรกซึ่งมีสปอร์อยู่เป็นหัวเชื้อในการเพิ่มจำนวนในครั้งต่อไป สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและประสบความสำเร็จได้เป็นอย่างดี

2.10.2 พืชอาศัย

ชนิดของพืชที่เราจะเลือกมาใช้เป็นพืชอาศัย (host plant) เป็นสิ่งที่มีความสำคัญมาก เพราะชนิดของพืชมีผลอย่างมากต่อการชักจูงให้เชื้อราสร้างสปอร์ อีกทั้งเพิ่มความสามารถและประสิทธิภาพในการเข้าสู่รากของเชื้อรา พืชอาศัยควรเป็นพืชที่เชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา colonize ได้ง่าย มีระบบรากที่แผ่ขยายมาก ทำให้มีโอกาสดำรงปริมาณรากและปริมาณสปอร์ของเชื้อรามาก และควรคำนึงถึงความทนทานของพืชอาศัยต่อสภาพแวดล้อมที่ปลูกและเหมาะสมกับชนิดของเชื้อราที่ต้องการเพิ่มปริมาณด้วย ตัวอย่างของพืชที่นิยมใช้เป็นพืชอาศัยได้แก่พืชตระกูลหญ้า เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง หญ้าชูดาน หญ้าบาร์เบีย เป็นต้น ซึ่งสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมในเขตร้อนได้ดีกว่าพืชจำพวกหัวหอม (*Allium* spp.) กระเทียม (*Trifolium* spp.) ที่มีระบบรากดีเช่นกันแต่จะชอบปริมาณแสงและอุณหภูมิที่ต่ำกว่า พืชจำพวกหญ้า (Brundrett *et al.*, 1996)

2.10.3 ขนาดของกระถาง

กระถางขนาดใหญ่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับการสร้างสปอร์ เนื่องจากกระถางขนาดใหญ่จะทำให้ระบบรากแผ่ขยายได้มาก ส่งผลให้ไมคอร์ไรซามีโอกาสเจอรากและเข้าสู่รากได้มาก การสร้างสปอร์จึงเกิดได้มากกว่าการใช้กระถางขนาดเล็ก ปริมาณรากที่เพิ่มขึ้นอาจเนื่องจากปริมาตรดินและกระถางที่มีอยู่ Schenck (1984) ได้อ้างไว้ว่าการสร้างสปอร์ต่อกรัม

ของดินและกรัมของน้ำหนักแห้งรากเพิ่มขึ้นตามปริมาตรของกระถางที่ใช้ปลูกเชื้อในหญ้า
 ชูดาน พืชในกระถางขนาด 15,000 cm³ ผลิตสปอร์ได้มากกว่าพืชในกระถางขนาด 750 cm³
 ถึง 90 เท่า การระบายอากาศและการให้ออกซิเจนแก่รากที่ดี เนื่องมาจากการระบายน้ำที่ดีของ
 ดิน จะมีผลต่อการสร้างสปอร์ในกระถางขนาดใหญ่

2.10.4 ความชื้นของดิน

ความชื้นของดินมีผลต่อการเข้าสู่รากและการสร้างสปอร์ของไมคอร์ไรซา ความชื้นของ
 ดินต้องอยู่ในระดับไม่ต่ำกว่า field capacity ดินที่แห้งหรือดินแฉะเกินไปจะทำให้เปอร์เซ็นต์
 colonization และการสร้างสปอร์ลดลง โดยจะมีผลอย่างมากต่อเส้นใยภายนอกมากกว่าเส้น
 ใยภายในชั้นคอร์เทกซ์ของราก การให้น้ำโดยส่วนใหญ่จะเหี่ยวนำไปให้เกิดการสร้างสปอร์และ
 เป็นที่ชื่นชอบของพืชในการเจริญเติบโต แต่หากความชื้นในดินมีมากเกินไปจะทำให้เกิดสภาวะ
 ที่เหมาะสมต่อการเจริญของพาราสิตไมคอร์ไรซา (mycorrhizal hyperparasites)
 เช่นพวก phycomycetes เช่นเดียวกับเชื้อก่อโรคพืชอื่นๆ (Schenck, 1984)

การศึกษาผลของความชื้นในดินที่มีต่อการเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา
 ในพืชตระกูลส้ม *Citrus volkameiana* ตรวจพบว่าเมื่อดินมีความชื้นต่อเนื่องมี root
 colonization 64% ในขณะที่เมื่อปล่อยดินให้แห้งเป็นช่วงๆมี root colonization 43% (สมจิตร์,
 2549)

2.10.5 อุณหภูมิของดิน

อุณหภูมิและสภาพอากาศที่พืชและไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่เหมาะสมที่สุดต่อ
 การเข้าสู่รากและการสร้างสปอร์มากที่สุดของไมคอร์ไรซา อุณหภูมิสูง ทำให้การเข้าสู่ราก
 และการสร้างสปอร์มากขึ้น ในขณะที่อุณหภูมิสูงส่งเสริมการสร้างอาร์บัสคูล พบว่าชนิดของอาร์
 บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะมากขึ้นในฤดูร้อนมากกว่าในฤดูหนาวและฤดูฝน การทำ cold shock
 สามารถส่งเสริมการสร้างสปอร์ได้ หากนำมาใช้ในช่วง 2 เดือนแรกหลังการปลูกเชื้อ (Schenck,
 1984)

2.10.6 ปริมาณของธาตุอาหารในดิน

ธาตุอาหารมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช หากวัสดุปลูกที่ใช้เป็นทรายหรือมี
 ส่วนผสมของทรายในปริมาณมาก อาจทำให้พืชได้รับธาตุอาหารไม่เพียงพอต่อการ
 เจริญเติบโต ดังนั้นจึงควรมีการเติมธาตุอาหารที่จำเป็นลงไป แต่ควรมีการควบคุมปริมาณไม่ให้
 มากเกินไปโดยเฉพาะ ฟอสฟอรัส การควบคุมระดับของฟอสฟอรัสเป็นสิ่งที่สำคัญมากต่อการ
 ผลิตหัวเชื้อ การให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสจะทำให้เปอร์เซ็นต์ colonization ลดลง (สมจิตร์, 2549)
 เนื่องจากต้นไม้ไม่สามารถใช้ธาตุฟอสฟอรัสได้เอง และไม่จำเป็นที่จะต้องอาศัยเชื้อราอาร์บัสคูลาร์
 ไมคอร์ไรซา พืชที่อายุมาก colonization จะถูกยับยั้งโดยฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำในระดับสูง
 (Schenck, 1984)

2.11 ไมคอร์ไรซากับยูคาลิปตัส

ต้นยูคาลิปตัสมีการสร้างความสัมพันธ์กับเห็ดไมคอร์ไรซาเป็นชนิดเด่น ทั้งในป่าธรรมชาติ (Chilvers, 2000) และสวนป่าปลูก (Brundrett *et al.* 1996) อาจมีการสร้างความสัมพันธ์ร่วมกับอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาหรือการเจริญร่วมกันของไมคอร์ไรซาทั้งสองชนิด (Chen *et al.* 2000) การสำรวจเบื้องต้นเกี่ยวกับความหลากหลายของเชื้อราในสวนป่ายูคาลิปตัสทางตอนใต้ของประเทศจีน และการค้นพบจากการทดลองปลูกเชื้อ ทำให้ทราบว่าต้นกล้ายูคาลิปตัสจะได้รับประโยชน์จากการปลูกเชื้อด้วยเชื้ออิงอาศัยที่จำเพาะก่อนการย้ายปลูกในดินที่มีธาตุอาหารต่ำ (Malajczuk *et al.* 1994; Chen *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006a; Dell, 2002) จากการศึกษาของ Chen *et al.*, (2007) ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างสปอร์โรคาร์ป (sporocarps) ของเห็ดไมคอร์ไรซาและสปอร์ของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในสวนป่ายูคาลิปตัส 155 สวนในพื้นที่ 4 จังหวัดทางตอนใต้ของจีนภายในระยะเวลาการศึกษา 2 ปี พบว่ามีความหลากหลายของเห็ดไมคอร์ไรซาบนผิวดินต่ำ ประกอบด้วย 14 ชนิดของเห็ดไมคอร์ไรซา ที่ถูกจัดอยู่ใน 6 จีนัส ได้แก่

1. *Amanita gemmata* (Fr.) Gill
2. *A. griseoverrucosa* Yang
3. *Boletus griseus* Forst
4. *Laccaria amethystea* (Bull. ex Gray.) Murr.
5. *L. laccata* (Scop.:Fr.) Berk et Br.
6. *Pisolithus* sp.
7. *Russula aeruginea* Lindb.:Fr.
8. *R. puellaris* Borszcz.
9. *Scleroderma areolatum* Ehrenb.
10. *S. bovista* Fr.
11. *S. cepa* Pers.
12. *S. citrinum* Pers.
13. *S. paradoxum* Beaton
14. *S. polyrhizum* Pers.

เห็ดไมคอร์ไรซาที่พบเป็นชนิดเด่นคือ *Scleroderma* และ *Pisolithus* ในจำนวน 21 อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบ *Glomus* เป็นชนิดเด่นที่พบบ่อยในดินจากสวนป่ายูคาลิปตัส โดยในช่วงแรกอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะแทงเส้นใยเข้าไปในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากยูคาลิปตัสก่อน เพื่อสร้างอาร์บัสคูลในการแลกเปลี่ยนสารอาหารกับเซลล์ราก จากนั้นเห็ดไมคอร์ไรซาจะแทงเส้นใยเข้าไปในรากเป็นลำดับต่อไปเพื่อสร้าง Hartig net และสร้าง mantle sheath หุ้มรอบ

ราก ถือเป็นการทำงานร่วมกันของไมคอร์ไรซาทั้งสองชนิด (Chilvers *et al.*, 2007) เชื้อราไมคอร์ไรซาชนิดต่างๆ ที่อาศัยอยู่ จะเป็นตัวช่วยดูดธาตุฟอสฟอรัสให้กับต้นยูคาลิปตัสได้มากขึ้น ช่วยให้ต้นไม้เจริญเติบโตดี และปรับปรุงดินเสื่อม ให้มีคุณภาพดีขึ้น เมื่อถึงฤดูฝน มีความชื้นที่เหมาะสมต่อการสร้างดอกเห็ด เชื้อเอคโตไมคอร์ไรซาเหล่านี้ก็จะแทงดอกเห็ดโผล่เหนือพื้นดิน เพื่อแพร่กระจายพันธุ์ออกไป

2.12 บทบาทของต้นกล้ายูคาลิปตัสในเชิงการค้า

ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus*) หรือ ต้นกระดาด เป็นไม้เนื้อแข็งโดยมีถิ่นกำเนิดในทวีปออสเตรเลีย ประเทศไทยได้เริ่มนำไม้ยูคาลิปตัสชนิดต่าง ๆ มาปลูกตั้งแต่ปี 2493 และทดสอบปลูกเมื่อปี 2507 ปัจจุบันได้มีการส่งเสริมให้ปลูกต้นยูคาลิปตัสสายพันธุ์ต่าง ๆ (อังคณา, จดหมายข่าวผลิใบฯ กรมวิชาการเกษตร) ได้แก่

1. ยูคาลิปตัส คามาลดูลินซิส (*Eucalyptus camaldulensis*)
2. ยูคาลิปตัส เทอเร็ติคอร์นิส (*Eucalyptus tereticornis*)
3. ยูคาลิปตัส ยูโรฟิลล่า (*Eucalyptus urophylla*)
4. ยูคาลิปตัส บราสเซียน่า (*Eucalyptus brassiana*)
5. ยูคาลิปตัส เพลลิต้า (*Eucalyptus pellita*)
6. ยูคาลิปตัส ดีกลูปต้า (*Eucalyptus deglupta*)
7. ยูคาลิปตัส แกรนด์ซิส (*Eucalyptus grandis*)

Eucalyptus camaldulensis เป็นยูคาลิปตัสที่ปลูกมากในประเทศไทย เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตเป็นการค้าซึ่งเป็นไม้โตเร็ว เก็บผลผลิตได้ใน 4-7 ปี ซึ่งผลผลิตประเทศไทยค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตโดยรวมนอกประเทศ เช่น ออสเตรเลีย จีน และ อินโดนีเซีย ซึ่งเป็นผู้ผลิตรายใหญ่แถบเอเชีย มีการพัฒนาใช้ไมคอร์ไรซาในการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้ายูคาลิปตัสที่เพาะในโรงเรือนก่อนที่จะย้ายไปปลูกในแปลง เนื่องจากมีอัตราการเจริญสูงกว่าไม่มีการใช้ ซึ่ง ไมคอร์ไรซาเป็นเชื้อราที่อาศัยร่วมกันกับรากพืช ในทางที่เป็นประโยชน์กับพืช ในแง่การแลกเปลี่ยนสารอาหารและเมตาโบไลต์ระหว่างรากกับพืชที่เป็นโฮสต์ ลดการเกิดโรค ช่วยให้โครงสร้างของดินเสถียร และช่วยให้พืชสามารถดูดซับน้ำได้มากกว่าปกติ (Smith and Read, 1997)

3. วิธีการวิจัย

3.1 พืชชนิด ECM และ AM ที่เหมาะสมในการช่วยการเจริญของกล้วยคาลิปัสจากสายพันธุ์ที่ปลูก เป็นการค้าในประเทศไทย ซึ่งเป็นกล้าที่ผลิตจากการปักชำและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อบริสุทธิ์ และการบ่งบอกชนิดของเห็ดกรวด และเห็ดลูกฝู่น

3.1.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเห็ดกรวด (*Pisolithus* spp.) และเห็ดลูกฝู่น (*Scleroderma* sp.) ในช่วงระหว่างเดือน พฤษภาคม ถึง กรกฎาคม 2553 ในพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย และสวนป่ายูคาลิปัส บริษัทรีเทค จังหวัดปราจีนบุรี ตรวจบันทึกลักษณะสัณฐานวิทยา วาดรูปจดบันทึกลักษณะ สถานที่เก็บ พืชอาศัย ขนาดของดอกเห็ดกรวด และเห็ดลูกฝู่นที่พบ นำไปทำแห้งที่ 40-45 องศาเซลเซียส แล้วเก็บไว้ในถุงที่บรรจุ silica gel จดบันทึก ให้หมายเลขตัวอย่าง และเก็บรักษาตัวอย่างแห้งไว้ ณ ห้องปฏิบัติการ วิจัยสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ ด้านการพัฒนาแบบยั่งยืนของทรัพยากรทางชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.1.1.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

นำดอกเห็ดที่ได้มาทำการแยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เลือกดอกเห็ดดอกอ่อนที่มีสภาพสมบูรณ์ ไม่มีรอยฉีกขาด ใช้คีมปลายแหลม (fine forceps) คีบเนื้อเยื่อด้านในของดอกเห็ดขนาดประมาณ 2 ตารางเซนติเมตร นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Melin-Norkans (MMN) medium (Langer *et al.*, 2008) โดยมี pH 6.0 ผสมด้วย 0.01 เปอร์เซ็นต์ chloramphenicol จากนั้นบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส และสังเกตการเจริญของเส้นใยจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ทำการต่อเชื้อ จนกระทั่งได้เส้นใยราที่บริสุทธิ์ นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.1.3 การจำแนกและบ่งบอกชนิดของเชื้อเห็ดกรวดและเห็ดลูกฝู่น

การจำแนกและบ่งบอกชนิดของเห็ดกรวด และเห็ดลูกฝู่นโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยามันที่แหล่งที่เก็บ รูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยา จากนั้น นำดอกเห็ดไปอบที่ 45-50 องศาเซลเซียส เก็บในกล่องพลาสติกเพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาต่อไป จากนั้นนำตัวอย่างและเส้นใยบริสุทธิ์ที่แยก ได้ทำการศึกษาอนุชีววิทยาในส่วนของ ITS region (Binder and Bresinsky, 2002; Phosri *et al.*, 2012)

3.1.2 การเก็บตัวอย่างสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซารอบรากต้นยูคาลิปตัสในแหล่งปลูกต่าง ๆ

3.1.2.1 การเก็บตัวอย่างรากและดินรอบรากยูคาลิปตัส

เก็บตัวอย่างดินรอบรากต้นยูคาลิปตัสเป็นจำนวน 3 จุดโดยรอบราก เก็บตัวอย่างดินประมาณ 400 กรัม พร้อมทั้งเก็บรากยูคาลิปตัสเพื่อนำไปตรวจสอบการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินและรากจากแต่ละแหล่งเป็นจำนวน 3 ซ้ำ แหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่างดินในรอบแรก ได้แก่ บ้านดง ต. นายาง อ.สบปราบ จังหวัดลำปาง และบ้านท่าตูม ม. 2 อ. ศรีมหาโพธิ์ จังหวัดปราจีนบุรี เพื่อดูความหลากหลายของสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ตัวอย่างดินรอบที่สอง เก็บในพื้นที่คณะเกษตรและคณะสถาปัตยกรรมมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และอำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย เพื่อศึกษาการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

3.1.2.2 การแยกสปอร์ของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดิน (Modified Brundrett *et al.*, 1996)

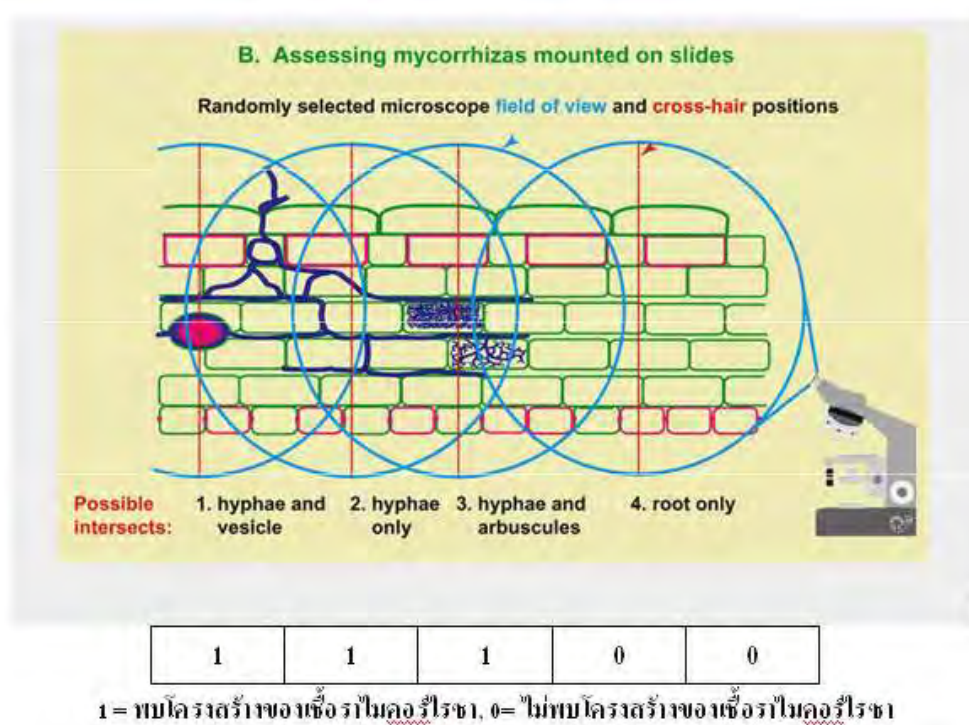
ชั่งตัวอย่างดิน 100 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไป 500 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ให้ดินละลาย ใช้ไม้พายกวนให้เม็ดดินกระจายตัว วนไปในทิศทางเดียวกันนาน 1 นาที แล้วพักไว้ 10 วินาที เทสารแขวนลอยของตัวอย่างดินผ่านตะแกรงที่มีขนาด 750 250 100 50 ไมโครเมตร ตามลำดับ พร้อมทั้งเปิดน้ำประปาให้ไหลผ่านตะแกรง พร้อมทั้งใช้กระบอกฉีดน้ำ ฉีดล้างภายในบีกเกอร์ให้หน้าที่ชะผ่านลงตะแกรง เติมน้ำลงไปในบีกเกอร์อีก 500 มิลลิลิตร แล้วทำซ้ำขั้นตอนดังกล่าวอีก 2 ครั้ง ใช้น้ำล้างสิ่งที่ติดบนตะแกรงให้มารวมกันบริเวณด้านข้าง ส่วนที่เป็นเศษซากพืชที่ติดบนตะแกรงขนาด 750 ไมโครเมตร ให้นำไปทิ้งลงขยะแล้วใช้กระบอกฉีดน้ำ ฉีดล้างสิ่งที่ตกค้างอยู่บนตะแกรงขนาด 250 100 50 ไมโครเมตร ผ่านกรวยลงในหลอดเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทเศษซากที่แขวนลอยด้านบนทิ้งและเก็บส่วนของตะกอนดินที่ก้นหลอดเหวี่ยง จากนั้นใส่สารละลายน้ำตาลทราย 50% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไป แล้วใช้แท่งแก้วกวนตะกอนดินให้กระจายตัวอยู่ในสารละลายโดยกวนวนไปในทิศทางเดียวกัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารแขวนลอยด้านบนที่ได้ลงบนตะแกรงขนาด 50 ไมโครเมตร แล้วใช้น้ำประปาล้างสิ่งตกค้างบนตะแกรง (สปอร์กับเศษซากพืช) ส่วนตะกอนดินที่ก้นหลอดเหวี่ยงให้เททิ้งในถังพักตะกอน ใช้กระบอกฉีดน้ำ ฉีดล้างสิ่งที่ค้างอยู่บนตะแกรงลงไปบนกระดาษกรองที่อยู่บนกรวยกรอง (Buchner funnel) ของเครื่องดูดสุญญากาศ ใช้ปากคีบนำกระดาษกรองใส่ลงในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ นำไปส่องดูสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ เพื่อตรวจสอบชนิดของสปอร์ตามลักษณะสัณฐานวิทยา

3.1.2.3 การจัดจำแนกชนิดสปอร์ของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ (Modified Brundrett *et al.*, 1996)

ใช้ปากกาหมึกถาวรเขียนรหัสหมายเลขของตัวอย่างสปอร์ลงบนด้านขวาของสไลด์
 หยดสาร Polyvinyl alcohol-lacto-glycerol :PVLG (ภาคผนวก ก) ลงบนด้านซ้ายของสไลด์
 และหยดสาร PVLG และ Melzer's reagent (ภาคผนวก ก) อัตราส่วน 1:1 ลงบนด้านขวาของ
 สไลด์ ใช้ปลายเข็มเขี่ยสปอร์ลงในสารที่หยดไว้ในแต่ละด้าน ด้านละ 10 สปอร์หากเป็นสปอร์
 ขนาดเล็ก หรือ 5 สปอร์หากเป็นสปอร์ขนาดใหญ่ กวนเบาๆให้สปอร์เข้ากันกับหยดสาร พักไว้
 3-5 นาทีให้สารหนืดค่อยๆปล่อยกระຈกปิดสไลด์จากเข็มเขี่ยลงบนหยดสาร ระวังอย่าให้เกิด
 ฟองอากาศอยู่ภายใต้กระຈกปิดสไลด์ ใช้ปลายเข็มเขี่ยกดกระຈกปิดสไลด์ตรงตำแหน่งที่มีสปอร์
 อยู่เบาๆ ให้สปอร์แตกอ้าออกเพื่อง่ายต่อการตรวจสอบลักษณะของสปอร์ เช่น สารภายในสปอร์
 และจำนวนกลุ่มของผนังสปอร์ เป็นต้น นำแผ่นสไลด์ไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์
 ประกอบตรวจสอบการเจริญของเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซาในรากพืช

3.1.2.4 วิธีการตรวจสอบใช้วิธีการย้อมรากด้วยสีย้อม Trypan blue (Modified Brundrett *et al.*, 1996)

นำตัวอย่างรากของต้นยูคาลิปตัสจากแหล่งศึกษาจำนวน 5 แหล่ง มาล้างด้วยน้ำเปล่า
 แล้วตัดเป็นท่อนเล็ก ๆ ขนาด 2-4 เซนติเมตร ลงในขวดแก้ว จากนั้น เติม 10% โพแทสเซียมไฮ
 ดรอกไซด์ (KOH) แช่ไว้ข้ามคืนหรือต้มที่ 90°C นาน 1 ชั่วโมง ขึ้นกับลักษณะของรากพืช หรือ
 นำไปเข้าหม้อนึ่งอัดไ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที ล้างรากด้วยน้ำเปล่า แล้ว
 เติมสีย้อม 0.05% ทริปแพนบลู (Trypan Blue) ให้ท่วมราก แช่ไว้ข้ามคืนหรือนานกว่าขึ้นกับ
 ลักษณะของรากพืช หรือนำไปเข้าหม้อนึ่งอัดไ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที
 นำรากไปตรวจสอบโครงสร้างของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ
 เลนส์ประกอบ โดยหยดน้ำกลั่น 1 หยดลงบนสไลด์ สุ่มเลือกตัวอย่างรากที่ย้อมเสร็จเรียบร้อยแล้ว
 แล้วมาวางบนสไลด์ที่มีน้ำเปล่า ตัดรากให้มีขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด
 สไลด์ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ หาดำแหน่งปลายรากโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 40
 เท่า (เลนส์ตา 10 เท่า x เลนส์วัตถุ 4 เท่า) ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเข้ารากโดยใช้กล้องจุลทรรศน์
 ที่มีกำลังขยาย 100 เท่า (เลนส์ตา 10 เท่า x เลนส์วัตถุ 10 เท่า) จากการนับภาพโครงสร้างของ
 เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น เวสิเคิล อาร์บัสคูล หรือเส้น
 ไย ส่วนที่เป็นเชื้อราจะติดสีฟ้า เนื้อเยื่อรากจะไม่ติดสีดังภาพ 6



ภาพ 6 แสดงตัวอย่างการนับโครงสร้างของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์

วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้ารากพืชของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การปรากฏโครงสร้างของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากขนาด 1 ซม. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้วิธีการนับโครงสร้างของเชื้อราที่พบ คือ 1=พบ และ 0=ไม่พบ นำค่าทั้งหมดมาคำนวณด้วยสมการ

% การเข้ารากพืช = $\frac{\text{จำนวนพื้นที่ใต้กล้องจุลทรรศน์ที่พบโครงสร้างของเชื้อราในราก} \times 100}{\text{จำนวนพื้นที่ใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้งหมดของราก}}$

จำนวนพื้นที่ใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้งหมดของราก

3.2 ผลผลิตหัวเชื้อจากสายพันธุ์ไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกแล้ว

3.2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเห็ดกรวดและเห็ดลูกฟุ้ง

3.2.1.1 การศึกษาผลของอาหารต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้งในห้องปฏิบัติการ

อาหารเลี้ยงเชื้อ 10 ชนิด ได้แก่ Amonium choloride glucose (AM) agar (Xu *et al.*, 2008), fungal-host (FH) agar (Vaario *et al.*, 1999), Heli (HI) medium (Xu *et al.*, 2008), modified Hagem's (HG) medium (McLaughlin, 1970), modified Melin-Norkans (MMN) medium (Langer *et al.*, 2008), G-MMN medium (Gafur *et al.*, 2004), L-MMN medium (Guerin-Laguette *et al.*, 2000), modified Murashige and Skoog (MS) medium (Guerin-Laguette *et al.*, 2000), malt extract (MEA) agar (Kumla *et al.*, 2011), และ modified SH (SH) medium (Guerin-Laguette *et al.*, 2000) อาหารแข็งที่นำมาใช้ทดลองปรับ pH 6.0 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH (ภาคผนวก)

นำกระดาษเซลโลเฟนที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วางบนผิวหน้าอาหารทดสอบ (De Araújo and Roussos, 2002) ในข้อ 3.2.1 ตัดชิ้นส่วนเส้นใยบริสุทธิ์ด้วยปลาย Pasture pipet Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตรที่ฆ่าเชื้อแล้ว วางบนอาหารที่ต้องการทดสอบ บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียสในที่มืด วัดการเจริญเติบโตโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี และวัดน้ำหนักแห้งของเส้นใย โดยนำเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดกรวดและเห็ดลูกฟุ้ง อบด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วนำมาชั่ง

3.2.1.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้งในห้องปฏิบัติการ ทำโดยเลือก อาหารที่เส้นใย เห็ดกรวดและเห็ดลูกฟุ้งเจริญได้ดีที่สุดที่ศึกษาจากข้อ 3.2.1 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียสในที่มืด วัดการเจริญเติบโตโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและวัดน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ด

3.2.1.3 การศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้งในห้องปฏิบัติการ อาหารรุ่นที่นำมาใช้ศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้งจากข้อ 3.2.1 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 โดยเตรียมอาหารเห็ดอาหารในจานเลี้ยงเชื้อและทำการปลูกเชื้อเช่นเดียวกับในข้อ 3.2.1 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในที่มืด วัดการเจริญโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี และวัดน้ำหนักแห้ง ของเส้นใยเห็ด

3.2.1.4 นำข้อมูลมาวิเคราะห์แบบ one-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 16.0) สำหรับ window และใช้ Turkey's test เพื่อบ่งบอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลอง ที่ $P < 0.05$

3.2.2 การศึกษาการผลิตหัวเชื้อเห็ดกรวด (*Pisolithus* spp.) และเห็ดลูกฟุ้ง (*Scleroderma* sp.) บริสุทธิ์

3.2.2.1 วัสดุที่เลือกใช้ในการผลิตหัวเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้ง คือ เวอร์มิคูไลท์ : พีท (1:1 v/v) ผสมกับอาหารเหลวที่เหมาะสมของเชื้อเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้ง คือ อาหาร MMN medium และ FH medium ตามลำดับ ในอัตราส่วน (50: 200 v/v) ใส่ลงในขวด

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 250 มิลลิลิตร (Lee *et al.*, 2008) ศึกษาจากข้อ 3.2 จากนั้นนำไปหมักเชื้อด้วยหม้อความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.2.2.2 ตัดชิ้นส่วนของเส้นใยเห็ดกรวดที่เจริญบนอาหารวัน MMN medium และเส้นใยเห็ดลูกฟุ้งที่เลี้ยงบนอาหาร FH medium อายุ 20 วัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร จำนวน 3 ชิ้นใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.2.1 บ่มไว้ในที่มืด รอจนเชื้อเจริญเต็มขวด แล้วนำไปทดสอบความสัมพันธ์ของเอนโดไมคอร์ไรซาในห้องปฏิบัติการ และในสภาพโรงเรือน

3.2.3 การเพิ่มจำนวนสปอร์ของเวสิคูลาร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยวิธี Trap culture

นำดินตัวอย่างที่มีหัวเชื้อสปอร์เอนโดไมคอร์ไรซาจากสถานที่ต่างๆทั้งหมด 5 แห่ง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินแต่ละแห่ง 2 ข้ว เพื่อนำมาเป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเอนโดไมคอร์ไรซาโดยใช้พีชอาศัย คือ ยูคาลิปตัส นำถุงพลาสติกใสที่เจาะรูแล้วเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำขัง รองลงไปในกระถางที่เตรียมไว้ ซึ่งเป็นกระถางที่มีการระบายออกของน้ำ การปลูกต้นกล้ายูคาลิปตัสจะใช้กระถางพลาสติกขนาด 8 นิ้ว เตรียมวัสดุปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ดิน:ทรายอัตราส่วน 1:1) ลงไปในกระถาง โดยใช้วัสดุปลูก 2 กิโลกรัมต่อกระถาง จากนั้นใช้น้ำกวดผิวหน้าของวัสดุปลูกให้เป็นหลุมตรงกลาง 1 หลุม ใส่ดินตัวอย่างที่มีหัวเชื้อปริมาณ 200 กรัมลงไปในหลุม นำต้นกล้ายูคาลิปตัสใส่ลงไป กลบดินบริเวณด้านข้างมาปิดหลุมเบาๆ พรมน้ำให้ต้นกล้าเล็กน้อย

การดูแลรักษาและการให้ปุ๋ย จะรดน้ำพีชอาศัยทุกวัน ให้ปริมาณน้ำในดินอยู่ในระดับ field capacity เพื่อป้องกันน้ำขัง และให้ปุ๋ยสูตร Modified Hoagland's Nutrient Solution (Gamborg and Wetter, 1975) ทุก 7 วัน เมื่อครบอายุการเก็บเกี่ยวคือหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 เดือน จึงนำที่ดินปลูกมาแยกสปอร์ของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดิน (Modified Brundrett *et al.*, 1996) วิธีการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.1.2 แล้วนับจำนวนสปอร์ที่เพิ่มขึ้นต่อดินปลูก 100 กรัมในแต่ละชุดการทดลอง นำข้อมูลมาวิเคราะห์แบบ one-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 11.5) สำหรับ window และใช้ Turkey's test เพื่อป้องกันความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลอง ที่ $P < 0.05$

3.3 วิธีที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อให้กับกล้ายูคาลิปตัสที่ผลิตเป็นการค้า

3.3.1 การศึกษาความสัมพันธ์ของเห็ดกรวดและเห็ดลูกฟุ้งกับยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camadulensis*) ในห้องปฏิบัติการ

3.3.1.1 การเตรียมเมล็ดยูคาลิปตัสคัดเลือกเมล็ดที่นำมาใช้ในการทดสอบ จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดโดยแช่ใน ethanol 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นฆ่าเชื้อด้วย hydrogen peroxide 2 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 6 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครึ่ง

ละ 3 นาที (Brundrett *et al.*, 1996) จากนั้นย้ายเมล็ดที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนอาหาร water agar 1.5 เปอร์เซ็นต์ บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร เมื่อต้นกล้าอายุ 25 วัน ย้ายต้นกล้า ลงปลูกบนหัวเชื้อที่เตรียมไว้อายุ 3 เดือนในสภาพปลอดเชื้อนำไปบ่มที่ตู้ growth chamber อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ใช้แสงสว่าง 1500 ลักซ์ 12 ชั่วโมงต่อวัน ความชื้นสัมพัทธ์ 70 ± 5 เปอร์เซ็นต์

3.3.1.2 ตรวจสอบการเข้ากันระหว่างต้นยูคาลิปตัสกับเชื้อเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้ง ด้วยการเก็บรากของต้นยูคาลิปตัสมาตัดบางตามขวาง สังเกตการสร้าง mentle sheets บริเวณรอบๆ รากและการเข้ารากของเส้นใยเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้งที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์พืช ด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบและกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Guerin-Laguette *et al.*, 2000) ตรวจสอบการเข้าราก เป็นระยะเวลา 1 ปี

3.3.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของเห็ดกรวด (*Pisolithus* spp.) และเห็ดลูกฟุ้ง (*Scleroderma* sp.) ในสภาวะโรงเรือน

3.3.2.1 สถานที่ทำการทดลอง โรงเรือนภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

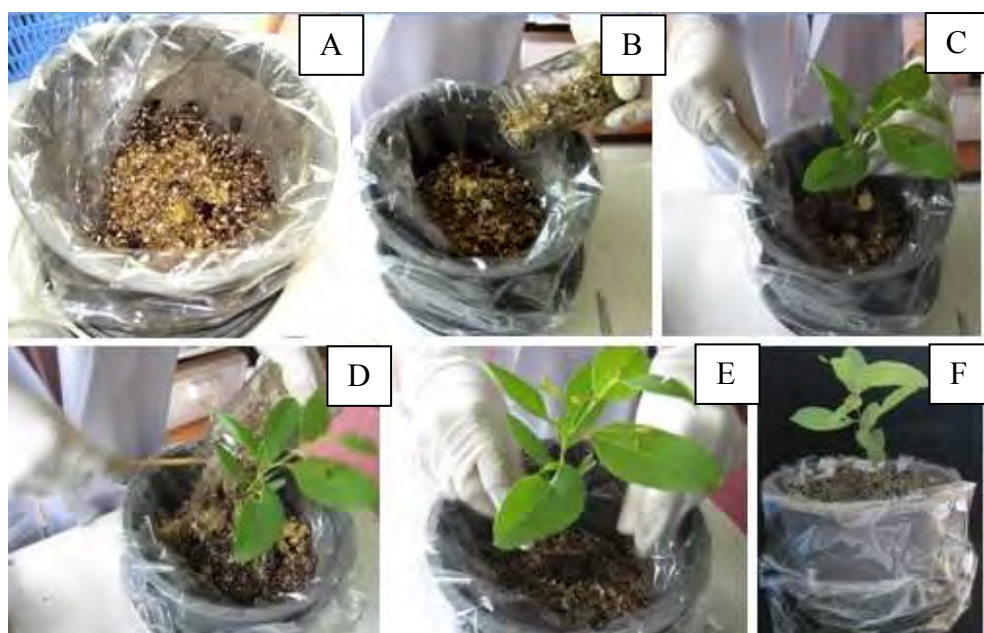
1) ต้นกล้ายูคาลิปตัส (*Eucalyptus camadulensis*) ได้จากโรงเพาะกล้าไม้ของเกษตรกรอำเภอนางรอง จังหวัดบุรีรัมย์ ต้นกล้าที่นำมาศึกษามีอายุ 2 เดือน สูง 25 เซนติเมตร

2) ใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ข้อ 3.3 ที่เจริญเต็มขวด ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อจากหัวเชื้อด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้ง

3) การเตรียมวัสดุปลูก วัสดุที่ใช้คือ ดินผสมทราย ซึ่งได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 3 รอบ ทิ้งไว้ให้เย็น เตรียมต้นกล้า อายุ 2 เดือนปลูกลงในชุดควบคุม ที่ไม่มีการปลูกเชื้อ และทำการปลูกเชื้อเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้งให้กับต้นกล้ายูคาลิปตัสในกระถางสูง 4 นิ้ว กว้าง 6 นิ้ว โดยรองก้นกระถางด้วยหัวเชื้อประมาณ 25 กรัม ปลูกต้นกล้ายูคาลิปตัสลงไป 1 ต้นกล้า/กระถาง กลบปิดด้วยวัสดุปลูกที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว (ภาพ 7)

4) การดูแลรักษากล้าไม้ รดน้ำกล้าไม้ตลอดการทดลองซึ่งการทดลองอยู่ในสภาวะโรงเรือน ระยะเวลาในการศึกษา จากเดือนสิงหาคม 2554 ถึงเดือนสิงหาคม 2555

5) ตรวจสอบการเข้ากันระหว่างต้นยูคาลิปตัสกับเชื้อเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้ง ด้วยการเก็บรากของต้นยูคาลิปตัสมาทำการทดลอง ตรวจการเข้ารากด้วยกล้องจุลทรรศน์ทุกเดือน เป็นเวลา 1 ปี และสังเกตการสร้าง mentle sheets และ Hartig net โดยการตัดตามขวาง และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ และ กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Guerin-Laguette *et al.*, 2000) และวัดความสูงของต้นยูคาลิปตัส



ภาพ 7 ขั้นตอนการปลูกเชื้อเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้งให้กับพืช

(A) รองกันกระถางด้วยวัสดุปลูก

(B) รองกันกระถางด้วยหัวเชื้อประมาณ 25 กรัม ต่อกระถาง

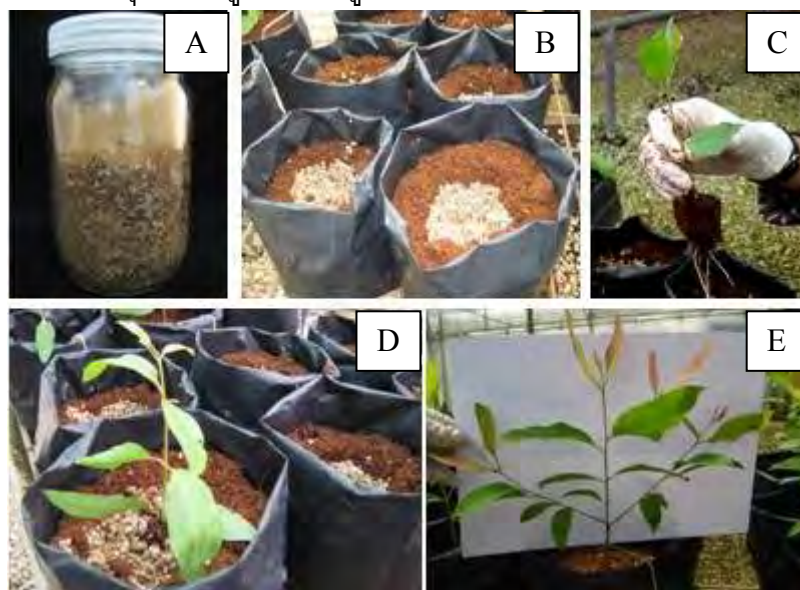
(C, D, E, F) ปลูกกล้าไม้ และรดน้ำ

3.3.2.2 สถานที่ทำการทดลอง โรงเรือนบริษัทรีเทค จังหวัดปราจีนบุรี

1) หัวเชื้อบริสุทธิ์เอคโตไมคอร์ไรซาที่เจริญเต็มขวด ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อจากหัวเชื้อด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง

2) การเตรียมวัสดุปลูกที่ใช้เพาะกับเชื้อบริสุทธิ์ได้แก่ ขุยมะพร้าว และที่ใช้วัสดุปลูกกับหัวเชื้อสดเป็น ขุยมะพร้าว: ปุ๋ยหมัก: ทราาย ในอัตราส่วน 1: 2: 1 ซึ่งได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 3 รอบ ทิ้งไว้ให้เย็น เตรียมต้นกล้าสายพันธุ์ลูกผสมที่พัฒนาแล้วใช้ผลิตเป็นการค้า ได้แก่ สายพันธุ์ K7 และ PT 48 กิ่งปักชำอายุ 2 เดือน เตรียมต้นกล้า อายุ 2 เดือนปลูกลงในชุดควบคุม ที่ไม่มีการปลูกเชื้อ และทำการปลูกเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซา และอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ให้กับต้นยูคาลิปตัส สายพันธุ์ K7 และ PT 48 ดังภาพ 8 เพื่อศึกษาผลของการปลูกเชื้อร่วมต่อการเจริญเติบโตของยูคาลิปตัส ได้ทำการปลูกเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซาสองสายพันธุ์คือ *Pisolithus albus* และ *Scleroderma sinnamariense* ในรูปแบบแบบเส้นใยในเวอร์มิคูไลต์ และสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ทดสอบการปลูกเชื้อร่วมกัน วิธีปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา คือ ใส่ต้นกล้ายูคาลิปตัสลงในหลุม ใช้ปากคีบคีบเอากระดากทรงที่มีสปอร์เอคโตไมคอร์ไรซา นำมาแตะกับรากของต้นกล้า ใช้น้ำกลั่นชะสปอร์และกระดากทรงให้ตกไปที่ก้นหลุม กลบดินด้านข้างมาปิดหลุมเบาๆ พรมน้ำให้ต้นกล้า

เล็กน้อย ส่วนหัวเชื้อสดของเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซา ใช้วิธีการคลุกเชื้อสดกับวัสดุปลูกประมาณ 100 กรัม ต่อถุงก่อนปลูกลงในถาดเพาะกล้าต่อไป (ภาพ 9)

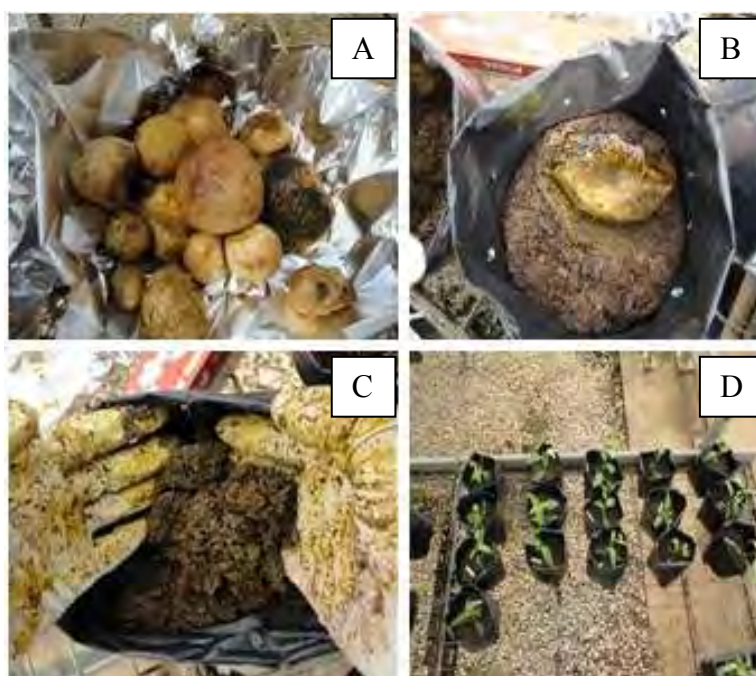


ภาพ 8 ขั้นตอนการปลูกเชื้อบริสุทธิ์ ให้กับต้นกล้ายูคาลิปตัส

(A) หัวเชื้อบริสุทธิ์

(A) รองกันกระถางด้วยหัวเชื้อประมาณ 25 กรัม ต่อกระถาง

(C, D, E) ปลูกกล้าไม้ และรดน้ำ



ภาพ 9 ขั้นตอนการปลูกเชื้อสด ให้กับต้นกล้ายูคาลิปตัส

(A) เชื้อสด

(A, C) คลุกเชื้อสดกับวัสดุปลูกประมาณ 100 กรัม ต่อถุง

(D) ปลุกกล้าไม้ และรดน้ำ

3) การดูแลรักษาต้นไม้ รดน้ำกล้าไม้ตลอดการทดลอง ระยะเวลาในการศึกษา จากเดือนกรกฎาคม 2553 - เดือนสิงหาคม 2554

4) ตรวจสอบการเข้ากันระหว่างต้นยูคาลิปตัสกับเชื้อเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้ง ด้วยการเก็บรากของต้นยูคาลิปตัสมาตัดบางตามขวาง สังเกตการสร้าง mycelium sheets บริเวณรอบๆ รากและการเข้ารากของเส้นใยเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้งที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์พืช ด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบและกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Guerin-Laguette *et al.*, 2000) ตรวจสอบการเข้าราก เป็นระยะเวลา 1 ปี

3.3.3 การตอบสนองด้านการเจริญของต้นกล้ายูคาลิปตัสต่อการปลูกเชื้อเอนโดไมคอร์ไรซา

3.3.3.1 การตอบสนองด้านการเจริญของต้นกล้ายูคาลิปตัสที่เพาะจากเมล็ดต่อการปลูกเชื้อเอนโดไมคอร์ไรซา ในโรงเรือนคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การปลูกสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับพืชอาศัย

นำถุงพลาสติกใสที่เจาะรูแล้วเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำขัง รองลงไปบนกระถางที่เตรียมไว้ ซึ่งเป็นกระถางที่มีการระบายออกของน้ำ การปลูกต้นกล้ายูคาลิปตัสจะใช้กระถางพลาสติกขนาด 8 นิ้ว เตรียมวัสดุปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ดิน:ทราย อัตราส่วน 1:1) ลงไปในกระถาง โดยใช้วัสดุปลูก 2 กิโลกรัมต่อกระถาง จากนั้นใช้นิ้วกดผิวหน้าของวัสดุปลูกในกระถางให้เป็นหลุมตรงกลาง 1 หลุม ใส่ต้นกล้ายูคาลิปตัสลงไป 1 หลุม ใช้ปากคืบ คืบเอากระดาดทรงที่มีสปอร์เอนโดไมคอร์ไรซา นำมาแตะกับรากของต้นกล้า ใช้น้ำกลั่นชะสปอร์และกระดาดทรงให้ตกไปที่ก้นหลุม กลบดินด้านข้างมาปิดหลุมเบาๆ พรมน้ำให้ต้นกล้าเล็กน้อย

การดูแลรักษาและการให้ปุ๋ย จะรดน้ำพืชอาศัยทุกวัน ให้ปริมาณน้ำในดินอยู่ในระดับ field capacity เพื่อป้องกันน้ำขัง และให้ปุ๋ยสูตร Modified Hoagland's Nutrient Solution (Gamborg and Wetter, 1975) ทุก 7 วันการวัดการเจริญของพืชและตรวจสอบการเจริญของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เมื่อครบอายุหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 เดือนจะทำการวัดความสูง ซึ่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้นเหนือดิน และตรวจสอบการเจริญของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากต้นยูคาลิปตัสโดยการหาเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่อาก ดังวิธีการทดลอง 3.6.1 ข้อ 4 นำข้อมูลมาวิเคราะห์แบบ one-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 11.5) สำหรับ window และใช้ Turkey's test เพื่อป้องกันความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลอง ที่ $P < 0.05$

3.4 งานวิจัยที่ได้รับมอบหมายเพิ่มเติมจากทางบริษัท

3.4.1 การศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสต่อการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

สืบเนื่องจากปัญหาการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสปริมาณมากในโรงเรือน อาจมีผลให้อัตราการเข้าสู่รากของไมคอร์ไรซาลดลง ทางบริษัทจึงเสนอให้ศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของผลของการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการเข้าสู่รากของไมคอร์ไรซา ความเข้มข้นที่เลือกใช้คือ

1. 1X
2. 0.75X
3. 0.5X
4. 0.25X
5. ไม่รดปุ๋ย

โดยปุ๋ยดังกล่าวเตรียมจากปุ๋ยสูตร 20-20-20 และ 6-32-32 อัตราส่วน 1:1 ให้ปุ๋ยสัปดาห์ละ 1 ครั้ง วิธีการปลูกเชื้อทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 โดยใช้วัสดุปลูกเป็น ทราย: ขุยมะพร้าว: ปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 1:2:1 เมื่อครบอายุ 3 เดือนหลังการปลูกเชื้อ ทำการเก็บผลความสูงของลำต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้นและราก รวมถึงหาอัตราการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา นำข้อมูลมาวิเคราะห์แบบ one-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 11.5) สำหรับ window และใช้ Turkey's test เพื่อป้องกันความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลอง ที่ $P < 0.05$

3.4.2 การศึกษาความหลากหลายของเโคโตไมคอร์ไรซาในแปลงปลูกต่างๆของทางบริษัท

สืบเนื่องจากทางบริษัทต้องการทราบว่า ในสภาวะแวดล้อมทั่วไปของแปลงปลูก มีความหลากหลายเห็ดราเโคโตไมคอร์ไรซาอยู่มากน้อยเพียงใด ทางบริษัทจึงเสนอให้ศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องนี้ โดยการเก็บตัวอย่างดินเพื่อวิเคราะห์ธาตุอาหาร เห็ดราเโคโตไมคอร์ไรซาและรากยูคาลิปตัสจากแปลงปลูกต่างๆ ดังนี้

1. ทำตุ้ม แปลง 1
2. ทำตุ้ม แปลง 2
3. แปลงคลองเขียว 1
4. แปลงลิขสิทธิ์ 1

3.4.3 การถ่ายทอดวิทยาการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซาและการเพาะเลี้ยงแก่พนักงานบริษัท ตรีเทค จำกัด

กิจกรรมที่ทางบริษัทขอความร่วมมือให้นักวิจัยบรรยายให้ความรู้แก่พนักงานในส่วนงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตต้นกล้า บรรยายใน 2 หัวข้อคือ

1. การประยุกต์ใช้หัวเชื้อเอดโตไมคอร์ไรซาในการผลิตต้นกล้วยคาลิปัตส์
2. การประยุกต์ใช้หัวเชื้อเอนโดไมคอร์ไรซาในการผลิตต้นกล้วยคาลิปัตส์

เนื้อหาประกอบด้วยประโยชน์ของไมคอร์ไรซา ขั้นตอนการแยกเชื้อไมคอร์ไรซา การเตรียมหัวเชื้อเพื่อการประยุกต์ใช้ในรูปแบบต่างๆ และผลการทดลองบางส่วนที่ได้นำมา ยกตัวอย่างในการบรรยาย (ภาพ 10)



ภาพ 10 การบรรยายให้ความรู้แก่เจ้าหน้าที่ส่วนงานการใช้หัวเชื้อร่วมในกระบวนการผลิตต้นกล้วย แก่พนักงานและนักวิชาการบริษัท ทรีเทค จำกัด

4. ผลการวิจัย

4.1 หาชนิด ECM และ AM ที่เหมาะสมในการช่วยการเจริญของกล้วยคาลิปัตส์จากสายพันธุ์ที่ปลูก เป็นการค้าในประเทศไทย ซึ่งเป็นกล้วยที่ผลิตจากการปักชำและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

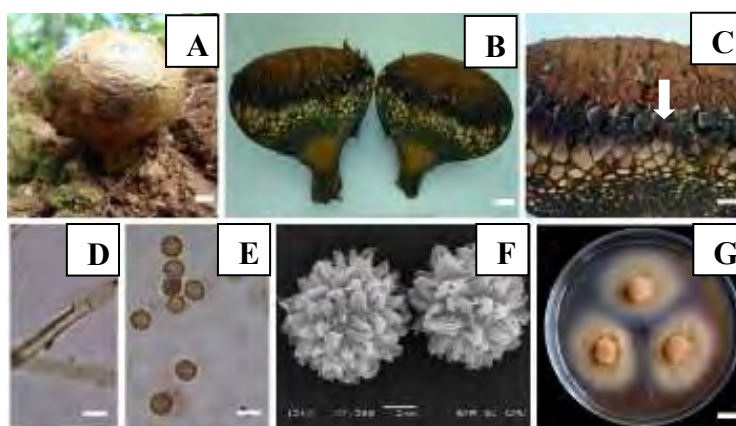
4.1.1 การเก็บตัวอย่างเห็ดเอดโตไมคอร์ไรซาจำเพาะกับต้นกล้วยคาลิปัตส์: เห็ดกรวดและเห็ดลูกฝุ่น

ตัวอย่างของเห็ดกรวดและเห็ดลูกฝุ่นที่เก็บในช่วงระหว่างเดือน พฤษภาคม ถึง กรกฎาคม 2553 จำนวน 11 ตัวอย่าง จำแนกและบ่งบอกชนิดได้ดังตาราง 1 โดยเป็นเห็ดกรวด *Pisolithus albus* (Bougher and Syne, 1998) จำนวน 7 ไอโซเลต เห็ดกรวด *Pisolithus orientalis* (Phosri et al., 2012) จำนวน 3 ไอโซเลต และเห็ดลูกฝุ่น *Scleroderma*

sinnamariense (Guzmán, 1970) จำนวน 1 ไอโซเลต ลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดกรวด และเห็ดลูกฝุ่นที่เก็บได้มีดังนี้

1. *Pisolithus orientalis*

ดอกเห็ดมีลักษณะทรงกลม สีน้ำตาลปนเหลือง ผิวขรุขระ ขนาดกว้าง 4.8-5.5 เซนติเมตร ยาว 4.2-5.0 เซนติเมตร สูงจากพื้น 1.5-2.0 เซนติเมตร (ภาพ 11A-11C) พบ clamp connection (ภาพ 11D) สปอร์มีสีน้ำตาล รูปร่างกลม ผนังสปอร์ขรุขระ คล้ายหนามเป็นกลุ่ม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.88-8.82 ไมโครเมตร (ภาพ 11E, 11F) เส้นใยบริสุทธิ์ของเชื้อมีสีเหลืองน้ำตาลเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA (ภาพ 11D) ไอโซเลตที่บ่งบอกชนิดเป็น *P. orientalis* คือไอโซเลต CMU001, CMU006 และ CMU010 ซึ่งทั้งหมดพบในพื้นที่ปลูกต้น *Pinus kesiya* และ *Cinchona pubescens*



ภาพ 11 สัณฐานวิทยาของดอกเห็ด *Pisolithus orientalis*

(A) รูปร่างดอกเห็ดในธรรมชาติ

(B) ดอกเห็ด *Pisolithus orientalis* ผ่าครึ่ง

(C) ลักษณะสปอร์สีน้ำตาล (ลูกศร)

(D) เส้นใยบริสุทธิ์

(E) ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้อง compound microscope

(F) ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้อง SEM

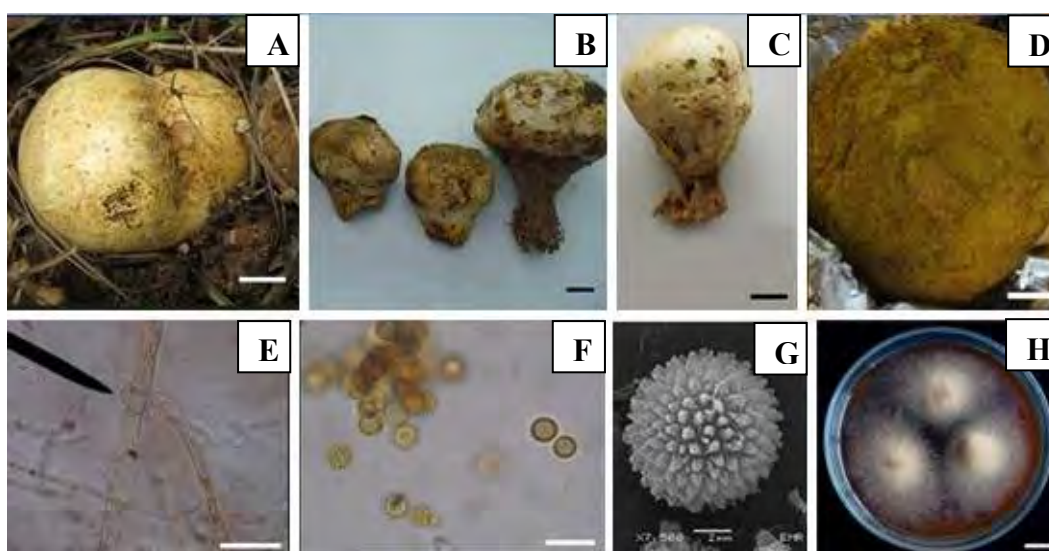
(G) เส้นใยบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร PDA

Bar A, B, C= 40 มิลลิเมตร, D= 3 ไมโครเมตร, E= 5 ไมโครเมตร, F=3 ไมโครเมตร, G= 4 เซนติเมตร

2. *Pisolithus albus*

ดอกเห็ดมีลักษณะทรงกลม สีเหลือง ผิวขรุขระ ขนาดกว้าง 4.0-11.5 เซนติเมตร ยาว 4.2-5.2 เซนติเมตร สูงจากพื้น 1.5-5.3 เซนติเมตร (ภาพ 12A-12D) พบ clamp connection (ภาพ 12E) สปอร์มีสีเขียวยาวรี รูปร่างกลม ผนังสปอร์ขรุขระ คล้ายหนาม ขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.42-9.31 ไมโครเมตร (ภาพ 12F-12G) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเส้นใยสีเหลือง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA (ภาพ 12H) ไอโซเลตที่บ่งบอกชนิดเป็น *P. albus* คือไอโซเลต CMU002, CMU003, CMU004, CMU 005, CMU007, CMU008 และ CMU009 ซึ่งทั้งหมดพบในพื้นที่ปลูกต้น *Eucalyptus camadulensis*



ภาพ 12 ลักษณะวิทยา ของดอกเห็ด *Pisolithus albus*

(A-C) รูปร่างดอกเห็ด

(D) ลักษณะสปอร์สีเขียวขี้ม้า

(E) ลักษณะเส้นใยแสดง Clamp connection (ปลายเข็มชี้) ภายใต้ กล้อง compound microscope

(F) ลักษณะเส้นใยบริสุทธิ์ ของสปอร์ภายใต้กล้อง compound microscope

(G) ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้อง SEM

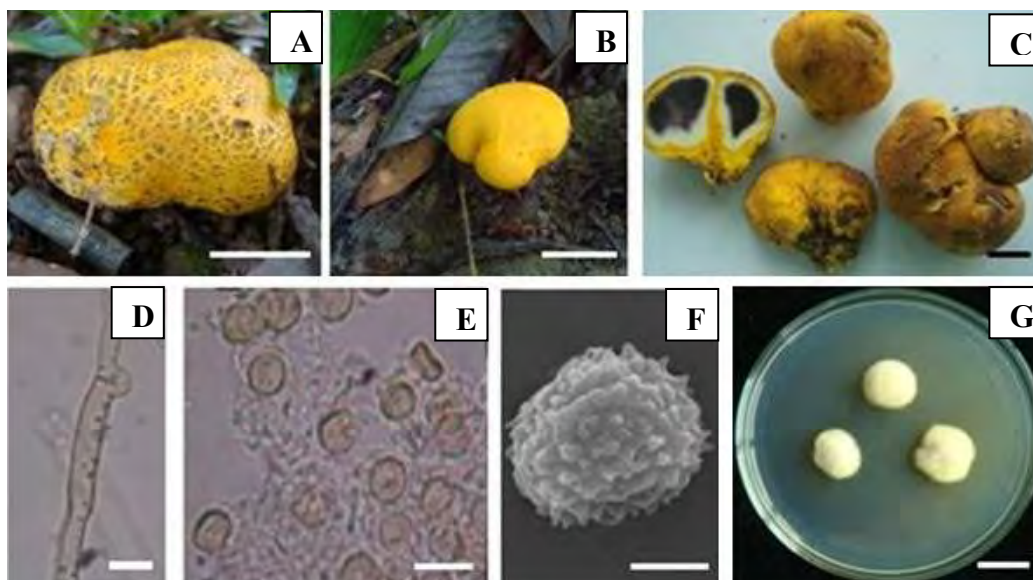
(H) เส้นใยบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร PDA

Bar A, B, C = 50 มิลลิเมตร, D = 70 มิลลิเมตร, E= 2.5 ไมโครเมตร, F=4 ไมโครเมตร, G= 4.5 ไมโครเมตร, H= 5 เซนติเมตร

3. *Scleroderma sinnamariense*

ดอกเห็ดส่วนใหญ่มีลักษณะทรงกลม สีเหลือง ผิวขรุขระ ขนาดกว้าง 2.1-6.4 เซนติเมตร สูง 2.0-5.0 เซนติเมตร สูงจากพื้น 1.0-2.0 เซนติเมตร (ภาพ 13A-13C) พบ clamp connection (ภาพ 13D) สปอร์มีรูปร่างกลม สปอร์มีสีน้ำตาลเข้มปนดำ ผิวขรุขระ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.18-6.15 ไมโครเมตร ผิวเห็นเป็นกลุ่มเมื่อดูด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบฉายกราด (SEM) (ภาพ 13F) เส้นใยบริสุทธิ์ของเชื้อมีสีเหลืองอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA

(ภาพ 13G) ไอโซเลตที่บ่งบอกชนิดเป็น *S. sinnamariense* คือไอโซเลต CMUSC001 พบในพื้นที่ปลูกต้นอบเชย *Cinnamomum bejolghota*



ภาพ 13 ลักษณะวิทยา ของดอกเห็ด *Scleroderma sinnamariense*

(A- B) รูปร่างดอกเห็ด

(C) ลักษณะดอกเห็ดผ่าครึ่งแสดงกลุ่มสปอร์สีน้ำตาลดำ

(D) ลักษณะเส้นใยแสดง Clamp connection ภายใต้อกล้อง compound microscope

(E) ลักษณะของสปอร์ภายใต้อกล้อง compound microscope

(F) ลักษณะของสปอร์ภายใต้อกล้อง SEM

(G) เส้นใยบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร PDA

Bar A, B, C = 20 มิลลิเมตร, D = 3 ไมโครเมตร, E= 3 ไมโครเมตร, F=2 ไมโครเมตร, G= 2.5 เซนติเมตร

ตาราง 1 สถานที่เก็บ พืชอาศัย สีสปอร์ และการบ่งบอกชนิดของ เห็ดกรวด และเห็ดลูกฟูก

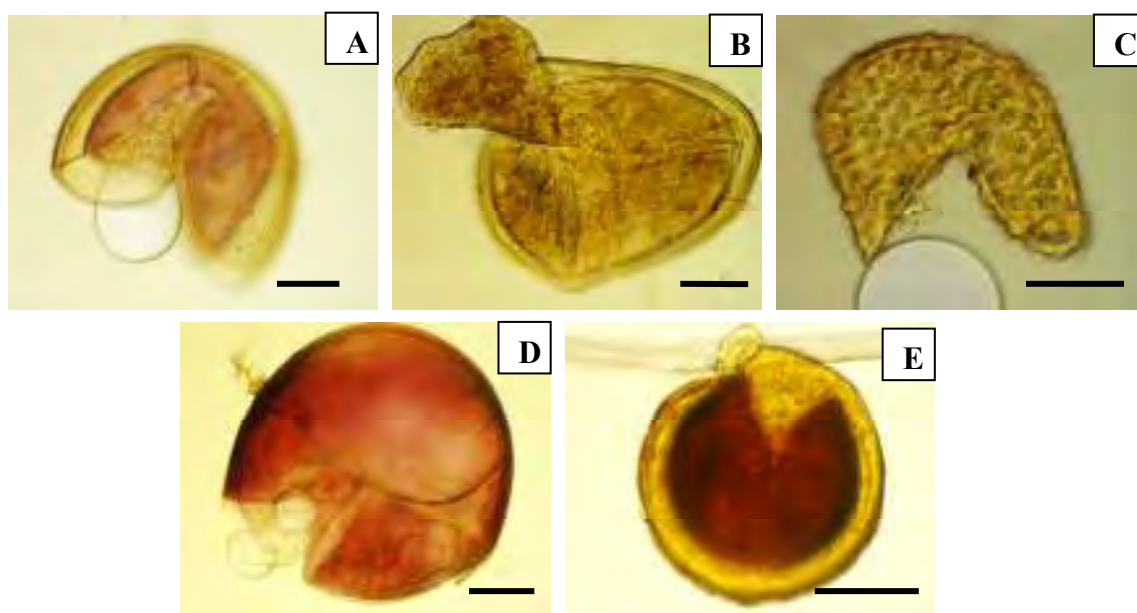
ไอโซเลต	สถานที่เก็บ	พืชอาศัย	สีของสปอร์	การบ่งบอกชนิด โดยลักษณะ สัณฐานวิทยา
CMU001	ดอยสุเทพ-ปุย จังหวัด เชียงใหม่	<i>Cinchona pubescens</i>	สีน้ำตาล	<i>Pisolithus orientalis</i>
CMU002	อำเภอหางดง จังหวัด เชียงใหม่	<i>Eucalyptus camadulensis</i>	สีเขียวขี้ม้า	<i>Pisolithus albus</i>
CMU003	อำเภอเมือง จังหวัด เชียงใหม่	<i>Eucalyptus camadulensis</i>	สีเขียวขี้ม้า	<i>Pisolithus albus</i>
CMU004	อำเภอเมือง จังหวัด เชียงใหม่	<i>Eucalyptus camadulensis</i>	สีเขียวขี้ม้า	<i>Pisolithus albus</i>
CMU005	อำเภอแม่วาง จังหวัด เชียงใหม่	<i>Eucalyptus camadulensis</i>	สีเขียวขี้ม้า	<i>Pisolithus albus</i>
CMU006	ดอยสุเทพ-ปุย จังหวัด เชียงใหม่	<i>Pinus kesiya</i>	สีน้ำตาล	<i>Pisolithus orientalis</i>
CMU007	อำเภอเมือง จังหวัด เชียงใหม่	<i>Eucalyptus camadulensis</i>	สีเขียวขี้ม้า	<i>Pisolithus albus</i>
CMU008	อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย	<i>Eucalyptus camadulensis</i>	สีเขียวขี้ม้า	<i>Pisolithus albus</i>
CMU009	อำเภอเมือง จังหวัด เชียงใหม่	<i>Eucalyptus camadulensis</i>	สีเขียวขี้ม้า	<i>Pisolithus albus</i>
CMU010	อำเภอแม่ออน จังหวัด เชียงใหม่	<i>Pinus kesiya</i>	สีน้ำตาล	<i>Pisolithus orientalis</i>
CMUSC 001	ดอยสุเทพ-ปุย จังหวัด เชียงใหม่	<i>Cinnamomum bejolghota</i>	สีน้ำตาล เข้ม	<i>Scleroderma sinnamariense</i>

4.1.2 การเก็บตัวอย่างสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซารอบรากต้นยูคาลิปตัส

จากการสำรวจจำนวนและชนิดของไมคอร์ไรซาจากดินรอบรากต้นยูคาลิปตัสในพื้นที่ อ. สบปราบ จ. ลำปาง และ อ. ศรีมหาโพธิ์ จ. ปราจีนบุรี พบว่าดินจาก อ. สบปราบ (สวนนายต๊ีบ) มีจำนวนสปอร์ไมคอร์ไรซามากที่สุด ในขณะที่ดินตัวอย่างจาก อ. ศรีมหาโพธิ์ มีน้อยกว่าดินจากอ. สบปราบ และชนิดของไมคอร์ไรซาของทั้งสองพื้นที่นั้นแตกต่างกัน ตัวอย่างดินจาก อ. สบปราบมีความหลากหลายของไมคอร์ไรซามากกว่าซึ่งพบไมคอร์ไรซาชนิดเด่นถึง 3 ชนิด ได้แก่ *A. spinosa*, *Acaulospora* sp. และ *Gi. pellucida* ในขณะที่ อ. ศรีมหาโพธิ์พบเพียง 2 ชนิด และทั้งสองชนิดนั้นอยู่ในจีนัสเดียวกัน ได้แก่ *A. mellae* และ *A. scrobiculata* (ภาพ 14) แต่อย่างไรก็ตามจีนัส *Acaulospora* ก็พบในทั้งสองพื้นที่ เป็นไปได้ว่าไมคอร์ไรซาในตระกูลนี้มีช่วงการเจริญเติบโตที่กว้างหรือทนต่อสภาวะแวดล้อมได้หลากหลาย ในขณะที่ไมคอร์ไรซาในจีนัส *Gigaspora* นั้นมีความจำเพาะเจาะจงในการเจริญ ณ สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมเท่านั้น และสภาพแวดล้อม ภูมิอากาศ และภูมิประเทศที่แตกต่างกันมีผลต่อชนิดและจำนวนของไมคอร์ไรซา ซึ่งจะได้ทำการเพิ่มจำนวนของไมคอร์ไรซาดังกล่าวโดยหาสภาวะที่เหมาะสมและทดสอบผลต่อการเจริญเติบโตของต้นยูคาลิปตัสต่อไป

ตาราง 2 แสดงผลจำนวนและชนิดเด่นของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซารอบรากต้นยูคาลิปตัสในแต่ละพื้นที่

แหล่งดินตัวอย่าง (บริเวณรอบต้นยูคาลิปตัส)	จำนวนอาร์บัสคู ลาร์ไมคอร์ไรซา ต่อดิน 100 กรัม	อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ชนิดเด่น
บ้านดง ต. นายาง อ.สบปราบ จ.ลำปาง (สวนนายต๊ีบ)	79.0 ± 19.8	<i>Acaulospora spinosa</i> , <i>Gigaspora pellucida</i>
บ้านดง ต. นายาง อ.สบปราบ จ.ลำปาง (สวนนายตา)	56.7 ± 24.0	<i>Gi. pellucida</i> , <i>Acaulospora</i> sp.
ทำตุม ม. 2 อ. ศรีมหาโพธิ์ (อายุ 1 ปี) PT51	9.7 ± 8.7	<i>A. scrobiculata</i>
ทำตุม ม. 2 อ. ศรีมหาโพธิ์ (อายุ 1 ปี) K67	5.3 ± 3.2	<i>A. mellae</i>
ทำตุม ม. 4 อ. ศรีมหาโพธิ์ (อายุ 3 ปี 6 เดือน) K7	10.7 ± 16.8	<i>A. scrobiculata</i>
ทำตุม ม. 2 อ. ศรีมหาโพธิ์ (อายุ 1 ปี) PT64	14.0 ± 7.8	<i>A. scrobiculata</i>



ภาพ 14 ลักษณะสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบในดินตัวอย่าง

(A) *Acaulospora scrobiculata*,

(B) *A. spinosa*

(C) *Acaulospora* sp.

(D) *Gigaspora pellucida*

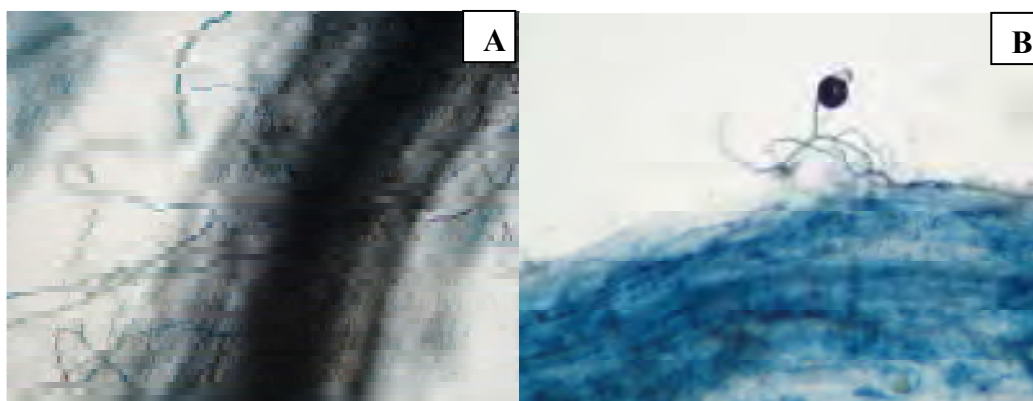
(E) *A. mellae*

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

รากยุคาลิปตัสที่เก็บเพิ่มเติมจากแหล่งปลูกในเขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย มีเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากตั้งแต่ 34-48% ดังตาราง 3 โครงสร้างของเชื้อราที่ตรวจพบส่วนใหญ่คือเส้นใยทั้งภายในและภายนอกราก รองลงมา คือ เวสิเคิลและสปอร์ ดังภาพ 15

ตาราง 3 เปอร์เซนต์การเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

แหล่งเก็บตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์การเข้าสู่ราก
1. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ AG01	45%
2. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ AG02	35%
3. อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย WP01	34%
4. อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย WP02	45%
5. คณะสถาปัตยกรรม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ FL01	48%



ภาพ 15 ลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

A) เส้นใยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่เจริญภายในและภายนอกรากยูคาลิปตัส

B) สปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่สร้างภายนอกรากยูคาลิปตัส

4.2 ผลผลิตหัวเชื้อจากสายพันธุ์ไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกแล้ว

4.2.1 การเพิ่มจำนวนสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาด้วยวิธี Trap culture

การเพิ่มจำนวนสปอร์ของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยใช้วิธีการดักสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินรอบรากยูคาลิปตัสที่เก็บมาจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ด้วยพืชอาศัยคือ ยูคาลิปตัสที่ได้จากการเพาะเมล็ด (ภาพ 16) พบว่า ดินหัวเชื้อจากหอพักชาย 2 คณะอุตสาหกรรมเกษตรสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ในต้นกล้ายูคาลิปตัสได้มากที่สุด จำนวน 284 สปอร์ต่อดิน 100 กรัม ซึ่งพบสปอร์ชนิดเด่นคือ *Acaulospora* AG จำนวน 180 สปอร์ต่อดิน 100 กรัม รองลงมาคือ ดินหัวเชื้อจากหมู่บ้านอ่างแก้ว แหล่งท่องเที่ยวเชิงเกษตรฝั่ง และคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ ตามลำดับ ส่วนดินหัวเชื้อจากโรงแรม Green lake resort ได้ผลการเพิ่มจำนวนสปอร์น้อยที่สุด ลักษณะของสปอร์ที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นดังภาพ 17-21 ส่วนเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินหัวเชื้อแต่ละแหล่งในต้นกล้ายูคาลิปตัส มีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันคือ เปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินหัวเชื้อบริเวณหอพักชาย 2 คณะอุตสาหกรรมเกษตร มากกว่าจากดินหัวเชื้อบริเวณคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ หมู่บ้านอ่างแก้ว แหล่งท่องเที่ยวเชิงเกษตรฝั่ง และโรงแรม Green lake resort ตามลำดับ ดังตาราง 4

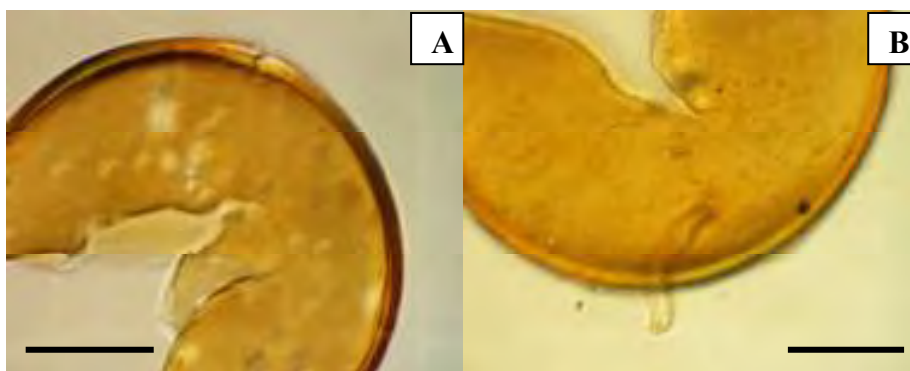


ภาพ 16 ต้นยูคาลิปตัสอายุ 3 เดือน หลังการเพิ่มจำนวนสปอร์โดยวิธี Trap culture

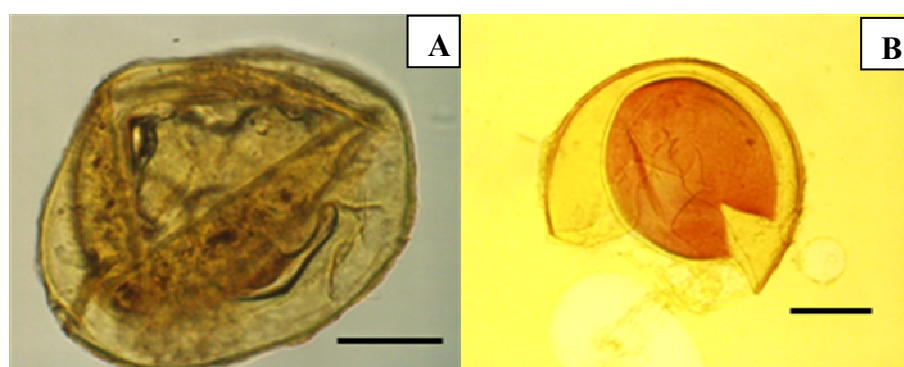
ตาราง 4 ผลของการเพิ่มจำนวนสปอร์ของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในต้นกล้วยคาลิปัตส โดยวิธี Trap culture

แหล่งของสปอร์หัวเชื้อ	ความสูงลำต้น (ซม.)	จำนวนสปอร์/ดิน 100 กรัม	เปอร์เซ็นต์การ เข้าสู่ราก	สปอร์ชนิดเด่น	จำนวนสปอร์ชนิดเด่น/ ดิน 100 กรัม
หมู่บ้านอ่างแก้ว	76.83±0.89	175.50±82.73	23.085±0.14	<i>Acaulospora</i> AK02	70.00±18.38
แหล่งท่องเที่ยวเชิงเกษตรผึ่ง	85.72±2.69	109.50±37.47	22.030±4.38	<i>Glomus</i> K	35.50±9.19
หอพักชาย คณะอุตสาหกรรมเกษตร	68.58±8.98	284.50±168.99	34.670±3.64	<i>Acaulospora</i> AG01	180.50±137.88
คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์	67.31±7.18	100.00±12.72	32.205±6.62	<i>Gigaspora</i> S01	27.00±12.72
Green lake resort	76.20±12.57	61.00±32.52	16.355±0.57	<i>Acaulospora</i> GL	22.00±7.07

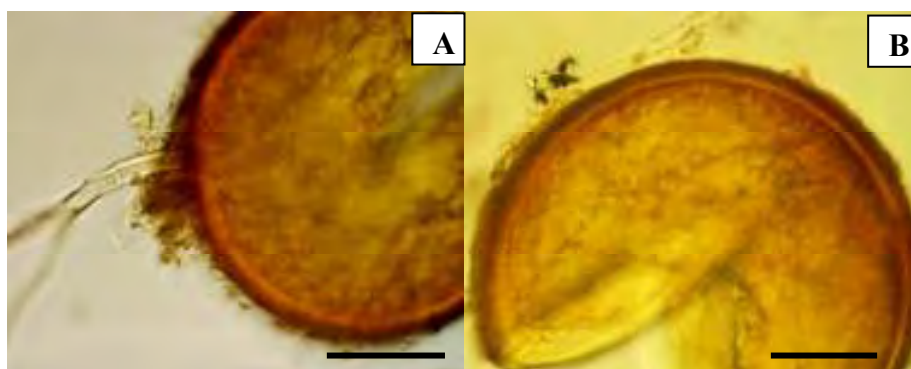
หมายเหตุ: ตัวอักษรบ่งบอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละแถวที่ $P < 0.05$ โดยการวิเคราะห์ One-way ANOVA



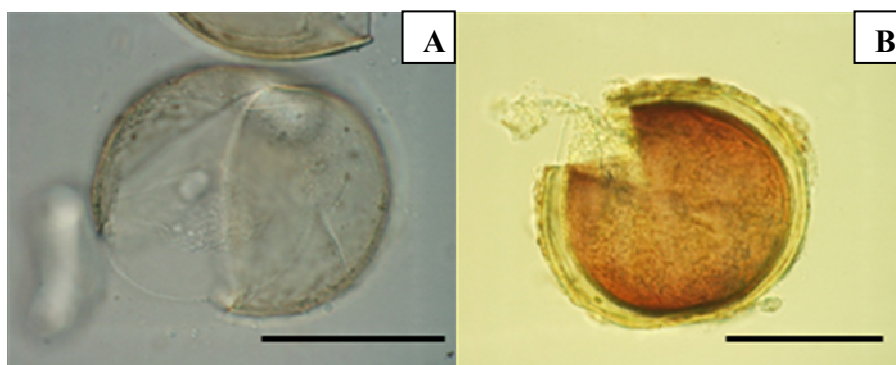
ภาพ 17 ลักษณะสปอร์ *Glomus* AK จากดินหัวเชื้อบริเวณหมู่บ้านอ่างแก้ว ลักษณะสปอร์ใน PVLG (A) ลักษณะสปอร์ใน Melzer's reagent (B) bar = 50 μ m



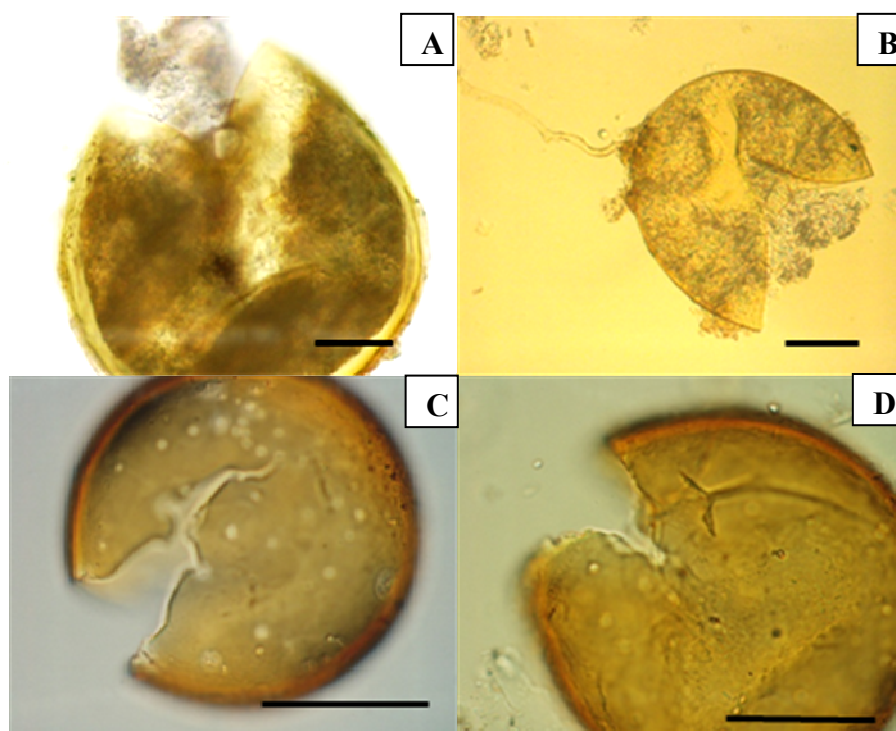
ภาพ 18 ลักษณะสปอร์ *Acaulospora* GL จากดินหัวเชื้อบริเวณ Green lake resort ลักษณะสปอร์ใน PVLG (A) ลักษณะสปอร์ใน Melzer's reagent (B) bar = 50 μ m.



ภาพ 19 ลักษณะสปอร์ *Glomus* K จากดินหัวเชื้อบริเวณแหล่งท่องเที่ยวเชิงเกษตรผึ่ง ลักษณะสปอร์ใน PVLG (A) ลักษณะสปอร์ใน Melzer's reagent (B) bar = 50 μ m.



ภาพ 20 ลักษณะสปอร์ *Acaulospora* AG01 จากดินหัวเชื้อบริเวณหอพักชาย 2 คณะ
อุตสาหกรรมเกษตร ลักษณะสปอร์ใน PVLG (A) ลักษณะสปอร์ใน Melzer's reagent (B) bar =
50 μ m



ภาพ 21 ลักษณะสปอร์ของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินจากบริเวณต่าง ๆ
(A, B) สปอร์ *Gigaspora* S01 และ (C, D) *Glomus* S02 จากดินหัวเชื้อบริเวณคณะ
สถาปัตยกรรมศาสตร์ (A, C) ลักษณะสปอร์ใน PVLG (B, D) ลักษณะสปอร์ใน Melzer's
reagent bar = 50 μ m.

4.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตหัวเชื้อของเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้ง

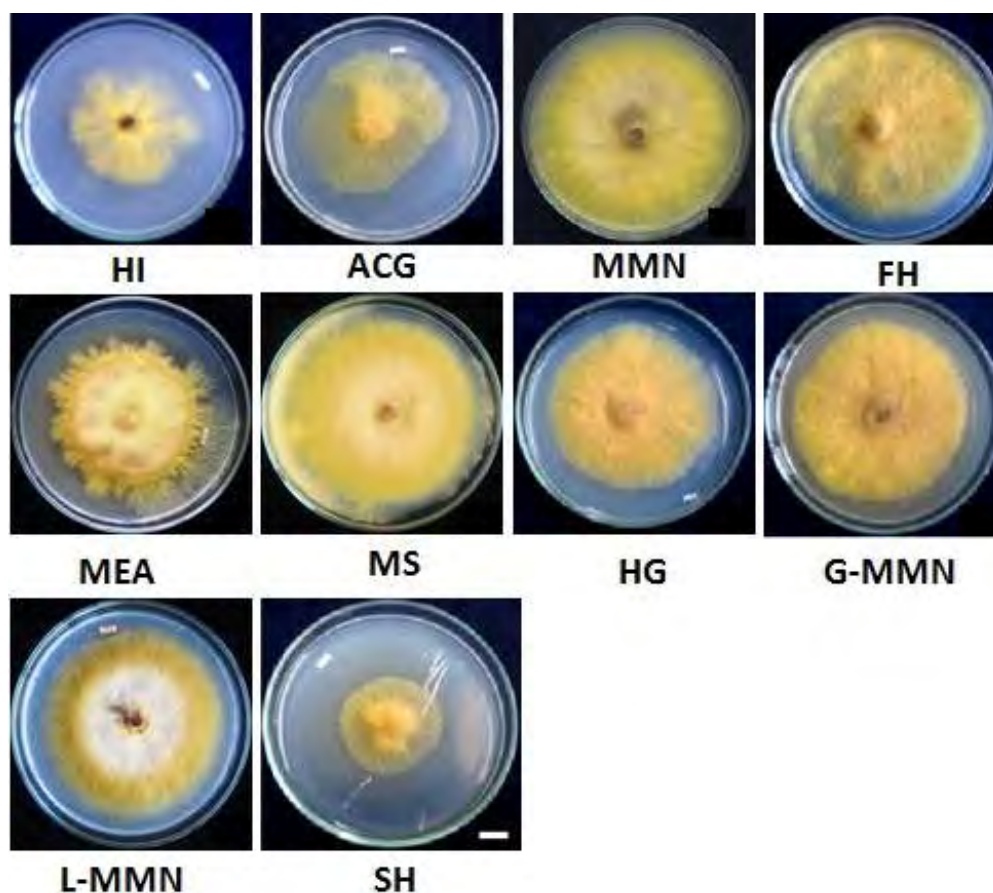
4.2.2.1 ผลการศึกษาของอาหารวุ้นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์เห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้ง

เส้นใยบริสุทธิ์ *P. albus* CMU005, *P. orientalis* CMU010 และ *S. sinnamariense* CMUSC001 ได้เลือกมาใช้ในการศึกษาอัตราการเจริญในอาหาร 10 ชนิด ได้แก่ 1) amonium chloride glucose (ACG) agar, 2) fungal-host (FH) agar, 3) Heli (HI) medium, 4) modified Hagem's (HG) medium, 5) modified Melin-Norkans (MMN) medium, 6) G-MMN medium, 7) L-MMN medium, 8) modified Murashige and Skoog (MS) medium, 9) malt extract (MEA) agar, 10) modified SH (SH) medium ในจานเพาะเลี้ยงเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ในที่มืด

เชื้อเห็ดกรวด *P. albus* CMU 005 เจริญบนอาหารทั้ง 10 ชนิดโดยมีเส้นใยสีเหลือง (ภาพ 22) และพบว่าเจริญได้ดีในอาหาร MMN medium, MS agar และ FH medium โดยในอาหาร MMN medium เชื้อมีอัตราการเจริญดีที่สุด คือ 90.00 ± 1.52 , 89.00 ± 1.42 และ 86.70 ± 1.44 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ 22, 25) และมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งเส้นใยมากที่สุดบนอาหาร MMN medium คือ 45.30 ± 1.27 มิลลิกรัม อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 26) และเมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. albus* CMU005 ในอาหาร SH medium พบว่าเชื้อมีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยน้อยที่สุด และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 1.70 ± 1.06 มิลลิเมตร

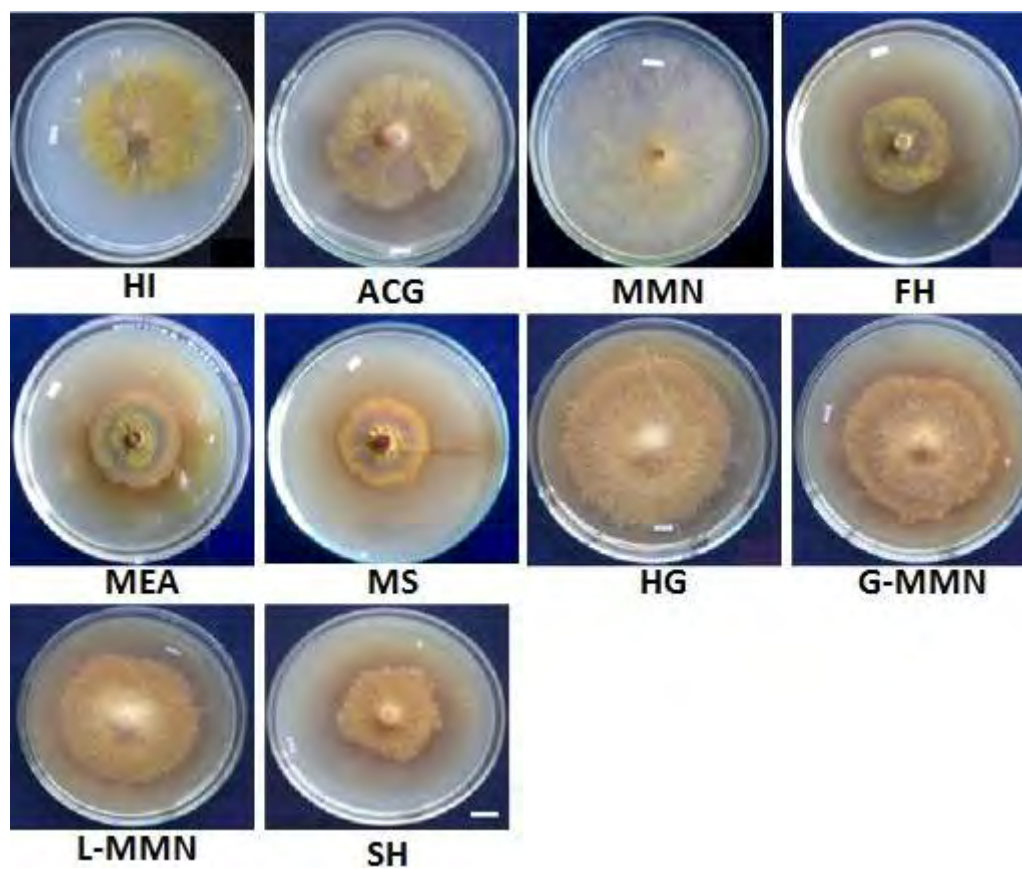
เชื้อเห็ดกรวด *P. orientalis* CMU010 เจริญบนอาหารทั้ง 10 ชนิดโดยมีเส้นใยสีเหลืองน้ำตาล (ภาพ 23) และพบว่า เจริญได้ดีในอาหาร MMN medium, HG medium และ G-MMN เชื้อมีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี คือ 90.00 ± 1.36 , 67.70 ± 1.25 และ 60.60 ± 1.14 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ 23, 25) และมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งเส้นใยมากที่สุดบนอาหาร MS medium คือ 44.40 ± 1.84 มิลลิกรัม ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 26) และเมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. orientalis* CMU005 ในอาหาร SH medium พบว่าเชื้อมีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยน้อยที่สุด

เชื้อเห็ดลูกฟุ้ง *S. sinnamariense* CMUSC001 เจริญบนอาหารทั้ง 10 ชนิดโดยมีเส้นใยสีเหลืองอ่อน (ภาพ 24) และพบว่าเจริญได้ดีในอาหาร FH medium, MS medium และ MMN medium เชื้อมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี คือ 43.50 ± 1.86 , 37.80 ± 1.81 และ 37.50 ± 1.76 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ 25) และมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งเส้นใยมากบนอาหาร FH agar และ MS medium และ HG medium เท่ากับ 40.50 ± 0.92 , 34.80 ± 0.82 และ 29.10 ± 1.75 มิลลิกรัม ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 26)



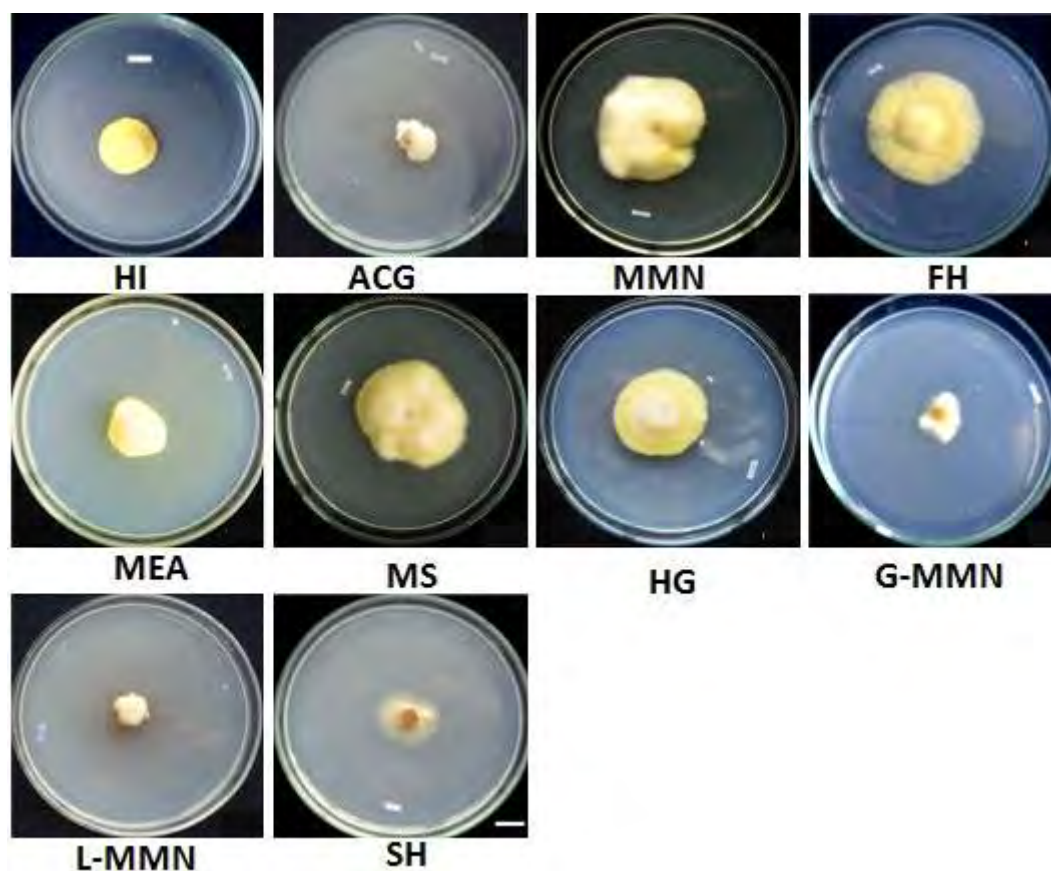
ภาพ 22 การเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด *Pisolithus albus* CMU 005 บนอาหารวุ้นแต่ละชนิด ในที่มีด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 21 วัน

หมายเหตุ HI = Heli medium, ACG = ammonium chloride glucose agar, MMN = modified Melin-Norkans medium, FH = fungal-host agar, MEA = malt extract agar, MS = Murashige and Skoog medium, HG = modified Hagem's medium, G-MMN = G-MMN medium, L-MMN = L-MMN medium และ SH = modified SH medium; Bar = 1 เซนติเมตร



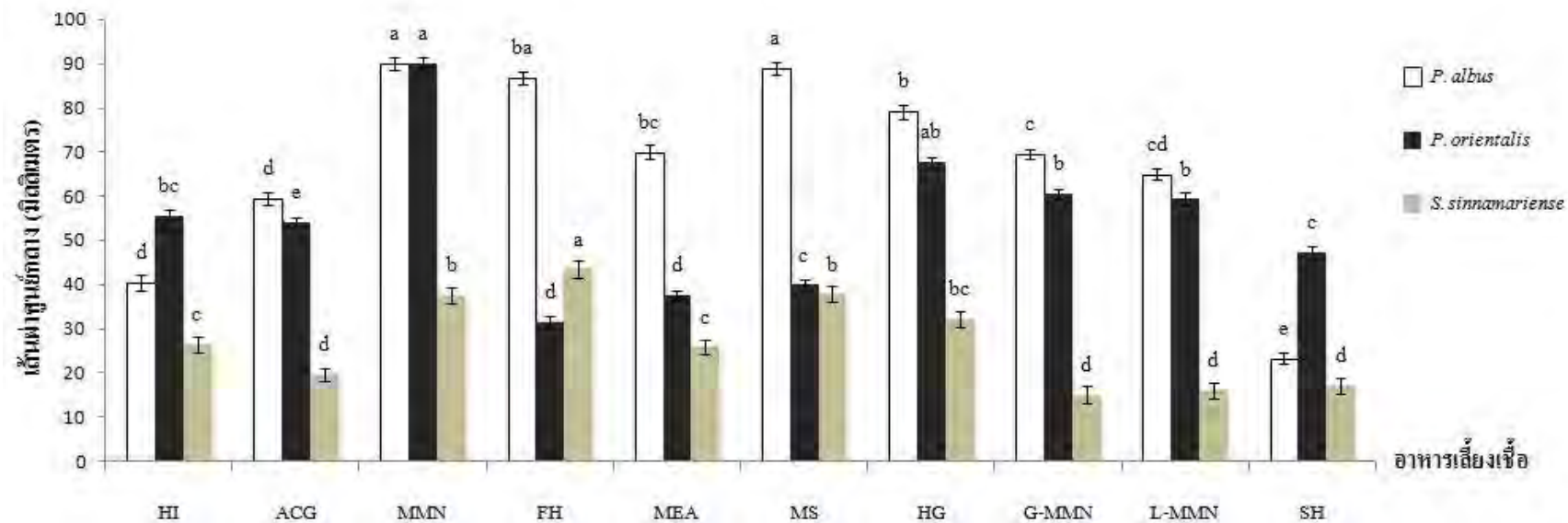
ภาพ 23 การเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด *Pisolithus orientalis* CMU010 บนอาหารวุ้นแต่ละชนิด ในที่มีด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 21 วัน

หมายเหตุ HI = Heli medium, ACG = ammonium chloride glucose agar, MMN = modified Melin-Norkans medium, FH = fungal-host agar, MEA = malt extract agar, MS = Murashige and Skoog medium, HG = modified Hagem's medium, G-MMN = G-MMN medium, L-MMN = L-MMN medium และ SH = modified SH medium; Bar = 1 เซนติเมตร



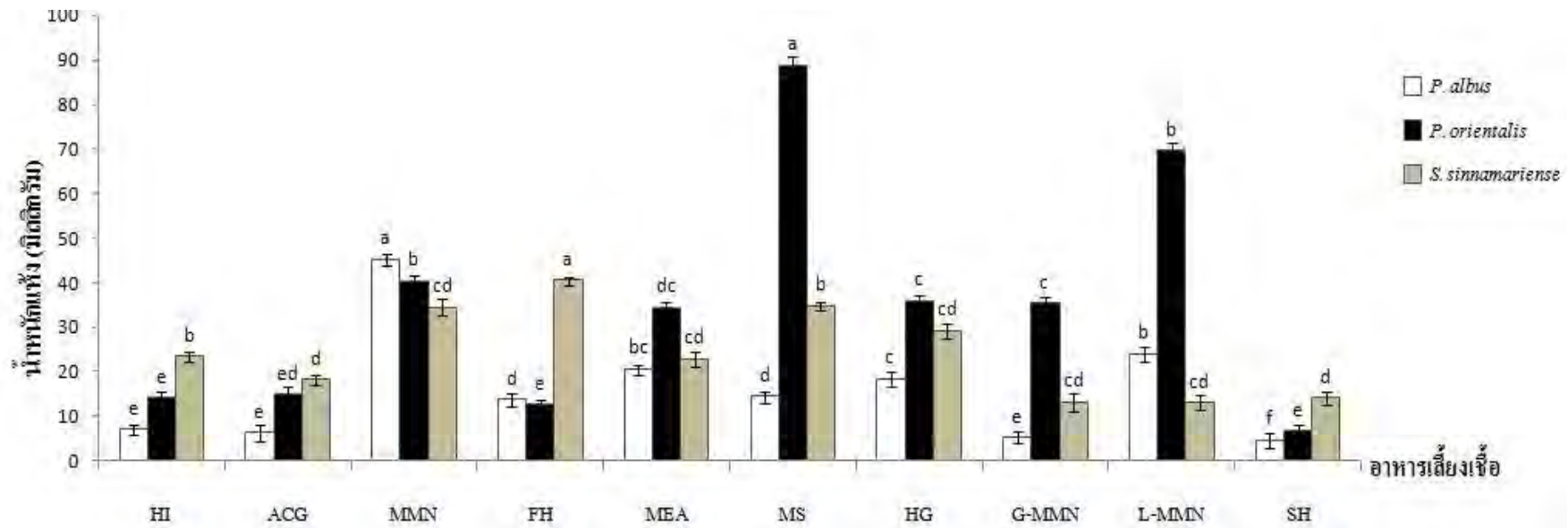
ภาพ 24 การเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด *Scleroderma sinnamariense* CMUSC001 บนอาหาร
วันแต่ละชนิด ในที่มีด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 21 วัน

หมายเหตุ HI = Heli medium, ACG = ammonium chloride glucose agar, MMN = modified
Melin-Norkans medium, FH = fungal-host agar, MEA = malt extract agar, MS =
Murashige and Skoog medium, HG = modified Hagem's medium, G-MMN = G-MMN
medium, L-MMN = L-MMN medium และ SH = modified SH medium; Bar = 1 เซนติเมตร



ภาพ 25 เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยเห็ดกรวด (*Pisolithus orientalis* CMU010, *Pisolithus albus* CMU005) และเห็ดลูกฟุ้ง (*Scleroderma sinnamariense* CMUSC001) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 21 วัน

หมายเหตุ: HI = Heli medium, ACG = amonium chloride glucose agar, MMN = modified Melin-Norkans medium, FH = fungal-host agar, MEA = malt extract agar, MS = Murashige and Skoog medium, HG = modifide Hagem's medium, G-MMN = G-MMN medium, L-MMN = L-MMN medium and SH = modified SH medium และตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลอง ที่ $P < 0.05$



ภาพ 26 อัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด (*Pisolithus orientalis* CMU010, *Pisolithus albus* CMU005) และเห็ดลูกฟุ้ง (*Scleroderma sinnamariense* CMUSC001) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 21 วัน

หมายเหตุ: HI = Heli medium, ACG = amonium choloride glucose agar, MMN = modified Melin-Norkans medium, FH = fungal-host agar, MEA = malt extract agar, MS = Murashige and Skoog medium, HG = modifide Hagem's medium, G-MMN = G-MMN medium, L-MMN = L-MMN medium and SH = modified SH medium และตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลอง ที่ $P < 0.05$

4.2.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์เห็ดกรวด และเห็ดลูกฟูน

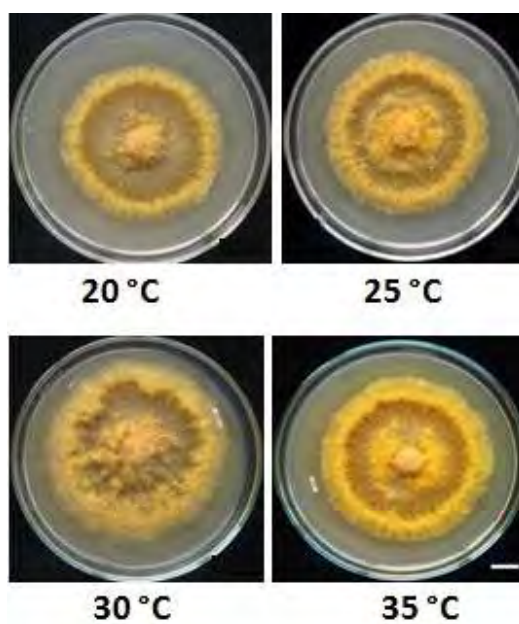
จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด (*P. orientalis* CMU010, *P. albus* CMU005) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN medium และเห็ดลูกฟูน (*S. sinnamariense* CMUSC001) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ FH medium ในจานเพาะเลี้ยง เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 20, 25, 30, 35, 40, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วันในที่มืด พบว่าเส้นใยเห็ดทั้ง 3 ชนิดเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียส โดยแต่ละอุณหภูมิโดยแต่ละอุณหภูมิเส้นใยมีการเจริญที่ต่างกันออกไป (ภาพ 27-31) ส่วนอุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียสไม่พบการเจริญ

ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ *P. orientalis* CMU010 เจริญบนอาหาร MMN medium ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เท่ากับ 68.00 ± 1.01 , 75.00 ± 1.26 , 90.30 ± 1.19 และ 80.10 ± 1.11 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ 27, 30) และมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้ง 32.93 ± 1.15 , 37.57 ± 1.79 , 43.93 ± 1.08 และ 40.30 ± 1.21 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ภาพ 31) อย่างมีนัยสำคัญ

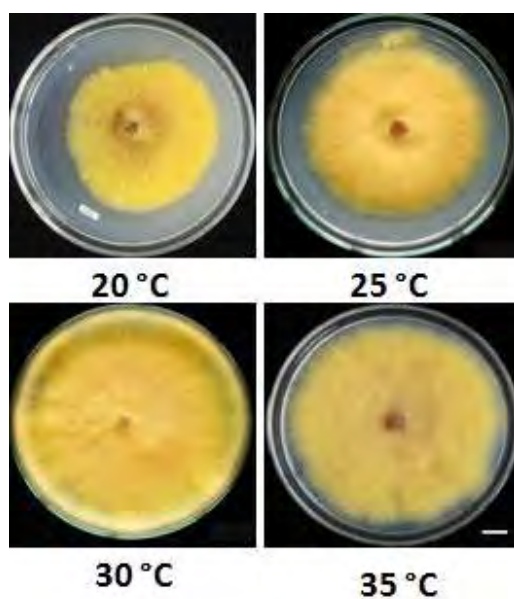
ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ *P. albus* CMU005 เจริญบนอาหาร MMN medium ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เท่ากับ 58.70 ± 1.23 , 64.00 ± 1.32 , 74.30 ± 1.13 และ 61.10 ± 1.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ 28, 30) และมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งมากที่สุดเมื่อบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส โดยมีค่า 64.21 ± 1.43 มิลลิกรัม อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 31)

ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ *S. sinnamariense* CMUSC001 เจริญบนอาหาร FH medium ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เท่ากับ 22.50 ± 0.91 , 47.30 ± 0.97 , 56.60 ± 1.27 และ 36.20 ± 1.26 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ 29, 30) และมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งมากที่สุดเมื่อบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งมากที่สุดคือ 41.33 ± 0.98 มิลลิกรัม ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 31)

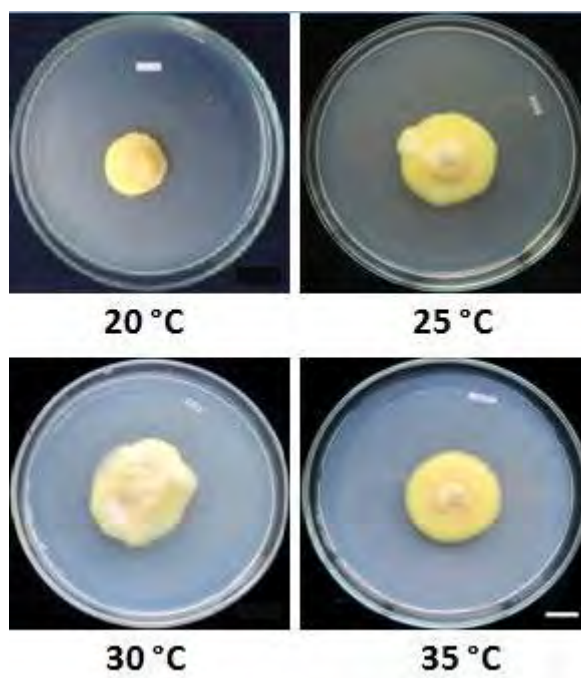
จากผลการทดลอง พบว่า อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อทั้ง 3 ชนิด โดยเชื้อมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย และมีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิอื่น ๆ



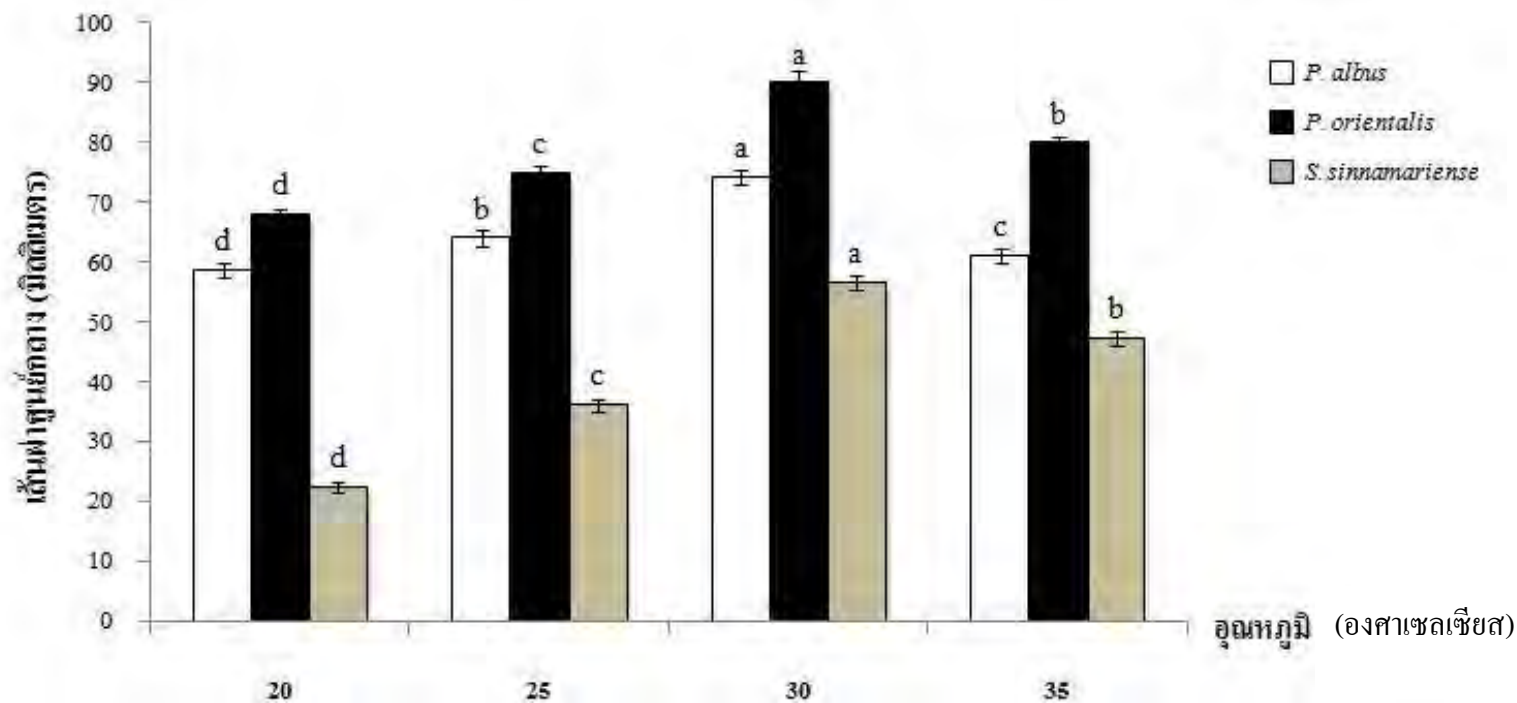
ภาพ 27 การเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด *Pisolithus orientalis* CMU010 บนอาหาร modified Melin-Norkans medium ในที่มีด ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในวันที่ 21; Bar = 1 เซนติเมตร



ภาพ 28 การเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด *Pisolithus albus* CMU005 บนอาหาร modified Melin-Norkans medium ในที่มีด ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในวันที่ 21; Bar = 1 เซนติเมตร

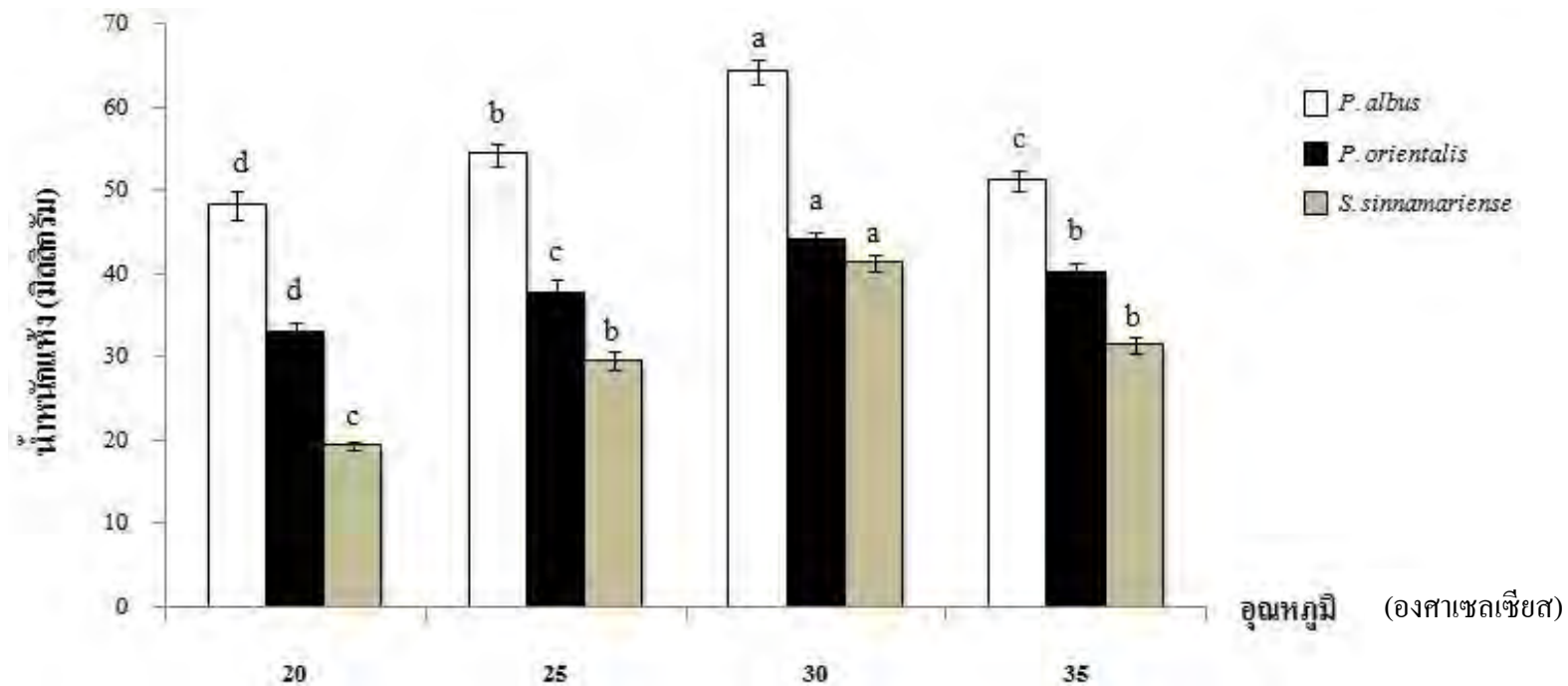


ภาพ 29 การเจริญของเส้นใยเห็ดลูกฟูก *Scleroderma sinnamariense* CMUSC001 บนอาหาร fungal-host agar ในที่มืด ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในวันที่ 21; Bar = 1 เซนติเมตร



ภาพ 30 เส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยเห็ดกรวด (*Pisolithus orientalis* CMU010, *Pisolithus albus* CMU005) บนอาหาร modified Melin-Norkans medium และเห็ดลูกฟู่ (*Scleroderma sinnamariense* CMUSC001) บนอาหาร fungal-host agar บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในที่มีด เป็นเวลา 21 วัน

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลอง ที่ $P < 0.05$



ภาพ 31 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดกรวด (*Pisolithus orientalis* CMU010, *Pisolithus albus* CMU005) บนอาหาร modified Melin-Norkans medium และเห็ดลูกฟุ้ง (*Scleroderma sinnamariense* CMUSC001) บนอาหาร fungal-host agar บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในที่มืด เป็นเวลา 21 วัน
 หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลอง ที่ $P < 0.05$

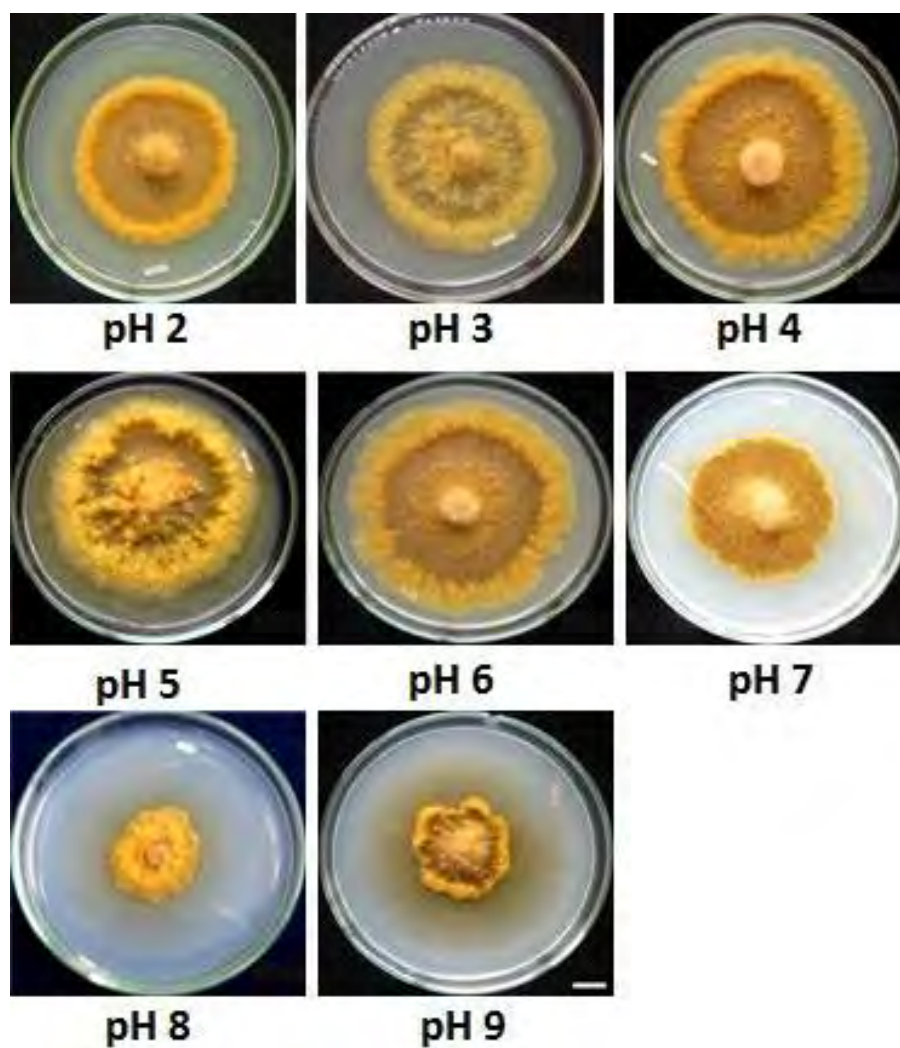
4.2.2.3 การศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์เห็ดกรวด และ เห็ดลูกฟูน

จากการศึกษาผลของการเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด (*P. orientalis*, *P. albus*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN medium และ เห็ดลูกฟูน (*S. sinnamariense*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ FH medium ในจานเพาะเลี้ยงเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืดที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 เป็นเวลา 21 วัน พบว่าเส้นใย เห็ดกรวด และเห็ดลูกฟูนสามารถเจริญได้ทุก pH แต่มีอัตราการเจริญที่แตกต่างกัน (ภาพ 32-36)

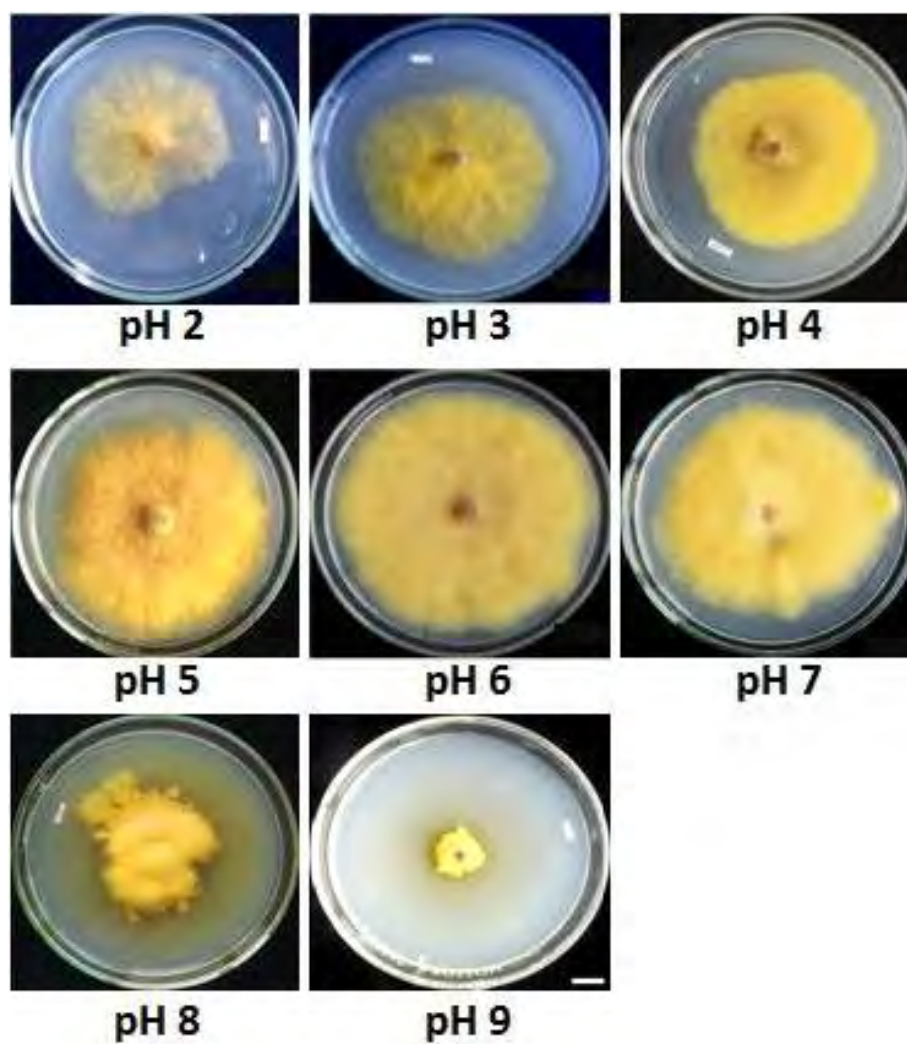
Pisolithus orientalis CMU010 เส้นใยสามารถเจริญได้ช้าที่ pH 2, 3, 4, 8 และ 9 (ภาพ 32) โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเส้นใยเท่ากับ 42.25 ± 1.45 , 45.12 ± 1.25 , 40.05 ± 1.13 และ 31.31 ± 1.34 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเส้นใยเท่ากับ 53.00 ± 1.23 , 58.70 ± 1.35 , 66.30 ± 1.21 , 41.22 ± 1.36 และ 43.00 ± 1.53 มิลลิกรัม ตามลำดับ ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยอยู่ระหว่าง pH 5-6 และพบว่า pH 6 เชื้อมีการเจริญดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 82.70 ± 1.42 มิลลิเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ยของเส้นใยมากที่สุดเท่ากับ 43.16 ± 1.25 มิลลิกรัม อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 35-36)

Pisolithus albus CMU005 เส้นใยสามารถเจริญได้ช้าที่ pH 2, 3, 4, 8 และ 9 (ภาพ 33) โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเส้นใยเท่ากับ 43.00 ± 1.21 , 59.00 ± 1.68 , 69.20 ± 1.45 , 55.30 ± 1.65 และ 45.30 ± 1.15 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเส้นใยเท่ากับ 27.19 ± 1.08 , 29.50 ± 1.45 , 32.72 ± 1.23 , 32.67 ± 1.12 และ 22.24 ± 1.16 มิลลิกรัม (ภาพ 36) ตามลำดับ ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยอยู่ระหว่าง pH 4-6 และพบว่า pH 6 เชื้อมีการเจริญดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 79.00 ± 1.26 มิลลิเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ยของเส้นใยมากที่สุดเท่ากับ 43.16 ± 1.25 มิลลิกรัม อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 35, 36)

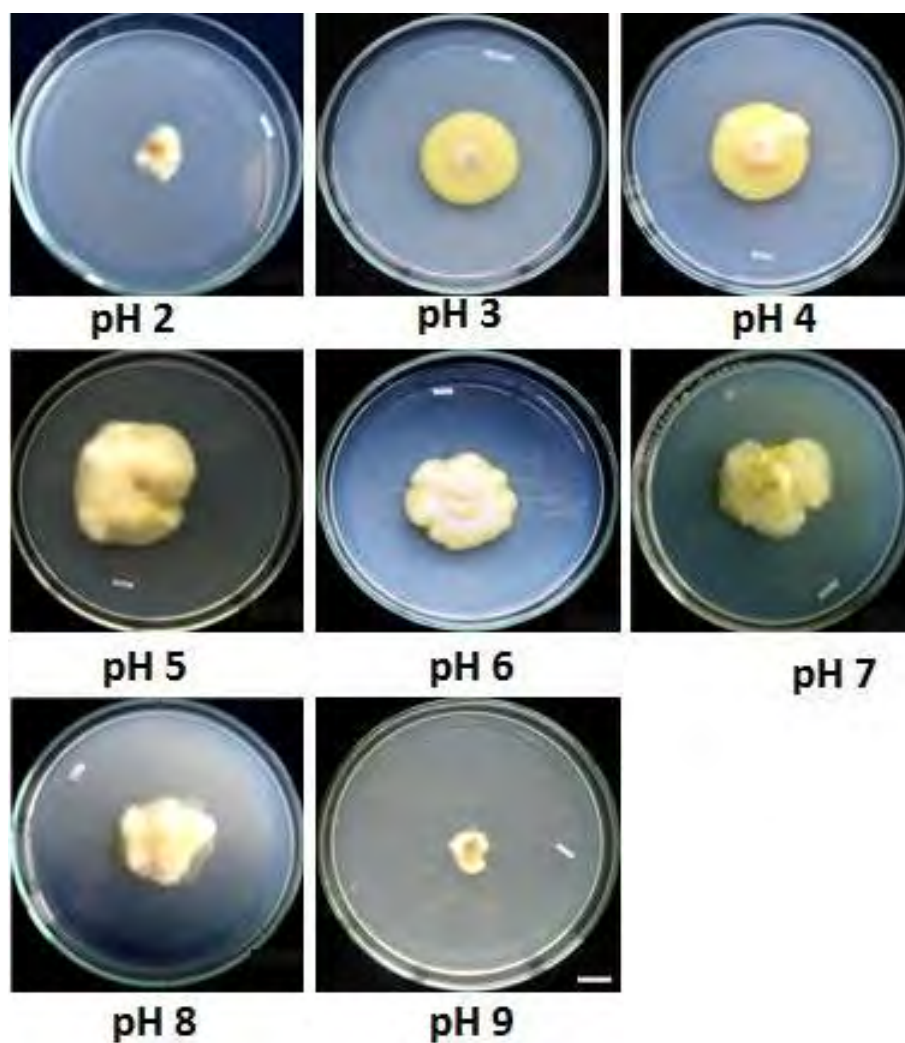
Scleroderma sinnamariense CMUSC001 สามารถเจริญได้ดีที่ pH 2, 3, 4, 8 และ 9 (ภาพ 34) โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเส้นใยเท่ากับ 21.33 ± 0.58 , 26.70 ± 0.73 , 32.30 ± 0.52 , 30.20 ± 1.26 , 27.50 ± 1.46 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเส้นใยเท่ากับ 19.20 ± 1.02 , 21.77 ± 1.01 , 30.97 ± 1.03 , 27.63 ± 1.02 และ 19.13 ± 1.01 มิลลิกรัม (ภาพ 34, 36) ตามลำดับ ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยอยู่ระหว่าง pH 4-6 และพบว่า pH 5 เชื้อมีการเจริญดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 40.37 ± 0.58 มิลลิเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ยของเส้นใยมากที่สุดเท่ากับ 47.70 ± 1.02 มิลลิกรัม อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 35, 36)



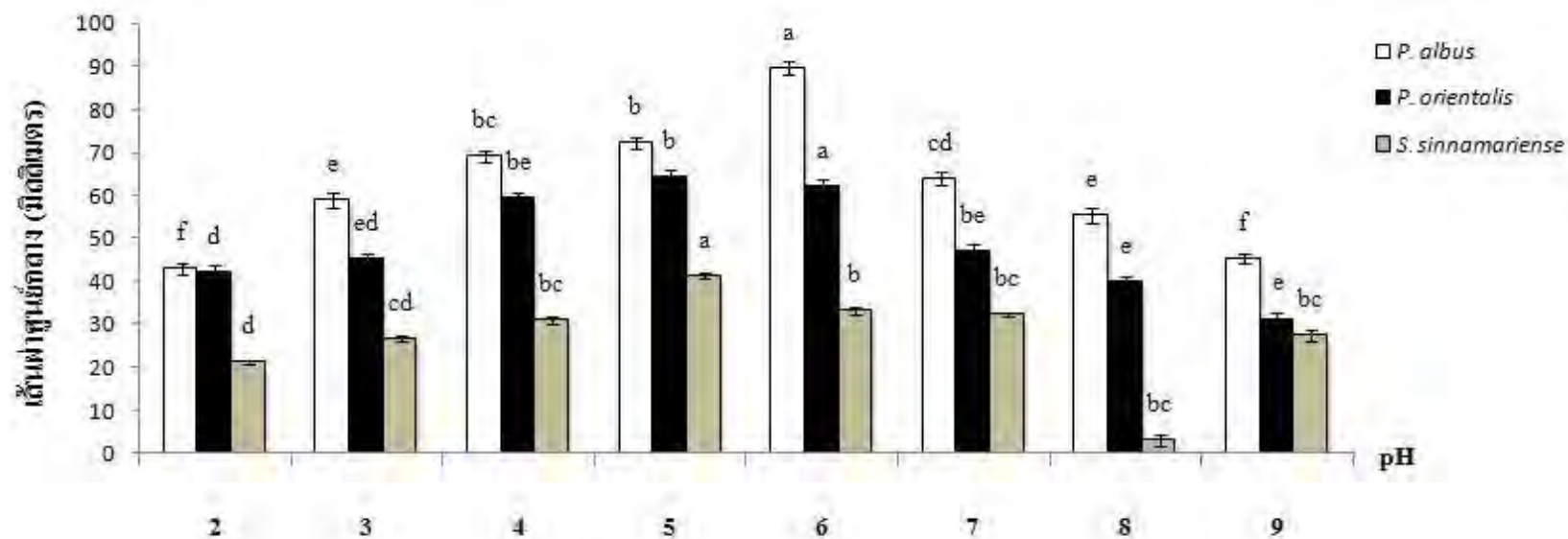
ภาพ 32 การเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด *Pisolithus orientalis* CMU010 บนอาหาร modified Melin-Norkans medium ที่มีค่า pH ต่าง ๆ ปุ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 21 วัน; Bar = 1 เซนติเมตร



ภาพ 33 การเจริญของเส้นใยเห็ดกรวด *Pisolithus albus* CMU005 บนอาหาร modified Melin-Norkans medium ที่มีค่า pH ต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 21 วัน; Bar = 1 เซนติเมตร

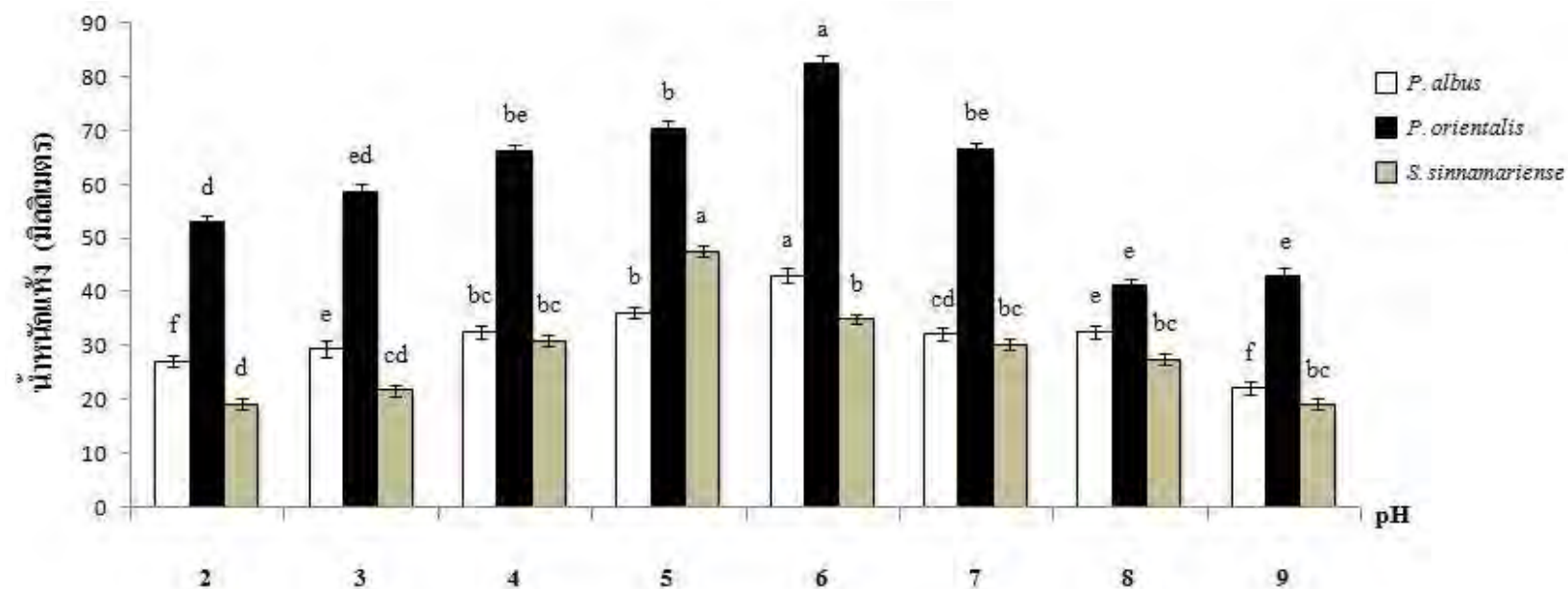


ภาพ 34 การเจริญของเส้นใยเห็ดลูกฟุ้ง *Scleroderma sinnamariense* CMUSC001 บนอาหาร fungal-host agar ที่มีค่า pH ต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 21 วัน; Bar = 1 เซนติเมตร



ภาพ 35 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเห็ดกรวด (*Pisolithus orientalis* CMU010, *Pisolithus albus* CMU005) และเห็ดลูกฟุ้ง *Scleroderma sinnamariense* (CMUSC001) บนอาหาร modified Melin-Norkans medium และอาหาร fungal-host agar บ่มที่ pH ต่าง ๆ ในที่มืด เป็นเวลา 21 วัน

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลอง ที่ $P < 0.05$

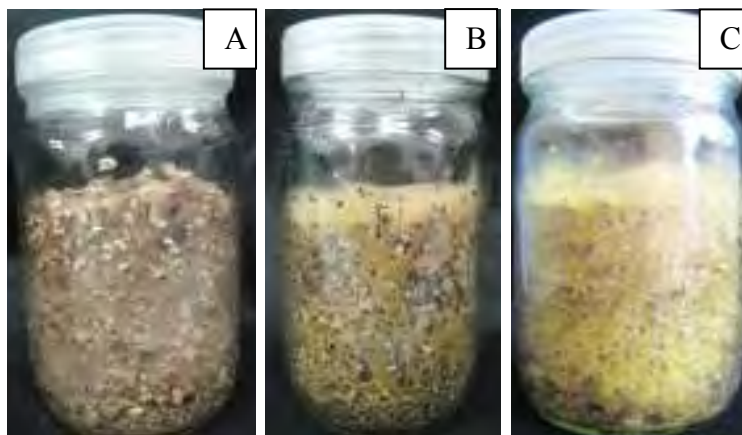


ภาพ 36 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดกรวด (*Pisolithus orientalis* CMU010, *Pisolithus albus* CMU005) และเห็ดลูกฟุ้ง *Scleroderma sinnamariense* (CMUSC001) บนอาหาร modified melin-Norkans medium และอาหาร fungal-host agar บ่มที่ pH ต่าง ๆ ในที่มืด เป็นเวลา 21 วัน

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลองที่ $P < 0.05$

4.2.2.4 การศึกษาการผลิตหัวเชื้อเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้งบริสุทธิ์

เส้นใยบริสุทธิ์ของเชื้อเห็ดกรวด *P. orientalis* CMU0010 และ *P. albus* CMU005 เจริญเต็มขวดในอาหาร MMN medium ระยะเวลา 3 เดือน ส่วนเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดลูกฟุ้ง *S. sinnamariense* CMUSC001 เจริญเต็มขวดในอาหาร FH medium ระยะเวลา 4 เดือน เมื่อป่นที่ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด (ภาพ 37)



ภาพ 37 หัวเชื้อเส้นใยบริสุทธิ์ วัสดุที่เลือกใช้ในการผลิตหัวเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้ง คือ เวอร์มิคูไลต์: พีท (1:1 v/v)

(A) เห็ดกรวด *Pisolithus orientalis* CMU0010 บนอาหาร modified Melin-Norkans medium

(B) เห็ดกรวด *Pissolithus albus* CMU005 บนอาหาร modified Melin-Norkans medium

(C) เห็ดลูกฟุ้ง *Scleroderma sinnamariense* CMUSC001 บนอาหาร fungal-host agar

4.3 หาวีที่ที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อให้กับกล้วยคาลิปตัสที่ผลิตเป็นการค้า

4.3.1 ผลของการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยคาลิปตัสที่เพาะจากเมล็ด

การทดสอบการเจริญเติบโตของต้นกล้วยคาลิปตัสที่ปลูกด้วยสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ซึ่งได้จากการคัดเลือกในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนสปอร์โดยวิธี Trap culture และจากห้องปฏิบัติการ 2813 (ภาพ 38) การปลูกอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทุกชนิดในต้นกล้วยคาลิปตัสเป็นเวลา 3 เดือน มีผลต่อความสูง และเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่ราก (ตาราง 5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม คือ กระถางที่ปลูกด้วย *G. etunicatum* มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการส่งเสริมการเจริญของความสูง น้ำหนักแห้งของลำต้นและราก เมื่อเปรียบเทียบกับกระถางที่ปลูกด้วยเชื้อ *Glomus* AK02, *G. mosseae*, *Acaulospora* AG01, *E. colombiana* และเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ถึงแม้ว่าการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละชนิด จะทำให้จำนวนสปอร์ที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

ของลำต้นและรากไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละชุดการทดลอง แต่ชุดการทดลองที่ปลูกเชื้อด้วย *G. etunicatum* ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดในการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้วยคาลิปัตส์ที่ได้จากการเพาะเมล็ด



ภาพ 38 ลักษณะสปอร์ที่คัดเลือกมาทดสอบใน PVLG; bar = 50 μ m. (A) *Acaulospora* AG01 (B) *Glomus* AK 02 (C) *Entrophospora colombiana* (D) *Glomus etunicatum* (E) *G. mosseae*

เปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดในต้นกล้วยคาลิปัตส์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของเชื้อ *G. etunicatum* มากกว่าเชื้อ *E. colombiana*, *G. mosseae*, *Glomus* AK02, *Acaulospora* AG01 และชุดควบคุม ตามลำดับ อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดมีอัตราการเข้าสู่รากอยู่ในระหว่าง 23.80% – 48.08%

ตาราง 5 ผลของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญของต้นกล้วยคาลิปตัดที่ได้จากการเพาะเมล็ด

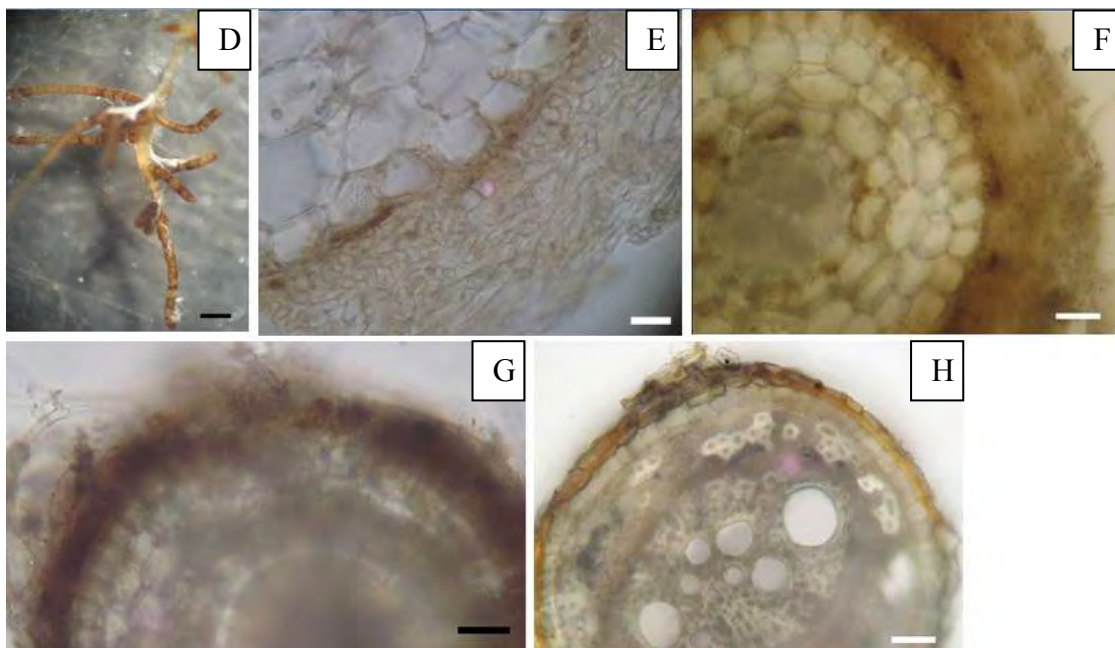
Treatment	ความสูงลำต้น (ซม.)	น้ำหนักสดลำ ต้น (กรัม)	น้ำหนักแห้งลำต้น (กรัม)	น้ำหนักสดราก (กรัม)	น้ำหนักแห้งราก (กรัม)	จำนวนสปอร์/ ดิน 100 กรัม	เปอร์เซ็นต์ การเข้าสู่ราก
Control	61.81a	28.65a	9.62a	10.66a	5.05a	0.00a	0.00a
<i>G. mosseae</i>	70.70ab	32.17a	11.70a	9.85a	2.92a	144.67a	33.93ab
<i>E. colombiana</i>	62.65a	27.93a	10.69a	9.48a	5.52a	139.33a	35.01ab
<i>G. etunicatum</i>	76.62b	34.81a	14.39a	11.52a	6.97a	290.00a	48.08b
<i>Acaulospora</i> AG01	70.27ab	29.21a	10.85a	8.83a	4.28a	101.00a	23.80ab
<i>Glomus</i> AK02	78.91b	32.01a	12.00a	10.94a	5.06a	65.00a	32.13ab

หมายเหตุ: ตัวอักษรบ่งบอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละแถวที่ $P < 0.05$ โดยการวิเคราะห์ One-way ANOVA

4.3.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของเห็ดกรวดและเห็ดลูกฟุ้งกับพืชอาศัยในห้องปฏิบัติการ

การทดลองการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาของเส้นใยเห็ดกรวดบริสุทธิ์ *P. albus* CMU005 และ *P. orientalis* CMU0010 และเห็ดลูกฟุ้ง *S. sinnamariense* CMUSC001 กับต้นกล้วยคาลิปัตสที่เพาะจากเมล็ดในห้องปฏิบัติการ พบว่า เมื่อตรวจสอบรากของต้นกล้วยคาลิปัตสที่ปลูกเชื้อ *P. albus* CMU 005 อายุ 1-2 เดือน ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบเพียงเส้นใยของเชื้อเจริญอยู่รอบราก ไม่สร้าง Mantle sheath และ Hartig net แต่เมื่อนำต้นกล้วยที่ปลูกเชื้ออายุ 3 เดือน มาตรวจสอบราก พบว่ารากมีลักษณะปลายบวมพอง (ภาพ 39 B) เมื่อเทียบกับรากของต้นกล้วยคาลิปัตสที่ไม่ปลูกเชื้อ (ภาพ 39 H) เมื่อทำการตัดตามขวางของโครงสร้างราก พบโครงสร้าง mantle sheath สีเหลืองน้ำตาลบริเวณรอบราก และ Hartig net (ภาพ 39 E) การตรวจสอบต้นกล้วยคาลิปัตสที่ปลูกเชื้อ *P. orientalis* CMU0010 พบว่า 1-3 เดือน พบเส้นใยเจริญรอบราก เมื่อ 4 เดือน ตรวจสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาพบโครงสร้าง mantle sheath สีน้ำตาลอ่อน (ภาพ 39 C) และ Hartig net (ภาพ 39 F) ส่วนการทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซา ของเห็ดลูกฟุ้ง *S. sinnamariense* CMUSC001 กับต้นกล้วยคาลิปัตส ไม่พบการสร้าง mantle sheath และ Hartig net พบเพียงเส้นใยบริเวณรอบราก (ภาพ 39 D, G)





ภาพ 39 การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในห้องปฏิบัติการ

(A) การทดสอบการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาในกล้ายูคาลิปตัสโดยใช้ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 250 มิลลิลิตร

(B) ลักษณะของรากต้นกล้ายูคาลิปตัส ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Pisolithus albus* CMU005

(C) ลักษณะของรากต้นกล้ายูคาลิปตัส ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Pisolithus orientalis* CMU0010

(D) ลักษณะของรากต้นกล้ายูคาลิปตัส หลังจากปลูกเชื้อ *Scleroderma sinnamariense* CMUSC001

(E) ภาพตัดตามขวางแสดง mantle sheath และ Hartig net ในชั้นคอร์เทกซ์ของรากต้นกล้ายูคาลิปตัสที่ติดเชื้อรา *Pisolithus albus* CMU005

(F) ภาพตัดตามขวางแสดง mantle sheath และ Hartig net ในชั้นคอร์เทกซ์ของรากต้นกล้ายูคาลิปตัสที่ติดเชื้อรา *Pisolithus orientalis* CMU0010

(G) ภาพตัดตามขวางแสดงการอาศัยอยู่ของเส้นใยรา *Scleroderma sinnamariense* CMUSC001 บริเวณรอบ ๆ ราก ต้นกล้ายูคาลิปตัส

(H) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ

Bar B= 1 มิลลิเมตร, C= 1.5 มิลลิเมตร, D= 1 ไมโครเมตร, E= 20 ไมโครเมตร, F= 20 ไมโครเมตร

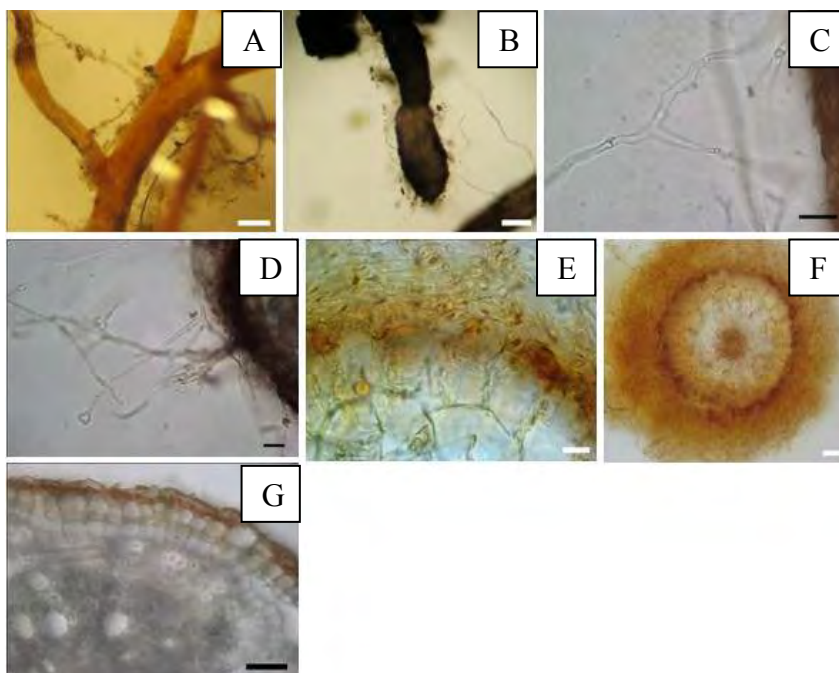
4.3.3 การศึกษาความสัมพันธ์ของเห็ด กรวด และเห็ดลูกฟูกกับพืชอาศัยในสภาวะโรงเรือนมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การทดสอบการเข้ารากเอคโตไมคอร์ไรซา ของเส้นใยเห็ดกรวดบริสุทธิ์ *P. albus* CMU005 และ *P. orientalis* CMU0010 กับต้นกล้วยคาลิปัตสในสภาวะโรงเรือน ผลการทดลองพบว่า เมื่อตรวจสอบรากของต้นยูคิปัตสที่ปลูกเชื้อ *P. albus* CMU005 และ *P. orientalis* CMU0010 อายุ 5-6 เดือน พบเพียงเส้นใยเจริญอยู่รอบๆ ราก (ภาพ 40 A) โดยเส้นใยมี clamp connection (ภาพ 40 C) ไม่สร้าง mantle sheath และ Hartig net (ภาพ 40 A) แต่เมื่อนำต้นกล้วยคาลิปัตสที่ปลูกเชื้ออายุ 7 เดือน มาตรวจสอบราก พบว่ารากมีลักษณะปลายบวมพอง (ภาพ 40 B) เมื่อทำการตัดตามขวางของโครงสร้างราก พบโครงสร้าง mantle sheath และ Hartig net (ภาพ 40E, 40F) โดยเปรียบเทียบกับรากของต้นยูคาลิปัตสที่ไม่ปลูกเชื้อ ส่วน *S. sinnamariense* CMUSC001 เมื่อนำต้นกล้วยคาลิปัตสที่ปลูกเชื้ออายุ 1 ปี มาตรวจสอบพบเส้นใยเจริญอยู่รอบ ๆ ราก ไม่พบโครงสร้าง mantle sheath และ Hartig net (ภาพ 40 D) เมื่อเปรียบเทียบกับความสูงของต้นกล้วยคาลิปัตสที่ปลูกเชื้อ พบว่าต้นกล้วยคาลิปัตสที่ปลูกเชื้อด้วย *P. albus* CMU005 มีค่าความสูงมากที่สุด 85.50 ± 2.15 ตามมาด้วยต้นกล้วยคาลิปัตสที่ปลูกเชื้อ *P. orientalis* CMU0010 ซึ่งมีความสูง 78.50 ± 3.13 เซนติเมตร (ตาราง 6) โดยพบว่าต้นกล้วยคาลิปัตสที่ปลูกเชื้อด้วย *S. sinnamariense* CMUSC001 มีความสูง 52.50 ± 2.52 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นกล้วยคาลิปัตสที่ไม่ปลูกเชื้อ (ตาราง 6) และไม่พบการสร้าง mantle sheath และ Hartig net ของ *S. sinnamariense* CMUSC001

ตาราง 6 ผลการตอบสนองของเชื้อบริสุทธิ์เอคโตไมคอร์ไรซา ด้านความสูงของต้นกล้วยคาลิปัตส

ชนิดหัวเชื้อ	ความสูง (เซนติเมตร)	รัศมี รอบลำต้น (มิลลิเมตร)
<i>P. albus</i> CMU005	85.50 ± 2.15 a	20.50 ± 2.34 a
<i>P. orientalis</i> CMU0010	78.50 ± 3.13 b	19.50 ± 1.69 b
<i>S. sinnamariense</i> CMUSC001	53.50 ± 2.52 c	17.50 ± 2.01 c
ชุดควบคุม	50.00 ± 3.10 d	12.50 ± 2.11 d

หมายเหตุ: ในคอลัมน์เดียวกันตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกันแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Turkey's test เพื่อป้องกันความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลอง ที่ $P < 0.05$



ภาพ 40 การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซาในสภาวะโรงเรือน

(A) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของรากยูคาลิปตัส ที่ปรากฏพืชน้อยอย่างหลวม ๆ ของเส้นใยรา เอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus albus* CMU005

(B) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของรากยูคาลิปตัส ที่ปรากฏพืชน้อยอย่างหลวม ๆ ของเส้นใยรา เอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus orientalis* CMU010

(C) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของรากยูคาลิปตัสหลังจากการปลูกเชื้อ 7 เดือนของ *Pisolithus orientalis* CMU010

(D) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของรากยูคาลิปตัสของ *Scleroderma sinnamariense* CMUSC001 พบเส้นใยบริเวณรอบ ๆ ราก

(E) เส้นใยของเห็ดกรวด *Pisolithus albus* CMU005 และการเข้ารากยูคาลิปตัส

(F) *Pisolithus orientalis* CMU010 พบเส้นใยรอบ ๆ รากต้นยูคาลิปตัส หลังจากปลูกเชื้อ 7 เดือน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

Bar A= 3 มิลลิเมตร, B= 4 มิลลิเมตร, C= 25 ไมโครเมตร, D= 2 ไมโครเมตร, E= 10 ไมโครเมตร, F= 20 ไมโครเมตร

4.3.4 การศึกษาความสัมพันธ์หัวเชื้อบริสุทธิ์เห็ดกรวด และเห็ดลูกฟูกับพืชอาศัยในสภาวะโรงเรือน ณ บริษัท ตรีเพค จังหวัดปราจีนบุรี

การทดสอบการเข้ารากเอคโตไมคอร์ไรซาของเส้นใยเห็ดกรวดบริสุทธิ์ *P. albus* CMU005 และ *P. orientalis* CMU0010 กับต้นกล้วยคาลิปตัสในสภาวะโรงเรือน ผลการทดลอง

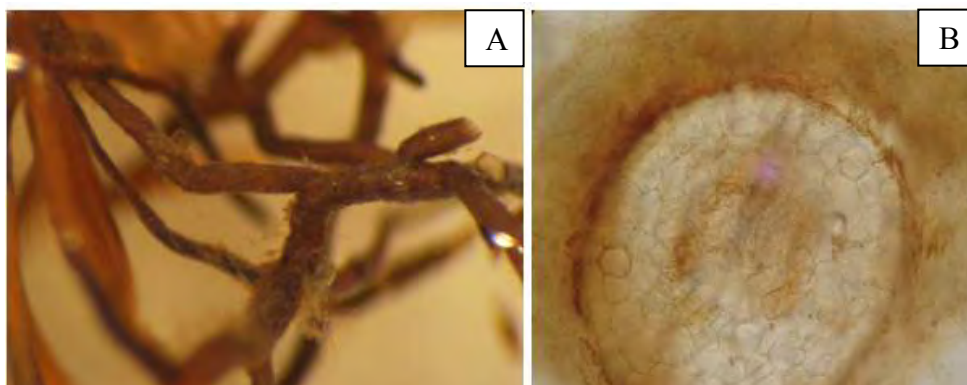
พบว่า เมื่อตรวจสอบรากของต้นยูคาลิปตัสที่ปลูกเชื้อ *P. albus* CMU005 และ *P. orientalis* CMU0010 อายุ 5-6 เดือน พบเพียงเส้นใยเจริญอยู่รอบ ๆ ราก (ภาพ 41 A) โดยเส้นใยมี clamp connection พบการสร้าง mantle sheath (ภาพ 41 B) ในต้นกล้าที่ปลูกเชื้ออายุ 7 เดือน โดยเปรียบเทียบกับรากของต้นยูคาลิปตัสที่ไม่ปลูกเชื้อ ส่วน *S. sinnamariense* CMUSC001 เมื่อนำต้นกล้าที่ปลูกเชื้ออายุ 1 ปี มาตรวจสอบพบเส้นใยเจริญอยู่รอบ ๆ ราก ไม่พบโครงสร้าง mantle sheath และ Hartig net และเมื่อเปรียบเทียบผลของการเจริญทางด้านความสูง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (ตาราง 7)

เมื่อเปรียบเทียบด้านความสูงของต้นกล้ายูคาลิปตัสที่ปลูกเชื้อ (ตาราง 7) พบว่าต้นกล้ายูคาลิปตัสสายพันธุ์ K7 มีการตอบสนองในด้านการเจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์ PT48 โดยพบว่า ต้นที่ปลูกเชื้อด้วย *P. albus* CMU005 มีค่าความสูงมากที่สุดคือ 70.10 และ 60.00 เซนติเมตรในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ K7 และ PT48 ตามลำดับ รองลงมาคือต้นกล้าที่ปลูกเชื้อ AMF *G. etunicatum* AMF *G. mosseae* และชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อไมคอร์ไรซา ตามลำดับ

ตาราง 7 การปลูกเชื้อสดของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับต้นกล้าปักชำยูคาลิปตัส

การทดลอง	ความสูงของต้น (เซนติเมตร)	
	PT48	K7
Control	25.75d	26.60d
EMC <i>P. albus</i> CMU005	70.10a	60.00a
AMF <i>G. etunicatum</i>	35.33b	39.40b
AMF <i>G. mosseae</i>	33.25c	36.00c

หมายเหตุ: ในคอลัมน์เดียวกันตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกันแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Turkey's test เพื่อบ่งบอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลอง ที่ $P < 0.05$



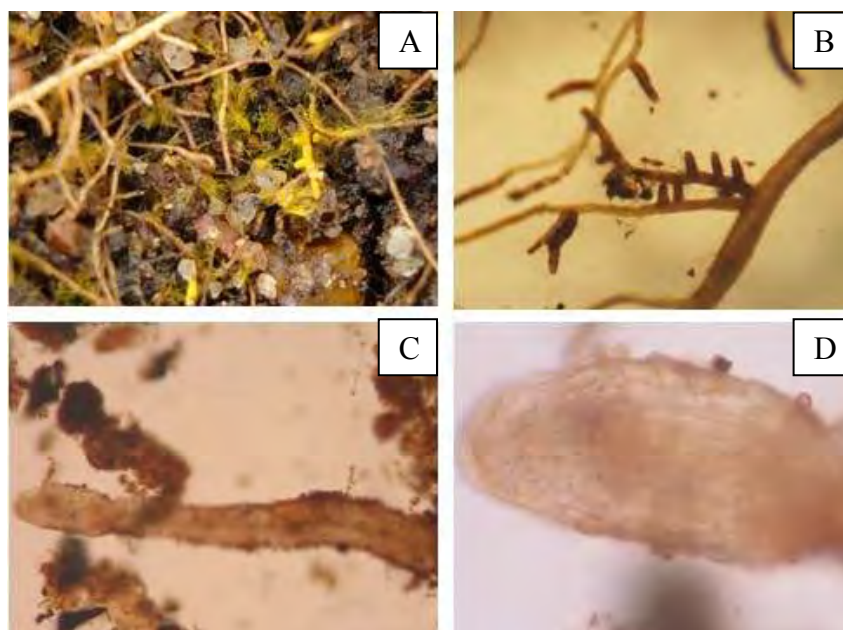
ภาพ 41 ลักษณะภายใต้กล้องของรากยูคาลิปตัส

(A) ลักษณะภายใต้กล้องสเตอริโอของรากยูคาลิปตัส K7 ที่ปรากฏพันธุ์อย่างหลวม ๆ ของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซา

B) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของรากยูคาลิปตัส PT48 ที่ปรากฏการพบการสร้างmantle sheath ของเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซา หลังจากปลูกเชื้อ 4 เดือน

4.3.5 การศึกษาผลของการปลูกหัวเชื้อสเตรปโตไมคอร์ไรซาและสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาหลังการปลูกเชื้อบนวัสดุปลูก: ปุ๋ยหมัก ขุยมะพร้าว และดินผสมทราย

การทดลองปลูกเชื้อสเตรปโตไมคอร์ไรซาที่เกิดการวัดที่เก็บจากสวนป่าของทางบริษัท ผสมกับวัสดุปลูก คือ ขุยมะพร้าว ปุ๋ยหมัก และดินผสมทราย ร่วมกับการงดการให้ปุ๋ยแก่ต้นกล้าตลอดระยะเวลาการทดลองเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าการตอบสนองของต้นกล้ายูคาลิปตัสปักชำทั้งสองสายพันธุ์ คือ PT48 และ K7 เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.01$ ในทุกค่าการเจริญที่ทำการวัด พบการสร้างเส้นใยอยู่บนบริเวณผิวดิน (rhizomorph) และเกาะที่รากของต้นกล้ายูคาลิปตัส (ภาพ 42 A) เมื่อนำมาส่องภายใต้กล้องสเตอริโอ พบว่า ลักษณะของรากมีสรีรวิทยาที่เปลี่ยนไป คือมีลักษณะอ้วน สั้น และแตกแขนงน้อย ซึ่งเป็นลักษณะของรากที่มีเอคโตไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ (ภาพ 42 B, C, D) เมื่อศึกษาทางด้านความสูงของต้นกล้ายูคาลิปตัสพบความแตกต่างด้านความสูงหลังจากการปลูกเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซา และอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมของสายพันธุ์ PT48 และ K7 ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ PT48 หลังการปลูกด้วยหัวเชื้อสดของเอคโตไมคอร์ไรซา ทำให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้นและราก ความสูงของลำต้น รวมถึงปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมต่อต้นมีค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกด้วยอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและชุดควบคุม (ตาราง 8) การปลูกเชื้อดังกล่าวให้ผลเช่นเดียวกันกับการเจริญของยูคาลิปตัสสายพันธุ์ K7 ในทุกชุดการทดลอง (ตาราง 9) ยกเว้นในด้านความสูงของลำต้น ที่การปลูกเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซาให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือ *G. etunicatum*, *G. mosseae* และชุดควบคุม ตามลำดับ ลักษณะของต้นกล้ายูคาลิปตัสในแต่ละชุดการทดลอง ดังภาพ 43

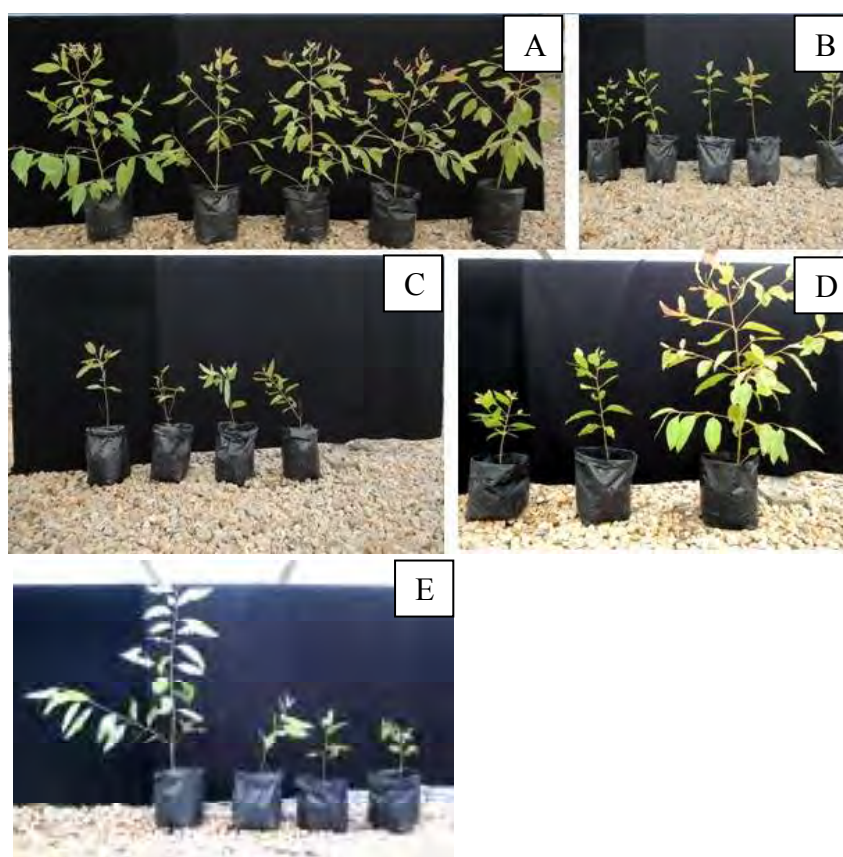


ภาพ 42 ลักษณะรากต้นกล้ายูคาลิปตัส หลังจากการปลูกเชื้อด้วยสปอร์สด อายุ 3 เดือน

A) ลักษณะของรากยูคาลิปตัส K7 ที่ปรากฏเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซา (เส้นใยสีเหลือง) พันอยู่อย่างหลวม ๆ และมีการสร้าง Rhizomorph

B) ลักษณะภายใต้กล้องสเตอริโอของรากยูคาลิปตัส PT48 ที่ปรากฏเส้นใยราเอคโตไมคอร์ไรซา พันอยู่อย่างหลวม ๆ และลักษณะรากอ้วนสั้น แดกแขนงน้อย หลังจากปลูกเชื้อ 3 เดือน

C-D) ลักษณะของรากที่มีการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาไปเป็นรากที่อ้วนสั้น



ภาพ 43 ต้นกล้วยคาลิปัตส์ หลังการปลูกเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

- (A) ต้นกล้วยคาลิปัตส์สายพันธุ์ K7 หลังการปลูกเชื้อสโตเอคโตไมคอร์ไรซาอายุ 3 เดือน
- (B) ต้นกล้วยคาลิปัตส์สายพันธุ์ K7 หลังการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา อายุ 3 เดือน
- (C) ต้นกล้วยคาลิปัตส์สายพันธุ์ K7 ไม่ได้ปลูกเชื้อ อายุ 3 เดือน
- (D) ผลการตอบสนองทางความสูงของต้นกล้วยคาลิปัตส์ สายพันธุ์ K7 หลังการปลูกเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซา, อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และชุดควบคุม เรียงจากขวาไปซ้ายตามลำดับ
- (E) ผลการตอบสนองทางความสูงของต้นกล้วยคาลิปัตส์ สายพันธุ์ PT 48 หลังการปลูกเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซา, อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และชุดควบคุม เรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ

ตาราง 8 ผลการตอบสนองของต้นกล้วยคาลิปตัดปักชำสายพันธุ์ PT48 ต่อการปลูกเชื้อเอกโตไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในด้านการเจริญและปริมาณธาตุอาหารของลำต้น

การทดลอง	น้ำหนักสดต้น (กรัม)	น้ำหนักแห้งต้น (กรัม)	น้ำหนักสดราก (กรัม)	น้ำหนักแห้งราก (กรัม)	ความสูง (เซนติเมตร)	ไนโตรเจน (Total N) g/ต้น	ฟอสฟอรัส (Total P) g/ต้น	โพแทสเซียม (Total K) g/ต้น
EMC (K7)	30.37a	19.12a	30.37a	14.97a	58.00a	14.39a	3.78a	16.71a
<i>G. mosseae</i> (K7)	4.82b	1.59b	9.22b	1.71b	33.33c	1.44b	0.35b	1.35b
<i>G. etunicatum</i> (K7)	7.03b	2.52b	3.90b	0.81b	40.67b	2.14b	0.55b	2.39b
Control (K7)	4.00b	1.38b	5.42b	1.05b	26.67d	1.28b	0.28b	1.17b
นัยสำคัญทางสถิติ	**	**	**	**	**	**	**	**

หมายเหตุ: ตัวอักษรบ่งบอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละคอลัมน์ที่ **: $p < 0.01$ โดยการวิเคราะห์ One-way ANOVA

ตาราง 9 ผลการตอบสนองของต้นกล้วยคาลิปตัสปักชำสายพันธุ์ K7 ต่อการปลูกเชื้อเห็ดโตไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในด้านการเจริญและปริมาณธาตุอาหารของลำต้น

การทดลอง	น้ำหนักสดต้น (กรัม)	น้ำหนักแห้งต้น (กรัม)	น้ำหนักสดราก (กรัม)	น้ำหนักแห้งราก (กรัม)	ความสูง (เซนติเมตร)	ไนโตรเจน (Total N) g/ต้น	ฟอสฟอรัส (Total P) g/ต้น	โพแทสเซียม (Total K) g/ต้น
EMC (K7)	30.37a	19.12a	30.37a	14.97a	58.00a	14.39a	3.78a	16.71a
<i>G. mosseae</i> (K7)	4.82b	1.59b	9.22b	1.71b	33.33c	1.44b	0.35b	1.35b
<i>G. etunicatum</i> (K7)	7.03b	2.52b	3.90b	0.81b	40.67b	2.14b	0.55b	2.39b
Control (K7)	4.00b	1.38b	5.42b	1.05b	26.67d	1.28b	0.28b	1.17b
นัยสำคัญทางสถิติ	**	**	**	**	**	**	**	**

หมายเหตุ: ตัวอักษรบ่งบอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละคอลัมน์ที่ **: $p < 0.01$ โดยการวิเคราะห์ One-way ANOVA

4.3.5 การปลูกเชื้อร่วม (co-inoculation) ของเชื้อบริสุทธิ์เอคโตไมคอร์ไรซาและสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับต้นกล้วยคาลิปัส

การศึกษาผลของการปลูกเชื้อร่วมต่อการเจริญเติบโตของยูคาลิปตัส โดยทำการปลูกเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซาสองสายพันธุ์คือ *Pisolithus albus* และ *Scleroderma sinnamariense* ที่อยู่ในรูปหัวเชื้อบริสุทธิ์ในวัสดุเพาะที่เป็นเวอร์มิคูไลต์ สปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา รวมถึงการปลูกเชื้อร่วมกันของไมคอร์ไรซาทั้งสองชนิด ผลการทดลองพบว่า ยูคาลิปตัสทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญในด้านความสูงดีที่สุดหลังจากการปลูกเชื้อร่วมของเอคโตไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (ตาราง 10) รองลงมาคือ การปลูกด้วยสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา, *P. albus*, *S. sinnamariense* และชุดควบคุม ตามลำดับ ลักษณะต้นกล้าทั้งสองสายพันธุ์หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 เดือน ดังภาพ 44-45

ตาราง 10 ผลการตอบสนองด้านความสูงของลำต้นต่อการปลูกเชื้อร่วม (Co-inoculation)

การทดลอง (co-inoculation)	ความสูงของต้น (เซนติเมตร)	
	PT48	K7
Control	60.00e	57.50d
EMC <i>P. albus</i>	70.00c	65.00c
EMC <i>S. sinnamariense</i>	65.00d	57.50d
AMF	75.00b	70.00b
AMF+EMC	80.00a	81.30a

หมายเหตุ: ตัวอักษรบ่งบอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละคอลัมน์ที่ $p < 0.05$



ภาพ 44 ยูคาลิปตัสปากชำสายพันธุ์ K7 อายุ 4 เดือนหลังการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซา



ภาพ 45 ยูคาลิปตัสปากชำ สายพันธุ์ PT48 อายุ 4 เดือนหลังการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซา

4.3.6 การศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสต่อการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

จากการทดลองให้ปุ๋ยสูตร 20-20-20 และ 6-32-32 อัตราส่วน 1:1 สัปดาห์ละครั้งที่มีความเข้มข้นต่างๆ แก่ต้นกล้วยคาลิปตัส พบว่าในทุกความเข้มข้นของปุ๋ยไม่ทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (ตาราง 9) แต่มีผลให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้นและรากมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของปุ๋ย โดยการให้ปุ๋ยที่ความเข้มข้น 1X ทำให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้นและรากมีค่ามากที่สุด ที่ $P < 0.01$ และให้ความสูงของลำต้นมากที่สุด ที่ $P < 0.05$ ลักษณะของลำต้นยูคาลิปตัสหลังการปลูกเชื้อ ดังภาพ 46

ตาราง 11 การศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสต่อการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การทดลอง	น้ำหนักสด ลำต้น (กรัม)	น้ำหนัก แห้งลำต้น (กรัม)	น้ำหนักสด ราก (กรัม)	น้ำหนักแห้ง ราก (กรัม)	ความสูง ของต้น (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์ การเข้าสู่ ราก
ไม่รดปุ๋ย	9.91c	3.06c	6.35b	1.31b	34.67b	38a
0.25X	15.48bc	4.24c	7.79b	1.74b	43.67b	35a
0.5X	19.78bc	6.37bc	13.25b	2.80b	41.33b	29a
0.75X	24.72b	8.01b	12.98b	3.03b	38.33b	30a
1X	35.55a	11.48a	23.21a	5.60a	50.67a	28a
นัยสำคัญทางสถิติ	**	**	**	**	*	ns

หมายเหตุ: ตัวอักษรบ่งบอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละคอลัมน์ที่ **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ และ ns: ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ One-way ANOVA



ภาพ 46 ลักษณะต้นยูคาลิปตัสปักชำอายุ 3 เดือนหลังการทดสอบผลของการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 1X, 0.75X, 0.5X, 0.25X และไม่รดปุ๋ย เรียงตามลำดับจากซ้ายไปขวา

4.3.7 การตอบสนองของต้นกล้วยปักชำยูคาลิปตัสต่อการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

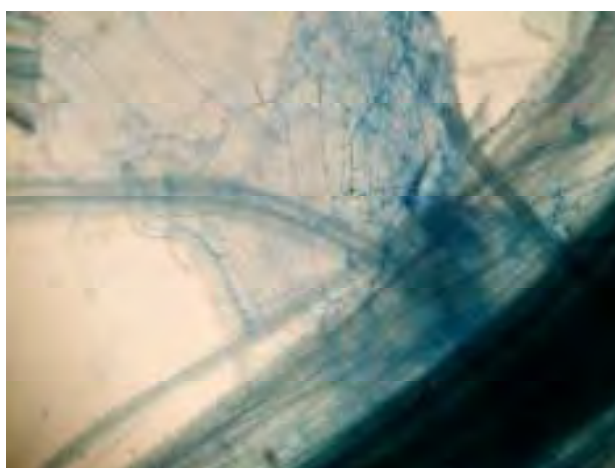
การปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับยูคาลิปตัสสายพันธุ์ PT48 ไม่มีผลทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อความสูงและน้ำหนักสดของลำต้นในทุกชุดการทดลอง (ตาราง 10) แต่พบว่า *G. etunicatum* ให้ผลดีที่สุดกับยูคาลิปตัสสายพันธุ์ PT48 เมื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกเชื้อ *Glomus* AK, *G. mosseae*, *E. colombiana* และชุดควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อ ส่วนการปลูกเชื้อให้กับยูคาลิปตัสสายพันธุ์ K7 ต้นที่ปลูกด้วยเชื้อ *E. colombiana* มีความสูงของลำต้นเปอร์เซ็นต์

การเข้าสู่รากของเชื้อรามากที่สุด รองลงมาคือ *G. mosseae*, *G. etunicatum*, *Glomus* AK และชุดควบคุม ตามลำดับ แต่ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อน้ำหนักสดของลำต้นในทุกชุดการทดลอง *E. colombiana* มีเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากสูงสุดในยูคาลิปตัสสายพันธุ์ K7 ($P < 0.01$) เช่นเดียวกันในสายพันธุ์ PT48 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ลักษณะเส้นใยอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในรากยูคาลิปตัส เป็นดังภาพ 47

ตาราง 12 การตอบสนองของต้นกล้าปักชำยูคาลิปตัสต่อการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การทดลอง	ความสูงของต้น (เซนติเมตร)		น้ำหนักสดของลำต้น (กรัม)		อัตราการเข้าสู่ราก (เปอร์เซ็นต์)	
	PT48	K7	PT48	K7	PT48	K7
ชุดควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อ)	73.2a	63.6c	79a	121a	0b	0c
<i>Glomus</i> AK	84.8a	83.4b	93a	129a	40.6a	53.13ab
<i>G. etunicatum</i>	91.8a	103.8a	97a	146a	46.9a	19.23bc
<i>G. mosseae</i>	84.4a	104.6a	87a	132a	59.6a	35abc
<i>Entrophospora colombiana</i>	78.0a	118.4a	88a	136a	60.5a	64.53a
นัยสำคัญทางสถิติ	ns	**	ns	ns	*	**

หมายเหตุ: ตัวอักษรบ่งบอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละคอลัมน์ที่ **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ และ ns: ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยการวิเคราะห์ One-way ANOVA



ภาพ 47 แสดงการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในเนื้อเยื่อชั้นคอร์เทกซ์ของรากยูคาลิปตัสปักชำ อายุ 6 เดือนหลังการปลูกเชื้อ

ต้นกล้าปักชำยูคาลิปตัสสายพันธุ์ K7 มีการตอบสนองด้านการเจริญของลำต้นดี หลังจากทำการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ ส่วนอัตราการเข้าสู่รากของเชื้อแต่ละชนิด มีความแปรผันไปตามชนิดสปอร์และสายพันธุ์ของต้นกล้า แต่ไม่ได้แปรผันตรงต่อการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้า ลักษณะของต้นกล้าอายุ 4 เดือนหลังการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ดังภาพ 48 และ 49



ภาพ 48 ยูคาลิปตัสปักชำ สายพันธุ์ K7 อายุ 4 เดือนหลังการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา



ภาพ 49 ยูคาลิปตัสปักชำ สายพันธุ์ PT48 อายุ 4 เดือนหลังการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

4.4 งานศึกษาเพิ่มเติม

1. การศึกษาความหลากหลายของเอดโตไมคอร์ไรซาในแปลงปลูกต่าง ๆ ของทางบริษัท

พบว่าในแปลงปลูกยูคาลิปตัสของทางบริษัท มีเห็ดราเอดโตไมคอร์ไรซาชนิดเด่นคือเห็ดกรวด *Pisolithus* spp. ซึ่งเป็นชนิดที่มีรายงานว่ามีความสำคัญที่สุดสำหรับการปลูกป่า และได้ถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตให้กับยูคาลิปตัสที่ปลูกเป็นการค้ามานาน ดังนั้นการชักนำราชนิดนี้เข้าสู่ดินจึงเป็นผลในการเพิ่มการผลิตของพลังงานและไฟเบอร์ให้กับโฮสต์ และยังพบเห็ดเอดโตไมคอร์ไรซาอื่น ๆ ได้แก่ เห็ดลูกฝุ่นและเห็ดตับเต่า รวมด้วย (ภาพ 49)



ภาพ 50 ลักษณะสวนป่าของทางบริษัท (A-B) โดยออกเก็บตัวอย่างดินรอบๆรากเพื่อมาวิเคราะห์ธาตุอาหารและสำรวจเอดโตไมคอร์ไรซารอบๆ รากยูคาลิปตัส (C) อีกทั้งศึกษาความหลากหลายเห็ดไมคอร์ไรซา พบ เห็ดก้อนกรวด (D-E) เห็ดลูกฝุ่น (F)

2. วิเคราะห์ธาตุอาหารในดินที่เก็บจากแปลงปลูกยูคาลิปตัสของบริษัท ทรีเทค จำกัด

ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และอินทรีย์วัตถุในดินที่เก็บตัวอย่างมาจากแปลงปลูกยูคาลิปตัสต่างๆของบริษัท ทรีเทค จำกัด เป็นดังตาราง 13 แปลงปลูกทำตุ้ม แปลง 1 มีปริมาณอินทรีย์วัตถุ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสมากที่สุด ในขณะที่แปลงคลองเขียว 1 มีปริมาณธาตุอาหารข้างต้นในปริมาณน้อยที่สุด

ตาราง 13 ผลการวิเคราะห์ธาตุอาหารในดินที่เก็บจากแปลงปลูกยูคาลิปตัส

ตัวอย่าง	อินทรีย์วัตถุ (OM) g/100g	ไนโตรเจน ทั้งหมด (Total N) g/100g	ฟอสฟอรัส (P) mg/kg	โพแทสเซียม (K) mg/kg
ทำตุ้ม แปลง 1	4.95	0.212	16.63	71.10
ทำตุ้ม แปลง 2	2.28	0.097	13.62	101.51
แปลงลิขสิทธิ์ 1	1.41	0.068	9.64	197.29
แปลงคลองเขียว 1	1.21	0.057	3.36	42.21

5. อภิปรายผลการทดลอง

5.1 หาชินิดECMและAMที่เหมาะสมในการช่วยการเจริญของกล้ายูคาลิปตัสจากสายพันธุ์ที่ปลูก เป็นการค้าในประเทศไทย ซึ่งเป็นกล้าที่ผลิตจากการปักชำและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การสำรวจความหลากหลายและเก็บตัวอย่างเห็ดกรวดและเห็ดลูกฟู้นในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงกรกฎาคม 2553 โดยทำการเก็บตัวอย่างใน 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และ เชียงราย พบ *P. albus* อาศัยกับยูคาลิปตัส (*E. camadulensis*) ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และ เชียงราย *P. orientalis* อาศัยกับต้นควินิน (*Cinchona pubescens*) และต้นสนสามใบ (*Pinus kesiya*) ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และ *S. sinnamariense* อาศัยกับต้นอบเชย (*Cinnamomum bejolghota*) ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ การศึกษาพบว่า *P. albus* มีความสัมพันธ์กับ *E. camaldulensis* ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับ Kanchanaprayudh *et al.* (2003) พบ *P. albus* มีความสัมพันธ์กับต้นยูคาลิปตัส *E. camaldulensis* ซึ่งพบในจังหวัดลำพูนในประเทศไทย นอกจากนี้ในประเทศออสเตรเลีย จีน มาเลเซีย มออคโค และสเปน ยังมีการรายงานพบความสัมพันธ์ของ *P. albus* กับต้นยูคาลิปตัสและต้นอาเคเซีย (Bougher and Syne, 1998; Martin *et al.*, 2002; Bakkali-Yakhlef *et al.*, 2009) ผลการศึกษานี้พบว่า *P. orientalis* มีความสัมพันธ์กับต้นสนสามใบ (*P. kesiya*) ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับ Martin *et al.* (2002) ที่รายงานว่า *P. orientalis* มี

ความสัมพันธ์กับต้นยูคาลิปตัส (*E. maidenii* และ *E. urophylla*) และ ต้นสน (*P. urophylla* และ *P. yunnanensis*) ในประเทศจีน และการศึกษาในประเทศไทยของ Phosriet *et al.* (2012) รายงานว่า *P. orientalis* ที่เก็บจากทางภาคเหนือตอนบนของประเทศไทยมีความสัมพันธ์ระหว่างต้นสนสามใบ (*P. kesiya*) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่า *P. albus* มีความสัมพันธ์กับยูคาลิปตัสในบริเวณสวนป่ายูคาลิปตัส บริษัท ทรีเทค จำกัด และ *P. orientalis* มีความสัมพันธ์กับอบเชย เห็ดลูกฝุ่น *S. sinnamariense* เป็นเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีการกระจายตัวในเขตร้อนเช่น มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ นิวไอร์แลนด์ และสามารถพบได้ในบริเวณตอนกลางของทวีปอเมริกา (Guzmán, 1970; Watling and Smith, 2004) จากรายงานก่อนหน้านี้ พบเห็ดลูกฝุ่น *S. sinnamariense* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (Phosri *et al.*, 2009) การศึกษานี้พบว่า *S. sinnamariense* อาศัยกับต้นอบเชย

จากการสำรวจความหลากหลายและการเข้าสู่รากของสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในดินรอบรากยูคาลิปตัสที่เก็บจากแหล่งต่างๆ พบว่ายูคาลิปตัสสามารถสร้างรูปแบบการเจริญร่วมกับอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ เปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากจากทุกแหล่งอยู่ระหว่าง 34–48% Malajczuk *et al.*, (1981) พบว่ามีรายงานรูปแบบดังกล่าวมาตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1934 และพบว่าเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากอยู่ระหว่าง 30–35% ในยูคาลิปตัส *E. marginata* และ *E. diversicolor* ซึ่งมีค่าน้อยกว่าต้น *Acacia pulchella* (50–70%) ที่ใช้เปรียบเทียบในการทดลอง Chen และคณะ (2007) สำรวจความหลากหลายของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในสวนยูคาลิปตัสทางตอนใต้ของจีน พบว่าสปอร์ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของจีนัส *Glomus* แต่มีจำนวนสปอร์น้อยและมีการเข้าสู่รากยูคาลิปตัสของทั้งเอคโตไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในอัตราที่ต่ำ จากงานวิจัยนี้พบว่าสปอร์ชนิดเด่น จัดอยู่ในจีนัส *Acaulospora* แต่จำนวนสปอร์ที่พบมีจำนวนน้อยเช่นกัน มีค่าระหว่าง 5.3–79 สปอร์ต่อดิน 100 กรัม ชนิดเด่นของสปอร์อาจมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการอยู่รอดได้ในสภาวะแวดล้อมรวมถึงสภาวะการเกษตรที่หลากหลาย เช่น การไถพรวน การปลูกพืชหมุนเวียน หรือการถูกชะทำลายผิวหน้าดินซึ่งสภาวะดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวนสปอร์ของ AM fungi ส่วนใหญ่ ดังนั้นการที่จะนำสปอร์ไปใช้ปลูกเชื้อในการทดลองต่อไป จำเป็นที่จะต้องทำการเพิ่มจำนวนสปอร์ให้ได้ปริมาณมากพอ เพื่อใช้ทดสอบการตอบสนองต่อการปลูกเชื้อของต้นยูคาลิปตัส

5.2 ผลิตหัวเชื้อจากสายพันธุ์ไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกแล้ว

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเห็ดกรวด *P. orientalis* CMU010 และ *P. albus* CMU005 และเห็ดลูกฝุ่น *S. sinnamariense* ในอาหารวัน 10 ชนิด พบว่า MMN medium เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของเส้นใย *P. albus* ส่วนเชื้อบริสุทธิ์ของ *P. orientalis* มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุดในอาหาร MMN medium แต่พบว่า อาหาร MS medium ให้น้ำหนักของเส้นใยมากที่สุด เห็ดลูกฝุ่น *S. sinnamariense* CMUSC001 เจริญได้ดีที่สุดในอาหาร FH medium จากรายงานก่อนหน้านี้ พบว่า อาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ของเอคโตไมคอร์ไรซา

แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา ตัวอย่างเช่น Sanmee (2004) และ Kumla *et al.*, (2011) พบว่า *P. potentosus* สามารถเจริญได้ดีในอาหาร FH medium และ MS medium นอกจากนี้ Kalm and Kalyoncu (2008) พบว่าอาหาร PDA และ MEA เป็นอาหารที่เหมาะสมกับเห็ด *Morchella* spp. และ Xu *et al.*, (2008) รายงานว่า *Laccarius deliciosus* สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร pine juice iron-magnesium ส่วน Rossi *et al.* (2002) พบว่า *P. microcarpus* สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร MMN medium นอกจากนี้ Xu *et al.* (2008) และ Kumla *et al.* (2011) พบว่าเส้นใยบริสุทธิ์ของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาต้องการสารอาหารและวิตามินสูงในการเจริญ

อุณหภูมิจัดเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญของเส้นใยอีกข้อหนึ่ง ซึ่งเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่ต่างกัน การศึกษาครั้งนี้พบว่าเห็ดกรวด (*P. orientalis* CMU010 และ *P. albus* CMU005) และเห็ดลูกฟุ้ง (*S. sinnamariense* CMUSC001) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20 – 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยเห็ดทั้ง 3 ชนิด คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์จะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ เช่น Sanmee (2004) และ Kumla *et al.* (2011) ได้รายงานไว้ว่า *P. portentosus* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Sánchez *et al.* (2001) รายงานว่า เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา ในแถบเมดิเตอร์เรเนียน สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส Xu *et al.*, (2008) รายงานว่า *Lactarius deliciosus*, *L. insulsus* และ *B. edulis* เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วน *Amanita caesarea* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 24–28 องศาเซลเซียส (Daza *et al.*, 2006)

การศึกษาเห็ดกรวด (*P. orientalis* CMU010 และ *P. albus* CMU005) พบว่า pH 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญ ส่วนเห็ดลูกฟุ้ง *S. sinnamariense* CMUSC001 พบว่า pH 5.0 เป็น pH ที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ของ (Daza *et al.*, 2006) ซึ่งระบุว่าซึ่งระบุว่าเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่มักเจริญได้ดีในอาหารที่มี pH เป็นกรดเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yamanaka, (2003) และ Xu *et al.*, (2008) ซึ่งรายงานไว้ว่า *Boletus edulis* และ *Hebeloma* sp. สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 ส่วน *P. portentosus* เจริญได้ดีที่สุดที่ pH 4.0 (Sanmee, 2004; Kumla *et al.*, 2011) *H. vinosophyllum*, *Lactarius bicolor* และ *L. deliciosus* เจริญได้ดีที่สุดที่ pH 6.0 รายงานของ Xu *et al.* (2008) และ Dix and Webster (1995) พบว่า *A. caesarea* เจริญได้ดีที่ 6.0-7.0 และ *P. tinctorius* เจริญได้ดีที่ pH 6.6 (Hung and Chien, 1979)

การผลิตหัวเชื้อบนวัสดุปลูกเวอร์มิคูไลท์: พีท (1:1 v/v) โดยเส้นใยเห็ดกรวดเจริญเต็มขวดโดยใช้เวลา 30 วัน เมื่อบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียสในที่มีระยะเวลา 3 เดือน และเติมสารละลาย MMN medium และ MS medium ในอัตราส่วน (50: 200 v/v) ในการทดลองนี้ ได้ผลเช่นเดียวกับ Lee *et al.*, (2008) ซึ่งได้ทดสอบการสร้างไมคอร์ไรซาบนวัสดุปลูกเวอร์มิคูไลท์: พีท (1:9 v/v) เมื่อเติมสารละลาย Pachlewski's liquid media บ่มในที่มืดเป็นระยะเวลา 15 วัน การผลิตหัวเชื้อของ

เอกโตไมคอร์ไรซาด้วยวิธีนี้ เป็นวิธีเดียวที่ทำให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ได้เส้นใยไมคอร์ไรซาในปริมาณมากและพร้อมที่จะนำไปปลูกเชื้อเพื่อให้งอกเส้นใยเข้าสู่รากใหม่ได้อย่างรวดเร็ว ถึงแม้ว่าเอกโตไมคอร์ไรซาจะเป็นเชื้อที่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แต่การจะผลิตหัวเชื้อในระดับสเกลใหญ่ด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ เกิดความยุ่งยากในการจัดการและต้องเพาะเลี้ยงในสภาวะควบคุม เนื่องจากต้องเตรียมสารละลายธาตุอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ และบ่มเป็นระยะเวลานาน 30 วันในสภาพปลอดเชื้อ ประกอบกับเวอร์มิคูไลต์และพีทที่ใช้เป็นวัสดุเพาะ มีราคาค่อนข้างแพง (ภาคผนวก) และเป็นสินค้านำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นการทดลองประยุกต์ใช้สปอร์สดที่เก็บจากดอกเห็ดกรวด *Pisolithus* sp. ที่เจริญร่วมกับยูคาลิปตัสตามธรรมชาติและเป็นเอกโตไมคอร์ไรซาชนิดเด่นที่จำเพาะกับยูคาลิปตัส (Chen *et al.*, 2007) มาปลูกให้กับยูคาลิปตัสในระยะต้นกล้าจึงเป็นวิธีการที่ง่ายต่อการจัดการมากที่สุด ข้อจำกัดอยู่ที่ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเชื้อสดจำกัดอยู่ในช่วงเดือนมิถุนายน-เดือนกรกฎาคมเท่านั้น ซึ่งจำเป็นต้องหาวิธีเก็บเชื้อสดให้อยู่ในรูปสปอร์แห้งและต้องมีการตรวจสอบอัตราการงอกในระหว่างการเก็บรักษาและหาอัตราการงอกของสปอร์ก่อนนำมาปลูกร่วมกับต้นกล้า

การเพิ่มจำนวนสปอร์ของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยใช้วิธีการดักสปอร์จากดินรอบรากยูคาลิปตัสที่เก็บมาจากแหล่งปลูกต่างๆ โดยใช้ยูคาลิปตัสที่ได้จากการเพาะเมล็ดเป็นพืชอาศัย เนื่องจากต้องการเพิ่มจำนวนสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่จำเพาะต่อการเจริญร่วมกับต้นยูคาลิปตัส การทดลองนี้พบว่า ดินหัวเชื้อจากหอพักชาย 2 คณะอุตสาหกรรมเกษตรสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ในต้นกล้ายูคาลิปตัสได้มากที่สุดและพบสปอร์ชนิดเด่นคือ *Acaulospora* AG รองลงมาคือ ดินหัวเชื้อจากหมู่บ้านอ่างแก้วซึ่งพบสปอร์ชนิดเด่นคือ *Glomus* AK สปอร์ทั้งสองชนิดมีปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้ในการปลูกเชื้อในการทดลองต่อไป อาจเนื่องมาจาก ดินจากหอพักชาย 2 คณะอุตสาหกรรมเกษตรและหมู่บ้านอ่างแก้ว อาจมีทั้งสปอร์ รากที่มีเส้นใยเชื้อรา AM fungi เจริญอยู่รวมถึง เส้นใยที่เจริญอยู่ในดินตัวอย่าง ทำให้ AM fungi มีโอกาสในการงอกเส้นใยใหม่เพื่อเข้าไปสู่รากใหม่ได้เร็วและดีขึ้น สอดคล้องกับการรายงานของ Brundrett *et al.*, (1996) ที่กล่าวว่าโครงสร้างที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดังกล่าว ช่วยให้ AM fungi สามารถเจริญเข้าไปในรากใหม่ได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สปอร์หรือรากที่มีเส้นใยเชื้อราเพียงอย่างเดียว วิธีการเพิ่มจำนวนสปอร์โดยใช้กระถาง (Pot culture) และใช้ดินเป็นวัสดุปลูกเป็นวิธีที่ง่ายต่อการจัดการมากที่สุด ใช้ต้นทุนการผลิตต่ำ (Ijdo *et al.*, 2011) ซึ่งอาจการฆ่าเชื้อดินด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสสามารถประยุกต์ใช้หม้อนึ่งวัสดุปลูกที่ทางบริษัท ทรีเทค จำกัดมีอยู่ หรืออาจใช้วิธีการรมด้วยสารเมทิลโบรไมด์ (methyl bromide) ซึ่งเป็นสารเคมีที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการรมกำจัดแมลงศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยว และการรมดิน (Soil Fumigation) เพื่อกำจัดไส้เดือนฝอย แมลง เมล็ดวัชพืช และเชื้อโรคพืชบางชนิดก่อนการเพาะปลูกเหมาะแก่การเตรียมดินเพื่อเพิ่มจำนวนสปอร์ในระดับสเกลใหญ่ วิธีการนี้จะทำให้ได้วัสดุปลูกที่ปราศจากเชื้อก่อโรค และทำให้ได้เชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่บริสุทธิ์หลังการปลูกเชื้อและการเก็บสปอร์ อย่างไรก็ตามในการทดลองต่อไปได้ใช้สปอร์

จากห้องปฏิบัติการวิจัยสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการด้านการพัฒนาอย่างยั่งยืนทางทรัพยากรชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่คือ *G. etunicatum* และ *G. mosseae* ร่วมในการปลูกเชื้อทดสอบกับสปอร์ *Acaulospora* AG และ *Glomus* AK ที่เพิ่มได้ด้วยวิธีการดักสปอร์ข้างต้น เพื่อคัดเลือกหาสปอร์ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของกล้ายูคาลิปตัสในการทดลองต่อไป

5.3 หาวีที่ที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อให้กับกล้ายูคาลิปตัสที่ผลิตเป็นการค้า

การทดสอบการสร้างเคโดไมคอร์ไรซากับต้นกล้ายูคาลิปตัส (*E. camadulensis*) ของเชื้อรา *P. albus* CMU005 และ *P. orientalis* CMU010 พบการสร้าง mantle sheath และ Hartig net ในระยะเวลา 3 และ 4 เดือนในห้องปฏิบัติการ, 7 เดือนในสภาวะโรงเรือนภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ 3 เดือนในสภาวะโรงเรือน บริษัท ตรีเพระระยะเวลาการสร้างเคโดไมคอร์ไรซาระหว่างเชื้อเห็ดกรวดกับพืชอาศัยนั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อเห็ดกรวด ชนิดของพืชอาศัยและลักษณะของการทดสอบ ตัวอย่างเช่น Costa et al. (2010) ได้ศึกษาการสร้างเคโดไมคอร์ไรซาของเชื้อบริสุทธิ์ *P. microcarpus* กับต้นยูคาลิปตัส *E. grandis* โดยใช้เส้นใยเป็นหัวเชื้อพบการสร้าง mantle sheath และ Hartig net ระยะเวลา 66 วันหลังการปลูกเชื้อในห้องปฏิบัติการ Rincón et al. (2007) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของ *P. tinctorius* เมื่อปลูกเชื้อด้วยสปอร์และเส้นใยพบการสร้างเคโดไมคอร์ไรซา ต้นสน *P. pinea* ในสภาพโรงเรือนหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 5 เดือน โดยหัวเชื้อที่เป็นสปอร์มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเคโดไมคอร์ไรซาได้ดีกว่าการใช้เส้นใย Misbahuzzaman and Ingleby (2005) พบการสร้าง mantle sheath และ Hartig net ของ *P. tinctorius* กับต้นยูคาลิปตัส *E. globulus* และ *E. camaldulensis* ที่ 18 สัปดาห์หลังจากปลูกเชื้อด้วยเส้นใยในสภาวะโรงเรือน *P. microcarpus* สร้างเคโดไมคอร์ไรซากับต้นกล้ายูคาลิปตัส *E. dunnii* ในระดับโรงเรือนในประเทศบราซิล ระยะเวลา 3 เดือน โดยใช้เส้นใยของเชื้อเป็นหัวเชื้อ (Souza et al., 2008) นอกจากนี้ Turjaman et al. (2005) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของ *P. arhizus* กับไม้วงศ์ยาง *Shorea pinaga* พบการสร้างเคโดไมคอร์ไรซาในสภาวะโรงเรือนหลังจากปลูกเชื้อด้วยสปอร์เป็นเวลา 7 เดือน ต้นกล้ายูคาลิปตัสที่ปลูกเชื้อ *P. albus* CMU005 และ *P. orientalis* CMU010 มีความสูงมากกว่าต้นกล้าที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Xu et al. (2001) พบว่าต้นกล้ายูคาลิปตัส *E. urophylla* ที่ปลูกเชื้อ *P. albus* มีความสูงมากกว่าต้นกล้าที่ไม่ปลูกเชื้อ นอกจากนี้ Turjaman et al. (2005) พบว่า ต้นกล้า *S. pinaga* ที่ปลูกเชื้อ *P. arhizus* มีความสูงมากกว่าต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ และ ต้นกล้าสน *P. pinaster* ที่ปลูกเชื้อด้วย *P. tinctorius* มีความสูงมากกว่าต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ อย่างไรก็ตาม Rincón et al. (2001) พบว่าความสูงต้นกล้า *P. pinea* ที่ปลูกเชื้อด้วย *P. tinctorius* และไม่ปลูกเชื้อไม่มีความแตกต่างกัน

ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *S. sinnanariense* CMUS001 ไม่สร้างเคโดไมคอร์ไรซากับต้นยูคาลิปตัส (*E. camadulensis*) ในห้องปฏิบัติการและสภาวะโรงเรือน อย่างไรก็ตาม การศึกษาก่อนหน้านี้ พบความสัมพันธ์ของเห็ดลูกฟูกอื่นๆ กับยูคาลิปตัสเช่น ในออสเตรเลียและจีนพบ

Scleroderma cepa, *S. citrinum* และ *S. areolatum* (Mao, 2000; Tan and Wang, 2000; Chen *et al.*, 2006a; 2006b) ในออสเตรเลียตะวันตกรายงานว่าพบ กลุ่มเห็ดลูกฝุ่นได้ทั่วไปในสวนป่า *E. globules* (Lu *et al.*, 1998) ส่วนในประเทศบราซิลพบ *S. bovista* และ *S. uruguayensis* ซึ่งสัมพันธ์กับสวนป่ายูคาลิปตัสและต้นสน (Coelho *et al.*, 1997; Giachini *et al.*, 2004)

การปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับกล้วยคาลิปตัสปักชำวิธีที่ใช้ในคือ การแตะสปอร์ที่นับจำนวนแล้วและอยู่บนกระดาษกรองลงบนรากยูคาลิปตัสโดยตรง เพื่อให้สปอร์มีโอกาสเจอรากให้มากที่สุด และเพิ่มโอกาสที่สปอร์จะงอกแทงเส้นใยเข้าไปในรากให้มากยิ่งขึ้น การทดลองปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับกล้วยคาลิปตัสที่ได้จากการเพาะเมล็ด พบว่ายูคาลิปตัสที่ปลูกด้วย *G. etunicatum* มีการเจริญเติบโตของต้นที่ดีที่สุดในด้านของความสูงของลำต้น น้ำหนักแห้งของลำต้นและราก และเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่ราก เมื่อเปรียบเทียบกับกระถางที่ปลูกด้วยเชื้อ *Glomus* AK, *G. mosseae*, *Acaulospora* AG, *E. colombiana* และชุดควบคุมสอดคล้องกับการทดลองของ Chen *et al.*, (2000) ที่ปลูกสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับ *E. globulus* และ *E. urophylla* พบว่ายูคาลิปตัสที่ปลูกสปอร์เชื้อลงไปมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าต้นที่ไม่ได้ปลูกสปอร์เชื้อ ในด้านความสูงของลำต้นและน้ำหนักแห้งของรากและลำต้น ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับการทดลองของ Arriagada *et al.*, (2009) การเพาะกล้วยคาลิปตัสในโรงเรือนของบริษัท ตรีเทค จำกัด มีการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสกับต้นกล้าในระยะแรกเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของต้นกล้า โดยเฉพาะกล่าปักชำที่มีอาการใบเหลืองและลำต้นไหม้ หากงดการให้ปุ๋ยในระยะแรกของการปักชำ Balzergue *et al.*, (2011) รายงานว่าสารที่ขับออกมาจากราก (Root exudates) ของพืชที่เจริญในสภาวะที่มีปริมาณฟอสฟอรัสสูงจะสูญเสียความสามารถในการกระตุ้นอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและขาด strigolactones ซึ่งเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นให้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในดินมาเจริญอยู่โดยรอบราก เมื่อทดสอบการปลูกเชื้อร่วมกับการให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ทางบริษัทใช้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละความเข้มข้นของปุ๋ยที่ให้แก่ต้นยูคาลิปตัสอาจเนื่องมาจาก ปริมาณฟอสฟอรัสที่ให้แก่ต้นกล้ามีปริมาณที่เพียงพอต่อการใช้ในการเจริญเติบโต สอดคล้องกับการรายงานของ Grant *et al.*, (2004) ที่กล่าวว่า การให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสเพิ่มเติมที่มากเกินไปกว่าความต้องการของพืชอาจขัดขวางการเจริญของไมคอร์ไรซา ดังนั้นการที่จะส่งเสริมการพัฒนาของไมคอร์ไรซา ค่าเริ่มต้นของระดับฟอสฟอรัสในดินจึงไม่ควรมากเกินไป ดังนั้นการให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสตามปกติของบริษัท จึงไม่เกิดผลกระทบต่อการเข้าสู่รากและการประยุกต์ใช้ไมคอร์ไรซาภายในโรงเรือน การปลูกเชื้อร่วมกันของเคโดไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา พบว่ายูคาลิปตัสทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญในด้านความสูงที่ดีที่สุดในหลังจากการปลูกเชื้อร่วมของเคโดไมคอร์ไรซาและอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานของ (Misbahuzzaman *et al.*, 2006) ที่พบว่าการปลูกเชื้อร่วมกันของไมคอร์ไรซาทั้งสองชนิด ทำให้ความสูงของลำต้นมีค่ามากกว่าการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพียงอย่างเดียว มีการรายงานว่า ในระยะแรกของการปลูกเชื้อร่วม อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะมีการเข้าสู่รากก่อนในชั้นคอร์เท็กซ์

ของราก ส่วนเอกโตไมคอร์ไรซาจะสร้าง Hartig net และ mantle sheath หุ้มรอบรากในระยะต่อไป เป็นการทำงานร่วมกันในแต่ละระยะหลังการปลูกเชื้อ (Wagg et al., 2008)

การศึกษาทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับการกระจายตัวของเห็ดกรวด *Pisolithus* และเห็ดลูกฝุ่น *Scleroderma* กับพืชอาศัยในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ผลการศึกษานี้มีความสำคัญต่อการเลือกชนิดเห็ดกรวด และเห็ดลูกฝุ่น เพื่อศึกษาการสร้างเอกโตไมคอร์ไรซาและส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าที่ใช้ในโรงเพาะชำซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการจัดการสวนป่าในประเทศไทยจากการศึกษาในครั้งนี้ควรจะศึกษาในด้านความสัมพันธ์ของเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซา *P. albus*, *P. orientalis* และ *S. sinnamariensis* และอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยชนิดอื่นๆ ต่อไป

6. สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดกรวด และเห็ดลูกฝุ่นจากจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดเชียงราย ในช่วงเดือน พฤษภาคม ถึง กรกฎาคม 2553 พบเห็ดกรวด 2 ชนิดคือ *P. albus* ซึ่งอาศัยอยู่กับต้นยูคาลิปตัส (*E. camadulensis*) และ *P. orientalis* ซึ่งอาศัยอยู่กับต้นสนสามใบ (*P. kesiya*) และต้นควินิน (*C. pubescens*) และพบเห็ดลูกฝุ่น 1 ชนิด คือ *S. sinnamariense* ซึ่งอาศัยอยู่กับต้นอบเชย (*C. bejolghota*) โดยเลือกเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดกรวด *P. albus* CMU005 และ *P. orientalis* CMU010 และเห็ดลูกฝุ่น *S. sinnamariense* CMUSC001 เป็นตัวแทนในการศึกษา ส่วนการสำรวจจำนวนและชนิดของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินรอบรากต้นยูคาลิปตัสในพื้นที่จังหวัดลำปาง และจังหวัดปราจีนบุรี พบไมคอร์ไรซาชนิดเด่น ได้แก่ *Acaulospora* sp., *A. spinosa*, *A. mellae*, *A. scrobiculata* และ *Gi. pellucida*

สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์เห็ดกรวด *P. albus* CMU005 คือเลี้ยงบนอาหาร MMN medium ที่ pH 6 และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อบริสุทธิ์เห็ดกรวด *P. orientalis* CMU010 เติบโตได้ดีในอาหาร MMN medium แต่ มีน้ำหนักแห้งสูงที่สุดบนอาหาร MS medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและ pH 6 ส่วนเชื้อบริสุทธิ์เห็ดลูกฝุ่น *S. sinnamariense* CMUSC001 คือเลี้ยงบน อาหาร FH medium ที่ pH 5 และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การผลิตหัวเชื้อเอกโตไมคอร์ไรซาในระดับสเกลใหญ่ ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับเวอร์มิคูไลต์และพีท มีข้อจำกัดในการจัดการ วัสดุเพาะราคาแพงและต้องเพาะเลี้ยงในสภาวะควบคุมเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นการทดลองประยุกต์ใช้สปอร์สดที่เก็บจากดอกเห็ดกรวด *Pisolithus* sp. ที่เจริญร่วมกับยูคาลิปตัสตามธรรมชาติ มาปลูกให้กับยูคาลิปตัสในระยะต้นกล้าจึงเป็นวิธีการที่ง่ายต่อการจัดการมากที่สุด ซึ่งในแปลงปลูกยูคาลิปตัสของทางบริษัท ทรีเทค จำกัด มี *Pisolithus* spp. เป็นชนิดเด่น และยังพบเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซาอื่นๆ ได้แก่ เห็ดลูกฝุ่นและเห็ดตับเต่า ร่วมด้วย ส่วนการเพิ่มจำนวนสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินรอบรากยูคาลิปตัสในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ด้วยวิธี Trap culture สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ *Acaulospora* AG และ

Glomus AK ได้มากและถูกคัดเลือกเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อปลูกทดสอบให้กับต้นกล้ายูคาลิปตัส ร่วมกับ *G. etunicatum*, *G. mosseae* และ *E. colombiana* ที่มีในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซากับต้นยูคาลิปตัส (*E. camadulensis*) ของเชื้อรา *P. albus* CMU005 และ *P. orientalis* CMU010 พบการสร้าง mantle sheath และ Hartig net ในระยะเวลา 3 เดือน เมื่อใช้เชื้อสด *P. albus* ที่พบบริเวณสวนป่ายูคาลิปตัส บริษัท ตรีเพ็ค ทำให้ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้นและราก ความสูงของลำต้น รวมถึงปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมต่อต้นมีค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกด้วยอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและชุดควบคุม การปลูกเชื้อดังกล่าวให้ผลเช่นเดียวกันกับการเจริญของยูคาลิปตัสสายพันธุ์ K7 นอกจากนี้ยังพบการสร้าง mantle sheath และ Hartig net ในระยะเวลา 4 เดือนในสภาพ โรงเรือนบริษัท ตรีเพ็ค จำกัด และในระยะเวลา 7 เดือนของการทดสอบในสภาพโรงเรือน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยต้นกล้ายูคาลิปตัสที่ปลูกเชื้อเห็ดกรวดทั้งสองชนิดมีความสูงมากกว่าต้นกล้าที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ส่วนเชื้อ *S. sinnamariense* CMUSC001 ไม่พบการสร้าง mantle sheath และ Hartig net กับต้นยูคาลิปตัสทั้งการทดสอบในห้องปฏิบัติการและโรงเรือน ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ K7 และ PT48 มีการเจริญในด้านความสูงดีที่สุดหลังจากการปลูกเชื้อร่วมของเอคโตไมคอร์ไรซา และอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา รองลงมาคือ การปลูกด้วยสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา, *P. albus*, *S. sinnamariense* และชุดควบคุม ตามลำดับ ส่วนการทดลองปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับ ต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ด พบว่ากระถางที่ปลูกด้วย *G. etunicatum* มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการ ส่งเสริมความสูง น้ำหนักแห้งของลำต้นและราก การปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับยูคาลิปตัสปักชำสายพันธุ์ PT48 พบว่า *G. etunicatum* ให้ผลดีที่สุดในการส่งเสริมด้านความสูงและ น้ำหนักสดของลำต้นในทุกชุดการทดลอง ส่วนการปลูกเชื้อให้กับยูคาลิปตัสสายพันธุ์ K7 ต้นที่ปลูก ด้วยเชื้อ *E. colombiana* มีความสูงของลำต้นและเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากมากที่สุด ใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส ในทุกความเข้มข้นของปุ๋ยไม่ทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา แต่มีผลให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้นและรากมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของปุ๋ย

เอกสารอ้างอิง

พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์, มลชัย กิตติศักดิ์มนตรี, ชงชัย คัมภีร์, จันทนา สุขปรีดี, อุทัยวรรณ แสงวณิช และ บุญวงศ์ ไทยอุตสาหะ. 2549. ผลของเชื้อราเวสสิคูลาร์-อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญของปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* var. *altissima*) และการเข้าทำลายปอแก้วของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*. Final Report: The Research Project for Higher Utilization of Forestry and Agricultural Plant Materials in Thailand (HUFA).

- สมจิตร อยู่เป็นสุข, 2549. ไมคอร์ไรซา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.
- อังคณา สุวรรณภู. ยุคาลิปตัส-ไม้คําใจ.กองบรรณาธิการจดหมายข่าวผลิใบฯ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ. (http://it.doa.go.th/pibai/pibai/n11/v_11-mar/ceaksong.html)
- อนิวรรณ เฉลิมพงษ์, 2525. การสำรวจเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาในระบบนิเวศวิทยาติบแล้ง. กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ.
- อนิวรรณ เฉลิมพงษ์, 2539. เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่ช่วยในการปลูกป่าภาคอีสาน สำนักวิชาการ กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ.
- Abbott, LK., Brundrett, M., and Malajczuk, N. 1999. Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia: Comparison of the effectiveness and specificity of different isolation procedures, Springer Berlin 8: 315-321.
- Arnold, E. 1988. The changing macromycete flora in Netherlands. Trannsaction of the British. Mycological Society 90: 391-406.
- Arriagada C., Pacheco P., Pereira G., Machuca A., Alvear M. and Ocampo J. A. 2009. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on Eucalyptus globulus seedlings and some soil enzyme activities under application of sewage sludge amendment. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 9(2): 89-101.
- Bakkali-Yakhlef, S., Abbas, Y., Abourouh, M., Hafidi, M. and Duponnois, R. 2009. Diversité phénotypique et moléculaire de l'association Quercusilex-Tetraclinis articulate. Actes du congrés International (Eds.) Biotechnologie microbienne au service du development (MICROBIOD), (MAROC 02-05 November), Marrakech.
- Balergue C., Puech-Page V., Bécard G. and Rochange S. F. 2011. The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signaling events. Journal of Experimental Botany 62: 1049–1060.
- Bi, Z.S., Zheng, G.Y. and Li, T.H. 1994. The macrofungus flora of Guangdong Province. Guangdong Science and Technology Press, Guanzhou.
- Binder, M. and Bresinsky, A. 2002. Derivation of a polymorphic lineage of Gasteromycetes from boletoid ancestors. Mycologia 94: 85-98.
- Bougher, N.L. 1995. Diversity of ectomycorrhizal fungi associated with eucalyptus in Australia. In M., Brundett, B., Dell, N., Malajczuk and M., Gong (Eds), Mycorrhizal Research for Forestry in Asia. ACIAR Proceedings No. 62 (pp. 15-28), Canberra.
- Bougher, N.L. and Syme, K. 1998. Fungi of Southern Australia. University of Western Australia Press, Nedlands.

- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. and Malajczuk, N. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph, Canberra.
- Brundett, M. and Trappe, J.M. 1990. Mycorrhizae-mutualistic plant-fungus symbioses. [online]. Available <http://mycorrhizas.info/ecm.html> [24, February].
- Cao, W. and Crawford, D.L. 1993. Carbon nutrition and hydrolytic and cellulolytic activities in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Canadian Journal of Microbiology 39: 529-535.
- Chamratpan, S. 2003. Biodiversity of medicinal mushroom in Northeast, Thailand. In proceeding, 2nd International Conference on Medicinal mushroom, Biotechnology, National centre for Genetic Engineering, 17-19 July 2003, Pattaya Thailand: 271-276.
- Chen Y.L., Brundrett M.C. and Dell B. 2000. Effects of ectomycorrhizas and vesicular-arbuscular mycorrhizas, alone or in competition, on root colonization and growth of *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla*. New Phytologist 146: 545–556.
- Chen, Y.L., Dell, B. and Malajczuk, N. 2006. Effect of *Scleroderma* spore density and age on mycorrhiza formation and growth of containerized *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla* seedlings. New Forest 31: 453-467.
- Chen, Y.L., Kang, L.H. and Dell, B. 2006a. Inoculation of *Eucalyptus urophylla* with spores of *Scleroderma* in a nursery in south China: comparison of field soil and potting mix. Forest Ecology and Management 222: 439-439.
- Chen, Y.L., Kang, L., Malajczuk, N. and Dell, B. 2006b. Selecting ectomycorrhizal fungi for inoculating plantations in south China: effect of *Scleroderma*; on colonization and growth of exotic *Eucalyptus globulus*, *E. urophylla*, *Pinus elliottii* and *P. radiata*. Mycorrhiza 16: 251-259.
- Chen Y. L., Liu S. and Dell B. 2007. Mycorrhizal status of Eucalyptus plantations in south China and implications for management. Mycorrhiza 17:527–535.
- Chilvers G.A. 2000. Mycorrhizas of eucalypts. In: Keane PJ, Kile GA, Podger FD, Brown BN (eds) Diseases and pathogens of eucalypts. CSIRO, Melbourne.
- Coelho, F.C., Borges, A.C., Neves, J.C.L., Barros, N.F.D., Muchovej, R.M.C. and De-Barros, N.F., 1997. Characterization and incidence of mycorrhizal fungi in stands of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. In Paraopeba, Bocaiuva ana Jao Pinheiro counties, Minas Gerais State. Revista Arvore 21: 393-404.

- Costa, M.D., Rocha-Compos, A.N.D., Santos, M.L., Arnaldo, M.L.S. and Borges, C. 2010. *In vitro* ectomycorrhiza formation by monokaryotic and dikaryotic isolates of *Pisolithus microcarpus* in *Eucalyptus grandis*. Revista Árvore, Viçosa-MG 34: 377-387.
- Cruz, C., Green, J.J., Watson, C.A., Wilson, F. and Martin-Lauão, M.A. 2004. Functional aspects of root architecture and mycorrhizal inoculation with respect to nutrient uptake capacity. Mycorrhiza 14: 177-184.
- Daza, A., Manjon, J.L., Camacho, M., Romero de la Osa, L., Aguilar, A., Santamaria, C. 2006. Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on *in vitro* culture of several isolates of *Amanita caesaria* (Scop.: Fr.) Pres. Mycorrhiza 16: 133-136.
- De Araújo, A.A. and Roussos, S. 2002. A technique for mycelial development of ectomycorrhizal fungi on agar medium. Applied Biochemistry and Biotechnology 98-100: 311-318.
- Dell, B. 2002. Role of mycorrhizal fungi in ecosystems. Chiang Mai University Journal of Natural Sciences 1: 47-60.
- Dell, B. and Malajczuk, N. 1994. Boron deficiency in eucalypt plantations in China. Canadian Journal of Forest Research 24: 2409-2416.
- Dell, B., Malajczuk, N. and Dunstan, W.A. 2002. Persistence of some Australian *Pisolithus* species introduced into eucalypt plantations in China. Forest Ecology and Management 169: 271.-281.
- Dix, N.J. and Webster, J. 1995. Fungal ecology. Chama and Hall, London.
- Duddridge, J.A., Malibar, A.S. and Read, D.J. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorph with special reference to their role in water transport. Nature 287: 834-836.
- Gafur, A., Schützendübel, A., Langenfeld-Heyser, R., Fritz, E. and Polle, A. 2004. Competible incompetent *Paxillus involutus* isolates for ectomycorrhiza formation *in vitro* with poplar (*Populus x canescens*) differ in H₂O₂ production. Plant Biology 6: 91-99.
- Gambrog O.L., Wetter L.R. 1975. Plant tissue culture method. Prairie Regional Laboratory. National Research Council of Canada. Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
- Garbaye, J. Delwaulle, J.C. and Diangana, D. 1988. Growth response of eucalypts in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. Forest Ecological and Management 24: 27-42.

- Garraway, M.O. and Evans, R.C. 1984. Fungal nutrition and physiology. Wiley, New York.
- Giachini, A.J., Suaza, L.A.B. and Oliveira, V.L. 2004. Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. *Mycorrhiza* 14: 375-381.
- Gong, M.Q., Chen, Y.L. and Zhong, C.L. 1997. Mycorrhizal Research and Application. China Forestry Publishing House, Beijing.
- Grant C., Bittman S., Montreal M., Plenchette C., and Morel C. 2004. Soil and fertilizer phosphorus: Effects on plant P supply and mycorrhizal development. *Canadian Journal of Plant Science* 85: 3–14.
- Grove, T.S. and Malajczuk, N. 1994. The potential for management of ectomycorrhiza in forestry. In (Eds.) A.D. Robson, L.K., Abbott and N. Malajczuk, *Management Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry*. Kluwer, (pp. 201-210), Academic Publishers, Dordrecht.
- Guerin-Laguette, A., Vaario, L.M., Gill, W.M., Lapeyrie, F., Matsushita, N. and Suzuki, K. 2000. Rapid *in vitro* ectomycorrhizal infection on *Pinus densifera* root by *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience* 41: 389-393.
- Guzmán, G. 1970. Monofio del genero 'Scleroderma' Pers. Emed. Fr. 'Fungi Basidiomycetes'. *Darwinia* 16: 233-407.
- Habte, M., Miyasaka, S.C. and Matsuyama, D.T. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi improve early forest-tree establishment. In: *Plant nutrition—Food Security and Sustainability of Agro-ecosystems* (eds. W.J. Horst et al.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 644– 645.
- Hadie, K. and Leyton, L. 1981. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover. I. In phosphate-deficient soil. *New Phytologist*. 89: 599-608.
- Harley, J.L. and Smith, S.E. 1983. Mycorrhizal symbiosis. London Academic Press. London.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. and Pegler, D.N. 1995. *Dictionary of the Fungi*. Cab International, Cambridge.
- Hung, L.L. and Chien, C.Y. 1979. Two new mycorrhizal syntheses: *Pisolithus tinctorius* and *Suillus bovinus* with Taiwan red pine. *Mycologia* 71: 202-206.
- Ijdo M., Cranenbrouck S. and Declerck S. 2011. Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. *Mycorrhiza* 21:1–16.

- Issac, S. 1992. Mutualistic symbiosis, In Fungal-Plant, Interaction. (Eds.) Chapman and Hall, Cambridge. University Printing house: 270-277.
- Kalm, E. and Kalyoncu, F. 2008. Mycelial growth rate of some Morels (*Morchella* spp.) in four different microbiology media. American–Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 3: 861-864.
- Kanchanaprayudh, K., Zhou, Z., Yomyart, S. and Hogetsu, T. 2003. Molecular phylogeny of ectomycorrhizal *Pisolithus* fungi associated with pine, dipterocarp, and eucalyptus trees in Thailand. Mycoscience 44: 287-294.
- Klinhom, U., Klinhom, W. and Kanchanamayoon, W. 2003. Mushrooms and traditional knowledge in Northeastern Thailand. In the 2nd International Conference on Medicinal Mushroom, Biotechnology, National centre for Genetic Engineering), Pattaya, Thailand: 177-181.
- Kumla, J., Danell, E., Bussaban, B. and Lumyong, S. 2011. Suitable growth conditions and nutrition factors on *in vitro* culture of *Phlebopus portentosus* (Boletales). Chiang Mai Journal of Science 38: 156-159.
- Langer, I., Krpata, D., Peintner, U., Wenzel, W.W. and Schweiger, P. 2006. Media formation influences *in vitro* ectomycorrhizal synthesis on the European aspen *Populus tremula* L. Mycorrhiza 18: 297-307.
- Launonen, T.M., Ashton, D.H. and Keane, P.J. 2005. Growth, nutrient acquisition and ectomycorrhizae of *Eucalyptus regnans* F. Muell. Seedlings in fertilized or diluted air dried and undried forest soil. Plant and soil 268: 221-231.
- Lee, S.S., Patahayah, M., Chong, W.S. and Lapeyrie, F. 2008. Successful ectomycorrhizal inoculation of two dipterocarp species with a locally isolated fungus in Peninsular Malasia. Journal of Tropical Forest Science 20: 237-247.
- Lu, X., Malajczuk, N. and Dell, B. 1998. Mycorrhiza formation and growth of *Eucalyptus globules* seedlings inoculated with spores of various ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 8: 81-86.
- Lumyong, S., Sanmee, R. and Lumyong, P. 2007. Is large scale cultivation of boletes possible ? Oprea Mycologica 1: 34-37.
- Malajczuk N. 1981. Presence of vesicular- arbuscular mycorrhizae in *Eucalyptus* spp. and *Acacia* sp., and their absence in *Banksia* sp. after inoculation with *Glomus fasciculatus*. New Phytologist 87: 567-572.

- Mao, X.L. 2000. The macrofungi of China. Henan Science and Technology Press, Zhengzhou.
- Martin, F., Diez, J., Dell, B. and Delaruelle, C. 2002. Phylogeograph of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. New Phytologist 153: 345-357.
- Marx, D.H. 1977. Tree host range and world distribution of ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Canadian Journal of Microbiology 23: 217-223.
- Marx, D.H. and Bryan, W.C. 1975. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedling in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. Forest Sciences 21: 245-254.
- Marx, D.H., Bryan, W.C. and Cordell, C.E. 1976. Growth and ectomycorrhizal development of pine seedling nursery soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. Forest Science 22: 91-100.
- Marx, D.H. and Davey, C.B. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhiza fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. IV. Resistance of aseptically mycorrhizae to infection *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathologist 59: 549-558.
- Marx, D.H. and Kenny, D.S. 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculums. In (Ed) N.C., Schenck, Methods and Principles of Mycorrhizal Research, The American Phytopathological Society, (pp. 131-146), St. Paul, Minnesota.
- Marx, D.H., Maaul, S.B. and Cordell, C.E. 1992. Application of specific ectomycorrhizal fungi in world forestry, Frontiers in Industrial Mycology. In (Ed) G.F. Leafham, (pp. 79-98), Chammn and Hall Inc. USA.
- Marx, D.H. and Ruehle, J.L. 1988. Ectomycorrhizae as biological tools in reclamation and revegetation of waste lands. In. A. Mahadevan, N. Raman and K. Natarajan (Eds.), Mycorrhizae for green Asia 1st Asian conference on mycorrhizae, Jan. 29-31, (pp. 339-334), Maadras, India.
- Marx, D.H. Ruehle, J.L. and Cordell, C.E. 1991. Method for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. Method in Microbiology. (Eds.) J.R. Norris, D.J. Read and A.K. Varma, (23: 383-411), London Academic Press, London.
- Master, C., Trappe, J.M. and Nussbaum, R.A. 1978. Fungal-small mammal interrelationships with emphasis on Oregon coniferous forest. Ecology 59: 799-809.
- McLaughlin, D.J. 1970. Environmental control of fruitbody development in *Boletus rubinellus* in axenic culture, Mycologia 62: 307-331

- Mikola, P. 1973. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practice, In (Eds.) G.C. Marks and T.T. Kozlowski, *Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology*, (pp. 383-411) Academic Press, New York.
- Misbahuzzaman, K. and Ingleby, K. 2005. A Structural Study of Ecto-mycorrhizas Formed in Seedling of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. *International Journal of Agriculture and Biology* 7: 400-405.
- Misbahuzzaman, K. and Newton A. 2006. Effect of Dual Arbuscular-ectomycorrhizal Inoculation on Mycorrhiza Formation and Growth in *E. camaldulensis* Dehnh. Seedlings Under Different Nutrient Regimes. *International Journal of Agriculture and Biology* 8: 848–854.
- Momoh, Z.O. and Gbadegesin, R.A. 1980. Fields of *Pisolithus tinctorius* as a mycorrhizal fungus of pine in Nigeria. In (Ed.) P. Mikola, *Tropical Mycorrhiza Research*, (pp. 73-79) Oxford University Press, New York.
- Munyaziza, E. and Kuyper, T.W. 1995. Ectomycorrhizal synthesis on seedling of *Azela quanzensis* Welw. using various types of inoculums. *Mycorrhiza* 5(4): 283-287.
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Boller T, Wiemken A. 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2816–2824.
- Pagano M. C. and Scotti M. R. 2008. Arbuscular and ectomycorrhizal colonization of two Eucalyptus species in semiarid Brazil. *Mycoscience* 49: 379–384.
- Phosri, C., María, P.M., Walting, R., Jeppson, M. and Sihanonth, P. 2009. Molecular phylogeny and re-assessment of some *Scleroderma* spp. (Gasteromycetes). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66: 83-91.
- Phosri, C., Martin, M.P., Suwannasai, N., Sihanonth, P. and Walting, R. 2012. *Pisolithus*: a new species from southeast Asia and a new combination. *Mycotaxon* 20: 195-208.
- Richter, D.L. 1992. Six species of *Scleroderma* (Gasteromycetes, Sclerodermatales) described from pure cultures. *Mycotaxon* 55:461-571.
- Richter, D.L. and Bruhn, J.N. 1989. Field survival of containerized red and jack pine seedlings inoculated with mycelia slurries of ectomycorrhizal fungi. *New Forests* 3:247-258.
- Rillig MC, Mummey, DL. 2006. (Tansley review) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* 171: 41-53.

- Rincón, A., De-Felipe, M.R. and Fernández-Pascual, M. 2007. Inoculation of *Pinus halepensis* Mill. With selected ectomycorrhizal fungi improves seedling establishment 2 years after planting in degraded gypsum soil. *Mycorrhiza* 18: 23-32.
- Rincón, A., Isabel, F. and Alvarez, J.P. 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11: 265-271
- Rohyadi, A., Smith, F.A., Murray, R.S. and Smith, S.E. 2004. Effect of pH on mycorrhiza colonization and nutrient uptake in cowpea under conditions that minimize confounding effects of available aluminium. *Plant and Soil* 260: 283-290.
- Rossi, M.J., Souza, J.A.R. and Oliveira, V.L. 2002. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 175-181.
- Sánchez, F., Honrubia, M. and Torres, P. 2001. Effect of pH, water stress and temperature on in vitro cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Cryptogamie Mycologie* 22: 243-258.
- Sanmee, R. 2004. Biodiversity, host range and growth of edible ectomycorrhizal fungi in upper northern Thailand. Ph.D. Thesis, Chiang Mai University, Chiang Mai.
- Sanmee, R., Lumyong, P., Dell B. and Lumyong, S. 2010. *In vitro* cultivation and fruit body formation of black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edible ectomycorrhizal fungus in Thailand, *Mycoscience* 51: 15-22.
- Santos V. L. Muchovej R. M., Borges A. C., Neves J. C. L., Kasuya M. C. M. 2001. Vesicular-arbuscular -ecto-mycorrhiza succession in seedlings of *Eucalyptus* spp. *Brazilian Journal of Microbiology* 32:81-86.
- Schenck, N.C. 1984. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, United States of America.
- Smith S.E. and Read D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd ed. Academic press London, etc.
- Souza, L.A.B, Bonnassiss, P.A.P., Filho, G.N.S and Oliveira, V.L. 2008. New isolates of ectomycorrhizal fungi and the growth of eucalypt. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43:235-241.
- Tan, F.H. and Wang, Y.Z. 2000. Survey on EMC fungi under eucalypt and pine plantations in Sichuan Province. *Journal of Sichuan Forestry Science and Technology* 21: 59-65.

- Theodorou, C. and Bowen, G.D. 1970. Mycorrhizal responses of radiata pine in experiments with different fungi. *Australian Forestry* 34:183–191.
- Thongklang, N., Hyde, K.D., Bussaban, B. and Lumyong, S. 2010. Culture condition, inoculums production and host response of a wild mushroom, *Phlebopus portentosus* strain CMUHH121-005. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 5: 413-425.
- Trappe, J.M. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annual Review of Phytopathologist* 15: 203-222.
- Turjaman, M., Tamai, Y., Segah, H., Limin S.H., Cha, J.Y., Osaki, M. and Tawaraya, K. 2005. Inoculation with the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus arhizus* and *Scleroderma* sp. improves early growth of *Shorea pinanga* nursery seedlings. *Forest Ecology and Management* 30: 67-73.
- Vaario, L.M., Tanaka, M., Ide, Y., Gill, W.M. and Suzuki, K. 1999. *In vitro* ectomycorrhiza formation between *Abies firma* and *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza* 9: 177-183.
- Vieira, R.F. and Carvalho, E.F. 1994. Ectomycorrhizal fungi from the Federal district Cerrados areas: occurrence and symbiotic efficiency. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 18: 321-324.
- Wagg C., Pautler M., Massicotte H. B. and Peterson R. L. 2008. The co-occurrence of ectomycorrhizal, arbuscular mycorrhizal, and dark septate fungi in seedlings of four members of the *Pinaceae*. *Mycorrhiza* 18:103–110.
- Watling, R. 2006. The sclerodermatoid fungi. *Mycoscience* 47: 18-24.
- Watling, R. and Smith, K. 2004. Taxonomic and floristic notes on some Malaysian fungi IV (*Scleroderma*). In (Ed.) C.L. Cripps, *Fungi in Forest Ecosystems, Diversity and Ecology*, (pp. 89: 93-96), *Memoirs of the New York Botanical Garden*.
- Warnock, J.H., Fitter, A.H. and Asher, M.B. 1982. The influence of a springtail, *Folsomia candida* (insect Collembola) on the mycorrhizal association of leek, *Allium porrum* and the vesicular-arbuscular endophyte, *Glomus fasciculatus*. *New Phytologist* 90: 283-292.
- Xu, D., Dell, B., Malajczuk, N. and Gong, M. 2001. Effects of P fertilization and ectomycorrhizal fungi inoculation on early growth of eucalypt in southern China. *Plant and Soil* 233: 47-57.
- Xu, M., Zhu, J., Kang, H., Xu, A., Zhang, J. and Li, F. 2008. Optimum conditions for pure culture of major ectomycorrhiza fungi obtained from *Pinus sylvestris* var. *mongolica*

plantations in southeastern Keerqin sandy lands, China. *Journal of Forestry Research* 19: 113-118.

Yamanaka, T. 2003. The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi *in vitro*. *Mycologia* 95: 584-589.

Yamanaka, K., Namba, K. and Tajiri, A. 2000. Fruit body formation of *Boletus reticulatus* in pure culture. *Mycoscience* 41: 189-191.

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

การเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบการเจริญของเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดกรวด เห็ดลูกฟูก

1. Amonium chloride glucose agar (Xu *et al.*, 2008)

KH ₂ PO ₄	1	mg
NH ₄ Cl	0.5	mg
Glucose	0.5	mg
CaCa ₂	0.1	mg
NaCl	0.5	mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3	mg
FeCl ₃	0.01	mg
Agar	20	g
Distilled H ₂ O	1	l

2. fungal-host agar (Vaario *et al.*, 1999)

KNO ₃	2,500	mg
(NH ₄)H ₂ PO ₄	300	mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	400	mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	200	mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	15	mg
Na ₂ EDTA	20	mg
H ₃ BO ₃	0.5	mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1	mg
MnSO ₄ .H ₂ O	1	mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.01	mg
KI	0.1	mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.02	mg

CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01	mg
Charcoal	0.3	g
Agar	20	g
Distilled H ₂ O	1	l

3. Heli medium (Xu *et al.*, 2008)

Glucose	0.5	mg
KH ₂ PO ₄	1	mg
CaCa ₂	0.1	mg
MgCl ₂	0.3	mg
NH ₄ Cl	0.5	mg
FeCl ₃	0.01	mg
NaCl	0.1	mg
Agar	20	g
Distilled H ₂ O	1	l

4. Modified Hagem's medium (McLaughlin, 1970)

Glucose	5	mg
Maltose	5	mg
KH ₂ PO ₄	1	mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5	mg
Amonium tartate	0.5	ml
Ferric citrate 1%	0.5	ml
Agar	20	g
Distilled H ₂ O	1	l

5. Modified Melin-Norkans medium (Langer *et al.*, 2008)

KH ₂ PO ₄	0.5	mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.25	mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.15	mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.05	mg
NaCl	0.025	mg
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.012	mg

Thiamine	0.001	mg
Glucose	2.5	mg
Malt extract	10	mg
Distilled H ₂ O	1	l
Agar	20	g
Distilled H ₂ O	1	l

6. G-MMN medium (Gafur *et al.*, 2004)

KH ₂ PO ₄	0.5	mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.25	mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.15	mg
CaCl ₃ .2H ₂ O	0.5	mg
NaCl	0.025	mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.012	mg
H ₃ BO ₃	0.015	mg
MnSO ₄ .H ₂ O	0.009	mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.001	mg
ZnSO ₄ .H ₂ O	0.005	mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.000003	mg
Pyridoxine HCl	0.0001	mg
Glucose	5.0	mg
Malt extract	3.0	mg
Agar	20	g
Distilled H ₂ O	1	l

7. L-MMN medium (Gafur *et al.*, 2004)

KH ₂ PO ₄	0.5	mg
(NH ₄)H ₂ PO ₄	0.25	mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.15	mg
CaCl ₃ .2H ₂ O	0.5	mg
NaCl	0.025	mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.012	mg
H ₃ BO ₃	0.015	mg

MnSO ₄ .H ₂ O	0.009	mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.001	mg
ZnSO ₄ .H ₂ O	0.005	mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.000003	mg
myo-Inositol	0.1	mg
Nicotinic acid	0.001	mg
Pyridoxine Hcl	0.01	mg
Glucose	5.0	mg
Agar	20	g
Distilled H ₂ O	1	l

8. Modified Murashige and Skoog medium (Guerin-Laguette *et al.*, 2000)

Stock 1

NH ₄ NO ₃	165	g
KNO ₃	190	g
Distilled H ₂ O	1	l

Stock 2

MgSO ₄ .7H ₂ O	37	g
MnSO ₄ .H ₂ O	1.090	g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.860	g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025	g
Distilled H ₂ O	1	l

Stock 3

CaCl ₂ .2H ₂ O	44	g
KI	0.083	g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0025	g
Distilled H ₂ O	1	l

Stock 4

KH ₂ PO ₄	17	g
H ₃ BO ₃	0.620	g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	g
Distilled H ₂ O	1	l

Stock 5

FeSO ₄ .7H ₂ O	2.784	g
Na ₂ EDTA	3.724	g
Distilled H ₂ O	1	l

Stock 6

Inositol	2	g
Nicothenic acid	0.01	g
Pyridoxine HCL	0.01	g
Thiamine HCL	0.002	g
Glycine	0.04	g
Distilled H ₂ O	1	l

โดยใช้

Stock 1-5	10	ml
-----------	----	----

Stock 6	5	ml
----------------	---	----

Sucrose	30	g
Agar	20	g
ปรับปริมาตรด้วย Distilled H ₂ O เป็น	1	l

9. Malt extract agar (Kumla *et al.*, 2011)

Malt extract	20	g
Agar	20	g
Distilled H ₂ O	1	l

10. Modified SH medium (Guerin-Laguette *et al.*, 2000)

Amonium tartate	1,000	mg
KH ₂ PO ₄	500	mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	200	mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	20	mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	15	mg
Na ₂ EDTA.H ₂ O	20	mg
H ₃ BO ₃	0.5	mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1	mg
MnSO ₄ .H ₂ O	1	mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.01	mg

KI	0.1	mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.02	mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01	mg
Glucose	10	g
Thiamine HCL	0.5	mg
Nicotinic acid	0.5	mg
Pyridoxine HCL	0.05	mg
Glucose	10	g
Agar	20	g
Distilled H ₂ O	1	l

ผสมสารอาหารแต่ละชนิดให้เข้ากันและปรับเป็น pH 6.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1. วัสดุที่เลือกใช้ในการผลิตหัวเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดกรวด และเห็ดลูกฟุ้ง วัสดุอุปกรณ์

ค่าใช้จ่ายในการทำหัวเชื้อเอกโตไมคอร์ไรซา

1. เวอร์มิคูไลท์: พีท (1:1 v/v) ราคา 1,200 บาท/ กระสอบ
2. MMN medium และ FH medium
3. วัสดุปลูก

สูตร อาหาร

Modified Melin-Norkans medium (Langer *et al.*, 2008)

KH ₂ PO ₄	0.5	mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.25	mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.15	mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.05	mg
NaCl	0.025	mg
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.012	mg
Thiamine	0.001	mg
Glucose	2.5	mg
Malt extract	10	mg
Distilled H ₂ O	1	l

Agar	20	g
Distilled H ₂ O	1	l

Fungal-host agar (Vaario *et al.*, 1999)

KNO ₃	2,500	mg
(NH ₄)H ₂ PO ₄	300	mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	400	mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	200	mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	15	mg
Na ₂ EDTA	20	mg
H ₃ BO ₃	0.5	mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1	mg
MnSO ₄ .H ₂ O	1	mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.01	mg
KI	0.1	mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.02	mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01	mg
Charcoal	0.3	g
Agar	20	g
Distilled H ₂ O	1	l

2. วัสดุที่เลือกใช้ในการผลิตหัวเชื้อสดของเห็ดกรวด

- หัวเชื้อสด (ดอกเห็ดสด 100 กรัม/กระถาง) ช่วงเวลาเก็บดอกเห็ด คือ ระหว่างเดือน พฤษภาคม ถึง กรกฎาคม 2553

- วัสดุปลูก ขุยมะพร้าว: ปุ๋ยหมัก: ทราย ในอัตราส่วน 1: 1: 1

ผลผลิต (output) ที่ได้จากโครงการ

1. ได้ข้อมูลความหลากหลายของ ECM (*Pisolithus*, *Scleroderma*) จากแหล่งปลูกยูคาลิปตัส และ AM ที่จำเพาะในแหล่งปลูก จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
2. ได้หัวเชื้อบริสุทธิ์ ECM/AM เพื่อจะใช้ทดลอง
3. ได้ข้อมูลวิธีการเพิ่มจำนวนของ ECM/AM เพื่อเป็นหัวเชื้อในห้องปฏิบัติการ
4. ได้กระบวนการผลิตหัวเชื้อ ECM และ AM สำหรับใช้ในการเพาะกล้ายูคาลิปตัสสายพันธุ์ที่ได้จากการปักชำในโรงเรือนของบริษัท ซึ่งผู้ประกอบการสามารถที่จะไปพัฒนาต่อได้
5. ตีพิมพ์ผลงานวิจัย 2 เรื่องในวารสารวิชาการนานาชาติ และเผยแพร่ผลงานวิจัย 3 เรื่องในงานประชุมวิชาการทั้งในและต่างประเทศ
6. สร้างนักวิจัยระดับปริญญาโท 1 คน

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

- Nakarin Suwannarach, Jaturong Kumla, Boonsom Bussaban and Saisamorn Lumyong. 2012. New report of leaf blight disease on eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) caused by *Pestalotiopsis virgatula* in Thailand. Canadian Journal of Plant Pathology 34 (2): 306-309.
- Jariwat Siri-in, Jaturong Kumla, Nakarin Suwannarach and Saisamorn Lumyong. 2013. Culture conditions and some properties of pure culture of ectomycorrhizal fungi, *Scleroderma sinnamariense*. Chaing Mai Journal of Science 40:1-11.

ผลงานวิจัยที่นำเสนอในงานประชุม

- Saisamorn Lumyong, Jaturong Kumla and Rarunee Sanmee. Metal chelating compounds and indole-3-acetic acid production by an ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus albus*. 7th International Symbiosis Society Congress "The earth's vast symbiosphere" July 22-28, 2012, Kraków, Poland.
- Jariwat Siri-in and Saisamorn Lumyong. Effect of medium, pH and temperature on *In vitro* culture of *Pisolithus albus* its ability of ectomycorrhizal formation in *Eucalyptus camadulansis*. The 6th Thai Mycological Conference in Bangkok, March 6, 2012, Rama Gradens Hotel, Bangkok, Thailand.

Chayapa Supreeyapond, Amornrat Jaiyasen and Saisamorn Lumyong. Propagation of arbuscular mycorrhizal spore and effects of arbuscular mycorrhiza on eucalyptus. The 6th Thai Mycological Conference in Bangkok, March 6, 2012, Rama Gradens Hotel, Bangkok, Thailand.