

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตัดแยก การจำแนก และการผลิตหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์
ไมคอร์ไรซาเพื่อประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมัน

Isolation, Identification and Inoculum production of Arbuscular Mycorrhizal
Fungi for growth promotion of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings

ผู้วิจัย

นายเชิดชัย โพธิ์ศรี

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* jacq.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากผลตอบแทนของการปลูกปาล์มน้ำมันดีกว่าการปลูกพืชชนิดอื่น เช่น ยางพารา และการทำนาข้าว จึงเป็นแรงจูงใจให้เกษตรกรขยายพื้นที่ปลูก ประกอบกับมีโครงการเปลี่ยนพื้นที่ปลูกปาล์มทั่วประเทศ ซึ่งในการนี้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้มีแผนกำหนดพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันใหม่ในประเทศขึ้น โดยในปัจจุบันได้มีการศึกษาความเป็นไปได้ของการปลูกปาล์มน้ำมัน เช่นในพื้นที่ตัวอย่างภาคเหนือ และตะวันออกเฉียงเหนือแล้ว นอกจากนี้การเกิดภาวะวิกฤตราคาน้ำมันแพงขึ้น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ทำให้ปาล์มน้ำมันกลายมาเป็นพืชที่มีบทบาทสำคัญกับนโยบายวาระแห่งชาติด้านพลังงานของประเทศ ด้วยความหวังเพื่อการนำมาผลิต "ไบโอดีเซล" ซึ่งจะสามารถลดภาระการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงบางส่วนจากต่างประเทศได้

การผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันให้มีคุณภาพและมาตรฐาน เพื่อรองรับการปลูกในแต่ละฤดูกาลจึงเป็นสิ่งสำคัญ นอกจากนี้พื้นที่ที่มีการปลูกปาล์มน้ำมันยังคงเคยเป็นพื้นที่ว่างเปล่า พื้นที่ป่า หรือเคยปลูกพืชอย่างอื่นมาก่อนแนวทางการเพิ่มพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันของประเทศในแต่ละพื้นที่อาจจะต้องประสบปัญหา หากขาดการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันระหว่างราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาและระบบรากของปาล์มน้ำมัน ถ้าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่นำไปปลูกใหม่มีคุณภาพต่ำ มีอัตราการตายสูง การเจริญเติบโตเป็นไปอย่างช้า และแคระแกรน หรือโดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าในดินมีฟอสฟอรัสต่ำหรือถูกตรึงอยู่ในดินจะส่งผลให้ปาล์มน้ำมันมีผลผลิตต่ำลงด้วย ซึ่งจะมีผลทำให้โครงการล้มเหลว และไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร การใส่ราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาให้กับพืชจะช่วยให้ธาตุอาหารเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่พืชดูดไปใช้ได้ง่าย จากที่กล่าวข้างต้น คณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความสำคัญของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซา และการศึกษาการนำไปประยุกต์ใช้ทางการเกษตร เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของพืชว่ามีบทบาทและความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพของประเทศไทย ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักคือ การใช้ความรู้ที่ได้จากการวิจัย เพื่อช่วยพัฒนาการผลิตแบบเกษตรยั่งยืน โดยการใช้จุลินทรีย์ที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้ถูกคัดเลือกโดยธรรมชาติว่าเหมาะสมกับภูมิอากาศและสภาวะแวดล้อมในประเทศไทย เพื่อที่จะใช้ผลิตเป็นหัวเชื้อสำหรับเพาะให้กับกล้าไม้ในแปลงเพาะ ก่อนย้ายนำไปปลูก ซึ่งจะช่วยเร่งอัตราการเจริญเติบโตของพืช และเพื่อทดแทนหรือเพื่อการลดการใช้ปุ๋ยเคมีโดยเฉพาะปุ๋ยฟอสเฟตในขั้นตอนของการผลิตพืช ทำให้ต้นทุนการผลิตพืชน้อยลงแล้ว ยังเป็นการปรับปรุงคุณภาพของดินด้วย

การสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างดินได้ดำเนินการในช่วงฤดูฝนในปี 2550 จากพื้นที่ขยายการปลูกปาล์มน้ำมันในพื้นที่ 5 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย ฉะเชิงเทรา น่าน หนองคาย และตราด เมื่อคัดแยก และจำแนกชนิดของสปอร์ราในดินบริเวณรอบราก โดยลักษณะทางสัณฐานและชีวโมเลกุล ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) จากยีนบริเวณ Small sub unit (SSU rDNA), Internal Transcribed Spacer (ITS) และบางส่วนของบริเวณ Large subunit (LSU rDNA) กับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับราในไฟลัม Glomeromycota เพื่อใช้ในการตรวจสอบชนิดของ AMF ในรากของปาล์มน้ำมันจากพื้นที่ 5 จังหวัด ผลการศึกษา พบว่า pcr product ที่ได้มีขนาด ประมาณ 1,500 bp การโคลน และการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR-Single Strand Conformation Polymorphisms (PCR-SSCP) พบว่าโคลนที่ได้มีความหลากหลายต่างกัน

แต่ละพื้นที่ เมื่อคัดเลือกโคลนจำนวน 53 โคลน ที่มีผลการวิเคราะห์ของ PCR-SSCP ต่างกัน ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ประกอบกับข้อมูลทางสัณฐานพบว่า ในรากปาล์มน้ำมัน และสปอร์ที่เก็บรวบรวมจากดินรอบรากปาล์มน้ำมันในพื้นที่ขยายการปลูกปาล์มน้ำมันทั้ง 5 จังหวัด ประกอบด้วยราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา สกุล *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Paraglomus* และ *Scutellospora* จำนวนไม่น้อยกว่า 13 ชนิด และอาจมีราชนิดใหม่อีก 2 ชนิด ได้แก่ uncultured *Glomus* sp. และ uncultured *Gigaspora* sp.

ผลของการใส่หัวเชื้อให้กับกล้าปาล์มน้ำมัน เพื่อทดสอบการสร้างไมคอร์ไรซาและการตอบสนองการเจริญเติบโตในด้านต่างๆ ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ภายใต้สภาวะเรือนกระจก พบว่าหัวเชื้อราทั้ง 3 ชนิด สามารถสร้างไมคอร์ไรซากับกล้าปาล์มน้ำมันได้ดี มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืชสูง ระหว่างร้อยละ 88.9-92.3 ดังนั้นมีแนวโน้มโดยรวมของการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นชัดเจนสำหรับกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อเมื่อเทียบกับกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ใส่หัวเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ติดเชื้อในรากกล้าปาล์มน้ำมันโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 25 โคลนพบว่า เป็นรา *Glomus intraradices* และ *Scutellospora nodosa*

รายงานวิจัยฉบับนี้ถือเป็นรายงานการวิจัยฉบับแรกที่ได้ใช้วิธีทางชีวโมเลกุลด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับรา ร่วมกับวิธีทางสัณฐานวิทยาเพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่สร้างสปอร์ภายในดิน และอยู่ในรากของปาล์มน้ำมันของประเทศไทย จากจำนวนโคลนกว่า 700 โคลน จัดกลุ่มก่อนคัดเลือกมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนทั้งสิ้น 78 โคลน ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดยการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับฐานข้อมูลนานาชาติ (GenBank) พบว่าสามารถระบุชนิดของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ถูกต้องชัดเจนในระดับ genus และ/หรือ species ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 95-99% จากลักษณะปาล์มน้ำมันซึ่งเป็นพืชที่มีระบบรากฝอย มีรากที่แตกแขนงทอดไปตามแนวนอน และประสานกันอย่างหนาแน่นอยู่ที่บริเวณผิวดิน ไม่มีขนราก ดังนั้นการดูดน้ำและแร่ธาตุของปาล์มน้ำมันจึงต้องพึ่งพาราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในการทำหน้าที่แทน การศึกษาครั้งนี้พบว่า ในดินรอบรากปาล์มน้ำมันมีราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่หลากหลายชนิด บางชนิดเป็นชนิดที่พบได้ทั่วไป บางชนิดอาจเป็นชนิดใหม่ที่ไม่เคยรายงานมาก่อน เมื่ออยู่ในรากพืชราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมันได้แตกต่างกัน ดังนั้นการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ของราที่เหมาะสมจึงจำเป็นอย่างยิ่ง เมื่อได้สายพันธุ์ที่เหมาะสม การเตรียมหัวเชื้อรากก็สามารถเพิ่มปริมาณและทำได้ในเรือนเพาะชำ การประยุกต์ใช้หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะช่วยปรับปรุงกล้าปาล์มน้ำมันให้มีคุณภาพดีขึ้น สามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อยู่รอดปลอดภัยเมื่อย้ายนำไปปลูกได้ และยังสามารถทดแทนหรือเพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมี โดยเฉพาะปุ๋ยฟอสเฟตในขั้นตอนของการผลิตพืช ทำให้ต้นทุนการผลิตพืชน้อยลงแล้ว ยังเป็นการปรับปรุงคุณภาพของดิน และสอดคล้องกับนโยบายของ The Roundtable on Sustainable Palm Oil (RSPO) ที่กำหนดให้สมาชิกสวนปาล์มหรือผู้ผลิตน้ำมันปาล์มที่ได้มาตรฐาน จะต้องมีการจัดการสวนปาล์มน้ำมันที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จึงจะได้รับการรับรองคุณภาพมาตรฐานจากRSPO อีกด้วย

การศึกษา arbuscular mycorrhiza (AMF) กับการประยุกต์ใช้ในระบบการผลิตทางการเกษตรในพืชชนิดต่างๆ ได้มีการรายงานไว้เป็นจำนวนมากพอสมควร แต่มีอยู่จำนวนน้อยที่รายงานเกี่ยวกับสถานะของ AMF กับปาล์มน้ำมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย การขาดการประยุกต์ใช้ AMF ในการเตรียมกล้าไม้เพื่อการผลิตที่ยั่งยืน และความก้าวหน้าในเทคนิคการเตรียมหัวเชื้อราให้ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อใช้เพาะให้กับกล้าปาล์มน้ำมัน ถือเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญของโครงการวิจัยนี้

การสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างดินได้ดำเนินการในช่วงฤดูฝนในปี 2550 จากพื้นที่ขยายการปลูกปาล์มน้ำมันใน 5 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย ฉะเชิงเทรา น่าน หนองคาย และตราด การคัดแยก และจำแนกชนิดของสปอร์ราในดินบริเวณรอบราก โดยลักษณะทางสัณฐานและชีวโมเลกุล ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) จากยีนบริเวณ Small sub unit (SSU rDNA), Internal Transcribed Spacer (ITS) และบางส่วนของบริเวณ Large subunit (LSU rDNA) กับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับราในไฟลัม Glomeromycota เพื่อใช้ในการตรวจสอบชนิดของ AMF ในรากของปาล์มน้ำมันที่นำมาจากภูมิภาคที่เลือกไว้ ผลการศึกษา พบว่า pcr product ที่ได้มีขนาด ประมาณ 1,500 bp การโคลน และการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR-Single Strand Conformation Polymorphisms (PCR-SSCP) พบว่าโคลนที่ได้มีความหลากหลายต่างกันในแต่ละพื้นที่ เมื่อคัดเลือกโคลนจำนวน 53 โคลน ที่มีผลการวิเคราะห์ของ PCR-SSCP ต่างกัน ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ประกอบกับข้อมูลทางสัณฐานพบว่า ในรากปาล์มน้ำมัน และสปอร์ที่เก็บรวบรวมจากดินรอบรากปาล์มน้ำมันในพื้นที่ขยายการปลูกปาล์มน้ำมันทั้ง 5 จังหวัด ประกอบด้วยรารอบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสกุล *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Paraglomus* และ *Scutellospora* จำนวนไม่น้อยกว่า 13 ชนิด และอาจมีราชนิดใหม่อีก 2 ชนิด ได้แก่ uncultured *Glomus* sp. และ uncultured *Gigaspora* sp.

ผลของการใส่หัวเชื้อให้กับกล้าปาล์มน้ำมัน เพื่อทดสอบการสร้างไมคอร์ไรซาและการตอบสนองการเจริญเติบโตในด้านต่างๆ ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ภายใต้สภาวะเรือนกระจก พบว่าหัวเชื้อราทั้ง 3 ชนิดสามารถสร้างไมคอร์ไรซากับกล้าปาล์มน้ำมันได้ดี มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืชสูง ระหว่างร้อยละ 88.9-92.3 ดังนั้นมีแนวโน้มโดยรวมของการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นชัดเจนสำหรับกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อเมื่อเทียบกับกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ใส่หัวเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบชนิดของรารอบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ติดเชื้อในรากกล้าปาล์มน้ำมันโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 25 โคลนพบว่า เป็นรา *Glomus intraradices* และ *Scutellospora nodosa*

คำสำคัญ: ความหลากหลาย Glomeromycota ปาล์มน้ำมัน อนุกรมวิธาน อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา SSCP

The potential of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) application in agricultural production systems has been well documented for several plant species. However, little is known about the AMF status of oil palm, particular in Thailand. The lack of application of AMF in nursery stock, the need to improve sustainable practice and progress in inoculation techniques initiated our investigation. More effective use of P inputs in oil palm planting stock production could be achieved if the mycorrhizal benefits were exploited, particularly when transplanted in the field. A survey was conducted and soil samples were taken from the selected regions where oil palms are planted from 5 oil palm plantations (Chiang Rai, Chachoengsao, Nan, Nongkai, Trad) during the rainy season in the year 2007. Trap cultures and pure pot cultures have been established. Several spore types were presented in each rhizosphere soil and were identified using traditional and molecular approaches. PCR amplification of partial SSU, ITS rDNA and partial LSU sequences with Glomeromycota-specific primers were used to detect AMF in root tissue of oil palm taken from selected regions. Approximately 1,500 bp amplicons were achieved. After cloning and PCR-SSCP analysis, the different polymorphisms of 53 recombinant clones were selected for sequencing. Five major genera of *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Paraglomus* and *Scutellospora* are recognised and at least 13 species whilst 2 described as uncultured *Glomus* sp. and uncultured *Gigaspora* sp, were observed in oil palm roots and spores collected from 5 different provinces.

The effect of selected soil inoculum in forming arbuscular mycorrhizas and the subsequent growth response in oil palm seedlings was studied. Attempts to develop mycorrhizas with 3 soil inoculum under greenhouse conditions were successful with high percentage of colonization varied from 88.9-92.3. There was, therefore, overall trend in seedling performance which could be attributed to inoculum treatments. Highly significant increased in growth were evident for inoculated plants compared with uninoculated ones. Specific molecular techniques were also used to detect the presence of the fungi infected in seedling roots representing *Glomus intraradices* and *Scutellospora nodosa*.

Key words: Diversity, Glomeromycota, Oil palm, Taxonomy, Arbuscular mycorrhizas, SSCP

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่สนับสนุนสถานที่เครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ ในการทำวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ประกิตต์สิน สีนันทน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Professor Peter Jeffries School of Biosciences, University of Kent at Canterbury, UK ที่ให้คำปรึกษาที่ดียิ่งในการดำเนินโครงการกับผู้วิจัย ตลอดจน Mrs. Louisa Robinson Boyer ที่แนะนำและให้ผู้วิจัยฝึกปฏิบัติเทคนิค Single Strand Conformation Polymorphisms จนชำนาญในระดับหนึ่ง

ขอบคุณคุณนันทินี ศรีจุมปา สถานีวิจัยพืชสวนจังหวัดเชียงราย ที่ช่วยเหลือ และประสานงานในการสำรวจเก็บตัวอย่างดินสวนปาล์มน้ำมันในแหล่งปลูกปาล์มน้ำมันต่างๆ

ขอขอบคุณทุกท่านที่ไม่สามารถกล่าวถึงได้หมด ที่ได้ช่วยเหลือในการดำเนินโครงการวิจัยในด้านอื่นๆ ด้วยดี

โครงการนี้ไม่อาจประสบความสำเร็จได้หากไม่ได้รับความช่วยเหลือทางเทคนิคชีวโมเลกุล และอื่นๆ จาก อ. ดร. ณัฏฐิกา สุวรรณศรัย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ผู้วิจัยขอขอบคุณอย่างยิ่ง

สุดท้ายผู้วิจัยหวังว่า รายงานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการผลิตกล้าปาล์มน้ำมันในประเทศไทย หรือเป็นแนวทางสำหรับการวิจัย arbuscular mycorrhizas กับปาล์มน้ำมัน เพื่อระบบการผลิตพืชที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมในอนาคตต่อไป

เชิดชัย โพธิ์ศรี

ตุลาคม 2554

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	1
บทคัดย่อ (ไทย)	3
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	4
กิตติกรรมประกาศ	5
บทที่ 1 บทนำ	10
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	10
วัตถุประสงค์	11
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
ราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซา	12
ราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซากับความจำเพาะเจาะจงของพืชอาศัย	14
อนุกรมวิธานของราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซา	14
ปาล์มน้ำมัน	16
ปาล์มน้ำมันในประเทศไทย	17
แนวโน้มการขยายตัวของผลผลิตปาล์มน้ำมัน	18
บทบาทของราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซาต่อพืช	19
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	24
การสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซา	24
การคัดแยก การจำแนกชนิด และการพิสูจน์เอกลักษณ์ราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซา	24
การเพิ่มปริมาณของสปอร์ราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซาในดินปาล์มน้ำมัน	29
การทดสอบการสร้างไมคอร์ไรซา	30
บทที่ 4 ผลการศึกษา	33
การสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซา	33
การคัดแยก การจำแนกชนิด	33
การเพิ่มปริมาณของสปอร์ราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซาในดินปาล์มน้ำมัน	49
การเตรียมหัวเชื้อราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซา	53
การจัดจำแนกชนิดราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซาด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล	53
ผลของราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซาต่อการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมัน	60
การทดสอบการติดเชื้อราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซากับกล้าปาล์มน้ำมัน	64
การตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อราอาร์บัสคิวลารีไมคอร์ไรซาในกล้าปาล์มน้ำมัน	65
บทที่ 5 วิเคราะห์ผลและสรุปผล	72
เอกสารอ้างอิง	77
ภาคผนวก	85

รูปที่	หน้า
1. โครงสร้าง arbuscule และ vesicle ของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาที่พบในเซลล์รากพืช	12
2. ขั้นตอนการเจริญของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซากับเซลล์รากพืชอาศัย	13
3. ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA บริเวณบางส่วนของ 18S rDNA, ITS และบางส่วนของ 28S rDNA	26
4. แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาการจัดจำแนกชนิดของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาในปาล์มน้ำมัน	32
5. ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ.เชียงราย	36
6. ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ. ฉะเชิงเทรา	39
7. ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ.หนองคาย	41
8. ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ.น่าน	44
9. ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ.ตราด	47
10. รากปาล์มน้ำมันที่มีการติดเชื้อราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาเมื่อย้อมด้วย trypan blue in lactoglycerol	48
11. ลักษณะของอาร์บัสคูล (arbuscule) เวสิเคิล และเส้นใยรา (hypha coil) ที่อยู่ภายในเซลล์ราก	50
12. จำนวนสปอร์รวมของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาต่อดิน 100 กรัม ที่แยกได้จากการร่อนด้วยวิธี wet sieving and decanting technique เมื่อใช้กล้าปาล์มน้ำมันเป็นพืชอาศัย	51
13. ตัวอย่างสปอร์ราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาในดินตัวอย่าง ที่ได้จาก trap culture เมื่อใช้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันเป็นพืชอาศัย	52
14. โครงสร้างของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาที่พบในรากของกล้าปาล์มน้ำมัน	52
15. ตัวอย่างของ PCR product ขนาดประมาณ 450 bp ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA บริเวณ D2	54
16. รูปแบบของแถบ single strand DNA ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง PCR product จากรีคอมบิแนนท์โคลนต่างๆของสปอร์ราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซา จ.น่าน (NN) ด้วยเทคนิค SSCP ย้อมด้วย silver stain	54
17. ตัวอย่างของ PCR product ขนาดประมาณ 1,500 bp ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA บางส่วนของ 18S rDNA, ITS และบางส่วนของ 28S rDNA	56

รูปที่	หน้า
18. การเจริญทางความสูงของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน เมื่อใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	60
19. การเจริญทางความสูงของกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือน ในทรีตเมนต์ที่ใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เปรียบเทียบกับชุดควบคุม	61
20. การเจริญเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้นกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน เมื่อใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	61
21. มวลชีวภาพส่วนเหนือดินของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน เมื่อใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	62
22. มวลชีวภาพส่วนใต้ดินเฉลี่ยของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน เมื่อใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ต่าง ๆ	63
23. มวลชีวภาพรวมของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน เมื่อใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	63
24. ลักษณะโครงสร้างไมคอร์ไรซาที่พบในเซลล์รากปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อ	64
25. ลักษณะของสปอร์และรากราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ตรวจพบในต้นปาล์มน้ำมันที่ใส่ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	66
26. ลักษณะของสปอร์ และรากราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ตรวจพบในต้นปาล์มน้ำมันที่ใส่ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	67
27. ตัวอย่างของ PCR product ขนาดประมาณ 1,500 bp ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA บางส่วนของ 18S rDNA, ITS และบางส่วนของ 28S rDNA	68

ตารางที่	หน้า
1 การจำแนกราคาราบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในปัจจุบัน	15
2 ผลผลิตน้ำมันพืชโลก ตั้งแต่ปี พ.ศ.2540 - 2550	17
3 พื้นที่ให้ผลผลิต ผลผลิตรวม ผลผลิต/ไร่ของประเทศผู้ผลิตสำคัญปี พ.ศ.2548	18
4 ผลผลิตน้ำมันปาล์มทั่วโลก ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 - 2550 ของประเทศต่าง ๆ	19
5 พื้นที่ปลูก พื้นที่ให้ผลผลิต และผลผลิตปาล์มน้ำมันของประเทศไทย ปี พ.ศ.2547 - 2550	19
6 ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	26
7 ผลการวิเคราะห์สมบัติดินตัวอย่างจากแหล่งพื้นที่ปลูกปาล์มต่างๆ	33
8 ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราคาราบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมัน	35
9 ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราคาราบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมัน	37
10 ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราคาราบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมัน	40
11 ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราคาราบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมัน	42
12 ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราคาราบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมัน	45
13 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของราคาราบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาของปาล์มน้ำมันกับฐานข้อมูล GenBank	57
14 ชนิดและลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราคาราบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบในรากปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อราคาราบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	65
15 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของราคาราบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาของกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อกับฐานข้อมูล GenBank	69
16 เปรียบเทียบชนิดของราคาราบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ตรวจพบในปาล์มน้ำมันที่เติมหัวเชื้อราคาราบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	71

“The study of plants without their mycorrhizas is the study of artefacts. The majority of plants, strictly speaking, do not have roots; they have mycorrhizas” (BEG-Committee, 25th May 1993)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhizal fungi; AMF) เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) กับพืช โดยราจะได้รับที่อยู่อาศัยและสารอาหารจากพืช ในขณะเดียวกันพืชจะได้รับธาตุอาหารต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟอสฟอรัส ดังนั้นราสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และทำให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุฟอสฟอรัส และธาตุอื่นๆในระบบนิเวศ เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าร้อยละ 80 ของพืชชั้นสูงจะมีความสัมพันธ์ดังกล่าว (Harley & Smith 1983, Smith & Read 1997) ในต่างประเทศได้มีการผลิตเชิงพาณิชย์ และประยุกต์ใช้ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (inoculum) หรือปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizers/microbial fertilizers) ให้กับพืชทั้งพืชไร่ พืชสวน และพืชป่าไม้มากมายหลายชนิด (Miyasaka et al. 2003) ความเป็นประโยชน์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในพืชเกษตรนั้นเห็นได้ชัดเจน ผลการศึกษาวิจัยและทดสอบ พบว่าการใช้ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสามารถเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น ลดการใช้ปุ๋ยเคมีที่มีราคาแพง มีความปลอดภัยกว่าการใช้สารเคมีหรือวิธีดั้งเดิมที่ปฏิบัติกัน นำไปสู่การเกษตรในรูปแบบที่ยั่งยืน และการผลิตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมได้ (Azcón-Aguilar & Barea 1996, Gosling et al. 2000, Harley & Smith 1983, Menge & Timmer 1982, Sylvia et al. 1993) ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะช่วยในการดูดซับความชื้น แร่ธาตุต่างๆให้กับพืช และช่วยให้พืชมีชีวิตรอดได้ในช่วงวิกฤติจากความแห้งแล้ง อุณหภูมิสูง ความเป็นพิษของดิน หรือโรคพืช เป็นต้น (Borowicz 2001, Meharg & Cairney 2000) นอกจากนี้ร่ายังช่วยในการปรับปรุงดิน ทำให้เมล็ดดินเกาะตัวกันดีขึ้น ช่วยป้องกันการชะล้างพังทลายของดิน ด้วย (Jeffries et al. 2003, Miller & Jastrow 1992) สำหรับการผลิตหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในประเทศไทยนั้นเริ่มขึ้นมาไม่นาน และการนำไปใช้โดยเกษตรกรยังไม่แพร่หลายเท่าที่ควร แม้ว่ารัฐบาลได้กำหนดให้มีการณรงค์ให้ใช้ปุ๋ย ตลอดจนการใช้สารต่อต้านศัตรูพืชชีวภาพอย่างแพร่หลาย และได้ประกาศให้การผลิตแบบเกษตรอินทรีย์เป็นวาระแห่งชาติตั้งแต่ปลายปี 2547 เป็นต้นมา

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* jacq.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากผลตอบแทนของการปลูกปาล์มน้ำมันดีกว่าการปลูกพืชชนิดอื่น เช่น ยางพารา และการทำนาข้าว จึงเป็นแรงจูงใจให้เกษตรกรขยายพื้นที่ปลูก ประกอบกับมีโครงการเปลี่ยนพื้นที่ปลูกปาล์มทั่วประเทศ ซึ่งในการนี้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้มีแผนกำหนดพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน (Zoning) ใหม่ในประเทศขึ้น โดยในปัจจุบันได้มีการศึกษาความเป็นไปได้ของการปลูกปาล์มน้ำมัน เช่นในพื้นที่ตัวอย่างภาคเหนือ และตะวันออกเฉียงเหนือแล้ว (http://www.doa.go.th/pl_data/PALM/1STAT/st01.html 2005) นอกจากนี้การเกิดภาวะวิกฤตราคาน้ำมันแพงขึ้น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ทำให้ปาล์มน้ำมันกลายมาเป็นพืชที่มี

บทบาทสำคัญกับนโยบายวาระแห่งชาติด้านพลังงานของประเทศ ด้วยความหวังเพื่อการนำมาผลิต "ไบโอดีเซล" ซึ่งจะสามารถลดภาระการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงบางส่วนจากต่างประเทศได้

การผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันให้มีคุณภาพและมาตรฐาน เพื่อรองรับการปลูกในแต่ละฤดูกาลจึงเป็นปัจจัยสำคัญ นอกจากนี้แล้วพื้นที่ที่มีการปลูกปาล์มน้ำมันยังคงเป็นพื้นที่ว่างเปล่า พื้นที่ป่า หรือเคยปลูกพืชอย่างอื่นมาก่อนแนวทางการเพิ่มพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันของประเทศในแต่ละพื้นที่อาจจะต้องประสบปัญหา หากขาดการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันระหว่างราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและระบบรากของปาล์มน้ำมัน ถ้าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่นำไปปลูกใหม่มีคุณภาพต่ำ มีอัตราการตายสูง การเจริญเติบโตเป็นไปอย่างช้า และแคระแกรน หรือโดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าในดินมีฟอสฟอรัสต่ำหรือถูกตรึงอยู่ในดินจะส่งผลให้ปาล์มน้ำมันมีผลผลิตต่ำลงด้วย ซึ่งจะมีผลทำให้โครงการล้มเหลว และไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร การใส่ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับพืชจะช่วยให้ธาตุอาหารเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่พืชดูดไปใช้ได้ง่าย (Blal et al. 1990) จากที่กล่าวข้างต้น คณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความสำคัญของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และการศึกษาการนำไปประยุกต์ใช้ทางการเกษตร เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของพืช ว่ามีบทบาทและความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพของประเทศไทย ดังนั้นโครงการนี้จึงมีเป้าหมายหลักคือ การใช้ความรู้ที่ได้จากการวิจัย เพื่อช่วยพัฒนาการผลิตแบบเกษตรยั่งยืน โดยการใช้จุลินทรีย์ที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้ถูกคัดเลือกโดยธรรมชาติว่าเหมาะสมกับภูมิอากาศและสภาวะแวดล้อมในประเทศไทย เพื่อที่จะใช้ผลิตเป็นหัวเชื้อสำหรับเพาะให้กับกล้าไม้ในแปลงเพาะ ก่อนย้ายนำไปปลูก ซึ่งจะช่วยเร่งอัตราการเจริญเติบโตของพืช และเพื่อทดแทนหรือเพื่อการลดการใช้ปุ๋ยเคมีโดยเฉพาะปุ๋ยฟอสเฟตในขั้นตอนของการผลิตพืช ทำให้ต้นทุนการผลิตพืชน้อยลงแล้ว ยังเป็นการปรับปรุงคุณภาพของดินด้วย

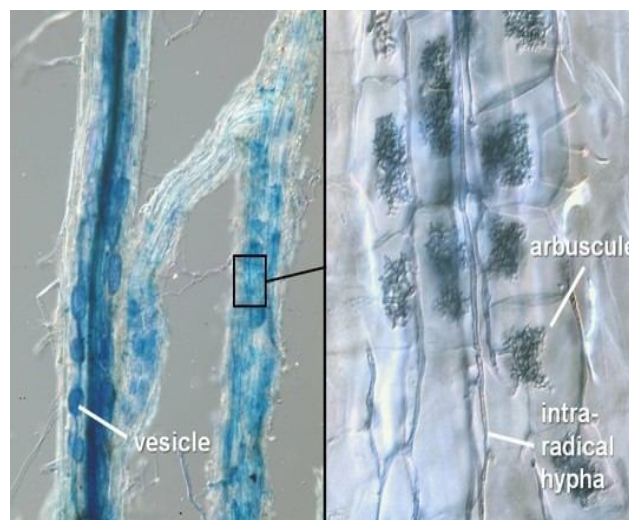
วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมัน และจัดจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐาน และ/หรือลักษณะทางพันธุกรรม
2. เพื่อเพิ่มปริมาณ และผลิตหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่คัดแยกได้
3. เพื่อศึกษาความสามารถของหัวเชื้อในการกระตุ้นการสร้างไมคอร์ไรซาของกล้าปาล์มน้ำมันและ ความสามารถในการเร่งอัตราการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมันภายใต้สภาวะเรือนกระจกและ/หรือในแปลงเพาะ

ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

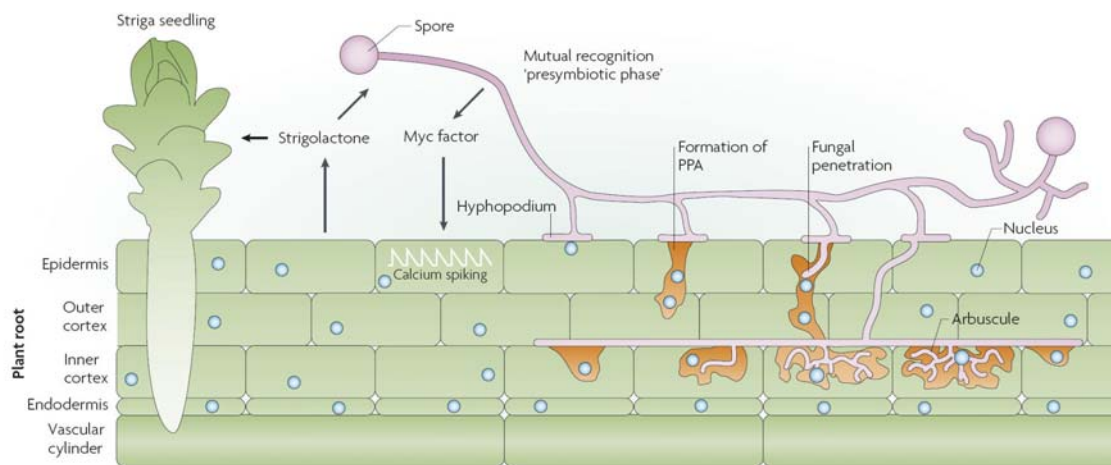
ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhizal fungi; AMF) เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยแบบพึ่งพาอาศัยกันและกัน (symbiosis) กับพืช โดยราจะได้รับที่อยู่อาศัยและสารอาหารจากพืช ในขณะที่พืชจะได้รับธาตุอาหารต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟอสฟอรัส ดังนั้นราสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชและทำให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุฟอสฟอรัส และธาตุอื่นๆในระบบนิเวศ เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าร้อยละ 80 ของพืชชั้นสูงจะมีความสัมพันธ์ดังกล่าว ราไมคอร์ไรซาในกลุ่มนี้จัดว่าเป็นชนิดที่เก่าแก่ที่สุดโดยพบในยุค Ordovician และคาดว่าน่าจะมีอายุไม่ต่ำกว่า 450 ล้านปี (Redecker et al. 2000) เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าร้อยละ 80 ของพืชชั้นสูงจะมีความสัมพันธ์ดังกล่าว (Harley & Smith 1983, Smith & Read 1997, Brundrett 2009)

เมื่ออยู่ร่วมกับรากพืชราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เส้นใยราสามารถเจริญเข้าไปภายในเซลล์รากพืชได้ โดยสร้างโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า arbuscule ภายในเซลล์รากพืช และบางชนิดสามารถสร้างโครงสร้าง vesicle ได้ (รูปที่ 1) ซึ่งราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะได้รับสารอาหารคาร์โบไฮเดรตจากพืช ในขณะที่พืชจะได้รับธาตุอาหารต่างๆ จากรา



รูปที่ 1. โครงสร้าง arbuscule และ vesicle ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบในเซลล์รากพืช (http://www.genetik.bio.lmu.de/research/schuessler/am_intro/index.html)

ช่วยกระตุ้นให้เกิดการออกของสปอร์รา แล้วสร้างเส้นใยรา นอกจากนี้ร่ายังสร้าง mycorrhizal factors (Myc) ซึ่งจะชักนำให้เกิดการสั่นของ calcium ในเซลล์ผิวชั้นนอกของราก ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของยีนต่างๆ ของพืชที่เกี่ยวข้องกับการเจริญร่วมกับรา โดยราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาจะสร้าง appressoria (หรือ hyphopodium) จากนั้นพัฒนาเป็นเส้นใยราที่เจริญเต็มที่ แล้วแทงเข้าไปเจริญในเซลล์รากพืชโดยพืชจะสร้าง prepenetration apparatus (PPA) เพื่อเป็นการนำทางให้เส้นใยราเจริญจากเซลล์รากไปยังชั้น cortex ได้ จากนั้นเส้นใยราจะเจริญไปตามแนวยาวของราก และสร้างสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ PPA ของพืช (PPA-like structures) ภายในเซลล์รากพืชเพื่อเพิ่มการแตกแขนงของเส้นใยรา แล้วสร้างโครงสร้าง arbuscule ราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาบางชนิดสามารถสร้างโครงสร้าง vesicle ส่วนสปอร์ราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาจะสร้างภายนอกเซลล์รากพืชที่บริเวณปลายของเส้นใย (รูปที่ 2) (Parniske 2008)



รูปที่ 2. ขั้นตอนการเจริญของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซากับเซลล์รากพืชอาศัย (Parniske 2008)

การศึกษารอาอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาในระบบนิเวศทำได้โดยการจำแนกชนิดจากสปอร์ราที่พบในดิน และการตรวจสอบการสร้างไมคอร์ไรซาในรากพืช Bever et al. (2001) ศึกษาความหลากหลายของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาในบริเวณสังคมพืชแห่งหนึ่งที่มีพืชอาศัยจำนวน 50 ชนิด และพบราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซา จำนวน 30 ชนิดอาศัยอยู่ร่วมกับพืช จำนวนและชนิดของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซายังแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับระดับความลึกของดิน ระบบการเพาะปลูก หรือการใช้ประโยชน์ที่ดิน (Oehl et al. 2003, 2005, Li et al. 2007) การศึกษาโครงสร้างและสังคมของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซา โดยเฉพาะการศึกษาความหลากหลายของชนิด และสังคมของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาที่เข้าอยู่ในรากพืชอาศัย กับราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาที่สร้างสปอร์อยู่ในดิน พบว่า ชนิดของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาที่พบในรากมีความแตกต่างกันกับชนิดของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาที่สร้างสปอร์ในดิน (Borstler et al. 2006, Hempel et al. 2007) การใช้พืชอาศัยปลูกเพื่อให้อาอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาในดินตัวอย่างสร้างสปอร์ หรือ trap culture เปรียบเทียบกับชนิดของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาที่พบในธรรมชาติยังมีความแตกต่างกันด้วย (Sýkorová et al. 2007) เนื่องจากราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาบางชนิดอาจยังไม่สร้างสปอร์ ในช่วงที่สุ่มเก็บตัวอย่าง โดยราบางชนิดต้องใช้เวลามากกว่า 20 เดือน จึงจะสร้างสปอร์ (Oehl et al. 2004)

ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับความจำเพาะเจาะจงของพืชอาศัย

เดิมมีความเข้าใจว่าราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัย เนื่องจากจำนวนชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบในปัจจุบัน ประมาณ 214 ชนิด พบว่าสามารถสร้างไมคอร์ไรซากับพืชได้ถึง 250,000 ชนิด (Fitter 2005) พืชที่เป็นพืชอาศัยทั่วไปของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ได้แก่ *Plantago lanceolata*, *Trifolium subterraneum* และ *Sorghum sudanense* ดังนั้นจึงนิยมใช้พืชดังกล่าวเพื่อปลูกถ่ายให้ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสร้างสปอร์ (Smith & Read 2008)

ในปัจจุบันพบว่าราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบางชนิดมีความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัย เช่น ต้น *Acer pseudoplatanus* เป็นพืชอาศัยของรา *Glomus hoi* เท่านั้น (Helgason et al. 2002) ดังนั้นพืชแต่ละชนิดจึงมีผลต่อการสร้างสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในธรรมชาติได้ (Jansa et al. 2002)

อนุกรมวิธานของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การจำแนกชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาก่อนข้างยาก เนื่องจากรากลุ่มนี้ไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ว่าจะสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ ได้แก่ azygospore หรือ chlamydospore ขึ้นในดินและรากพืช สปอร์ราอาจมีขนาดใหญ่มาก มีเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 1.2 มิลลิเมตร ที่ประกอบด้วยนิวเคลียสจำนวนตั้งแต่ 576-35,000 นิวเคลียส (Hosny et al. 1998, Viera & Glenn 1990) โดยมีปริมาณของดีเอ็นเอ 0.26-3.4 pg ต่อนิวเคลียส ขึ้นอยู่กับชนิดรา (Bianciotto & Bonfante 1992, Hosny et al. 1998, Viera & Glenn 1990) รา *Scutellospora pellucida* มีจำนวนจีโนมทั้งหมด เท่ากับ 1,058 Mb (Bianciotto & Bonfante 1992) รา *Glomus* sp. ไอโซเลต DAOM197198 มีจำนวนจีโนมทั้งหมด เท่ากับ 16.54 Mb (Hijri & Sanders 2004) เป็นต้น โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน การพัฒนาของสปอร์ที่แตกต่างกัน และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Small subunit (SSU) rDNA ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเป็นราแท้จริงอยู่ในไฟลัม Glomeromycota (Schüßler 2001) มีเพียง class เดียวคือ Glomeromycetes 4 อันดับ 11 วงศ์ 17 สกุล ที่รู้จักและทราบชนิดแล้วคาดว่าจะมีประมาณ 228 ชนิด (ตารางที่ 1) (Schüßler & Walker 2010)

ตารางที่ 1 การจำแนกรารอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในปัจจุบัน (Schüßler & Walker 2010)

	Order	Family	Genus
phylum Glomeromycota	Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i> <i>Funneliformis</i> <i>Rhizophagus</i> <i>Sclerocystis</i>
class Glomeromycetes		Claroideoglomeraceae	<i>Claroideoglomus</i>
	Diversisporales	Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i> <i>Scutellospora</i> <i>Racocetra</i>
		Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>
		Entrophosporaceae	<i>Entrophospora</i>
		Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
		Diversisporaceae	<i>Diversispora</i> <i>Otospora</i>
	Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
	Archaeosporales	Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>
		Ambisporaceae	<i>Ambispora</i>
		Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i>

เนื่องจากการจำแนกชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานเพียงอย่างเดียวนั้น มีข้อจำกัดหลายประการ ทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกได้ในระดับชนิด หรือไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้อย่างถูกต้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการจัดจำแนกชนิดของราที่เจริญในเซลล์รากพืชอาศัย หรือราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซานี้ เดียวกันอาจมีรูปร่างของสปอร์ได้สองแบบ (dimorphic spores) ทำให้จำแนกชนิดได้แตกต่างกัน (Sawaki et al. 1998, Redecker et al. 2000b) ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการนำเอาเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาช่วยในการศึกษาดังกล่าว ยีนที่มีรายงานว่าสามารถนำมาใช้ในการศึกษาได้แก่ ยีน Ribosomal RNA (rDNA) ในส่วนของ Small Subunit (SSU), Internal Transcribed Spacer (ITS) และ partial large subunit (LSU) rDNA (Clapp et al. 2001, Rodriguez et al. 2001) เป็นต้น ซึ่งข้อมูลทางพันธุกรรมของยีนดังกล่าวสามารถใช้ในการศึกษาอนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้อย่างถูกต้อง

ในต่างประเทศมีการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส และใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะมาใช้ศึกษาความหลากหลายชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นและนิยมใช้กันมาก ได้แก่ AM1 (Helgason et al. 1998) และ NS31 (Simon et al. 1992) โดยผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่นี้ มีค่าประมาณ 550 bp ข้อจำกัดของไพรเมอร์ NS31 คือเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูแคริโอตทั้งหมด ส่วน AM1 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในอันดับ Archaeosporales และ Paraglomerales ได้ (Redecker et al. 2000b, Schüßler 2001) ไพรเมอร์คู่นี้จึงเหมาะสำหรับศึกษาราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในอันดับ Glomerales และ Diversisporales เท่านั้น ต่อมาได้มีการพัฒนาไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษามากขึ้น โดยใช้สำหรับบริเวณ SSU ได้แก่ AML1-AML2 (800 bp), GlomerWT0-Glomer1536 หรือ GlomerWT0-GlomerWT1,2,3,4 (1,130 bp) (Lee et al. 2008, Wubet et al. 2006)

ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นและนิยมใช้ศึกษาบริเวณ ITS และ partial LSU ได้แก่ NS5/ITS4, Glom1310, Arch1311/ITS4, ITS1F/Glom5.8R, SSU-Gom1/LSU-Glom1 (Redecker 2000, Renker et al. 2003) และเมื่อเร็วๆ นี้ Krüger et al. (2010) ได้พัฒนาชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับบริเวณ SSU, ITS และบางส่วนของ LSU ของราในไฟลัม Glomeromycota โดยใช้เทคนิค nested PCR พบว่ามีประสิทธิภาพดีสามารถใช้ตรวจหาราอาร์บัสคูลาร์ได้ทั้งจากสปอร์ และรากพืชอาศัย

ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน (Oil palm) จัดอยู่ในพืชตระกูลปาล์มในวงศ์ Palmaceae สกุล *Elaeis* ซึ่งมีอยู่ 3 ชนิด คือ 1) *Elaeis guineensis* (African oil palm) 2) *Elaeis oleifera* (Southern American oil palm) และ 3) *Elaeis odora* (American oil palm) ปาล์มน้ำมันสองชนิดแรก เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ การใช้ประโยชน์น้ำมันปาล์มเกิดขึ้นจากผลปาล์ม 2 ส่วน คือ จากเปลือกหุ้มภายนอก และจากเนื้อในของเมล็ด น้ำมันจากเปลือกของปาล์ม ประกอบด้วยกรดไขมันที่อิ่มตัว ประมาณร้อยละ 52 และกรดไขมันไม่อิ่มตัว ร้อยละ 48 ดังนั้น จึงต้องนำน้ำมันดิบผ่านกรรมวิธีแยกกรดไขมันทั้งสองออกจากกัน นำน้ำมันไม่อิ่มตัวไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ใช้ปรุงอาหาร ทำเนยเทียม หรือมาการีน เนยขาว เป็นส่วนผสมของนมข้นหวาน ไอศกรีม และขนมอีกหลายชนิด ส่วนที่เป็นกรดไขมันอิ่มตัวก็นำไปทำสบู่ ผงซักฟอก และผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมอื่น ๆ ส่วนน้ำมันเนื้อในของเมล็ดปาล์ม ประกอบด้วยน้ำมันชนิดอิ่มตัวสูงถึงร้อยละ 85 - 90 ทำให้ไม่เหมาะต่อการบริโภค จึงนำไปใช้ ในอุตสาหกรรมทำสบู่ เครื่องสำอาง ผงซักฟอกอุตสาหกรรม

ข้อมูลของกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา รายงานว่าในปี 2550 ผลผลิตน้ำมันพืชของโลกสูงกว่าปี 2540 ประมาณ 62 % และผลผลิตน้ำมันถั่วเหลืองสูงเป็นอันดับ 1 ในช่วงก่อนปี 2548 และหลังจากนั้นเป็นต้นมา ปาล์มน้ำมันกลายเป็นพืชน้ำมันอันดับ 1 แทนที่ ถั่วเหลือง และมีผลผลิตน้ำมันสูงถึง 36.83 ล้านตัน (ตารางที่ 2) ทั้งนี้เนื่องจากผลผลิตน้ำมันต่อไร่ของปาล์มน้ำมันสูงกว่า ถั่วเหลืองประมาณ 9 เท่าตัว

ตารางที่ 2 ผลผลิตน้ำมันพืชโลก ตั้งแต่ปี พ.ศ.2540 - 2550

ชนิด	ผลผลิตน้ำมันพืช (ล้านตัน)					
	2540	2545	2547	2548	2549	2550
น้ำมันถั่วเหลือง	22.57	28.90	30.05	32.50	34.48	35.99
น้ำมันปาล์ม	16.97	25.36	29.59	33.88	35.81	36.83
น้ำมันเมล็ดในปาล์ม	2.20	3.12	3.67	4.13	4.38	4.55
น้ำมันมะพร้าว	3.29	3.21	3.29	3.44	3.40	3.25
น้ำมันทานตะวัน	9.00	7.42	9.17	9.04	10.42	10.00
อื่นๆ	21.13	24.69	26.15	28.50	29.36	31.27
รวม	75.16	92.70	101.92	111.56	117.85	121.89

ที่มา : กระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา (2550)

ปาล์มน้ำมันในประเทศไทย

ปาล์มน้ำมันมีถิ่นกำเนิดเดิมในทวีปแอฟริกา ชาวโปรตุเกสได้นำปาล์มน้ำมันเข้ามาปลูกในเอเชียครั้งแรก ที่สวนพฤกษศาสตร์โบกอร์ ในประเทศอินโดนีเซีย ในปี พ.ศ. 2391 ต่อมาผู้นำไปปลูกในตอนเหนือของเกาะสุมาตรา ปรากฏว่าให้ผลผลิตสูง จึงมีการปลูกในเชิงการค้า และประเทศมาเลเซียได้กลายเป็นประเทศส่งออกน้ำมันปาล์มมากที่สุดในประเทศไทย พระยาประดิพัทธ์ภูบาล ได้นำมาปลูกครั้งแรกเป็นไม้ประดับเมื่อปี พ.ศ. 2472 โดยปลูกเป็นปาล์มประดับที่สถานีการยางคอหงส์ จังหวัดสงขลา และสถานีสิกรรมพลู จังหวัดจันทบุรี และได้มีการทำสวนปาล์มกันจริงจัง ประมาณปี พ.ศ. 2511 โดยโครงการนิคมสร้างตนเองพัฒนาภาคใต้ จังหวัดสตูลและโครงการบริษัทอุตสาหกรรมน้ำมันและสวนปาล์มจำกัด (สวนเจียร วานิช) จังหวัดกระบี่ รวมพื้นที่ปลูกทั้งสิ้นประมาณ 40,000 ไร่ ภายหลังได้ขยายไปสู่จังหวัดอื่น ๆ ที่ใกล้เคียง โดยจังหวัดที่มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันมากที่สุดคือ กระบี่ สุราษฎร์ธานี และชุมพร ตามลำดับ (ชาย และสุรกิตติ 2547)

การสำรวจข้อมูลเกี่ยวกับพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันของประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ในปี พ.ศ.2548 พบว่า ประเทศที่มีพื้นที่ให้ผลผลิตมากเป็นอันดับ 1 คือ มาเลเซีย รองลงมาคือ อินโดนีเซีย ไนจีเรีย ไทยและโคลัมเบีย และเมื่อเปรียบเทียบศักยภาพของปาล์มน้ำมันในการให้ผลผลิต/ไร่ พบว่า มาเลเซียสามารถให้ผลผลิต/ไร่ ได้สูงสุด 3.3 ตัน/ไร่/ปี ทั้งนี้เนื่องจากสภาพพื้นที่และปริมาณน้ำฝนที่เอื้ออำนวยต่อการผลิตปาล์มน้ำมัน และประเทศที่ให้ผลผลิตรองลงมาคือ อินโดนีเซีย และไทย (ตารางที่ 3) และในปี 2550 พบว่า อินโดนีเซียกลายเป็นประเทศที่มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันมากเป็นอันดับ 1 ของโลกและสามารถผลิตปาล์มน้ำมันได้สูงเป็นอันดับ 1 เช่นกัน

ตารางที่ 3 พื้นที่ให้ผลผลิต ผลผลิตรวม ผลผลิต/ไร่ของประเทศผู้ผลิตสำคัญปี พ.ศ.2548

ประเทศ	พื้นที่ให้ผลผลิต (ไร่)	ผลผลิตทะลายสดรวม (ล้านตัน)	ผลผลิต/ไร่ (ตัน/ไร่/ปี)
มาเลเซีย	22.6	75.6	3.3
อินโดนีเซีย	22.5	64.2	2.8
ไนจีเรีย	20.7	8.7	0.4
ไทย	2.0	5.0	2.4
โคลัมเบีย	1.0	3.3	3.0
รวม	78.8	173	2.1

แนวโน้มการขยายตัวของผลผลิตปาล์มน้ำมัน

จากการสำรวจข้อมูลของผลผลิตน้ำมันปาล์มของโลก พบว่าในปี พ.ศ. 2550 มีผลผลิตน้ำมันปาล์มทั่วโลกสูงกว่าผลผลิตในปี พ.ศ. 2540 มากกว่า 2 เท่า เนื่องจากการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เพื่อบรรเทาปริมาณการใช้ไขมันที่มีเพิ่มมากขึ้น และรองรับการเป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซล จากตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ประเทศมาเลเซียเป็นผู้ผลิตน้ำมันปาล์มรายใหญ่ของโลก แต่ปรากฏว่าใน ปี พ.ศ. 2550 ประเทศผู้ผลิตน้ำมันปาล์มรายใหญ่ของโลกได้กลายเป็นประเทศอินโดนีเซีย สำหรับประเทศไทยเป็นผู้ผลิตมากเป็นลำดับที่สาม ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 เป็นต้นมา เนื่องจากผลผลิต/ไร่/ปีของประเทศไทยสูงกว่าไนจีเรีย สืบเนื่องจากความต้องการใช้น้ำมันดิบที่เพิ่มขึ้น ทั้งในด้านบริโภค-อุปโภค การใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนสำหรับผลิตไบโอดีเซล และราคาผลผลิตทะลายสดที่สูงขึ้น (ปี 2550 ราคาผลผลิตทะลายสดเฉลี่ย 4.07 บาท/กิโลกรัม) รัฐบาลไทยได้กำหนดยุทธศาสตร์การพัฒนา ส่งเสริมไบโอดีเซล ทดแทนน้ำมันดีเซล ร้อยละ 5 ในปี พ.ศ. 2554 หรือเป็นไบโอดีเซล B100 จำนวน 3.02 ล้านลิตรต่อวัน จึงมีแผนส่งเสริมการปลูกปาล์มน้ำมันเพิ่ม 2.5 ล้านไร่ ในปี พ.ศ. 2551- 2555 และเพิ่มเป็น 10 ล้านไร่ ในปี พ.ศ. 2572 ทำให้เกษตรกรและภาคเอกชนมีความสนใจต้องการปลูกปาล์มน้ำมันเพิ่ม ขึ้นเป็นอย่างมาก พื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันของไทยจึงเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 ผลผลิตน้ำมันปาล์มทั่วโลก ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 - 2550 ของประเทศต่าง ๆ

ประเทศ	ผลผลิตน้ำมันปาล์ม (ล้านตัน)					
	2540	2545	2547	2548	2549	2550
มาเลเซีย	8.51	11.86	13.42	15.19	15.49	15.80
อินโดนีเซีย	5.00	9.20	11.50	14.00	15.40	15.90
ไนจีเรีย	0.50	0.76	0.78	0.79	0.80	0.81
ไทย	0.30	0.78	0.84	0.70	0.76	1.00
โคลัมเบีย	0.39	0.52	0.61	0.65	0.69	0.77
อื่นๆ	2.27	2.24	2.44	2.55	2.67	2.55
รวม	16.97	25.36	29.59	33.88	35.81	36.83

ตารางที่ 5 พื้นที่ปลูก พื้นที่ให้ผลผลิต และผลผลิตปาล์มน้ำมันของประเทศไทย ปี พ.ศ.2547 - 2550

รายการ		ปี 2547	ปี 2548	ปี 2549	ปี 2550
พื้นที่ปลูก	(ล้านไร่)	2.40	2.75	3.07	3.15
พื้นที่ให้ผลผลิต	(ล้านไร่)	1.93	2.03	2.37	2.72
ผลผลิต/ไร่	(ตัน)	2.68	2.47	2.63	2.67
- ทะลาย	(ล้านตัน)	5.18	5.00	6.24	7.27
- น้ำมันปาล์มดิบ (ล้านตัน)		0.82	0.78	1.17	1.24

ที่มา : แผนพัฒนาอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมัน ปี 2551 - 2555 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรกฎาคม 2550

บทบาทของราอาร์บัสคูลารีไมคอร์ไรซาต่อพืช

ราอาร์บัสคูลารีไมคอร์ไรซามีประโยชน์ต่อการดูดซึมน้ำและแร่ธาตุ และการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากเส้นใยราที่เจริญอยู่นอกรากช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมน้ำและแร่ธาตุได้มากขึ้น ความยาวของเส้นใยราที่เจริญออกจากรากเข้าไปในดินอาจยาวลึกลงไปใต้ดิน ประมาณ 60-180 เซนติเมตร (Querejeta et al, 2007) และมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กมาก เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของราก ทำให้เส้นใยราสามารถแทรกเข้าไปในช่องว่างภายในดิน จึงเข้าถึงแร่ธาตุและน้ำได้ดีกว่ารากพืชที่ไม่มีไมคอร์ไรซา ราอาร์บัสคูลารีไมคอร์ไรซาปลดปล่อยสารอินทรีย์ และทำให้อนุภาคดินเกิดการรวมตัวกันเป็นเม็ดดิน (Brundrett et

al. 1996, Bethlenfalvay et al. 1999, van der Heijden & Sanders 2003, Koide & Mosse, 2004) บทบาทที่สำคัญของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อพืช กล่าวสรุปได้ ดังนี้

1. ช่วยให้พืชดูดแร่ธาตุอาหารได้มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นธาตุที่เคลื่อนที่ได้ยากในดิน ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำโดยถูกตรึงอยู่ในรูปของ Al-, Ca- และ Fe-phosphates (Smith & Read 2008) หรืออยู่ในรูปของ inositol phosphates (phytate), phospholipid และ nucleic acid จะถูกย่อยโดยราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เส้นใยสามารถแผ่ไปได้ไกล และเข้าถึงบริเวณที่มีฟอสฟอรัสสะสมอยู่ในดินในตำแหน่งที่ไกลกว่าราก จึงสามารถดูดฟอสฟอรัสกลับมาให้พืช ทำให้พืชมีการเจริญดีขึ้น (Grace et al. 2009, Smith et al. 2003, 2004, 2009) นอกจากฟอสฟอรัสแล้ว ยังพบว่าเส้นใยยังช่วยในการดูดไนโตรเจน ให้กับพืชได้ถึงร้อยละ 30-42 (Mäder et al. 2000, Govindarajulu et al. 2005) และช่วยให้พืชแต่ละชนิดดูดแร่ธาตุอาหารจุลธาตุ เช่น ทองแดง และสังกะสี ได้มากขึ้น (Gnekow & Marschner 1989, Li et al. 1991)

2. ช่วยให้พืชดูดน้ำได้มากขึ้น เพิ่มความสามารถในการทนแล้งให้กับพืช เส้นใยของราช่วยดูดน้ำให้กับพืช และช่วยในการปรับปรุงโครงสร้างของดิน และทำให้เกิดเม็ดดิน (Rillig 2004, van der Heijden et al. 2006) อึมน้ำได้ดีขึ้น นอกจากนี้ร่ายังช่วยเพิ่มอินทรีย์วัตถุในดินให้สูงขึ้น โดยการสร้าง Glomalin ซึ่งเป็นสารประเภท polysaccharide ที่ปลดปล่อยออกมาทางเส้นใยภายนอกราก ทำให้ดินร่วนซุย มีโครงสร้างดีขึ้น

ในต่างประเทศได้มีการผลิตเชิงพาณิชย์ และประยุกต์ใช้ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (inoculum) หรือปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizers /microbial fertilizers) ให้กับพืช ทั้งพืชไร่ พืชสวน และพืชป่า ไม่นานหลายชนิด (Miyasaka et al. 2003) ความเป็นประโยชน์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในพืชเกษตรเห็นได้ชัดเจน ผลการศึกษาวิจัย และทดสอบ พบว่าการใช้ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพิ่มผลผลิตพืชให้สูงขึ้น ลดการใช้ปุ๋ยเคมีที่มีราคาแพง มีความปลอดภัยกว่าการใช้สารเคมีหรือวิธีดั้งเดิมที่ปฏิบัติกัน นำไปสู่การเกษตรในรูปแบบที่ยั่งยืน และการผลิตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมได้ (Azcón-Aguilar & Barea 1996, Gosling et al. 2005, Harley & Smith 1983, Menge & Timmer 1982, Sylvia et al. 1993) ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะช่วยให้การดูดซับความชื้น แร่ธาตุต่างๆ ให้กับพืช และช่วยให้พืชมีชีวิตรอดได้ในช่วงวิกฤติจากความแห้งแล้ง อุณหภูมิสูง ความเป็นพิษของดิน หรือโรคพืช เป็นต้น (Borowicz 2001, Meharg & Cairney 2000) นอกจากนี้ร่ายังช่วยในการปรับปรุงดิน ทำให้เม็ดดินเกาะตัวกันดีขึ้นจึงช่วยป้องกันการชะล้างพังทลายของดินด้วย (Jeffries et al. 2003, Miller & Jastrow 1992)

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 รัฐบาลได้กำหนดให้เป็นปีแห่งความปลอดภัยด้านอาหาร มีการณรงค์ให้ใช้ปุ๋ย ตลอดจนการใช้สารต่อต้านศัตรูพืชชีวภาพอย่างแพร่หลาย และได้ประกาศให้การผลิตแบบเกษตรอินทรีย์เป็นวาระแห่งชาติตั้งแต่ปลายปี 2547 เป็นต้นมา สำหรับการผลิตเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในประเทศไทยเริ่มขึ้นมาไม่นาน และการนำไปใช้โดยเกษตรกรยังไม่แพร่หลายนักเท่าที่ควร ได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และการประยุกต์ใช้ทั้งในพืชเกษตร และป่าไม้ ตัวอย่าง ดังนี้

ณัฐวรังก์ (2530) ศึกษาการกระจายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในดินปลูกถั่วลิสง และกล้าไม้ชนิดต่างๆ เช่น มะค่าโมง พะยูง เลี่ยน ยูคาลิปตัส เป็นต้น พบว่าราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดที่พบมากที่สุดคือ ราในสกุล *Glomus sp.* และ *Sclerocystis sp.*

พรพิมล (2531) ศึกษาการแพร่กระจายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในดินปลูกส้มในประเทศไทย พบว่าราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดที่พบแพร่กระจายมากที่สุดคือ ราในสกุล *Glomus* sp. และ *Acaulospora* sp.

ไพรัตน์ (2540) ศึกษาการใช้เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาร่วมกับจุลินทรีย์ละลายฟอสฟอรัสในการเพิ่มผลผลิตของถั่วเหลืองที่ปลูกเชื้อไรโซเบียม เพื่อประเมินถึงกิจกรรมร่วมกันของจุลินทรีย์ทั้งสองที่มีต่อการเจริญเติบโตและการดูดใช้ธาตุฟอสฟอรัส ของถั่วเหลือง ผลการทดลองพบว่า การใส่เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาร่วมกับจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต มีแนวโน้มให้น้ำหนักสดของส่วนเหนือดินและราก น้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดินและราก ความเข้มข้นไนโตรเจนและปริมาณการดูดใช้ไนโตรเจน ความเข้มข้นฟอสฟอรัสและปริมาณการดูดใช้ฟอสฟอรัสในส่วนเหนือดินสูงกว่าชุดควบคุม

สุเทพ และโกวิท (2541) ทดสอบประสิทธิภาพของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 9 ชนิด ได้แก่ *Acaulospora pinosap*, *Glomus albidum*, *G. aggregatum*, *G. claroideum*, *G. delhiense*, *G. manihotis*, *G. monosporus* และ *Scutellospora fulgida* ต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้สะเดา กระถินเทพา และประดู่ โดยเปรียบเทียบทั้งที่มีการใส่และไม่ใส่เชื้อราให้กับกล้าไม้ ทดสอบภายใต้สภาวะเรือนทดลองและภาคสนาม พบว่าภายใต้สภาวะเรือนกระจกทดลองผลการทดสอบปรากฏว่าราทั้ง 9 ชนิดช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตด้านความสูง และน้ำหนักแห้งได้มากกว่าต้นไม้ที่ไม่ใส่เชื้อรา

ธงชัย (2541) ศึกษาผลของการใช้ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และหินฟอสเฟตที่มีต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวาน และถั่วเหลืองฝักสด โดยทดสอบผงเชื้อ *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora dilatata*, *Entrophospora* sp. สำหรับข้าวโพด และ *Entrophospora* sp, *Glomus tenuis*, *Glomus claroideum* สำหรับถั่วเหลืองรวมทั้งการไม่ใช้หัวเชื้ออีก 1 ทริตเมนต์ ร่วมกับการใช้หินฟอสเฟตอีก 4 ระดับ คือ 0, 25, 50 และ 100 กก./ไร่ ผลการทดลองในข้าวโพด พบว่าผลผลิตจะสูงสุด เมื่อใช้ผงเชื้อ *Acaulospora dilatata* กับหินฟอสเฟต 50 กก./ไร่ คือ 556 กก./ไร่ ผลการศึกษาในถั่วเหลือง พบว่าผลผลิตที่ได้ไม่ค่อยสูงนัก การใส่เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาร่วมกับหินฟอสเฟต ทำให้ผลผลิตสูงขึ้นบ้าง การใส่รา *Glomus claroideum* กับหินฟอสเฟต 50 กก./ไร่ จะให้ผลผลิตสูงสุดคือ 294.33 กก./ไร่ การใส่รา *Entrophospora* sp. อย่างเดียวส่งเสริมให้ถั่วเหลืองมีเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัส ในต้นพืชสูงขึ้นได้ (0.35 เปอร์เซ็นต์) รา *Glomus claroideum* และ *Glomus tenuis* มีแนวโน้มทำให้มี ฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ในดินที่ปลูกถั่วเหลืองสูงกว่าในดินที่ไม่ได้มีการใส่ผงเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

สุนัดดา (2545) ทดสอบการใช้หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (*Glomus* sp.) ร่วมกับราเอคโตไมคอร์ไรซา (*Pisolithus* sp.) ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของกล้าไม้ยูคาลิปตัส พบว่าการใช้หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาร่วมกับราเอคโตไมคอร์ไรซา สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกล้าไม้ได้ดีกว่าชุดควบคุม

Blal & Gianinazzi-Pearson (1990) และ Blal et al. (1990) รายงานว่ากล้าปาล์มน้ำมันที่มีราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และมีประสิทธิภาพในการดูดกินปุ๋ยฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปของ triple superphosphate ได้ดีเพิ่มขึ้น 2.7-5.6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่มีไมคอร์ไรซา

Nadarajah & Nawawi (1993) พบการกระจายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 12 ชนิด ได้แก่ *Glomus clarum*, *G. clavisporum*, *G. fasciculatum*, *G. geosporum*, *G. macrocarpum*, *G. microcarpum*, Unidentified *Glomus* sp., *Sclerocystis coremioides*, *Acaulospora laevis*, *A.*

scrobiculata, *Gigaspora decipiens* และ *Gi. Margarita* ในดินที่เก็บจากพื้นที่สวนปาล์มน้ำมัน 4 แห่งในมาเลเซีย

Sylvia et al. (1993) ศึกษาผลของการใช้เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวโพด ผลการทดลองพบว่าในการใส่หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *Glomus etunicatum* มีแนวโน้มทำให้น้ำหนักสดของส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน ความเข้มข้นฟอสฟอรัส และปริมาณการดูดใช้ฟอสฟอรัสในส่วนเหนือดินสูงกว่าชุดควบคุม

Widiastuti & Tarhadi (1993) พบว่าการใส่หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับกล้าปาล์มน้ำมัน สามารถช่วยให้กล้าปาล์มน้ำมันเจริญเติบโตดี มีอัตราการรอดตายสูงขึ้นและส่งผลต่อการดูดฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นร้อยละ 37-44 เมื่อเทียบกับกล้าปาล์มน้ำมันที่เป็นชุดควบคุม

Setiadi et al. (2000) ทดสอบการใช้หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ได้แก่ *Acaulospora* sp. *Gigaspora rosea* และ *Glomus etunicatum* ให้กับกล้าไม้ *Acacia mangium*, *Trichospermum burrettii* และ *Paraserianthes falcataria* ที่นำไปปลูกในพื้นที่เหมืองนิกเกิล (Ni) ร้าง ผลการศึกษาพบว่าการใส่หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับกล้าไม้ทั้งสามชนิดทำให้การเจริญเติบโตของกล้าไม้ และการตั้งตัวของกล้าไม้ในพื้นที่เหมืองร้าง ดีกว่ากล้าไม้ที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อรา

Dodd et al. (2002) ทดสอบการใช้หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 5 ชนิด ได้แก่ *Glomus claroideum*, *G. geosporum*, *G. mosseae*, *G. intraradices* และ *Glomus* sp. ให้กับกล้าไม้ *Elymus pycnanthus* ที่นำไปปลูกเพื่อฟื้นฟูพื้นที่ดินเสื่อมโทรมจากการก่อสร้างอุโมงค์ Euro tunnel ผลการศึกษาพบว่าการใส่หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับกล้าไม้ ทำให้การเจริญเติบโตของกล้าไม้ และการรอดตายในพื้นที่ดินเสื่อมโทรม ดีกว่ากล้าไม้ที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อรา

Anonymous (2003) ทดสอบความสามารถในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol agent) ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา โดยการใส่หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับกล้าต้นโกโก้ (cocoa) และกล้าปาล์มน้ำมัน พบว่าการใส่หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในต้นโกโก้ สามารถลดอัตราการเชื้อของรา *Ganoderma pseudoferum* ในรากลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$) สำหรับกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา พบว่าเพียงร้อยละ 20 ของต้นกล้าทั้งหมดเท่านั้นที่พบการเกิดโรคในรากโดยเชื้อราดังกล่าว เมื่อปลูกในแปลงทดลองนาน 9 เดือน

Youpensuk et al. (2008) พบว่าการใส่หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับต่ำทำให้ต้นกล้าส้มสายน้ำผึ้ง มีการเจริญทางมวลชีวภาพสูงกว่าต้นกล้าที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ

Hamza et al. (2010) ทดสอบการใส่ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 2 ชนิด ได้แก่ *Glomus mosseae* และ *G. intraradices* ให้กับต้นกล้ามะกอก (*Olea europaea* L.) พบว่าต้นกล้าที่ใส่หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา มีการเจริญทางความสูง และมวลชีวภาพมากกว่าต้นกล้าที่ไม่ใส่หัวเชื้อรา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยต้นกล้าที่ใส่เชื้อ *G. mosseae* และ *G. intraradices* มีน้ำหนักสดเพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 376 และ 226 เมื่อเทียบกับต้นกล้าที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ

นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าการใส่หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซายังสามารถเพิ่มผลผลิตและส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชอื่นๆอีกหลายชนิด เช่น กาแฟ องุ่น แอปเปิ้ล พลัม สับปะรด อะโวคาโด สตอร์เบอร์รี่ ราสเบอร์รี่ เชอร์รี่ แพร์ มันฝรั่ง เป็นต้น (Varma & Schuepp 1995, Fortuna et al. 1996, Lovato et al. 1996, Azcon-Aguilar & Barea 1996, Siqueira et al. 1998, Duffy & Cassells 2000, Cardoso et al. 2003)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น สรุปได้ว่าราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซารสร้างไมคอร์ไรซากับพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และการอนุรักษ์ชนิดต่างๆ ได้หลากหลายชนิด การกระจายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะพบได้ในดินทุกแห่ง ทั้งที่ใช้สำหรับการเกษตร พืชหญ้า ป่าไม้ หรือแม้กระทั่งดินที่ปล่อยรกร้างในเหมืองเก่า ดังนั้นราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจึงถือได้ว่าเป็นองค์ประกอบที่สำคัญยิ่งในสังคมพืชตามธรรมชาติ และในระบบนิเวศการเกษตร แม้ว่าจะมีข้อมูลเกี่ยวกับราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจำนวนมากพอสมควร แต่เมื่อเปรียบเทียบกันแล้ว ข้อมูลการวิจัยเกี่ยวกับราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และการนำไปประยุกต์ใช้กับพืชเศรษฐกิจ เช่น ปาล์มน้ำมัน นับว่ายังมีอยู่น้อยมากโดยเฉพาะในประเทศไทย ทั้งที่ปรากฏชัดเจนว่ามีความเป็นไปได้ค่อนข้างสูงที่จะนำราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาไปประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อให้กับพืชเศรษฐกิจชนิดนี้

1. การสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมัน

เก็บรวบรวมตัวอย่างดิน และตัวอย่างรากปาล์มน้ำมันจากพื้นที่แปลงปลูกปาล์มน้ำมัน ในพื้นที่ขยายการปลูกปาล์มน้ำมัน 5 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ เชียงราย ฉะเชิงเทรา หนองคาย น่าน และตราด ในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2550- กันยายน 2550 โดยการสุ่มหลายๆ จุด ที่ระดับความลึก 15 เซนติเมตร บดเม็ดดินแต่ละตัวอย่างที่สุ่มได้ให้แตกแล้วคลุกเคล้าให้เข้ากันอย่างสม่ำเสมอ (composite sample) แล้วสุ่มตัวอย่างดังกล่าวประมาณตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม เพื่อนำมาวิเคราะห์สมบัติของดิน เช่น ความเป็นกรดด่าง (Thomas 1996) ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (Tekmar-Dohrmann 2000) ปริมาณฟอสฟอรัสในดิน (Kuo 1996) เป็นต้น ตัวอย่างรากล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วตัดเป็นท่อนสั้นๆ เก็บในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อการย้อมสีศึกษาโครงสร้างของ arbuscules และ vesicles ภายในเซลล์รากพืช ด้วยวิธีของ Phillips & Hayman (1970) และสกัด DNA เพื่อการระบุชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อไป โดยเก็บรักษารากไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะใช้

2. การคัดแยก การจำแนกชนิด และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

2.1 การคัดแยกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา วิธี wet sieving & decanting technique (Gerdemann & Nicolson 1963)

ชั่งดินจากข้อ 1 ปริมาณ 100 กรัม แช่น้ำปัสเปปา 500 มิลลิลิตร ใช้มือบดขยี้ดินให้เม็ดดินกระจาย ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอนเป็นเวลา 30 นาที เทส่วนของเหลวผ่านตะแกรงที่มีขนาด 2 mm 125 μ m 63 μ m และ 38 μ m ใช้น้ำล้างส่วนที่ตกค้างบนตะแกรงร้อนขนาด 38 μ m แล้วถ่ายวัสดุที่ตกค้างอยู่บนตะแกรงร้อนดังกล่าวลงในหลอด centrifuge นำไปหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนของเหลวใสทิ้ง และเก็บส่วนที่ตกตะกอนไว้

2.2 วิธี sucrose centrifugation (Smith & Skipper 1979)

นำส่วนที่ตกตะกอนจากข้อ 2.1 นำมาเติมสารละลาย 40 % sucrose (w/v) เขย่าตะกอนดินและสารละลายให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 2000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสในหลอด centrifuge มากรองบนแผ่นกรองและวางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereomicroscope) นำสปอร์ที่แยกได้วางบนแผ่นสไลด์ หยดด้วย polyvinyl-Lacto-Glycerol (PVLG) + Melzer's reagent แล้วปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ เก็บไว้เพื่อจำแนกชนิดต่อไป

2.3 การจัดจำแนกชนิดราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน ตรวจสอบลักษณะสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 20x 40x และ 100x สังเกตลักษณะ

ของสปอร์ เช่น สีของสปอร์ ผนังของสปอร์ และวัดขนาดของสปอร์ เป็นต้น จัดกลุ่มหรือจำแนกชนิดเบื้องต้นตามลักษณะของสปอร์ โดยเทียบกับฐานข้อมูลของ International Culture Collection of Arbuscular & Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM)

2.4 การจัดจำแนกชนิดราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรม

ตัวอย่างสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และรากพืชได้นำมาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ/หรือ บางส่วนของ 28S rDNA large subunit (LSU)

2.4.1 การสกัด DNA ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

ตัวอย่างของสปอร์จะสกัด DNA โดยใช้สปอร์ 1-5 สปอร์ ที่มีลักษณะทางสัณฐานใกล้เคียงกัน โดยการประยุกต์วิธีของ Zeze et al. (1998) คือล้างสปอร์ด้วยสารละลาย 0.2% (w/v) chloramines T, 0.02% (w/v) streptomycin sulphate และ 0.002% (v/v) tween 20 นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2-3 ครั้ง แล้วบดสปอร์ด้วย micro pestle เติม CTAB ปริมาตร 100 μ l (100 mM Tris-HCl (pH8), 1.2 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.2% CTAB, 0.2% β -mercaptoethanol) และ เอนไซม์ RNase A (10mg/ μ l) ปริมาตร 1 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 60 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนน้ำใสให้หมด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เติมสารละลาย 3M NaOAc (pH 8) ปริมาตร 10 μ l และสารละลายแช่เย็น isopropanol ปริมาตร 110 μ l แล้วกลับหลอดไปมานำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20°C นาน 15 นาที เพื่อตกตะกอน DNA จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้งแล้วล้างตะกอน DNA ที่ได้ด้วยสารละลายแช่เย็น 70% alcohol ปริมาตร 100 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้งแล้วปล่อยให้แห้ง DNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 50 μ l สารละลาย DNA ที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้

ตัวอย่างรากราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบโครงสร้างของ arbuscules และ/หรือ vesicles นำมาตัดให้มีความยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร จำนวน 4-5 ชิ้น ต่อตัวอย่าง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้สะอาดก่อนนำมาแช่ในสารละลาย 0.2% (w/v) chloramines T, 0.02% (w/v) streptomycin sulphate และ 0.002% (v/v) tween 20 นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2-3 ครั้ง นำมาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด Plant Genomic DNA Extraction Kit (Qiagen) สารละลาย DNA ที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้

2.4.2 การเพิ่มจำนวน DNA ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบริเวณ ITS และบางส่วนของ 28S rDNA (ITS-28S rDNA)

เนื่องจากการเพิ่มจำนวน DNA ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างนั้นได้ศึกษาทั้งสปอร์และรากปาล์มน้ำมัน โดยชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงในตารางที่ 6 ส่วนตำแหน่งของไพรเมอร์แสดงดังรูปที่ 3

ตารางที่ 6 ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')	เอกสารอ้างอิง
ALF01	GGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAG	Clapp et al. 2001
NDL22	TGGTCCGTGTTTCAAGACG	van Tuinen et al. 1998
SSUmAf1	TGGGTAATCTTTTGAAACTTYA	Krueger et al. 2010
SSUmAf2	TGGGTAATCTTGTGAAACTTCA	Krueger et al. 2010
SSUmAf	ผสม SSUmAf1 กับ SSUmAf2 ในความเข้มข้นที่เท่ากัน	Krueger et al. 2010
SSUmCf1	TCGCTCTTCAACGAGGAATC	Krueger et al. 2010
SSUmCf2	TATTGTTCTTCAACGAGGAATC	Krueger et al. 2010
SSUmCf3	TATTGCTCTTNAACGAGGAATC	Krueger et al. 2010
SSUmCf	ผสม SSUmCf1 ถึง SSUmCf3 ในความเข้มข้นที่เท่ากัน	Krueger et al. 2010
LSUmAr1	GCTCACACTCAAATCTATCAAA	Krueger et al. 2010
LSUmAr2	GCTCTAACTCAATTCTATCGAT	Krueger et al. 2010
LSUmAr3	TGCTCTTACTCAAATCTATCAAA	Krueger et al. 2010
LSUmAr4	GCTCTTACTCAAACCTATCGA	Krueger et al. 2010
LSUmAr	ผสม SSUmAf1 ถึง SSUmAf4 ในความเข้มข้นที่เท่ากัน	Krueger et al. 2010
LSUmBr1	DAACACTCGCATATATGTTAGA	Krueger et al. 2010
LSUmBr2	AACACTCGCACATATGTTAGA	Krueger et al. 2010
LSUmBr3	AACACTCGCATACATGTTAGA	Krueger et al. 2010
LSUmBr4	AAACACTCGCACATATGTTAGA	Krueger et al. 2010
LSUmBr5	AACACTCGCATATATGCTAGA	Krueger et al. 2010
LSUmBr	ผสม SSUmBf1 ถึง SSUmBf5 ในความเข้มข้นที่เท่ากัน	Krueger et al. 2010



รูปที่ 3. ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA บริเวณบางส่วนของ 18S rDNA, ITS และบางส่วนของ 28S rDNA (Krueger et al. 2010)

2.4.2.1 การเพิ่มจำนวน DNA บริเวณ D2 ของ 28S rDNA

สารละลาย DNA ของสปอร์และรากรากอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้นำมาเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR โดยเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรเท่ากับ 50 μ l ที่มีส่วนประกอบดังนี้ สารละลาย DNA เข้มข้นประมาณ 10-100 ng ไพรเมอร์ ALF01/NDL22 เข้มข้นอย่างละ 0.4 μ M สารละลาย dNTP เข้มข้น 200 μ M เอนไซม์ *Taq* Polymerase 1 U (Finnzymes, Finland) สารละลายบัฟเฟอร์ 1X แล้วเติมน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 μ l จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR (BioRad) โดยใช้โปรแกรมที่ปรับปรุงจากวิธีของ Clapp et al. (2001) ดังนี้

1) Initial denature	95°C	4 นาที
2) Denature	95°C	1 นาที
3) Annealing	50°C	1 นาที
4) Extension	72°C	3 นาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2) ถึง 4) จำนวน 5 รอบ		
5) Denature	95°C	1 นาที
6) Annealing	55°C	1 นาที
7) Extension	72°C	3 นาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5) ถึง 7) จำนวน 30 รอบ		
8) Final extension	72°C	10 นาที

PCR product ที่ได้นำมาตรวจหาด้วยวิธี gel eletrophoresis โดยใช้ 1% agarose (Invitrogen) ในสารละลาย 0.5X TBE (Invitrogen) ที่ 100 โวลต์ นาน 30 นาที เทียบกับ 100 bp DNA ladder marker (Fermentas) จากนั้นตรวจดูแถบ DNA ภายใต UV ด้วยเครื่อง Gel Doc (BioRad)

2.4.2.2 การเพิ่มจำนวน DNA บริเวณบางส่วนของ 18S rDNA, ITS และบางส่วนของ 28S rDNA

สารละลาย DNA ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากรากปาล์มน้ำมันนำมาเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี nested PCR ตามวิธีของ Krueger et al. (2010)

PCR รอบแรกเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรเท่ากับ 20 µl ที่มีส่วนประกอบดังนี้ สารละลาย DNA เข้มข้นประมาณ 10-100 ng ไพรเมอร์ SSUmAf/SSUmAr เข้มข้นอย่างละ 0.5 µM สารละลาย dNTP เข้มข้น 200 µM เอนไซม์ Phusion Polymerase 0.02 U (Finzyme, Finland) สารละลายบัฟเฟอร์ Phusion HF 1X แล้วเติมน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 µl จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR (BioRad) โดยใช้โปรแกรมดังนี้

1) Initial denature	99°C	5 นาที
2) Denature	99°C	10 วินาที
3) Annealing	60°C	30 วินาที
4) Extension	72°C	1 นาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2) ถึง 4) จำนวน 40 รอบ		
5) Final extension	72°C	10 นาที

PCR รอบที่สองเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรเท่ากับ 20 µl ที่มีส่วนประกอบดังนี้ PCR product จากการทำ PCR รอบแรกปริมาตร 1 µl ไพรเมอร์ SSUmCf / SSUmBr เข้มข้นอย่างละ 0.5 µM สารละลาย dNTP เข้มข้น 200 µl µM เอนไซม์ Phusion Polymerase 0.02 U (Finzyme, Finland) สารละลายบัฟเฟอร์ Phusion HF 1X แล้วเติมน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 µl จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR (BioRad) โดยใช้โปรแกรมดังนี้

- | | | | |
|--|------|----|--------|
| 1) Initial denature | 99°C | 5 | นาที |
| 2) Denature | 99°C | 10 | วินาที |
| 3) Annealing | 63°C | 30 | วินาที |
| 4) Extension | 72°C | 1 | นาที |
| ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2) ถึง 4) จำนวน 35 รอบ | | | |
| 5) Final extension | 72°C | 10 | นาที |

PCR product ที่ได้นำมาตรวจหาด้วยวิธี gel electrophoresis ตามที่อธิบายในหัวข้อ 2.4.2.1

2.4.3 การโคลนและการตรวจหารีคอมบิแนนท์โคลน (recombinant clone)

เนื่องจาก PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเอนไซม์ *Taq* Polymerase ในข้อ 2.4.2.1 จะได้ชิ้น DNA ที่มีปลายเหนียว (sticky ends) ในขณะที่ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเอนไซม์ *Phusion* Polymerase ในข้อ 2.4.2.2 จะได้ชิ้น DNA ที่มีปลายทู่ (blunt ends) ดังนั้นในการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ (ligation) จึงต้องใช้เวกเตอร์ที่ต่างกัน

2.4.3.1 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

PCR product ที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.4.2 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด PCR Purification kit (Favorgen) ตามคู่มือบริษัทผู้ผลิต ชิ้น DNA บริสุทธิ์ที่ได้นำมาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis (ข้อ 2.4.2.1)

2.4.3.2 การโคลนชิ้น DNA

ชิ้น DNA บริสุทธิ์ที่มีปลายเหนียวนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ PCR8/GW/TOPO (Invitrogen) ตามคู่มือบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำไป transformation เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) โดยรีคอมบิแนนท์โคลนได้ถูกคัดเลือกโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ Spectinomycin เข้มข้น 100 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

ในขณะที่ชิ้น DNA บริสุทธิ์ที่มีปลายทู่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pJET (Fermantas) ตามคู่มือบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำไป transformation เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* TOP10 (Invitrogen) โดยรีคอมบิแนนท์โคลนได้ถูกคัดเลือกโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ Ampicillin เข้มข้น 100 µl /ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

2.4.3.3 การสกัด DNA plasmid

โคโลนีของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้จำนวน 30-50 โคโลนี ต่อตัวอย่าง นำมาเลี้ยงใน LB broth ปริมาตร 2 ml ที่เติม Spectinomycin เข้มข้น 100 µg/ml (หรือ Ampicillin เข้มข้น 100 µl /ml) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C บน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 200 rpm นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเทใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 1 นาที เพื่อเก็บเซลล์แบคทีเรีย แล้วนำมาสกัด DNA plasmid ตามวิธีของ Sambrook et al. (1989)

2.4.4 การวิเคราะห์ และจัดกลุ่มรีคอมบิแนนท์โคลนด้วยเทคนิค single strand conformation polymorphism (SSCP)

เนื่องจากตัวอย่างของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากการสกัด DNA จากจำนวนสปอร์ที่มากกว่า 1 สปอร์ และจากรากปาล์มน้ำมันนั้น อาจจะมีจำนวนชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามากกว่า 1 ชนิด ดังนั้นรีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้จึงนำมาจัดกลุ่มก่อนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

DNA plasmid ที่สกัดได้จากข้อ 2.4.3.3 นำมาเพิ่มจำนวน DNA บริเวณ D2 ของ 28S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ALF01/NDL22 ตามที่อธิบายในหัวข้อ 2.4.2.1 จากนั้น PCR product ที่ได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 450 bp นำไปวิเคราะห์ผ่านเครื่อง SSCP (BioRad) (Kjoller & Rosendahl 2000) ตามคู่มือบริษัทผู้ผลิต โดยรูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากการวิเคราะห์นำมาจัดกลุ่มเพื่อคัดเลือกตัวแทนของรีคอมบิแนนท์โคลนไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

2.4.5 การหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์โคลน

ตัวอย่าง DNA plasmid ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่คัดเลือก ได้ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยผ่านบริษัท Ward Medic จำกัด ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นำมาตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม BioEdit (Hall, T.A., 1999) และนำไปเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST เพื่อการระบุชนิด

3. การเพิ่มปริมาณของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในดินปาล์มน้ำมัน โดยวิธี Trap culture

3.1 การเตรียมตัวอย่างพืชทดลอง

ตัวอย่างพืชที่ใช้คือ ข้าวฟ่าง โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างมาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10-15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง

3.2 การเตรียมวัสดุปลูก

นำดินเชื้อ (soil inoculum) (ดินเชื้อ หมายถึง ดินที่เก็บมาจากรอบรากปาล์มน้ำมัน ที่ระดับความลึก 15 เซนติเมตร) จากแหล่งต่างๆ ทั้ง 5 จังหวัด มาผสมกับทราย (ทรายล้างน้ำให้สะอาด และผึ่งแดดให้แห้งก่อนอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนึ่งฆ่าเชื้อทั้งหมด 2 ครั้ง แต่ครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง) ในอัตราส่วน 1:1 ตามลำดับ ใส่ลงในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 17 เซนติเมตร สูง 15 เซนติเมตร ที่ใช้ทำความสะอาดด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์แล้ว ใส่เมล็ดข้าวฟ่างในข้อ 3.1 ประมาณ 20-30 เมล็ดลงในแต่ละกระถาง จำนวน 10 กระถาง รดน้ำทุกวันให้ชุ่มพอประมาณ

3.3 การตรวจสอบสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การตรวจหาและนับจำนวนสปอร์ทั้งหมดในดิน เมื่อพืชอายุ 3 เดือน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินของแต่ละแหล่งที่มาจากทุกกระถางมาผสมคลุกเคล้าเป็น composite sample แล้วสุ่มตัวอย่างดินเพื่อตรวจสอบสปอร์ราตามวิธีในข้อ 2.1-2.3 ตรวจสอบลักษณะสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 20x 40x และ 100x สังเกตลักษณะของสปอร์ เช่น สีของสปอร์ ผนังของสปอร์ และขนาดของ

สปอร์ และจัดกลุ่มเบื้องต้นตามลักษณะของสปอร์ ตัวอย่างรากพืชย้อมสีตามวิธีของ Phillipe & Hayman (1970)

ตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในเซลล์รากพืช โดยนำรากพืชที่ย้อมสีแล้วมาตัดให้ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เรียงบนสไลด์ สไลด์ละ 10 ชิ้น นับปริมาณชิ้นรากที่มีเชื้อราไมคอร์ไรซา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับจำนวนรากทั้งหมด

4. ทดสอบการสร้างไมคอร์ไรซา และเปรียบเทียบอัตราการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อรา และชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อรา

4.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (inoculum) โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างมาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10-15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ใส่เมล็ดข้าวฟ่างใน ลงในกระบอก รดน้ำทุกวันให้ชุ่มพอประมาณ เมื่อเมล็ดข้าวฟ่างงอก และมีใบแท้ปรากฏอย่างน้อย 2 คู่ นำราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีการสร้างสปอร์จำนวนมาก จากการทำ trap culture ในข้อ 3 มาเพิ่มจำนวนเพื่อทำหัวเชื้อ ด้วยการเพาะเลี้ยงกับข้าวฟ่างโดยปลูกสปอร์ลงบนรากข้าวฟ่าง จำนวน 1 สปอร์ต่อต้น (single spore) นำต้นข้าวฟ่างที่ได้รับการปลูกสปอร์ไว้ในสภาพเพาะชำแบบหลุมๆ ทรงสูง ขนาด 9×14×7 นิ้ว ชนิด 24 หลุม ที่ฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวของสภาพเพาะ โดยล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วใช้เอทธานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ดให้ทั่วด้านในของสภาพเพาะแล้ว ใช้วัสดุปลูก คือ ดินทราย และหน้าดิน ในอัตราส่วน 1: 1 (ส่วนผสมทั้งสอง นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง โดยทิ้งช่วงเวลาในการนึ่งครั้งที่ 2 ห่างจากครั้งแรก นาน 24 ชั่วโมง) ดูแลรักษาต้นข้าวฟ่างด้วยการรดน้ำวันละครั้งทุกวัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน เมื่อพืชอายุได้ 3 เดือน ตัดส่วนเหนือดินทิ้ง ตรวจหาและนับจำนวนสปอร์ทั้งหมดในดิน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินจากทุกหลุมมาผสมคลุกเคล้าเป็น composite sample แล้วสุ่มตัวอย่างดินเพื่อตรวจหาสปอร์ราตามวิธีในข้อ 2.1-2.3 ตรวจสอบลักษณะสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 20x 40x และ 100x สังเกตลักษณะของสปอร์ เช่น สีของสปอร์ ผนังของสปอร์ และขนาดของสปอร์ และจัดกลุ่มเบื้องต้นตามลักษณะของสปอร์ ตัวอย่างรากพืชย้อมสีตามวิธีของ Phillipe & Hayman (1970) ตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในเซลล์รากพืช โดยนำรากพืชที่ย้อมสีแล้วมาตัดให้ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เรียงบนสไลด์ สไลด์ละ 10 ชิ้น นับปริมาณชิ้นรากที่มีเชื้อราไมคอร์ไรซา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับจำนวนรากทั้งหมด

ดินและรากที่เหลือนำไปฝังให้แห้ง เก็บไว้เป็นดินหัวเชื้อ เพื่อเพาะให้กับกล้าปาล์มน้ำมันต่อไป

4.2 การเตรียมเมล็ดปาล์มน้ำมัน ใช้เมล็ดปาล์มน้ำมันที่อกแล้วจากศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี สายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 ราคาจำหน่าย 12 บาท/เมล็ด

4.3 การเตรียมวัสดุที่จะใช้ในการเพาะกล้าปาล์มน้ำมัน

4.3.1 การเตรียมถุงเพาะชำ ใช้ถุงเพาะชำขนาด 4 x 6 นิ้ว ฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวของถุงเพาะชำ โดยล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วแช่ในเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

4.3.2 การเตรียมวัสดุที่ใช้เพาะ นำทรายผสมหน้าดิน ด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร (pH ของวัสดุที่ใช้เพาะเท่ากับ 6.0) ซึ่งได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่วโมง โดยนึ่งฆ่าเชื้อทั้งหมด 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง ผสมคลุกเคล้ากับดินหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 ในอัตราดินหัวเชื้อ 10 กรัมต่อต้น (Schultz 2001) บรรจุลงในถุงเพาะชำที่ได้เตรียมไว้ในข้อ 4.3.1 เตรียมชุดการทดลองควบคุม โดยไม่ใส่หัวเชื้อ นำเมล็ดไม้ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2.2 ปลูกลงในถุงเพาะชำ โดยใส่หลุมละ 1 เมล็ด ใช้แผนการทดลองแบบ completely randomized design แต่ละชุดการทดลองทำ 20 ซ้ำ

4.4 การดูแลรักษากล้าไม้ รดน้ำกล้าปาล์มน้ำมันในถุงเพาะชำทั้งหมด ให้ชุ่มพอประมาณ อย่าให้แฉะเกินไป ในตอนเช้า และเย็นอย่างสม่ำเสมอ จนกล้าอายุครบ 12 เดือน ซึ่งเสร็จสิ้นการทดลอง

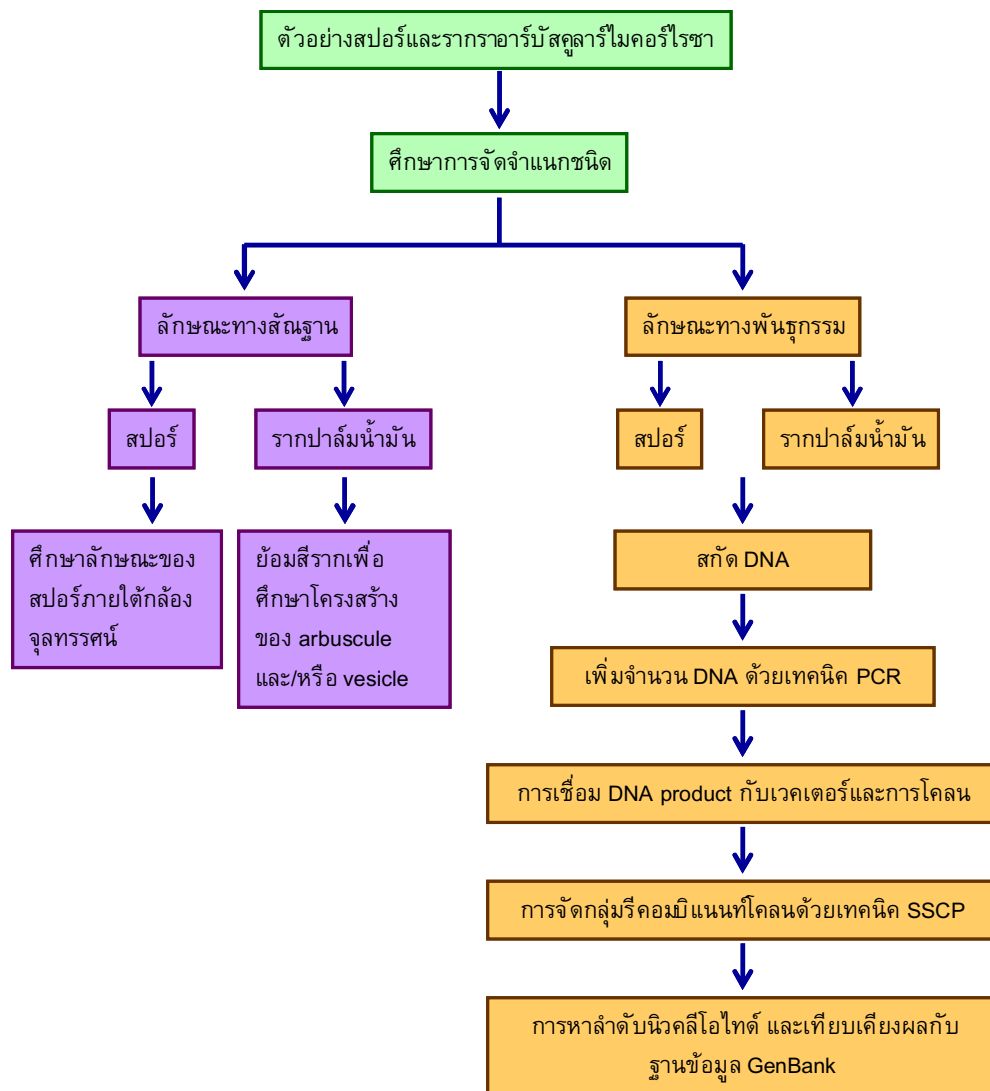
4.5 การเก็บข้อมูล เปรียบเทียบหาการเจริญเติบโตของกล้าปาล์มน้ำมัน ที่มีการใส่ดินหัวเชื้อ และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ดินหัวเชื้อ เมื่ออายุ 12 เดือน สุ่มถอนกล้าปาล์มน้ำมัน จากถุงเพาะชำ จำนวน 5 ต้น โดยวัด

4.5.1 ความสูงของกล้าปาล์มน้ำมัน และเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้น เมื่อกล้าอายุครบ 8 เดือน

4.5.2 หามวลชีวภาพในแต่ละส่วนของกล้าปาล์มน้ำมัน แยกเป็นส่วนเหนือดิน และรากของแต่ละต้น จากนั้นนำทั้ง 2 ส่วน ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งเพื่อหามวลชีวภาพส่วนต่าง ๆ ของกล้าปาล์มน้ำมันแต่ละต้นต่อไป

4.5.3 หาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (percent Infection) ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาของกล้าปาล์มน้ำมัน โดยตัดรากออกเป็นชิ้น ให้มีความยาวประมาณชิ้นละ 1-1.5 เซนติเมตร ย้อมสีรากตามวิธีของ Phillips และ Hayman (1970) สุ่มชิ้นส่วนของรากที่ย้อมสีแล้วมา 50 ชิ้น วางบนแผ่นสไลด์ ครึ่งละ 5 ชิ้น นับจำนวนชิ้นส่วนของรากที่พบว่ามีเชื้อราไมคอร์ไรซาของแต่ละชุดการทดลองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ

4.5.4 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตของทางความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้น มวลชีวภาพส่วนต่าง ๆ ของกล้าปาล์มน้ำมัน และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ เมื่ออายุครบ 12 เดือน โดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) หากมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan 's new multiple-range test (DMRT)



รูปที่ 4. แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาการจัดจำแนกชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในปาล์มน้ำมัน

1. การสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมัน

ผลการวิเคราะห์สมบัติของดินตัวอย่างจาก 5 จังหวัด พบว่ามีเนื้อดินแตกต่างกัน เป็นดินกรรณแรงถึงกรดเล็กน้อย มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่าง 4.3-5.8 โดยดินตัวอย่างที่มี pH ต่ำสุดคือดินตัวอย่างจากจังหวัดตราด และ pH สูงสุดคือดินตัวอย่างจากจังหวัดฉะเชิงเทรา ดินมีปริมาณอินทรีย์วัตถุตั้งแต่ต่ำจนถึงสูง (1%-5.3%) มีปริมาณธาตุอาหารในดิน โดยเฉพาะฟอสฟอรัสอยู่สูงถึงสูงมาก (42 ppm-320 ppm) สมบัติอื่นๆของดินตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์สมบัติดินตัวอย่างจากแหล่งพื้นที่ปลูกปาล์มต่างๆ

แหล่งดิน	pH	Soil texture			texture	Organic matter (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)
		%Sand	%Silt	%Clay							
เชียงราย	5.0	53	25	22	SCL	3.3M	0.16	57VH	260VH	1000H	80M
น่าน	5.4	31	41	28	CL	3.5M	0.26	656VH	300VH	2160H	300H
ฉะเชิงเทรา	5.8	75	17	8	SL	1.0L	0.06	79VH	70L	480M	70M
ตราด	4.3	43	21	36	CL	5.3H	0.23	449VH	120H	520M	100H
หนองคาย	4.4	55	29	16	SL	2.2M	0.12	42H	320VH	720H	110H

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษข้างหลังตัวเลขเป็นค่ามาตรฐานการวิเคราะห์ VH=very high, H=high, M=medium, L=low

2. การคัดแยกและการจัดจำแนกชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างที่ได้จากธรรมชาติ

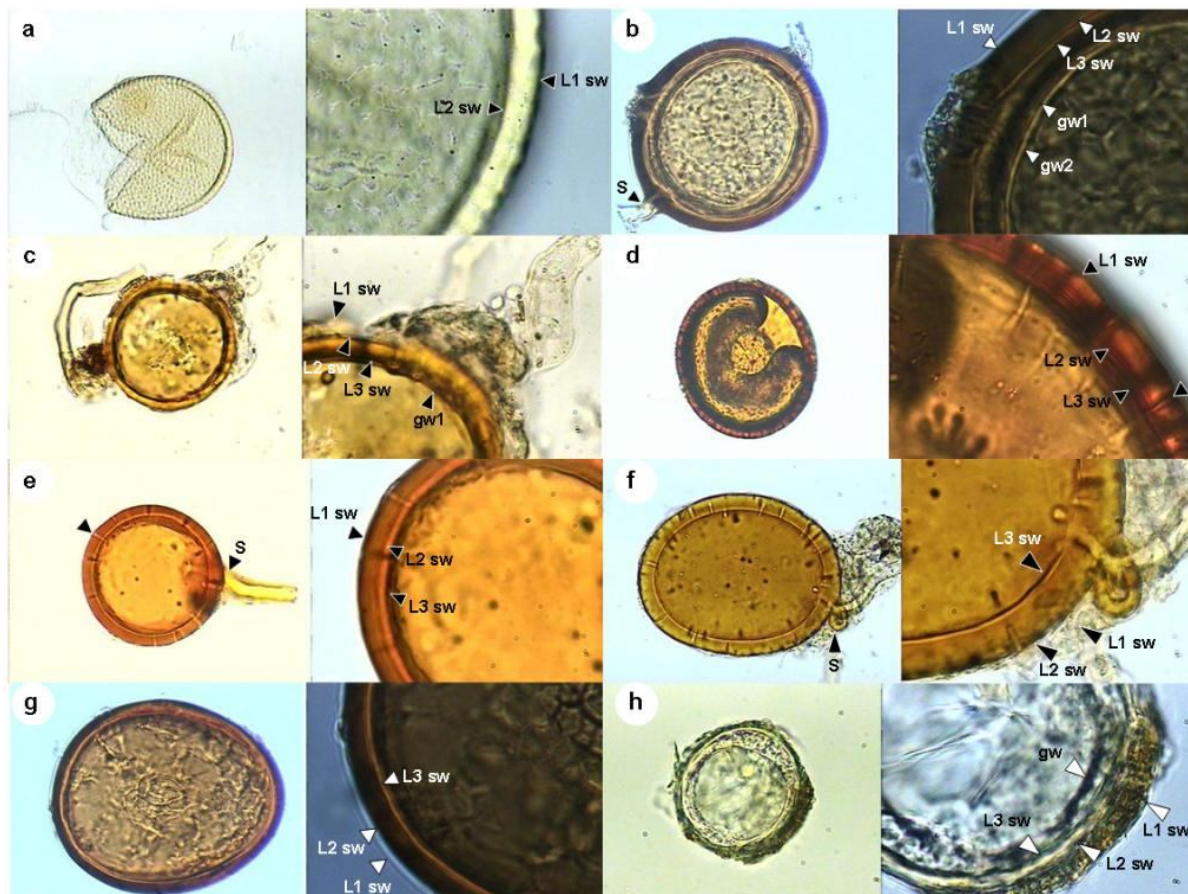
ผลการคัดแยก และจำแนกชนิดสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมันจากพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันใน 5 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย น่าน หนองคาย ฉะเชิงเทรา และ ตราด โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน เช่น ขนาด สี รูปร่าง จำนวนชั้นของผนังสปอร์ เป็นต้น ผลแสดงในตารางที่ 8-12 และ รูปที่ 5-9 สปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ที่พบส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Glomus*, *Acaulospora* และ *Scutellospora* ตามลำดับ ในขณะที่ *Gigaspora* พบเฉพาะดินรอบรากปาล์มน้ำมันที่ได้จาก จ.ฉะเชิงเทรา เท่านั้น เมื่อศึกษาความหลากหลายของสปอร์พบสูงสุดในดินจาก จ.น่าน (13 ชนิด) จ.ฉะเชิงเทรา (12 ชนิด) จ.ตราด (10 ชนิด) จ.เชียงราย (8 ชนิด) และ จ.หนองคาย (8 ชนิด) โดยมีจำนวนสปอร์รวมทั้งหมดต่อดิน 100 กรัม เท่ากับ 210, 231, 236, 220 และ 251 สปอร์ ตามลำดับ นอกจากนี้พบสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจำนวน 8 ชนิด ที่ยังไม่สามารถระบุสกุลได้เนื่องจากมีข้อมูลทางสัณฐานที่จำกัด หรือสปอร์ที่คัดแยกได้มีสภาพไม่สมบูรณ์ เป็น

สปอร์แก่ หรือมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ดินอื่น นอกจากสปอร์ราที่ตรวจพบ และคัดแยกได้จากดินแล้ว ยังตรวจพบโครงสร้างของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากปาล์มน้ำมันด้วย โครงสร้างที่ตรวจพบ ได้แก่ สปอร์เวสิเคิล (vesicle) เส้นใยรอบราก (external hyphae) และเส้นใยขดเป็นวงในราก (hyphal coil) พบโครงสร้างคล้ายต้นไม้หรืออาร์บัสคูล (arbuscule) แต่ไม่ชัดเจนนัก (รูปที่ 10)

การจัดจำแนกชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยอาศัยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานเพียงอย่างเดียวพบว่าไม่สามารถระบุชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะในรากปาล์มน้ำมัน ดังนั้นจึงนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาช่วยในการระบุชนิดโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อการระบุชนิดที่ถูกต้อง ทั้งยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบรากปาล์มน้ำมันที่เติมหัวเชื้อของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอีกด้วย

ตารางที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมัน

พื้นที่	สีของสปอร์		ขนาดเส้นผ่าน		รูปร่างของสปอร์	ลักษณะทางสัณฐานอื่นๆ	ชนิด
	น้ำ	PVLG	Melzer	ศูนย์กลางของสปอร์ (µm)			
เขียงราย (CR)							
CRns1	pale yellow	pale yellow	pale yellow	120	Globose to subglobose	Pitted membrane; 2 layers of spore wall [L1 และ L2 (5-7.5 µm)]	<i>Acaulospora</i> sp.1
CRns2	orange brown	orange brown	dark orange brown	125	Globose to subglobose	Subtending hyphae; 3 layers of spore wall (L1, L2 และ L3); 2 layers of germination wall (gw1 และ gw2)	<i>Acaulospora</i> sp.2
CRns3	brown	Brown	Brown	115-125	Globose to subglobose	Subtending hyphae; 3 layers of spore wall [L1(sloughing layer), L2 และ L3(laminae)]	<i>Acaulospora</i> sp.3
CRns4	red brown	red brown	red brown	155	Subglobose	3 layers of spore wall [L1, L2(laminae) และ L3]	<i>Glomus</i> sp.1
CRns5	red brown	red brown	red brown	100-125	Globose to subglobose	Subtending hyphae; 3 layers of spore wall [L1, L2 และ L3(laminae)]; pores on spore wall	<i>Glomus</i> sp.2
CRns6	brown	Brown	Brown	125	Subglobose	Subtending hyphae; 3 layers of spore wall [L1(mucilaginous layer), L2(thicken up to 5 µm) และ L3(laminae)]; pores on spore wall	<i>Glomus</i> sp.3
CRns7	dark brown	dark brown	dark brown	150	Subglobose	3 layers of spore wall [L1, L2 และ L3(laminae)]	Unidentified species1
CRns8	colourless	Colourless	colourless	70	Subglobose	Small spore; 3 layers of spore wall [L1(mucilaginous layer), L2 และ L3]	Unidentified species2



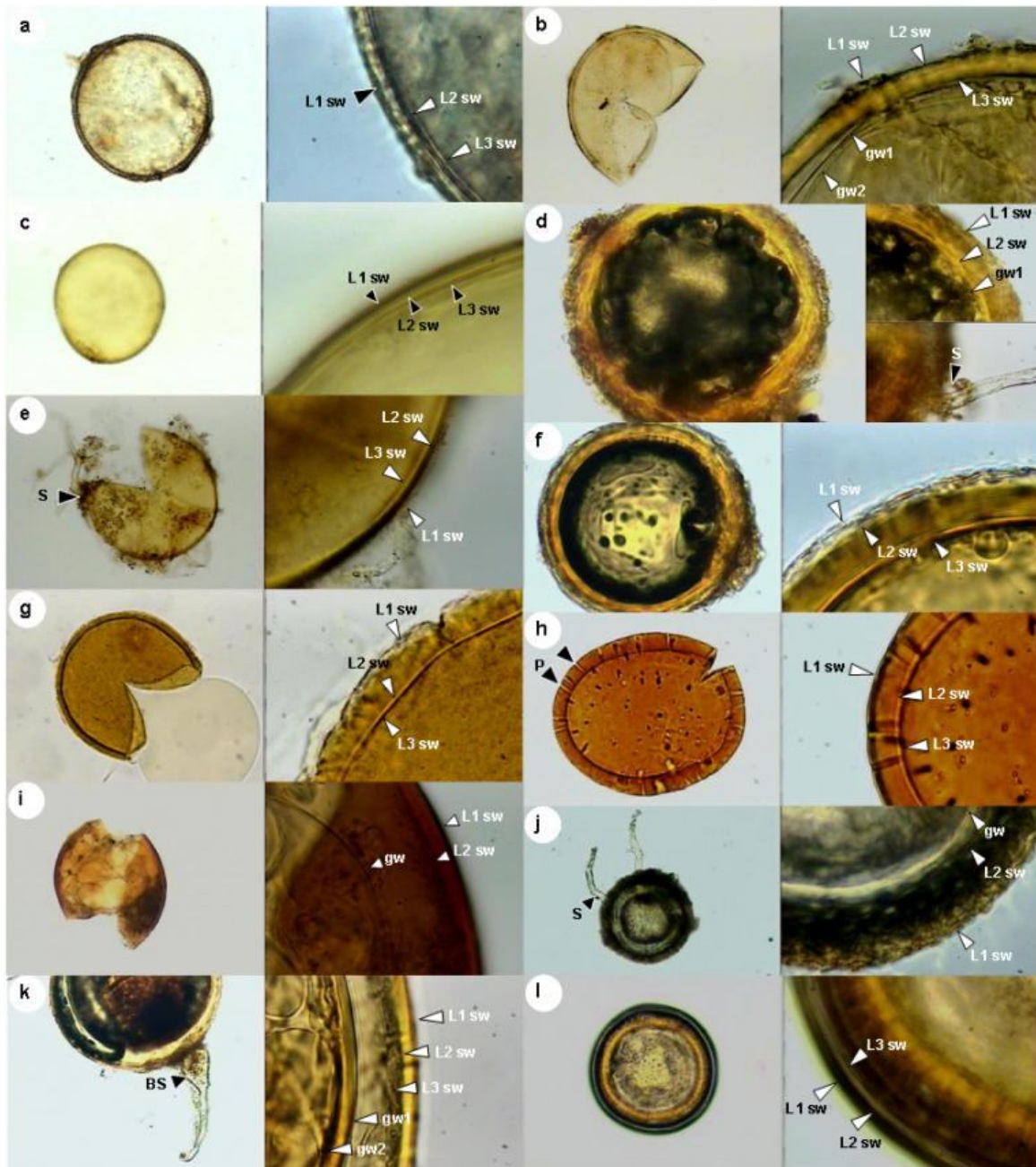
รูปที่ 5. ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ.เชียงใหม่ (a) *Acaulospora* sp.CRns1, (b) *Acaulospora* sp.CRns2, (c) *Acaulospora* sp.CRns3, (d) *Glomus* sp.CRns4, (e) *Glomus* sp.CRns5, (f) *Glomus* sp.CRns6, (g) Unidentified species1 และ (h) Unidentified species2; L1 sw = layer 1 of spore wall, L2 sw = layer 2 of spore wall, L3 sw = layer 3 of spore wall, gw1 = germination wall 1, gw2 = germination wall 2, S = subtending hyphae

ตารางที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ.ฉะเชิงเทรา

พื้นที่	สีของสปอร์		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ (µm)	รูปร่างของสปอร์	ลักษณะทางสัณฐานอื่นๆ	ชนิด
	น้ำ	PVLG				
ฉะเชิงเทรา (CS)						
CSns1	pale yellow	pale yellow	100-165	Globose to subglobose	Pitted membrane; 3 layers of spore wall (L1, L2 และ L3)	<i>Acaulospora</i> sp.1
CSns2	yellow brown	yellow brown	150-165	Globose to subglobose	Pitted membrane; 3 layers of spore wall [L1 (sloughing layer), L2 และ L3 (laminae)]; 2 layers of germination wall (gw1 และ gw2)	<i>Acaulospora</i> sp.2
CSns3	pale yellow	pale yellow	250	Subglobose	3 layers of spore wall [L1 (smooth layer), L2 (laminae) และ L3 (laminae)]	<i>Gigaspora</i> sp.1
CSns4	dark brown	dark brown	115-125	Globose to subglobose	Subtending hypha; 2 layers of spore wall [L1 (mucilagierous layer) และ L2 (laminae)]	<i>Glomus</i> sp.1
CSns5	brown	Brown	100-165	Globose to subglobose	Subtending hyphae; 3 layers of spore wall [L1 (sloughing layer), L2 (laminae) และ L3 (laminae)]	<i>Glomus</i> sp.2
CSns6	dark brown	dark brown	100-140	Globose to subglobose	3 layers of spore wall (L1 (sloughing layer), L2 และ L3)	<i>Glomus</i> sp.3
CSns7	orange brown	orange brown	125-165	Globose to subglobose	3 layers of spore wall [L1 (sloughing layer), L2 (laminae) และ L3]	<i>Glomus</i> sp.4
CSns8	orange brown	orange brown	100-125	Subglobose	3 layers of spore wall [L1 (thicken up to 7 µm), L2 และ L3]; pores on spore wall	<i>Glomus</i> sp.5

ตารางที่ 9 (ต่อ)

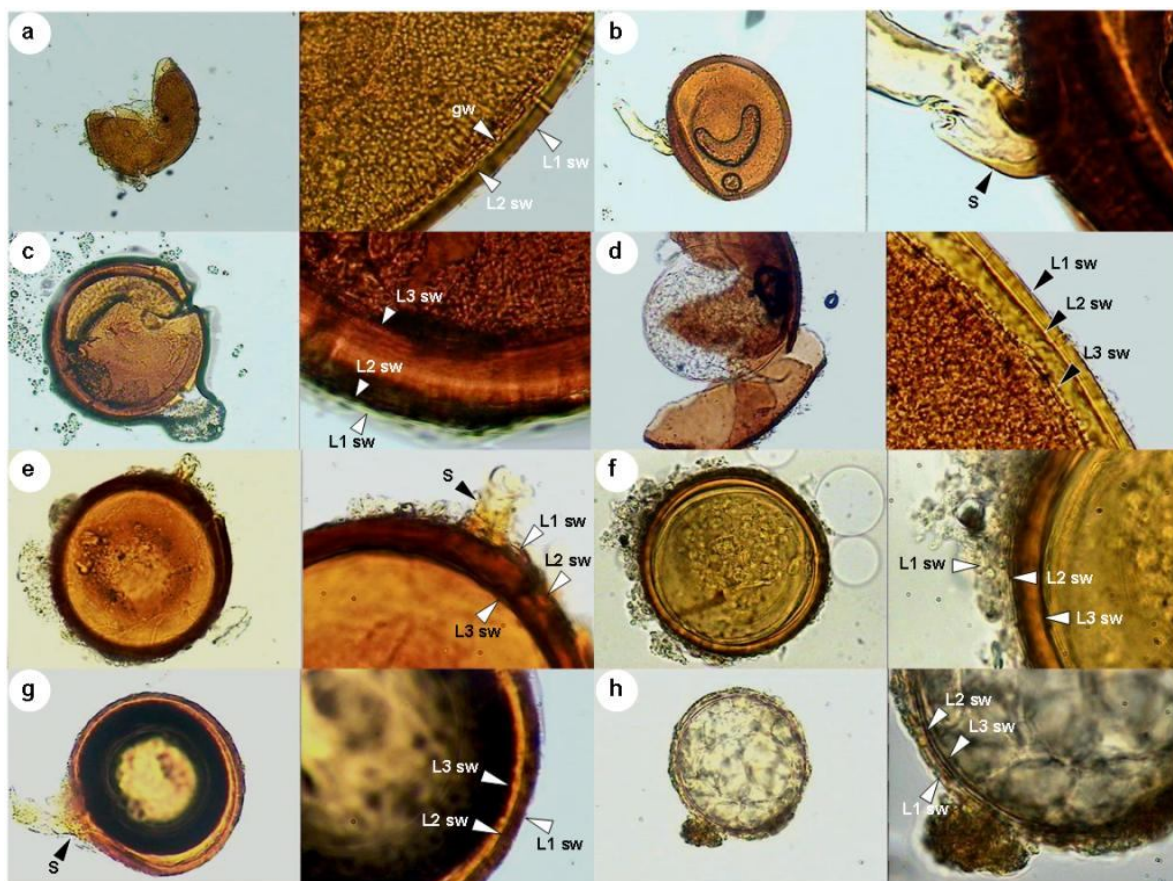
พื้นที่	สีของสปอร์		ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางของ สปอร์ (µm)	รูปร่างของ สปอร์	ลักษณะทางสัณฐานอื่นๆ	ชนิด
	น้ำ	PVLG				
ฉะเชิงเทรา (CS)						
CSns9	dark brown	dark brown	140	Subglobose	2 layers of spore wall [L1 (smooth layer) และ L2]	Glomus sp.6
CSns10	dark brown	dark brown	115	Globose to subglobose	Subtending hyphae; 2 layers of spore wall [L1 (smooth layer) และ L2]	Glomus sp.7
CSns11	dark brown	dark brown	210	Globose to subglobose	Bulbous suspensor; 3 layers of spore wall (L1, L2 และ L3); 2 layers of germination wall (gw1 และ gw2)	Scutellospora sp.1
CSns12	black	Black	150	Globose	3 layers of spore wall [L1 (smooth layer), L2 และ L3]	Unidentified species



รูปที่ 6. ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลารีไมคอร์ไรซาบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ. ฉะเชิงเทรา (a) *Acaulospora* sp.CSns1, (b) *Acaulospora* sp.CSns2, (c) *Acaulospora* sp.CSns3, (d) *Gigaspora* sp.CSns4, (e) *Glomus* sp.CSns5, (f) *Glomus* sp.CSns6, (g) *Glomus* sp.CSns7, (h) *Glomus* sp.CSns8, (i) *Glomus* sp.CSns9, (j) *Glomus* sp.CSns10, (k) *Scutellospora* sp.CSns11, (l) Unidentified species1; L1 sw = layer 1 of spore wall, L2 sw = layer 2 of spore wall, L3 sw = layer 3 of spore wall, gw1 = germinal wall 1, gw2 = germination wall 2, S = subtending hyphae, BP = Bulbous suspensor, P = pore

ตารางที่ 10 ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ.หนองคาย

พื้นที่	สีของสปอร์		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ (µm)	รูปร่างของสปอร์	ลักษณะทางสัณฐานอื่นๆ	ชนิด
	น้ำ	PVLG				
หนองคาย (NK)						
NKns1	dark brown	dark brown	240	Globose to subglobose	Pitted membrane; 2 layers of spore wall [L1 (smooth and rigid layer) และ L2]	<i>Acaulospora</i> sp.1
NKns2	brown	Brown	135	Globose to subglobose	Subtending hyphae; 3 layers of spore wall (L1, L2 และ L3)	<i>Glomus</i> sp.1
NKns3	orange brown	orange brown	185	Globose	3 layers of spore wall (L1, L2 และ L3)	<i>Glomus</i> sp.2
NKns4	red brown	red brown	195	Subglobose	Subtending hyphae; 3 layers of spore wall (L1, L2 และ L3)	<i>Glomus</i> sp.3
NKns5	orange brown	orange brown	75-100	Globose	Subtending hyphae; 3 layers of spore wall [L1 (sloughing layer), L2 และ L3]	<i>Glomus</i> sp.4
NKns6	orange yellow	orange yellow	125-135	Globose	3 layers of spore wall [L1 (mucilagierous layer), L2 และ L3]	<i>Glomus</i> sp.5
NKns7	dark brown	dark brown	140	Subglobose	Subtending hyphae; 3 layers of spore wall (L1, L2 และ L3)	<i>Scutellospora</i> sp.1
NKns8	Colourless	Colourless	80	Subglobose	3 layers of spore wall [L1 (mucilagierous layer), L2 (laminae) และ L3 (laminae)]	Unidentified species1



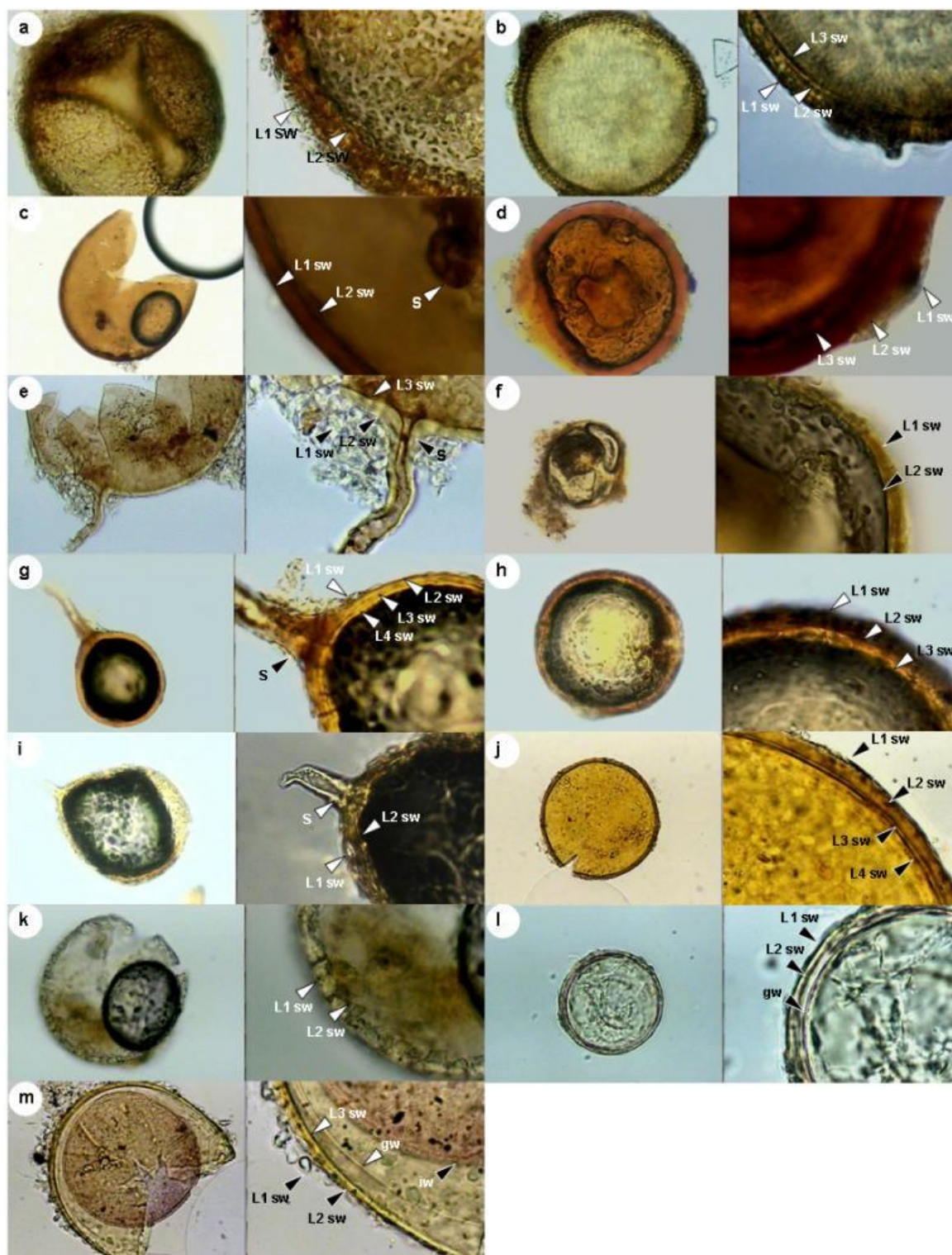
รูปที่ 7. ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ.หนองคาย (a) *Acaulospora* sp.NKns1, (b) *Glomus* sp.NKns2, (c) *Glomus* sp.NKns3, (d) *Glomus* sp.NKns4, (e) *Glomus* sp.NKns5, (f) *Glomus* sp.NKns6, (g) *Scutellospora* sp.NKns7, (h) Unidentified species1; L1 sw = layer 1 of spore wall, L2 sw = layer 2 of spore wall, L3 sw = layer 3 of spore wall, gw1 = germinal wall 1, gw2 = germination wall 2, S = subtending hyphae

ตารางที่ 11 ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ.น่าน

พื้นที่	สีของสปอร์		ขนาดเส้นผ่าน		รูปร่างของสปอร์	ลักษณะทางสัณฐานอื่นๆ	ชนิด
	น้ำ	PVLG	Melzer	ศูนย์กลางของสปอร์ (µm)			
น่าน (NN)							
NNns1	Brown	Brown	Brown	135	Globose to subglobose	Pitted membrane; 2 layers of spore wall [L1 (sloughing layer) และ L2]	<i>Acaulospora</i> sp.1
NNns2	Yellow	Yellow	Yellow	165	Globose to subglobose	Pitted membrane; 3 layers of spore wall [L1, L2 (liminae) และ L3]	<i>Acaulospora</i> sp.2
NNns3	Brown	Brown	Brown	200	Subglobose	2 layers of spore wall (L1 และ L2)	<i>Glomus</i> sp.1
NNns4	orange brown	orange brown	orange brown	125	Subglobose	3 layers of spore wall [L1 (sloughing layer), L2 และ L3]	<i>Glomus</i> sp.2
NNns5	Brown	Brown	Brown	150	Globose to subglobose	Subtending hyphae; 3 layers of spore wall [L1 (mucilagerious layer), L2 และ L3]	<i>Glomus</i> sp.3
NNns6	Brown	Brown	Brown	130-135	Subglobose	2 layers of spore wall [L1 (mucilagerious layer) และ L2]	<i>Glomus</i> sp.4
NNns7	orange brown	orange brown	orange brown	60	Globose to subglobose	Small spore; Subtending hyphae; 4 layers of spore wall [L1 (sloughing layer), L2 (laminae), L3 (laminae) และ L4]	<i>Glomus</i> sp.5
NNns8	dark brown	dark brown	dark brown	140	Globose to subglobose	3 layers of spore wall (L1, L2 และ L3)	<i>Glomus</i> sp.6
NNns9	yellow brown	yellow brown	yellow brown	85	Subglobose	Subtending hyphae; 2 layers of spore wall [L1 (sloughing layer) และ L2]	<i>Glomus</i> sp.7

ตารางที่ 11 (ต่อ)

พื้นที่	สีของสปอร์		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ (µm)	รูปร่างของสปอร์	ลักษณะทางสัณฐานอื่นๆ	ชนิด
	น้ำ	PVLG				
น่าน (NN)						
NNns10	Yellow	Yellow	125-165	Globose	4 layers of spore wall [L1 (sloughing layer), L2, L3 (laminae) และ L4]	Glomus sp.8
NNns11	pale yellow	pale yellow	115	Subglobose	Ornamentation layer; 2 layers of spore wall (L1 และ L2)	Unidentified sp.1
NNns12	Colourless	Colourless	65-75	Globose	2 layers of spore wall (L1 และ L2); germinal layer	Unidentified sp.2
NNns13	Brown	Brown	125-150	Globose to subglobose	3 layers of spore wall [L1 (mucilagierous layer), L2 และ L3]; germinal layer; inner wall	Unidentified sp.3



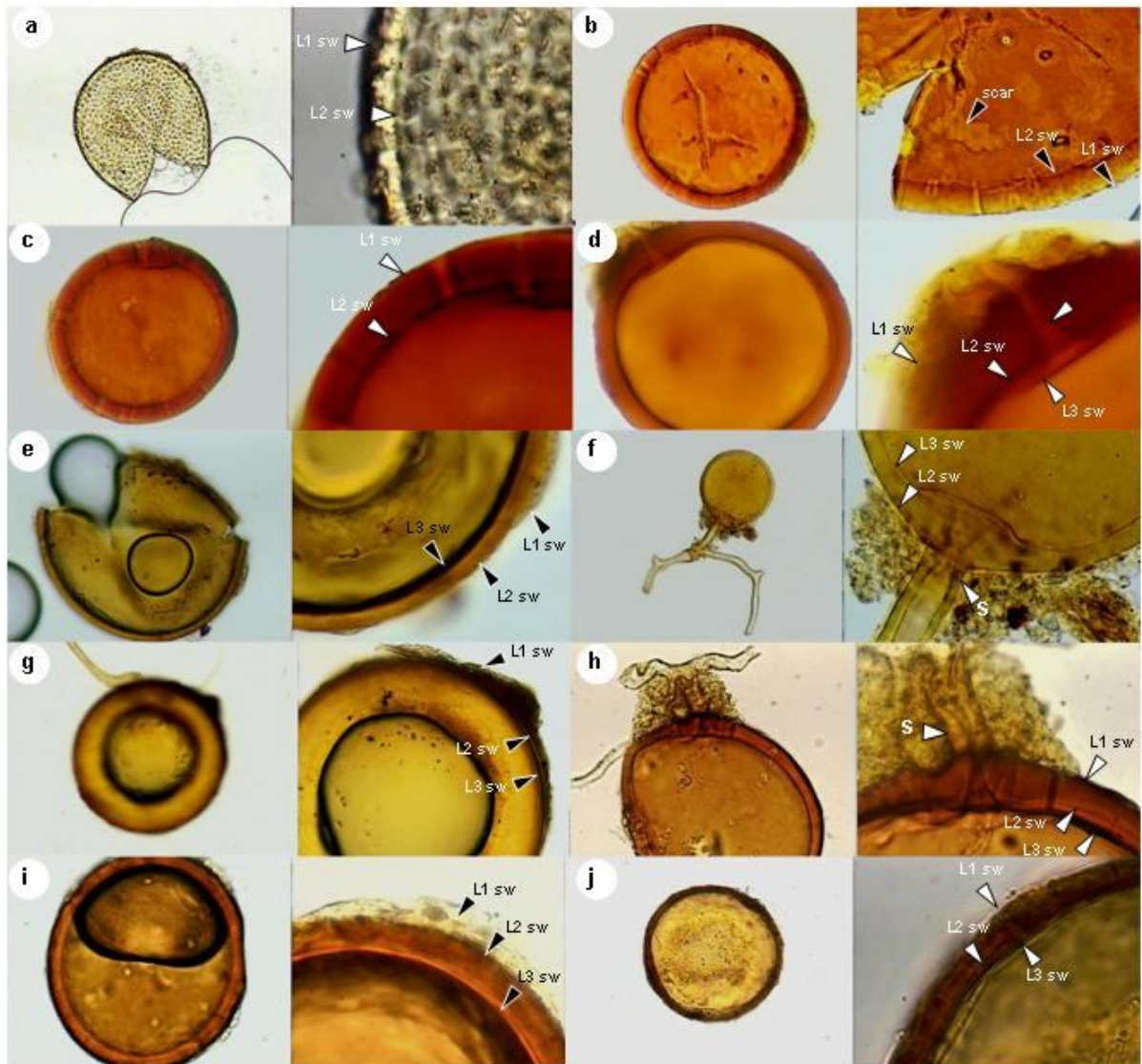
รูปที่ 8. ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ.น่าน (a) *Acaulospora* sp.NNns1, (b) *Acaulospora* sp.NNns2, (c) *Glomus* sp.NNns3, (d) *Glomus* sp.NNns4, (e) *Glomus* sp.NNns5, (f) *Glomus* sp. NNns6, (g) *Glomus* sp.NNns7, (h) *Glomus* sp.NNns8, (i) *Glomus* sp.NNns9, (j) *Glomus* sp.NNns10, (k) Unidentified sp. NNns11, (l) Unidentified sp. NNns12, (m) Unidentified sp. NNns13; L1 sw = layer 1 of spore wall, L2 sw = layer 2 of spore wall, L3 sw = layer 3 of spore wall, gw = germinal wall, S = subtending hyphae

ตารางที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ.ตราด

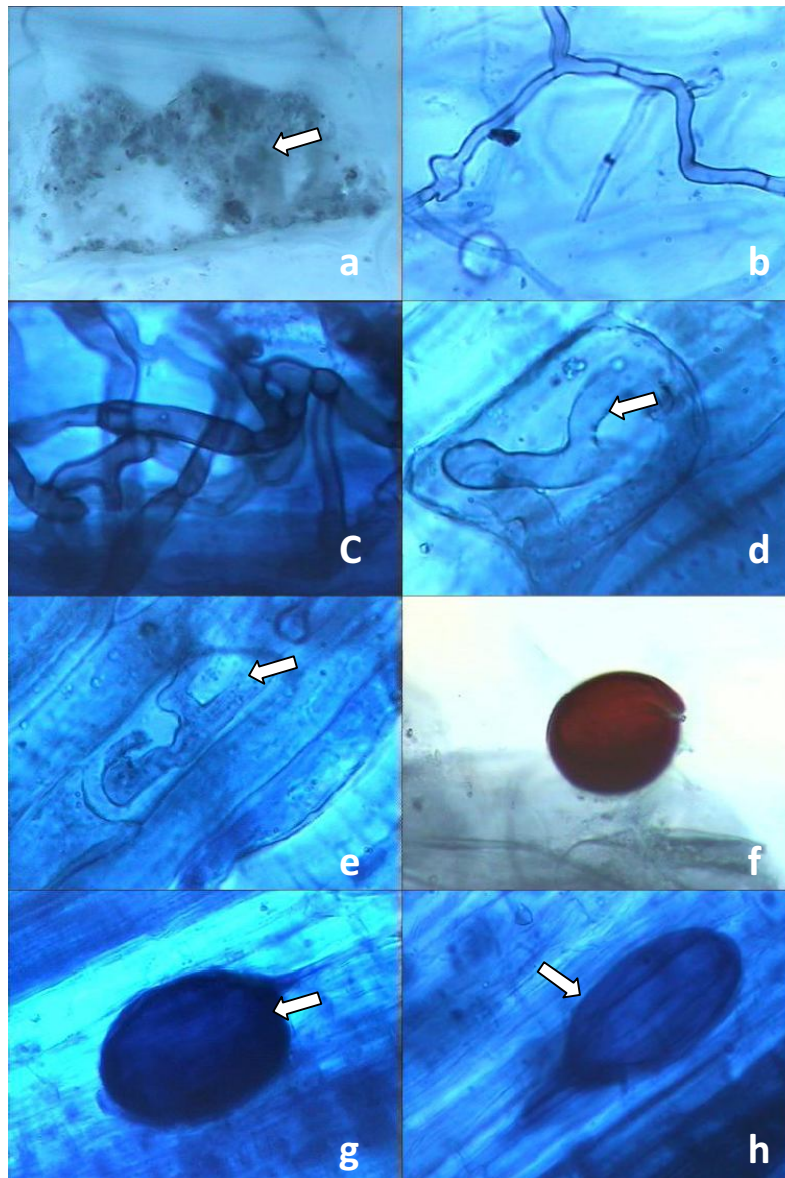
พื้นที่	สีของสปอร์		PVLG	Melzer	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ (µm)		รูปร่างของสปอร์	ลักษณะทางสัณฐานอื่นๆ	ชนิด
	น้ำ								
ตราด (TR)									
TRns1	yellow		Yellow	Yellow	165		Globose to subglobose	Pitted membrane; 2 layers of spore wall (L1 และ L2)	<i>Acaulospora</i> sp.1
TRns2	orange brown		orange brown	orange brown	100-125		Globose	2 layers of spore wall (L1 และ L2)	<i>Glomus</i> sp.1
TRns3	red brown		red brown	red brown	100-125		Globose to subglobose	2 layers of spore wall (L1 และ L2)	<i>Glomus</i> sp.2
TRns4	orange brown		orange brown	orange brown	155-190		Globose to subglobose	Germination tube; 3 layers of spore wall (L1, L2 และ L3)	<i>Glomus</i> sp.3
TRns5	yellow brown		yellow brown	yellow brown	175		Subglobose	3 layers of spore wall (L1, L2 และ L3)	<i>Glomus</i> sp.4
TRns6	yellow brown		yellow brown	yellow brown	75		Globose to subglobose	Subtending hypha; 3 layers of spore wall [L1 (mucilagierous layer), L2 และ L3 (laminae)]	<i>Glomus</i> sp.5
TRns7	yellow brown		yellow brown	yellow brown	350		Globose to subglobose	Subtending hypha; 3 layers of spore wall [L1 (stoughing layer), L2 (laminae) และ L3]	<i>Scutellospora</i> sp.1

ตารางที่ 12 (ต่อ)

พื้นที่	สีของสปอร์		ขนาดเส้นผ่าน		รูปร่างของสปอร์	ลักษณะทางสัณฐานอื่นๆ	ชนิด
	น้ำ	PVLG	Melzer	ศูนย์กลางของสปอร์ (µm)			
ตลาด (TR)							
TRns8	orange	orange	orange	75-100	Subglobose	Subtending hypha; 3 layers of spore wall [L1 (stoughing layer), L2 (laminae) และ L3]	Glomus sp.6
	brown	brown	brown				
TRns9	orange	orange	orange	75-100	Globose to subglobose	3 layers of spore wall [L1 (mucilagerious layer), L2 และ L3]	Glomus sp.7
	brown	brown	brown				
TRns10	yellow	yellow	yellow	150	Globose to subglobose	3 layers of spore wall (L1, L2 และ L3)	Unidentified sp.1
	brown	brown	brown				



รูปที่ 9. ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบริเวณรากปาล์มน้ำมัน จ.ตราด (a) *Acaulospora* sp.TRns1, (b) *Glomus* sp.TRns2, (c) *Glomus* sp.TRns3, (d) *Glomus* sp.TRns4, (e) *Glomus* sp.TRns5, (f) *Glomus* sp.TRns6, (g) *Scutellospora* sp.TRns7, (h) *Glomus* sp.TRns8, (i) *Glomus* sp.TRns9, (j) Unidentified sp. TRns10; L1 sw = layer 1 of spore wall, L2 sw = layer 2 of spore wall, L3 sw = layer 3 of spore wall, gw = germinal wall, S = subtending hyphae



รูปที่ 10. รากปาล์มน้ำมันที่มีการติดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเมื่อย้อมด้วย trypan blue in lactoglycerol, a) ลักษณะโครงสร้างคล้ายอาร์บัสคูล (ลูกศรชี้) b) เส้นใยราที่อยู่ภายนอกราก c) เส้นใยราที่อยู่ภายนอกราก d) และ e) เส้นใยราที่ขดงออยู่ในเซลล์ราก f) สปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่อยู่ภายนอกราก g) และ h) เวสิเคิล (กำลังขยาย 1000 เท่า)

3. การเพิ่มปริมาณสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การเพิ่มปริมาณสปอร์โดยวิธีผสมดินตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ กับวัสดุปลูก โดยมีพีชอาคัยเพื่อใช้ล่อให้เกิดการสร้างสปอร์ (trap cultures) คือ ข้าวฟ่าง เก็บตัวอย่างดินเพื่อตรวจคัดแยกหาสปอร์รา เมื่อข้าวฟ่างอายุ 3 เดือน พบว่า ดินจากแหล่งขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน จ.เชียงราย (CR) สามารถคัดแยก และจำแนกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ทั้งหมด 2 สกุล 2 ชนิด ได้แก่ *Acaulospora* sp. CRts1 (318 สปอร์) และ *Glomus* sp. CRts1 (273 สปอร์) มีจำนวนสปอร์เฉลี่ยต่อดิน 100 กรัม รวมทั้งหมด คือ 591 สปอร์

ดินจากแหล่งขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน จ.น่าน (NN) สามารถคัดแยก และจำแนกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ทั้งหมด 1 สกุล 1 ชนิด ได้แก่ *Acaulospora* sp. NNts1 1 มีจำนวนสปอร์เฉลี่ยต่อดิน 100 กรัมรวมทั้งหมด คือ 328 สปอร์

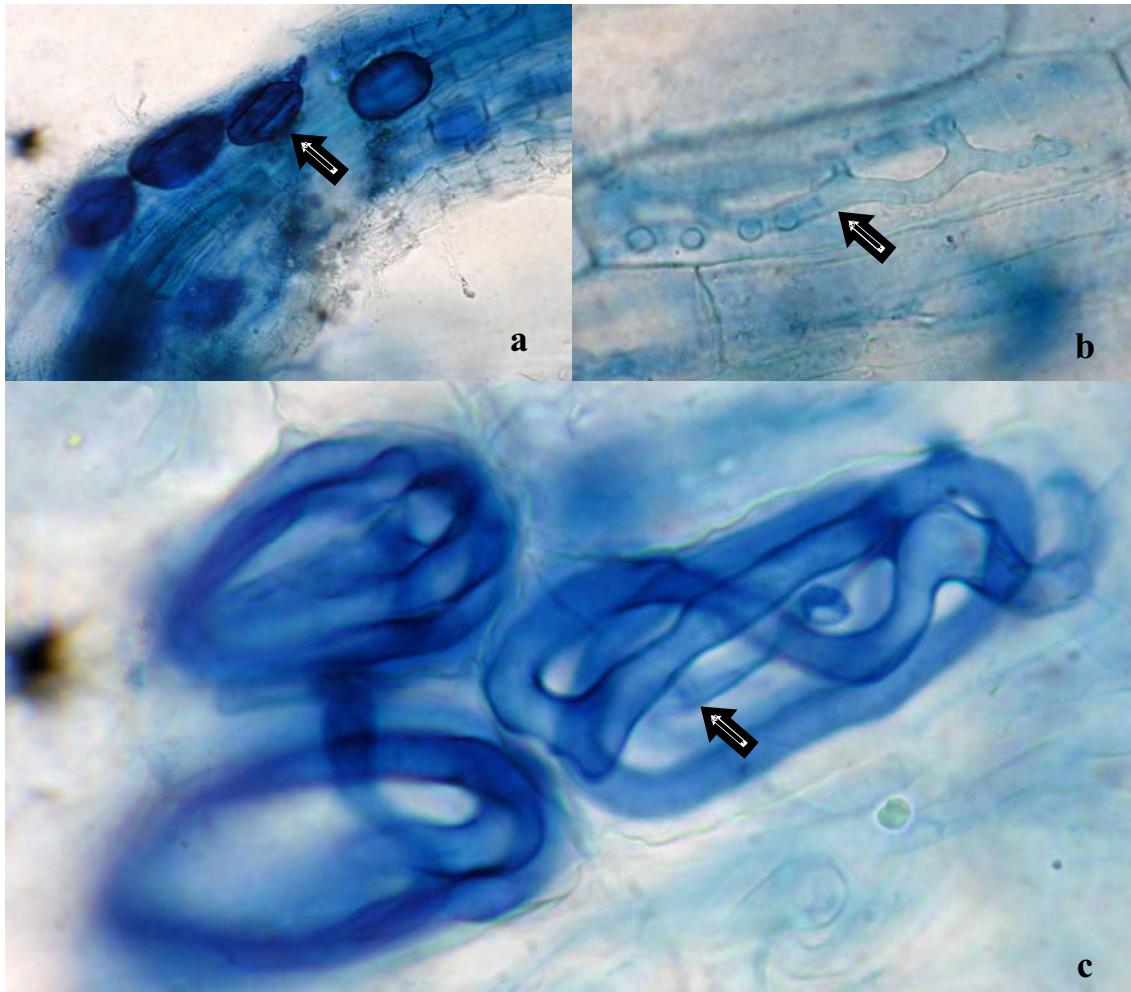
ดินจากแหล่งขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน จ.หนองคาย (NK) สามารถคัดแยก และจำแนกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ทั้งหมด 2 สกุล 2 ชนิด ได้แก่ *Acaulospora* sp. NKts1 (136 สปอร์) *Glomus* sp. NKts1 (454 สปอร์) จำนวนสปอร์เฉลี่ยต่อดิน 100 กรัม รวมทั้งหมด คือ 590 สปอร์

ดินจากแหล่งขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน จ.ฉะเชิงเทรา (CS) สามารถคัดแยก และจำแนกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ทั้งหมด 2 สกุล 2 ชนิด ได้แก่ *Acaulospora* sp. CSts1 (168 สปอร์) *Glomus* sp. CSts1 (265 สปอร์) มีจำนวนสปอร์เฉลี่ยต่อดิน 100 กรัมรวมทั้งหมด คือ 433 สปอร์

ดินจากแหล่งขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน จ.ตราด (TR) สามารถคัดแยก และจำแนกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ทั้งหมด 1 สกุล ได้แก่ *Glomus* sp. TRts1 มีจำนวนสปอร์เฉลี่ยต่อดิน 100 กรัมรวมทั้งหมด คือ 812 สปอร์

ร้อยละการติดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากข้าวฟ่าง ที่ปลูกในกระถางอายุ 3 เดือน พบว่าข้าวฟ่างในกระถางที่ใส่ดินเชื้อ (soil inoculum) จากแหล่งขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน จังหวัดเชียงราย น่าน หนองคาย ฉะเชิงเทรา และตราด มีร้อยละเฉลี่ยการติดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เท่ากับ 33.0, 19.2, 20.6, 26.7 และ 21.9 ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$)

การศึกษาลักษณะการเกิดไมคอร์ไรซากับรากข้าวฟ่างที่ปลูกในกระถาง อายุ 3 เดือน พบว่ารากข้าวฟ่างไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา เมื่อนำรากมาย้อมสี และศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากมีการติดสี พบการสร้างเส้นใยภายนอกราก (external hypha) เวสิเคิล (vesicle) เส้นใยที่ขดอยู่ภายใน (hyphal coli) อยู่ในเซลล์ของราก (รูปที่ 11)

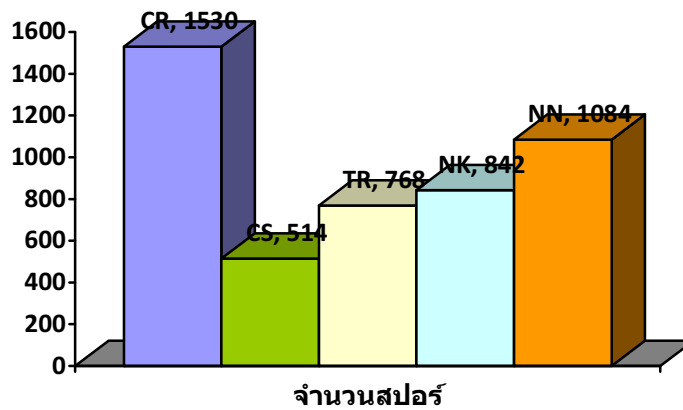


รูปที่ 11. ลักษณะของอาร์บัสคูล (arbuscule) เวสิเคิล และเส้นใยรา (hypha coil) ที่อยู่ภายในเซลล์ราก, a) อาร์บัสคูล มีลักษณะคล้ายต้นไม้แคระ ย้อมติดสี Trypan blue (ลูกศรชี้) กำลังขยาย 1000 เท่า b) เวสิเคิลในเซลล์รากพืช ที่ย้อมติดสี Trypan blue (ลูกศรชี้) กำลังขยาย 200 เท่า c) เส้นใยรา (hypha coil) ภายในเซลล์รากที่ย้อมติดสี Trypan blue (ลูกศรชี้)

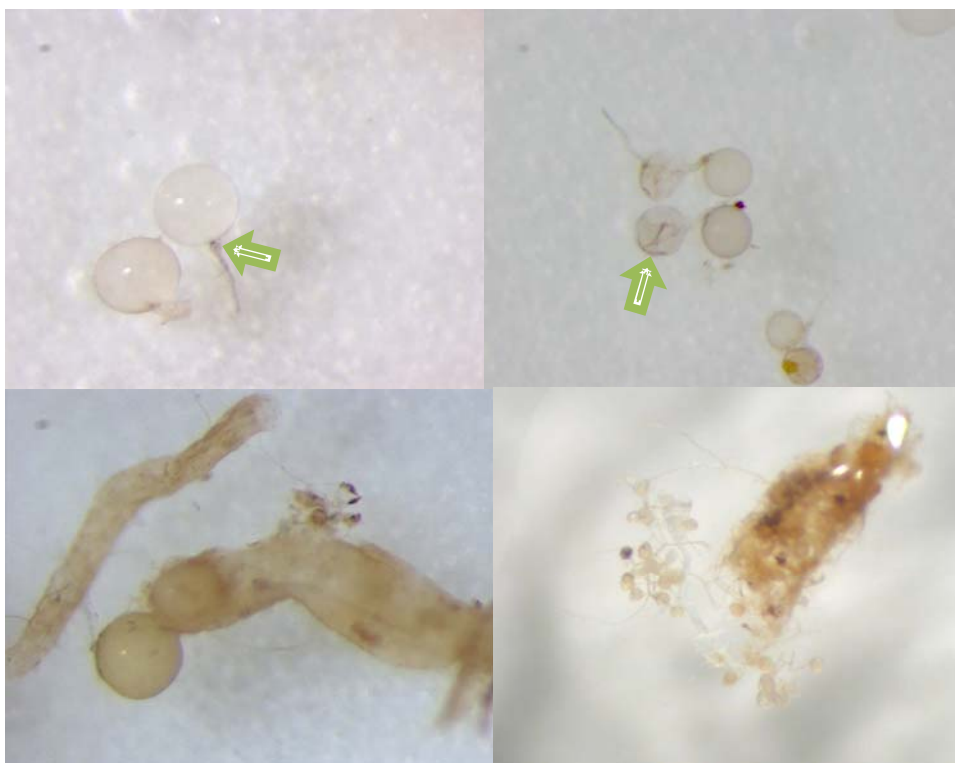
4. การเพิ่มปริมาณสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยกล้ำปาล์มน้ำมัน

การเพิ่มปริมาณสร้างสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยใช้กล้ำปาล์มน้ำมันโดยตรงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบข้อมูลว่าในดินตัวอย่างมีสปอร์ราชนิดใดบ้างที่สามารถกระตุ้นให้เกิดใหม่ และสร้างไมคอร์ไรซากับปาล์มน้ำมันได้ หรือสปอร์ราชนิดใดที่มีความจำเพาะเจาะจง (host specificity) กับปาล์มน้ำมันอย่างแท้จริง ซึ่งจะช่วยให้ลดขั้นตอนหรือระยะเวลาในการคัดเลือกสปอร์ที่จะนำไปเพิ่มปริมาณเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อหรือการจำแนกชนิดต่อไป โดยในกระถาง trap culture เดิมที่ปลูกข้าวฟ่าง ภายหลังที่ได้ตัดส่วนเหนือดินของข้าวฟ่างทั้งหมดทิ้งไป ได้ย้ายปลูกเมล็ดตอกของปาล์มน้ำมันที่ได้รับจากศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันจังหวัดสุราษฎร์ธานีลงในกระถางของทั้ง 5 แหล่งดินตัวอย่าง (เชียงใหม่ CR, น่าน NN, ฉะเชิงเทรา CS, หนองคาย NK และตราด TR) กระถางละ 1 เมล็ด เมื่อระยะเวลา 4-5 เดือน ได้สุ่มตัวอย่างดินจำนวน 100 กรัม มาตรวจหาสปอร์ราและการติดเชื้อในรากปาล์มน้ำมัน พบว่า จำนวนสปอร์ราโดยรวมทั้งหมดต่อดินตัวอย่าง 100 กรัม ที่ได้จากการร่อนด้วยวิธี wet sieving and decanting technique มีจำนวนเพิ่มขึ้นมาก สปอร์ที่พบส่วนใหญ่มีขนาด

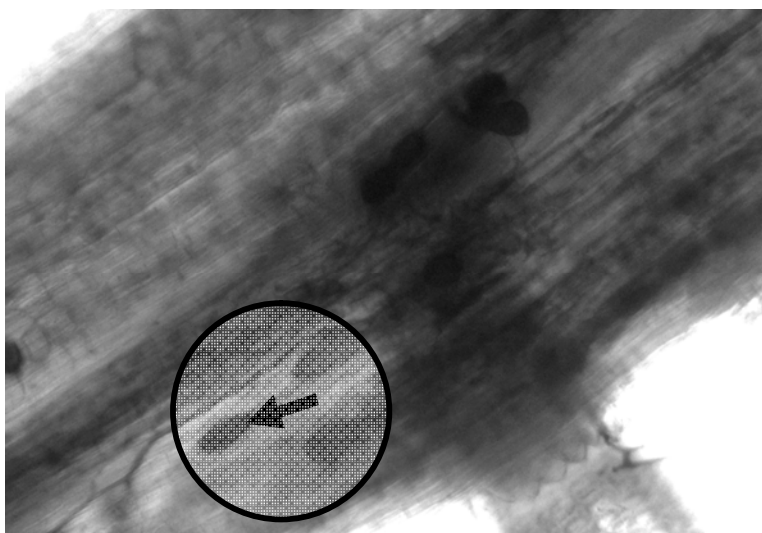
มากกว่า 63 ไมโครเมตร โดยในกระถางที่ปลูกกล้าปาล์มน้ำมันและใส่ดินเชื้อจาก CR มีจำนวนสปอร์รวมต่อดิน 100 กรัมสูงที่สุด รองลงมาคือ NN, NK, TR และ CS ตามลำดับ (รูปที่ 12) และสปอร์ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Acaulospora Glomus* และ *Scutellospora* พบการสร้างสปอร์ราในราก และการติดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากกล้าปาล์มน้ำมัน (รูปที่ 13-14)



รูปที่ 12. จำนวนสปอร์รวมของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อดิน 100 กรัม ที่แยกได้จากการร่อนด้วยวิธี wet sieving and decanting technique เมื่อใช้กล้าปาล์มน้ำมันเป็นพืชอาศัย



รูปที่ 13. ตัวอย่างสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในดินตัวอย่าง ที่ได้จาก trap culture เมื่อใช้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันเป็นพืชอาศัย a) สปอร์ราสกุล *Scutellospora* sp. เห็น bulbous subtending hyphae (ลูกศรชี้) b) สปอร์ราสกุล *Acaulospora* sp. เห็นสปอร์เดิมที่สลายไปแล้ว (ลูกศรชี้) c) สปอร์ราที่เกิดอยู่ในรากปาล์มน้ำมัน d) กลุ่มสปอร์ราสกุล *Glomus* sp.



รูปที่ 14. โครงสร้างของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบในรากของกล้าปาล์มน้ำมัน (ในบริเวณวงกลมล้อมรอบ ลูกศรชี้แสดงโครงสร้างเวสิเคิล)

5. การเตรียมหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาไมคอร์ไรซา

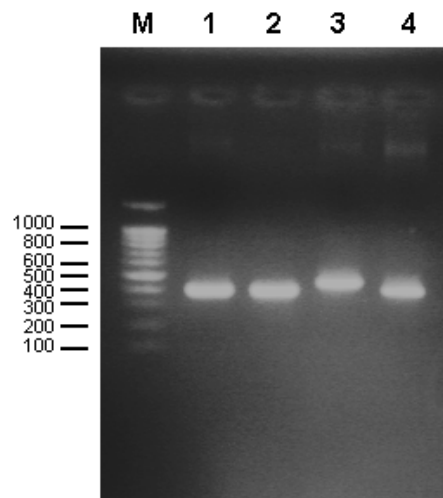
ได้สุ่มเลือกสปอร์ราที่เป็นตัวแทนจากสปอร์ที่คัดแยกได้จากดินในกระถางปลูกกล้าปาล์มน้ำมัน และเป็นสปอร์ที่มีชีวิตสภาพสมบูรณ์จาก 2 แหล่งที่มา คือ CR และ NN ซึ่งเพิ่มปริมาณสปอร์ในดินได้สูงสุดในผลการทดลองข้อ 4 ตามลำดับ โดยปลูกสปอร์รากับพืชทดสอบได้แก่ ข้าวฟ่างในกระถางที่มีวัสดุปลูกคือ ทราย และหน้าดิน อัตราส่วน 1:1 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้สปอร์ 1 สปอร์ต่อต้นกล้าข้าวฟ่าง 1 ต้น (single spore) เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1-2 เดือน พบว่าต้นกล้ามีอาการเหลืองซีด และพบการระบาดของเชื้อ ต้นกล้าตายลงเป็นจำนวนมาก (ร้อยละ 70) แม้ได้แก้ไขโดยการปลูกซ่อมรอบที่ 2 ก็ยังมีการระบาดของเชื้อในข้าวฟ่างอย่างต่อเนื่อง การระบาดของเชื้อที่อาจเป็นพาหะนำโรค/หรือไวรัสของต้นพืชทดสอบ เป็นปัญหาสำคัญ ทำให้การทดลองต้องล่าช้าหรือใช้เวลานานขึ้น เนื่องจากต้องปลูกซ่อมแซมหรือทดแทนต้นพืชที่ตายลงเกือบทั้งชุดทดลอง โครงการวิจัย ฯ ได้พยายามหลีกเลี่ยงการใช้ยาปราบศัตรูพืช เพราะมีรายงานว่ายาปราบศัตรูพืชมีผลต่อราไมคอร์ไรซา จึงทำให้ต้องเปลี่ยนแผนการศึกษาโดยใช้หัวเชื้อที่มีทั้งดินและรากของกล้าปาล์มน้ำมันจากผลการทดลองในข้อ 4 มาเป็นหัวเชื้อตั้งต้น สำหรับเพาะให้กับกล้าปาล์มน้ำมันเพื่อทดสอบผลของราไมคอร์ไรซาต่อการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมันในชุดการทดลองต่อไป

6. การจัดจำแนกชนิดราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างที่ได้จากดินแปลงปลูกปาล์มน้ำมันด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

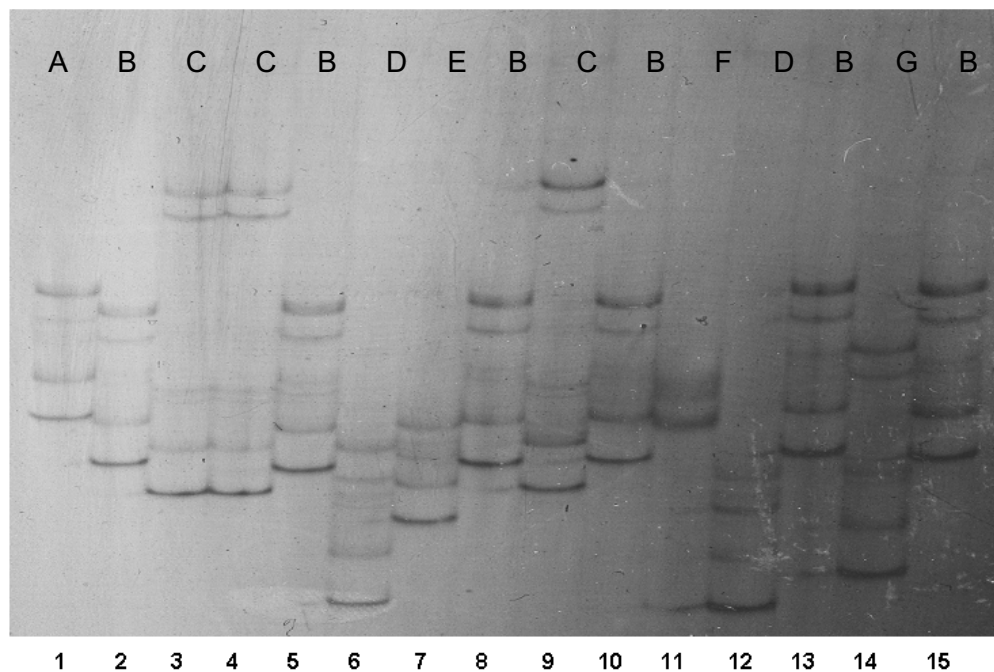
ตัวอย่างของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และรากปาล์มน้ำมันที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ต่างๆ ได้ถูกคัดเลือกมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อการระบุชนิด

6.1 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D2 ของ 28S rDNA

ในเบื้องต้นสกัด DNA จากตัวอย่างสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากดินแปลงปลูกปาล์มน้ำมันจาก จ.เชียงราย และ จ.น่าน นำมาเพิ่มจำนวน DNA บริเวณ D2 ของ 28S rDNA ด้วยเทคนิค PCR จากสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ขึ้น DNA product ขนาดประมาณ 450 bp ตัวอย่างแสดงในรูปที่ 15 เมื่อนำไปโคลน และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP (ตัวอย่างแสดงในรูปที่ 16 และภาคผนวก ก) จากนั้นคัดเลือกตัวแทนของ recombinant clone ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ผลแสดงในตารางที่ 13



รูปที่ 15. ตัวอย่างของ PCR product ขนาดประมาณ 450 bp ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA บริเวณ D2 ตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose ในสารละลาย 0.5x TBE เทียบกับ 100 bp DNA ladder (M); (1 และ 2) สปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจาก จ.เชียงใหม่ (CR); (3 และ 4) สปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจาก จ.น่าน (NN)



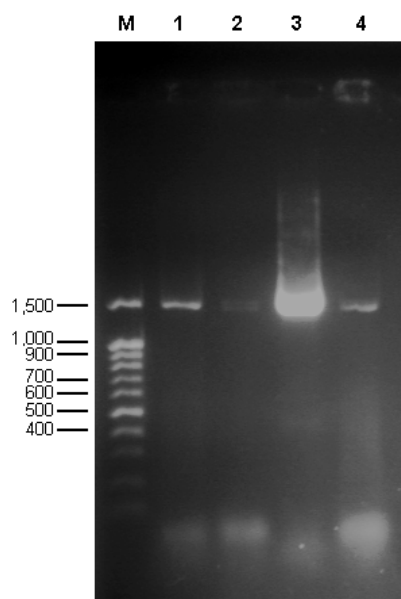
รูปที่ 16. รูปแบบของแถบ single strand DNA ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง PCR product จากรีคอมบิแนนท์โคลนต่างๆ ของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา จ.น่าน (NN) ด้วยเทคนิค SSCP ย้อมด้วย silver stain

ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับฐานข้อมูล GenBank พบว่าสามารถระบุชนิดของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ถูกต้องชัดเจนในระดับ genus และ/หรือ species ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 95-99% ในขณะที่บาง clone มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำ เช่น clone NNS_C6-3 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงสุดกับ *Glomus versiforme* (GB) เท่ากับ < 88 % และ clone NNS_C6-13 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงสุดกับ *Glomus manihotis* (GB) เท่ากับ < 88 % เป็นต้น

ผลการศึกษาตัวอย่างจากรากปาล์มน้ำมันในแหล่งปลูก 5 จังหวัดที่ศึกษา ซึ่งตรวจพบโครงสร้าง arbuscule และ/หรือ vesicle พบว่าเมื่อเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้ไพรเมอร์ ALF01/NDL22 พบว่า PCR product ที่ได้มีมากกว่า 1 แถบ ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน แม้ว่าผู้วิจัยได้เลือกตัดแถบ PCR product ที่มีขนาดใกล้เคียงกับ 450 bp มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วทำการโคลน วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP และคัดเลือกโคลนไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไม่ใช่ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเพิ่มจำนวน DNA บริเวณ D2 ของ 28S rDNA ด้วยไพรเมอร์ ALF01/NDL22 ซึ่งเป็นไพรเมอร์สำหรับเชื้อราทั่วไป ดังนั้นเมื่อนำมาใช้ในการศึกษารากอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากปาล์มน้ำมันซึ่งอาจจะมีเชื้อราชนิดอื่นๆ ที่ติดปนมากับดิน จึงทำให้ได้ PCR product มากกว่า 1 แถบ รวมทั้งผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ก็ไม่ใช่ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอีกด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษารากอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากปาล์มน้ำมันโดยการทำ nested PCR ตามวิธีของ Krueger et al. (2010)

6.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของ 18S rDNA, ITS และบางส่วนของ 28S rDNA

ผลการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค nested PCR ของตัวอย่างราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากรากปาล์มน้ำมันพบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 bp ตัวอย่างแสดงในรูปที่ 17 เมื่อนำไปโคลนและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP เพื่อจัดกลุ่ม (ภาคผนวก ข) และคัดเลือกตัวแทนของรีคอมบิแนนท์โคลนไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 13 แม้ว่าผลการเทียบเคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของรากปาล์มน้ำมันในบาง clone มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำกว่า 94% ซึ่งอาจเนื่องมาจากข้อมูลของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในฐานข้อมูลนานาชาติ เช่น GenBank มีจำกัด แต่อย่างไรก็ตามจากข้อมูลทางพันธุกรรมบริเวณบางส่วนของ 18S rDNA, ITS และบางส่วนของ 28S rDNA ที่ศึกษาพบว่ามีประสิทธิภาพดีสามารถใช้ในการระบุชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้อย่างชัดเจนในระดับ species รวมทั้งไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในการศึกษารากอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Krueger et al. 2010) ในรากปาล์มน้ำมันนั้นสามารถใช้เพิ่มจำนวน DNA ของ ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้อย่างจำเพาะ ดังนั้นในการศึกษาตรวจหาการติดเชื้อของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการเพาะกล้าปาล์มน้ำมัน จึงเลือกใช้เทคนิค nested PCR ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดของสปอร์ และรากปาล์มน้ำมันต่อไป



รูปที่ 17. ตัวอย่างของ PCR product ขนาดประมาณ 1,500 bp ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA บางส่วนของ 18S rDNA, ITS และบางส่วนของ 28S rDNA ตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose ในสารละลาย 0.5x TBE เทียบกับ 100 bp DNA ladder (M); (1) รากปาล์มน้ำมันจาก จ.น่าน (NN), (2) รากปาล์มน้ำมันจาก จ.เชียงราย (CR), (3) รากปาล์มน้ำมันจาก จ.ตราด (TR) และ (4) รากปาล์มน้ำมันจาก จ.หนองคาย (NK)

ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากรากปาล์มน้ำมันในแหล่งปลูกต่างๆ พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำ คืออยู่ระหว่าง 87-95% และมีเพียงบางตัวอย่างเท่านั้นที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูง คือ อยู่ระหว่าง 97-98% ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่ารากปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่ติดเชื้อราในสกุล *Scutellospora* ซึ่งพบในทุกพื้นที่ที่ทำการศึกษา รองลงมาคือ *Glomus* ตามลำดับ (ตารางที่ 13) โดยรากปาล์มน้ำมันจาก จ.ฉะเชิงเทรา พบการติดเชื้อ *Scutellospora heterogama* (94-97% similarity), *Scutellospora reticulata* (95% similarity) และ *Glomus* sp. (95% similarity) ในขณะที่รากปาล์มน้ำมันจาก จ.หนองคาย พบ *Scutellospora gilmorei* (89-98% similarity) และ *Scutellospora nodusa* (96% similarity) ส่วนรากปาล์มน้ำมัน จ.น่าน พบ uncultured *Glomus* (87-95% similarity), *Scutellospora nodusa* (94-96% similarity) และ *Glomus sinuosum* (97% similarity) และรากปาล์มน้ำมันจาก จ.ตราด พบการติดเชื้อ *Scutellospora gilmorei* (94-95% similarity), uncultured *Paraglomus* (87% similarity) และ uncultured *Glomus* (89% similarity)

ตารางที่ 13 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาของปาล์มน้ำมันกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST

Type of sample	Location	SSCP profile	Clone ID	BLAST result		Accession No.	% identity
				D2 region of 28S rDNA	18S rDNA-ITS-28S rDNA		
AMF Spores	จ.เชียงใหม่		CRns_C2-1	<i>Acaulospora tuberculata</i>	-	AF378440	98
			CRns_C2-2	<i>Acaulospora tuberculata</i>	-	AF378440	97
			CRns_C2-3	<i>Acaulospora tuberculata</i>	-	AF378440	98
			CRns_C2-6	<i>Glomus etunicatum</i>	-	AY541829	97
			CRns_C2-7	Uncultured <i>Gigaspora</i>	-	AB369770	97
			CRns_C2-8	<i>Acaulospora tuberculata</i>	-	AB369770	98
			CRns_C2-10	<i>Acaulospora tuberculata</i>	-	AF378440	98
			CRns_C2-14	<i>Acaulospora tuberculata</i>	-	AF378440	96
			CRns_C2-15	<i>Acaulospora tuberculata</i>	-	AF378440	98
			CRns_C2-16	<i>Acaulospora tuberculata</i>	-	AF378440	98
			CRns_C3-1	Uncultured <i>Gigaspora</i>	-	AB369770	98
			CRns_C3-2	Uncultured <i>Gigaspora</i>	-	AB369770	97
			CRns_C3-3	Uncultured <i>Gigaspora</i>	-	AB369772	97
			CRns_C3-4	Uncultured <i>Gigaspora</i>	-	AB369770	98
			CRns_C3-8	Uncultured <i>Gigaspora</i>	-	AB369770	98
			CRns_C3-9	Uncultured <i>Gigaspora</i>	-	AB369772	97
			CRns_C3-11	<i>Gigaspora rosea</i>	-	AF378454	95
			CRns_C3-12	<i>Gigaspora rosea</i>	-	AF378454	96
AMF Spores	จ.น่าน		NNns_C6-1	<i>Glomus mosseae</i>	-	AF145738	99
			NNns_C6-2	<i>Glomus mosseae</i>	-	AY541918	97

ตารางที่ 13 (ต่อ)

Type of sample	Location	SSCP profile	Clone ID	BLAST result		Asscession No.	% identity
				D2 region	18S rDNA-ITS-28S rDNA		
AMF Spores	จ.น่าน		NNns_C6-3	<i>Glomus versiforme</i>		EU346868	low
			NNns_C6-5	<i>Glomus versiforme</i>	-	EU346868	low
			NNns_C6-7	<i>Acaulospora tuberculata</i>	-	AF378440	98
			NNns_C6-8	<i>Acaulospora tuberculata</i>	-	AF378440	97
			NNns_C6-13	<i>Glomus manihotis</i>	-	AY541871	low
			NNns_C6-14	<i>Acaulospora tuberculata</i>	-	AF378437	98
			NNns_C6-15	<i>Glomus mosseae</i>	-	AF145738	99
			NNns_C6-16	<i>Acaulospora tuberculata</i>	-	AF378440	99
AMF roots	จ.น่าน		NNnr_C18-4	-	<i>Glomus sinuosum</i>	HQ243127	97
			NNnr_C18-9	-	Uncultured <i>Glomus</i>	FM206335	94
			NNnr_C18-11	-	Uncultured <i>Glomus</i>	HQ243107	88
			NNnr_C18-14	-	Uncultured <i>Glomus</i>	HQ243127	88
			NNnr_C18-19	-	<i>Scutellospora nodusa</i>	FM876836	96
			NNnr_C18-46	-	<i>Scutellospora gilmorei</i>	FN547615	94
			NNnr_C18-64	-	Uncultured <i>Glomus</i>	HQ243162	87
			NNnr_C18-69	-	Uncultured <i>Glomus</i>	HQ243160	95
AMF roots	จ.ฉะเชิงเทรา		CSnr_C17-1	-	<i>Scutellospora heterogama</i>	FM876838	94
			CSnr_C17-2	-	<i>Scutellospora heterogama</i>	FM876838	97
			CSnr_C17-12	-	Uncultured <i>Glomus</i>	AB561102	93

ตารางที่ 13 (ต่อ)

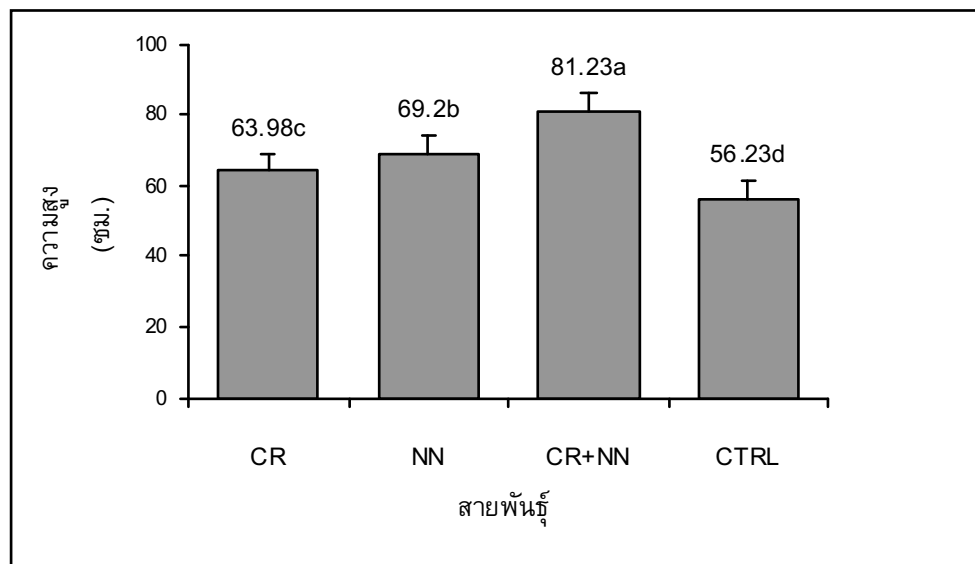
Type of sample	Location	SSCP profile	Clone ID	BLAST result		Asscession No.	% identity
				D2 region	18S rDNA-ITS-28S rDNA		
AMF roots	จ.ฉะเชิงเทรา		CSnr_C17-32	-	<i>Scutellospora heterogama</i>	FM876838	94
			CSnr_C17-33	-	<i>Scutellospora reticulata</i>	AJ871271	95
			CSnr_C17-35	-	<i>Glomus</i> sp.	HQ243256	95
AMF roots	จ.ตราด		TRnr_C16-1	-	Uncultured <i>Paraglomus</i>	DQ400284	87
			TRnr_C16-3	-	Uncultured <i>Paraglomus</i>	DQ400284	87
			TRnr_C16-12	-	Uncultured <i>Paraglomus</i>	AM942521	87
			TRnr_C16-28	-	Uncultured <i>Glomus</i>	AB561101	89
			TRnr_C16-40	-	<i>Scutellospora gilmorei</i>	FN547617	94
			TRnr_C16-48	-	<i>Scutellospora gilmorei</i>	FN547617	94
			TRnr_C16-69	-	<i>Scutellospora gilmorei</i>	FN547617	95
AMF roots	จ.หนองคาย		NKnr_C15-2	-	<i>Scutellospora gilmorei</i>	FN547617	89
			NKnr_C15-6	-	<i>Scutellospora nodusa</i>	FM876836	96
			NKnr_C15-10	-	<i>Scutellospora gilmorei</i>	FM876836	95
			NKnr_C15-23	-	<i>Scutellospora gilmorei</i>	FM876833	98

7. ผลของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมัน

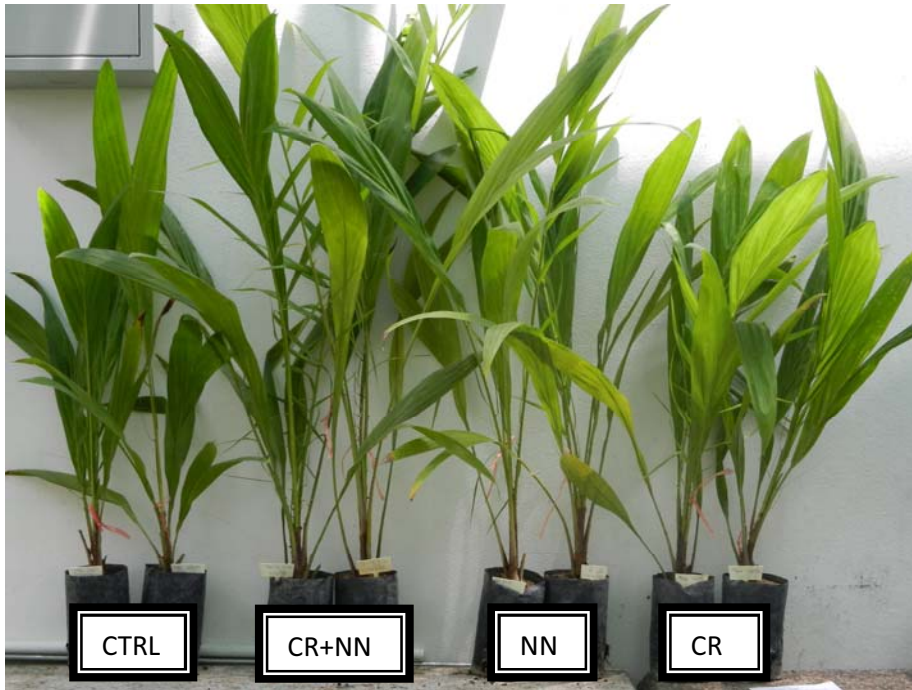
การทดสอบการนำดินหว่าเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา คือ CR, NN, CR+NN มาใส่ให้กับกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 เดือน ในเรือนเพาะชำ (open air nursery) เปรียบเทียบผลของการใส่ดินหว่าเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ทรีตเมนต์ต่อการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมัน กับชุดควบคุม (CTRL) วัดเปรียบเทียบการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน ดังนี้

7.1 การเจริญทางความสูงของกล้าปาล์มน้ำมัน

เปรียบเทียบการเจริญโดยเรียงความสูงของกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือน เมื่อใส่ดินหว่าเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ CR+NN, NN, CR, CTRL พบว่า ความสูงของกล้าปาล์มน้ำมัน มีค่า 81.23, 69.20, 63.98 และ 56.23 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความสูงของกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่ดินหว่าเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ และชุดควบคุม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 18-19)



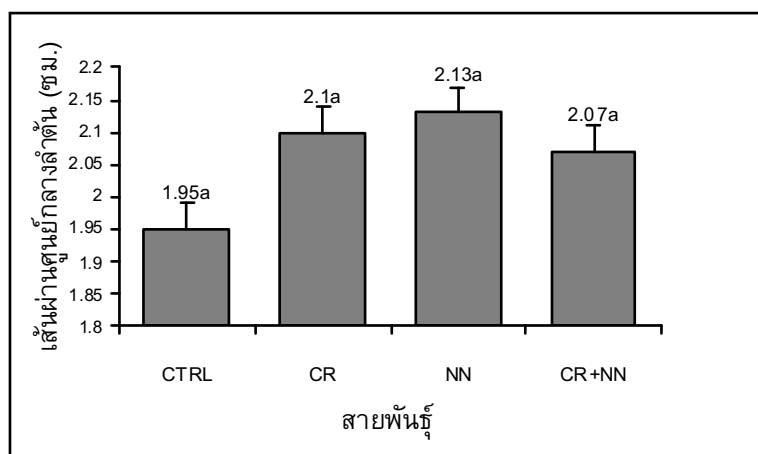
รูปที่ 18. การเจริญทางความสูงของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน เมื่อใส่ดินหว่าเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่หว่าเชื้อรา เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.05$)



รูปที่ 19. การเจริญทางความสูงของกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือน ในทรีตเมนต์ที่ใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

7.2 การเจริญทางเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

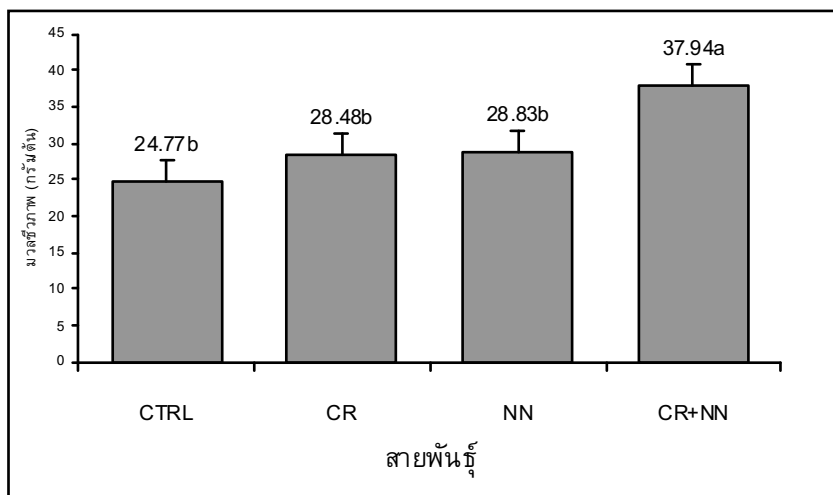
เปรียบเทียบการเจริญโดยเรียงเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้นกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน เมื่อใส่หัวเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อราสายพันธุ์ NN, CR, CR+NN และชุดควบคุม มีค่า 2.13, 2.10, 2.07 และ 1.95 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่า เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์และชุดควบคุม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 20)



รูปที่ 20. การเจริญเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้นกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน เมื่อใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$)

7.3 มวลชีวภาพส่วนเนื้อดิน (น้ำหนักแห้งของใบ และลำต้น) ของกล้าปาล์มน้ำมัน

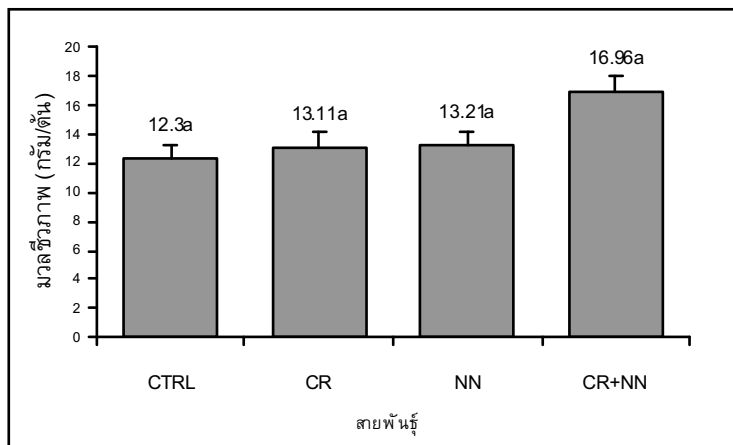
เปรียบเทียบการเจริญโดยเรียงมวลชีวภาพส่วนเนื้อดินของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน เมื่อใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า มวลชีวภาพส่วนเนื้อดินของกล้าปาล์มน้ำมันเมื่อใส่ดินหัวเชื้อราสายพันธุ์ CR+NN, NN, CR และชุดควบคุม มีค่า 37.94, 28.83, 28.48 และ 24.77 กรัมต่อต้น ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่า มวลชีวภาพส่วนเนื้อดินของกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่ดินหัวเชื้อสายพันธุ์ CR+NN มีความแตกต่างจากทรีตเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 21)



รูปที่ 21. มวลชีวภาพส่วนเนื้อดินของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน เมื่อใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$)

7.4 มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน (น้ำหนักแห้งของราก) ของกล้าปาล์มน้ำมัน

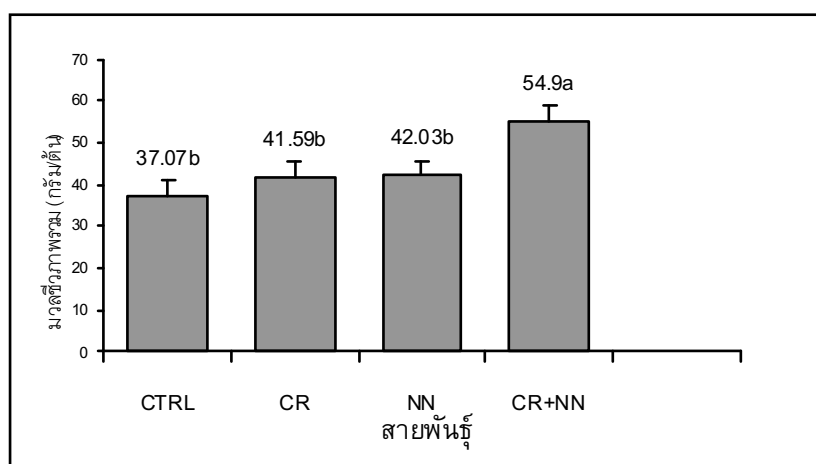
เปรียบเทียบการเจริญโดยเรียงมวลชีวภาพส่วนใต้ดินของกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า มวลชีวภาพส่วนใต้ดินของกล้าปาล์มน้ำมันเมื่อใส่ดินหัวเชื้อราสายพันธุ์ CR+NN, NN, CR และชุดควบคุม มีค่า 16.96, 13.21, 13.11 และ 12.30 กรัมต่อต้น ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่า มวลชีวภาพส่วนใต้ดินของกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์และชุดควบคุม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 22)



รูปที่ 22. มวลชีวิภาพส่วนใต้ดินเฉลี่ยของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน เมื่อใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อรา เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$)

7.5 มวลชีวิภาพรวม (น้ำหนักแห้งของใบ ลำต้น และราก) ของกล้าปาล์มน้ำมัน

เปรียบเทียบการเจริญโดยเรียงมวลชีวิภาพรวมของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน เมื่อใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า มวลชีวิภาพรวมของกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่ดินหัวเชื้อราสายพันธุ์ CR+NN, NN, CR และชุดควบคุม มีค่า 54.90, 42.03, 41.59 และ 37.07 กรัมต่อต้น ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่า มวลชีวิภาพรวมของกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่ดินหัวเชื้อราสายพันธุ์ CR+NN มีความแตกต่างจากทรีตเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 23)

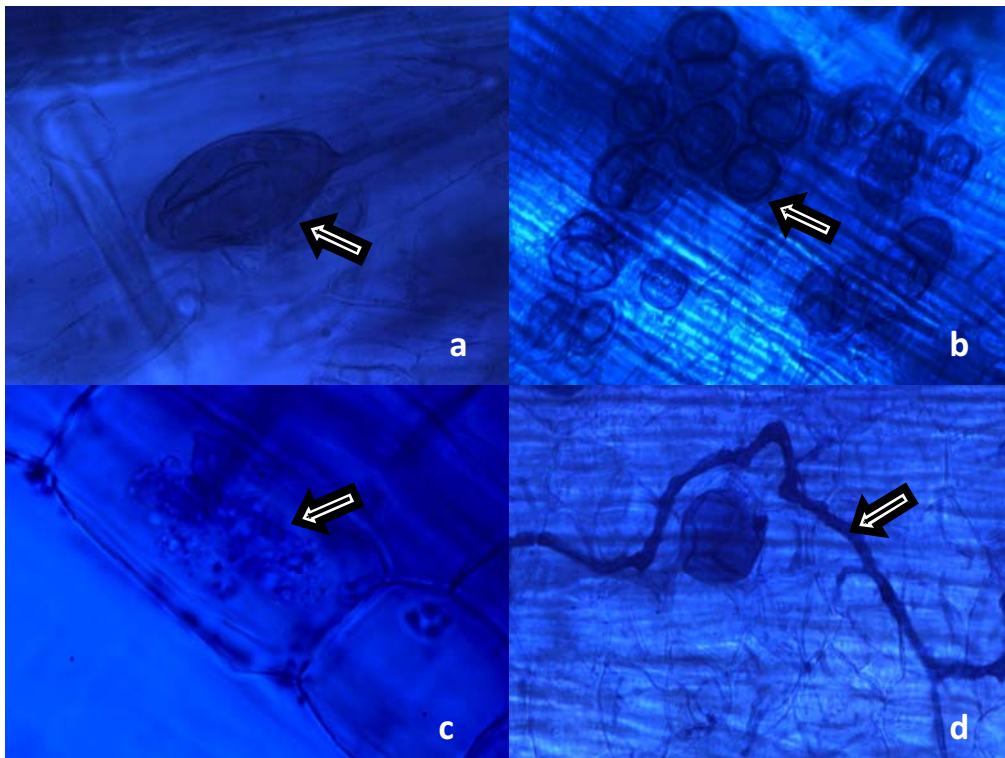


รูปที่ 23. มวลชีวิภาพรวมของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน เมื่อใส่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อรา เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามอักษรในแนวนอน ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับด้านข้างต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$)

7.6 การทดสอบการติดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับกล้าปาล์มน้ำมัน

เปรียบเทียบโดยเรียงร้อยละการติดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในกล้าปาล์มน้ำมันเมื่อไต่ดินหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า ร้อยละการติดเชื้อในกล้าปาล์มน้ำมันเมื่อไต่หัวเชื้อรา สายพันธุ์ NN, CR และ CR+NN มีค่า 92.46, 89.75 และ 88.88 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์สูง เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่า ร้อยละการติดเชื้อของกล้าปาล์มน้ำมันที่ไต่หัวเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบการติดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในชุดควบคุม

การศึกษาลักษณะการเกิดไมคอร์ไรซากับรากของกล้าปาล์มน้ำมัน เมื่อนำรากมาย้อมสี และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ากล้าปาล์มน้ำมันที่ไต่ดินหัวเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการสร้างเวสิเคิล อาร์บัสคูล สปอร์รา และเส้นใยที่อยู่ภายนอกรากชัดเจน (รูปที่ 24)



รูปที่ 24. ลักษณะโครงสร้างไมคอร์ไรซา (ลูกศรชี้) ที่พบในเซลล์รากปาล์มน้ำมันที่ไต่หัวเชื้อ a: vesicle (กำลังขยาย 400 เท่า) ในทรีตเมนต์ NN, b: กลุ่มของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (กำลังขยาย 400 เท่า) ในทรีตเมนต์ CR, c: arbuscule (กำลังขยาย 400 เท่า) ในทรีตเมนต์ CR+NN, d: external hyphae และสปอร์รา (กำลังขยาย 400 เท่า) ในทรีตเมนต์ CR

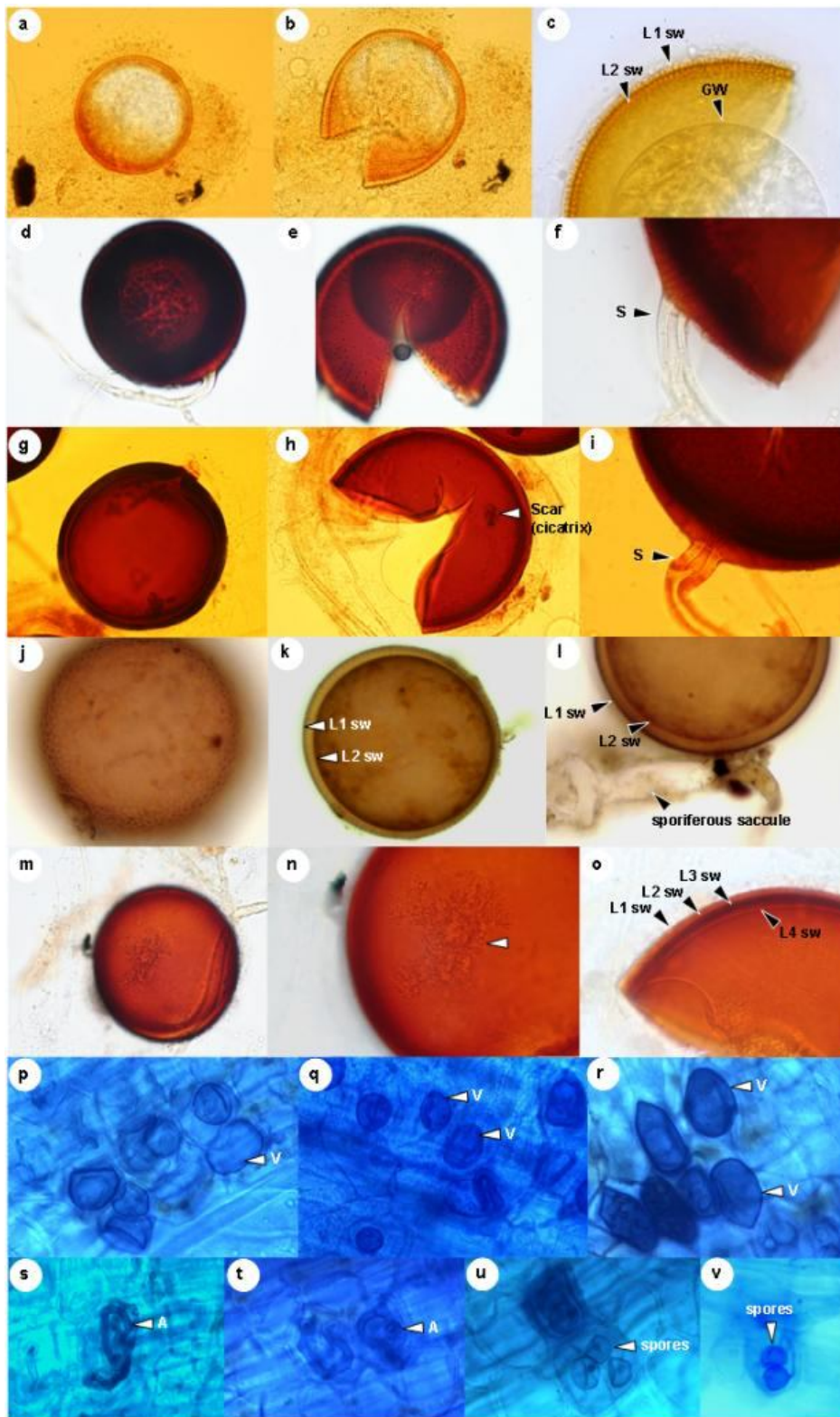
8. การตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในกล้าปาล์มน้ำมัน (seeding) ที่ใส่หัวเชื้อ

8.1 การศึกษาสปอร์และรากราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่ดินหัวเชื้อโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน

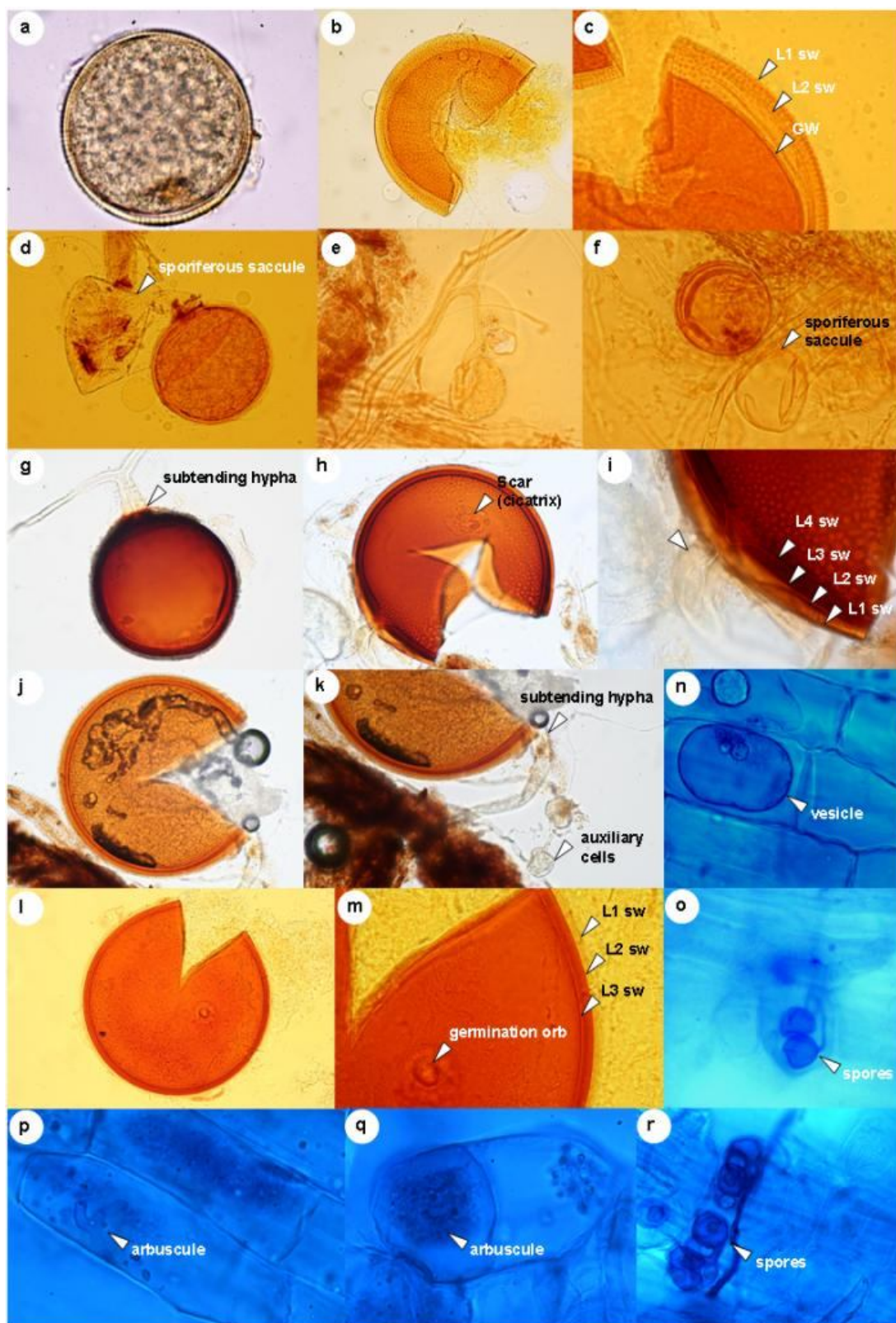
การสุ่มตัวอย่างดินรอบรากปาล์มน้ำมันที่ใส่ดินหัวเชื้อทั้ง 3 ชุดการทดลอง คือ CR NN และ CR+NN เพื่อแยกสปอร์ และรากราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เพื่อการจัดจำแนกชนิด ผลแสดงในตารางที่ 14 และรูปที่ 25-26 พบว่าส่วนใหญ่เป็นราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในสกุล *Acaulospora* และ *Scutellospora* ในทุกชุดการทดลอง ส่วนรากปาล์มน้ำมันเมื่อย้อมด้วยสี typan blue พบโครงสร้างทั้ง arbuscule และ vesicle

ตารางที่ 14 ชนิดและลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบในรากปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

ชุดทดลอง	ชนิด	โครงสร้างที่ตรวจพบในราก
1) CR	<i>Acaulospora</i> sp. (CRs1)	Arbuscules and vesicles
	<i>Scutellospora</i> sp. (CRs2)	
2) NN	<i>Acaulospora</i> sp. (NNs1)	Arbuscules and vesicles
	<i>Scutellospora</i> sp. (NNs2)	
	<i>Glomus</i> sp. (NNs3)	
3) CR+NN	<i>Acaulospora</i> sp. (CRNNs1)	Arbuscules and vesicles
	<i>Scutellospora</i> sp. (CRNNs2)	
	<i>Scutellospora</i> sp. (CRNNs3)	



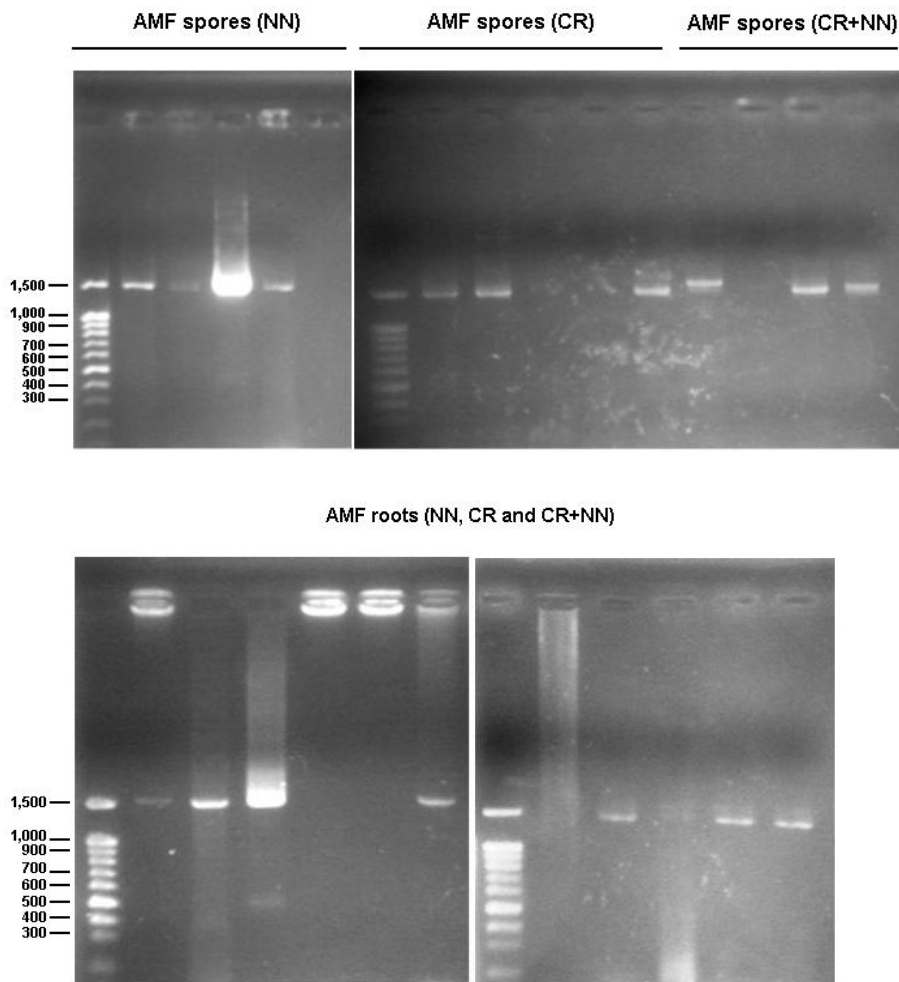
รูปที่ 25. ลักษณะของสปอร์และรากราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ตรวจพบในต้นปาล์มน้ำมันที่ใส่ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา
ชุดการทดลองที่ 1 (CR), (a - c) *Acaulospora* sp. CRs1, (d - i) *Scutellospora* sp. CRs2, (p - q) vesicles ที่พบใน
เซลล์ราก, (s) arbuscule ที่พบในเซลล์ราก และ (u) spores ที่พบในเซลล์ราก
ชุดการทดลองที่ 2 (NN) (j - l) *Acaulospora* sp. NNs1, (m - o) *Scutellospora* sp. NNs2, (r) vesicles ที่พบในเซลล์
ราก, (t) arbuscule ที่พบในเซลล์ราก และ (v) spores ที่พบในเซลล์ราก



รูปที่ 26. ลักษณะของสปอร์ และรากราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ตรวจพบในต้นปาล์มน้ำมันที่ใส่ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในชุดการทดลองที่ 3 (CR+NN) (a - f) *Acaulospora* sp. CRNNs1, (g - i) *Scutellospora* sp. CRNNs2, (j - m) *Scutellospora* sp. CRNNs3, (n) vesicle ที่พบในเซลล์ราก, (o - r) spores ที่พบในเซลล์ราก, (p - q) arbuscule ที่พบในเซลล์ราก

8.2 การศึกษาสปอร์และรากราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อด้วยเทคนิคทางพันธุกรรม

ตัวอย่างสปอร์และรากราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อทั้ง 3 ชุดการทดลองได้นำมาศึกษาเพื่อการจำแนกชนิดด้วยเทคนิค nested PCR (รูปที่ 27), โคลน, วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP (ภาคผนวก ก) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ก่อนนำไปเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ผลแสดงในตารางที่ 15



รูปที่ 27. ตัวอย่างของ PCR product ขนาดประมาณ 1,500 bp ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA บางส่วนของ 18S rDNA, ITS และบางส่วนของ 28S rDNA ตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose ในสารละลาย 0.5x TBE เทียบกับ 100 bp DNA ladder จากตัวอย่างสปอร์ (บน) และรากกล้าปาล์มน้ำมัน (ล่าง) ที่เติมหัวเชื้อ

ตารางที่ 15 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาของกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST

Inoculum	AMF	Clone ID	BLAST result 18S rDNA-ITS-28S rDNA	Asscession No.	% identity
CR	ND	ND	ND		
NN	สปอร์	NNss_C19-3	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	FR692352	94
		NNss_C19-4	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	FR692352	94
		NNss_C19-17	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	FR692352	87
		NNss_C19-20	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	FR692352	95
		NNss_C19-29	Uncultured <i>Acaulospora</i>	FR692349	96
		NNss_C19-31	<i>Kuklospora kentinensis</i>	FR692352	87
		NNss_C19-43	Uncultured <i>Acaulospora</i>	FM206336	93
		NNss_C20-42	<i>Scutellospora nodosa</i>	FM876836	95
		NNss_C20-54	<i>Scutellospora gilmorei</i>	FN547617	95
	รากปาล์มน้ำมัน	NNsr_C22-14	<i>Glomus intraradices</i>	FM865546	99
		NNsr_C22-17	<i>Glomus intraradices</i>	FM865565	99
		NNsr_C22-19	<i>Glomus irregulare</i>	HE577801	90
		NNsr_C22-47	<i>Glomus intraradices</i>	FM865547	98
		NNsr_C22-59	<i>Glomus intraradices</i>	FM865602	99
		NNsr_C22-63	<i>Glomus intraradices</i>	FM865549	99
CR+NN	สปอร์	CRNNss_C21-9	<i>Scutellospora nodosa</i>	FM876836	95
		CRNNss_C21-10	<i>Scutellospora nodosa</i>	FM876836	94
		CRNNss_C21-103	<i>Scutellospora nodosa</i>	FM876836	96
		CRNNss_C26-3	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	FR692352	98
		CRNNss_C26-8	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	FR692352	98
		CRNNss_C26-38	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	FR692352	98
		CRNNss_C26-43	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	FR692352	97
	รากปาล์มน้ำมัน	CRNNsr_C23-2	<i>Scutellospora nodosa</i>	FM876836	94
		CRNNsr_C23-35	<i>Scutellospora nodosa</i>	FM876836	95
		CRNNsr_C23-48	<i>Scutellospora nodosa</i>	FM876836	94

หมายเหตุ: ND=not determine

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากปาล์มน้ำมัน โดยอาศัยทั้งลักษณะทางสัณฐานและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของ 18S rDNA, ITS และ 18S rDNA ผลแสดงในตารางที่ 16 จากผลการตรวจวิเคราะห์ชี้ให้เห็นว่าเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมีประสิทธิภาพดี สามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของทั้งสปอร์และรากรารอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ นอกจากนี้ยังเป็นการยืนยันการติดเชื้อของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในเซลล์รากปาล์มน้ำมันอีกด้วย โดยสปอร์ที่พบมากเป็นราในสกุล *Acaulospora* และ *Scutellospora* ซึ่งเป็นสกุลราที่เติมลงไปในกลุ่มน้ำมันเพื่อเป็นหัวเชื้อ แต่เมื่อใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลในการพิสูจน์ชนิดของสปอร์ดังกล่าวพบว่าจัดจำแนกตามชนิดได้มากกว่า 2 ชนิด อาจเนื่องมาจากการศึกษาทางพันธุกรรมใช้สปอร์ในการสกัดดีเอ็นเอมากกว่า 1 สปอร์ เช่น ในชุดการทดลองที่ 2 ตัวอย่างของสปอร์ *Acaulospora* sp. NNs1 ที่มีลักษณะทางสัณฐานเหมือนกันจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และสปอร์จำนวน 5-10 สปอร์ได้นำมาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งผลที่ได้พบว่าเชื้อ *Acaulospora* ที่เลือกการศึกษานั้นสามารถจัดจำแนกชนิดได้ถึง 5 ชนิด แตกต่างกัน คือ *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora* sp., Uncultured *Acaulospora* และ *Kuklospora kentinensis* (*Acaulospora kentinensis*) (ตารางที่ 16) เช่นเดียวกับ *Scutellospora* sp. NNs2 เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสามารถจัดจำแนกชนิดได้ 2 ชนิด คือ *Scutellospora nodosa* และ *Scutellospora gilmorei* เป็นต้น ส่วนชุดการทดลองที่ 3 สปอร์ของ *Acaulospora* sp. CRNNs1 และ *Scutellospora* sp. CRNNs2 พบว่าเป็น *Acaulospora scrobiculata* และ *Scutellospora nodosa* ตามลำดับ

เมื่อศึกษาชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากปาล์มน้ำมันที่มีการใส่หัวเชื้อ จากผลการทดลองตรวจพบเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น และบางชนิดที่ตรวจพบสปอร์ในดินแต่ไม่พบในราก เช่น ชุดการทดลองที่ 3 พบสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 2 ชนิด แต่ตรวจพบในรากเพียงชนิดเดียวคือ *Scutellospora nodosa* เท่านั้น อาจเนื่องมาจากการสุ่มรากตัวอย่างมาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมมีจำนวนน้อยเกินไปทำให้ได้จำนวนชนิดของตัวอย่างไม่ครอบคลุม หรืออาจเนื่องมาจากปริมาณการติดเชื้อในรากของ *A. scrobiculata* มีจำนวนน้อยกว่า *S. nodosa* มากทำให้ตรวจหาไม่พบ เป็นต้น

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ตรวจพบในปาล์มน้ำมันที่เดิมหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

ชุดการทดลอง	ชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา		
	ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์	ลักษณะทางพันธุกรรมของสปอร์	ลักษณะทางพันธุกรรมของราก
CR	<i>Acaulospora</i> sp. CRs1	-	-
	<i>Scutellospora</i> sp. CRs2	-	-
NN	<i>Acaulospora</i> sp. NNs1	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	
		<i>Acaulospora</i> sp.	
		Uncultured <i>Acaulospora</i>	
		<i>Kuklospora kentinensis</i>	
	<i>Scutellospora</i> sp. NNs2	<i>Scutellospora nodosa</i>	
		<i>Scutellospora gilmorei</i>	
	<i>Glomus</i> sp. NNs3	<i>Glomus intraradices</i>	
CR+NN	<i>Acaulospora</i> sp. CRNNs1	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	
	<i>Scutellospora</i> sp. CRNNs2	<i>Scutellospora nodosa</i>	<i>Scutellospora nodosa</i>
	<i>Scutellospora</i> sp. CRNNs3		

การผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันให้มีคุณภาพและมาตรฐาน เพื่อรองรับการปลูกในแต่ละฤดูกาลเป็นปัจจัยสำคัญ พื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันที่เคยเป็นพื้นที่ว่างเปล่า พื้นที่ป่า หรือเคยปลูกพืชอย่างอื่นมาก่อน ในแต่ละพื้นที่อาจจะประสบปัญหา หากขาดการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันระหว่างราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และระบบรากของปาล์มน้ำมัน ดังคำกล่าวที่ว่า *“The study of plants without their mycorrhizas is the study of artefacts. The majority of plants, strictly speaking, do not have roots; they have mycorrhizas”* (BEG-Committee, 25th May 1993) ถ้าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่นำไปปลูกใหม่มีคุณภาพต่ำ มีอัตราการตายสูง การเจริญเติบโตเป็นไปอย่างช้า และแคระแกรน หรือโดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าในดินมีฟอสฟอรัสต่ำหรือถูกตรึงอยู่ในดินจะส่งผลให้ปาล์มน้ำมันมีผลผลิตต่ำลงด้วย ซึ่งจะมีผลทำให้โครงการล้มเหลว หรือไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร นอกจากนี้จากข้อกำหนดของ the Roundtable on Sustainable Palm Oil (RSPO) สวนปาล์มหรือผู้ผลิตน้ำมันปาล์มที่ได้มาตรฐาน จะต้องมีการจัดการสวนปาล์มที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จึงจะได้รับการรับรองคุณภาพมาตรฐานจาก RSPO (Roundtable on Sustainable Palm Oil, 2007) โครงการวิจัยนี้ได้ตระหนักถึงความสำคัญของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และการศึกษาการนำไปประยุกต์ใช้ทางการเกษตรเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของพืช ว่ามีบทบาทและความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพของประเทศไทย ดังนั้นโครงการนี้จึงมีเป้าหมายหลักคือ การใช้ความรู้ที่ได้จากการวิจัย เพื่อช่วยพัฒนาการผลิตแบบเกษตรยั่งยืน โดยการใช้จุลินทรีย์ที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้ถูกคัดเลือกโดยธรรมชาติว่าเหมาะสมกับภูมิอากาศและสภาวะแวดล้อมในประเทศไทย เพื่อที่จะใช้ผลิตเป็นหัวเชื้อสำหรับเพาะให้กับกล้าไม้ในแปลงเพาะ ก่อนย้ายนำไปปลูก ซึ่งจะช่วยเร่งอัตราการเจริญเติบโตของพืช และเพื่อทดแทนหรือเพื่อการลดการใช้ปุ๋ยเคมีโดยเฉพาะปุ๋ยฟอสเฟตในขั้นตอนของการผลิตพืช ทำให้ต้นทุนการผลิตพืชน้อยลงแล้ว ยังเป็นการปรับปรุงคุณภาพของดินด้วย

การสำรวจและเก็บตัวอย่างราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินบริเวณรากพืชจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมัน ในพื้นที่ขยายการปลูกปาล์มน้ำมัน 5 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ เชียงราย น่าน ตราด ฉะเชิงเทรา และหนองคาย ระหว่างช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2550-กันยายน 2550 โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างหลายๆจุดที่ระดับความลึก 15 เซนติเมตร ตัวอย่างดินที่รวบรวมได้นำมาวิเคราะห์สมบัติของดิน ตรวจสอบสเปกตรัม และจำแนกชนิดราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ตรวจสอบการติดเชื้อในรากปาล์มน้ำมัน จากการศึกษาพบว่าดินส่วนใหญ่เป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง มีปริมาณของธาตุอาหารหลัก N P K อยู่ระหว่าง 0.06-0.26%, 42-656 ppm และ 70-320 ppm ตามลำดับ เนื่องจากเกษตรกรมีการให้ปุ๋ยกับปาล์มน้ำมันเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟอสฟอรัส (triple superphosphate) ในอัตรา 65-120 kg/ha/year (phosri et al. 2010)

ปาล์มน้ำมันมีระบบรากฝอย มีรากที่แตกแขนงทอดไปตามแนวนอน และประสานกันอย่างหนาแน่นอยู่ที่บริเวณผิวดิน ไม่มีขนราก (Corner 1966) ดังนั้นการดูดน้ำและแร่ธาตุของปาล์มน้ำมันจึงต้องพึ่งพาราก

บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในการทำหน้าที่แทน (Corley & Tinker 2003) จากการตรวจหา และคัดแยกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินตัวอย่าง โดยวิธี wet sieving and decanting technique พบสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่เกิดอยู่เดี่ยวๆ อย่างน้อย 4 สกุล ได้แก่ *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora* และ *Scutellospora* จำนวนไม่น้อยกว่า 50 สายพันธุ์ โดยพบว่าสกุล *Glomus* มีการกระจายมากที่สุด พบได้ในดินตัวอย่างทุกแหล่ง สอดคล้องกับรายงานของ Nadarajah (1980) ที่สำรวจราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาครั้งแรกในดินรอบรากปาล์มน้ำมันในมาเลเซีย พบว่าราส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Glomus* และ *Acaulospora* นอกจากสปอร์ราที่ตรวจพบ และคัดแยกได้จากดินแล้ว ยังตรวจพบโครงสร้างของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากปาล์มน้ำมันด้วย โครงสร้างที่ตรวจพบ ได้แก่ สปอร์ที่เกิดภายในราก เวสิเคิล (vesicle) เส้นใยรอบราก (external hyphae) และเส้นใยขดเป็นวงในราก (hyphal coil) พบโครงสร้างคล้ายต้นไม้หรืออาร์บัสคูล (arbuscule) สอดคล้องกับรายงานของ Nadarajah (1980) ด้วย

จากการศึกษาเพื่อการจัดจำแนกชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างสปอร์ และรากปาล์มน้ำมันโดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ SSU, ITS และบางส่วนของ LSU ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำไปโคลน และวิเคราะห์คอมพิวแทนท์โคลนที่ได้จำนวนไม่น้อยกว่า 700 โคลน ด้วยเทคนิค SSCP เพื่อการจัดกลุ่มก่อนคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนทั้งสิ้น 78 โคลน ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดยการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับฐานข้อมูล GenBank พบว่าสามารถระบุชนิดของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ถูกต้องชัดเจนในระดับ genus และ/หรือ species ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 95-99% โดยพบสปอร์รา *A. tuberculata* ในดินเป็นส่วนใหญ่ รองลงมาคือ *Glomus* (*G. versiforme*, *G. manihotis* และ *G. mosseae*) และ uncultured *Gigaspora* และ *Gi. rosea* ราสกุล *Acaulospora* มีลักษณะเป็น facultative symbionts สามารถปรับตัวให้เข้ากับพืชอาศัยชนิดต่างๆ และสภาพแวดล้อมของดินที่แตกต่างกันได้ดี โดยเฉพาะดินที่เป็นกรดจึง พบเป็นชนิดเด่นในดิน และมีจำนวนมาก (Abbott & Robson 1991, Sieverding 1991, Shepherd et al. 1996, Straker et al. 2010) ส่วนราสกุล *Glomus* มีลักษณะเป็น generalist สามารถพบได้ทั่วไป พบกระจายในเขตหนาว เขตอบอุ่น และเขตร้อนชื้นของโลก โดยมักพบในดินที่เป็นกรด-ด่างๆอ่อน (Mukerji et al. 2002) แต่ดินในสวนปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่เป็นดินกรดสูง (pH 4.0-5.8) จึงอาจทำให้พบสปอร์ราในสกุลนี้ได้น้อย

ราในสกุล *Gigaspora* สร้างสปอร์ขนาดใหญ่ มักเจริญได้ดีในเนื้อดินประเภทที่มีทรายผสมอยู่ (Lee & Koske 1994) แต่พบสปอร์ได้น้อยในดินปาล์มน้ำมัน อาจเนื่องจากราในสกุลนี้ ต้องใช้เวลาในการสร้างสปอร์นานกว่าราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดอื่นๆ ที่สร้างสปอร์ที่มีขนาดเล็ก นอกจากนี้ระยะเวลาในการสุ่มตัวอย่างหรือฤดูกาล และจำนวนตัวอย่างอาจมีผลต่อการพบหรือไม่พบสปอร์ราชนิดนั้นๆ ด้วย เนื่องจากราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบางชนิดอาจยังไม่สร้างสปอร์ ในช่วงที่สุ่มเก็บตัวอย่าง โดยราบางชนิดต้องใช้เวลามากกว่า 20 เดือน จึงจะสร้างสปอร์ (Oehl et al. 2004)

การจำแนกชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่อยู่ในรากปาล์มน้ำมันในแหล่งปลูกต่างๆ พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำ คืออยู่ระหว่าง 87-95% และมีเพียงบางตัวอย่างเท่านั้นที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูง คือ อยู่ระหว่าง 97-98% ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่าในรากปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่ติดเชื้อราในสกุล *Scutellospora* (*S. heterogama*, *S. reticulata*, *S. nodosa*, *S. gilmorei*) ซึ่งพบในทุกพื้นที่ที่ทำการศึกษา รองลงมาคือ *Glomus* (*G. sinuosum*, *Glomus* sp., uncultured *Glomus*) แต่จากการศึกษา

พบสปอร์ราในสกุล *Scutellospora* ได้น้อยในดินปาล์มน้ำมัน เนื่องจากรา *Scutellospora* มีลักษณะคล้ายกับราสกุล *Gigaspora* คือสร้างสปอร์ขนาดใหญ่ ต้องใช้เวลาในการสร้างสปอร์นานกว่าราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดอื่นๆ ที่สร้างสปอร์ที่มีขนาดเล็ก นอกจากนี้ระยะเวลาในการสุ่มตัวอย่างหรือฤดูกาล และจำนวนตัวอย่างอาจมีผลต่อการพบหรือไม่พบสปอร์ราชนิดนั้นๆ เช่นเดียวกับกรณีของรา *Gigaspora*

การเพิ่มปริมาณสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาด้วยวิธี trap culture โดยใช้พืชอาศัยคือ ข้าวฟ่างและปาล์มน้ำมัน พบว่าสามารถทำให้เกิดการสร้างสปอร์ราขึ้นใหม่ได้ โดยสปอร์ที่พบส่วนใหญ่ อยู่ในสกุล *Acaulospora*, *Glomus* และ *Scutellospora* แม้ว่าวิธีดังกล่าวจะเป็นวิธีที่นิยมใช้ทั่วไป แต่มีข้อจำกัดคือพืชอาศัย ระยะเวลาในการสุ่มเก็บตัวอย่าง และปัจจัยสิ่งแวดล้อมในสภาพเรือนเพาะชำ มีผลต่อการสร้างสปอร์ราแต่ละชนิดขึ้นมาใหม่ได้ (Jansa et al. 2002, Oehl et al. 2003, Ahlu et al. 2006) ราบางชนิดอาจสร้างสปอร์ได้เร็ว แต่ราบางชนิดต้องใช้เวลา 18-20 เดือน จึงจะสร้างสปอร์ (Oehl et al. 2005) ดังนั้นอาจไม่พบสปอร์ราบางชนิดได้ภายในดิน นอกจากนี้ชนิดของราที่สร้างสปอร์ได้มากภายใต้สภาวะที่ทำการทดลองหรือที่เจริญอยู่ภายในดิน อาจเป็นสปอร์ราที่อยู่กับพืชอาศัยชนิดอื่นที่มีอยู่ในแปลงปาล์มน้ำมัน จึงแตกต่างจากชนิดของราที่เข้าไปอยู่ภายในเซลล์รากพืชที่เราศึกษาด้วย (Clap et al. 1995, Kowalchuk et al. 2002, Wubet et al. 2003, Renker et al. 2005, Ahlu et al. 2006, Böstler et al. 2006, Hempel et al. 2007) ดังนั้นจำนวนสปอร์ที่เพิ่มปริมาณได้จึงบอกให้ทราบถึงแนวโน้มที่จะนำไปทำเป็นหัวเชื้อต่อไปได้ แต่ไม่ได้แสดงว่าสปอร์ราชนิดนั้นจะเป็นชนิดเดียวกันกับที่อยู่ภายในเซลล์รากพืชเสมอไป อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ได้ใช้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันเป็นพืชอาศัย เพื่อชักนำและเพิ่มการสร้างสปอร์ของราโดยตรง และเมื่อใช้ร่วมกับการตรวจสอบโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ทำให้ทราบข้อมูลได้ว่า ในดินตัวอย่าง มีสปอร์ราชนิดใดบ้างที่สามารถชักนำให้เกิดใหม่ และสร้างไมคอร์ไรซากับปาล์มน้ำมันได้ หรือสปอร์ราชนิดใดที่มีความจำเพาะเจาะจง (host specificity) กับปาล์มน้ำมันอย่างแท้จริง ไม่ใช่เป็นสปอร์ราที่อยู่กับพืชอาศัยชนิดอื่นที่มีอยู่ในแปลงปาล์มน้ำมัน ซึ่งจะช่วยให้ลดขั้นตอน หรือระยะเวลาในการคัดเลือกสปอร์ที่จะนำไปเพิ่มปริมาณเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อหรือการจำแนกชนิดต่อไป การนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้จึงมีความเหมาะสม ทำให้ทราบชนิดของราที่สร้างสปอร์ภายในดิน และที่เจริญอยู่ภายในเซลล์รากพืชว่าเป็นราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดใด โดยช่วยลดข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างซึ่งมีผลต่อการสร้างสปอร์ของราแต่ละชนิดลงได้ แต่จำเป็นต้องใช้จำนวนตัวอย่างรากพืชที่มากพอด้วย เพื่อแสดงถึงตัวแทนของประชากรราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แท้จริงในสังคมหรือแหล่งที่ศึกษา การนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ยังทำให้ทราบด้วยว่ารากพืชอาจมีจำนวนชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่เจริญอยู่ในรากพืชหลายชนิด บางชนิดอาจเป็นชนิดใหม่ที่ไม่เคยรายงานมาก่อน แสดงถึงความหลากหลายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทางพันธุกรรมที่มีมากกว่าการศึกษาโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานของสปอร์แต่เพียงอย่างเดียว เช่น ในการศึกษาพบว่ามีราสกุล *Paraglomus* และชนิดที่เป็น unknown *Glomus* เป็นต้น เจริญอยู่ในรากปาล์มน้ำมันที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย ด้วย แตกต่างจากรายงานการศึกษาอื่นในประเทศไทยที่ไม่เคยรายงาน หรือพบรา *Paraglomus* อยู่เลย (Youpensuk et al. 2004, Nandakwang et al. 2008, Youpensuk et al. 2008)

จากผลการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 12 เดือน ที่วัดจากความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้น มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน (น้ำหนักแห้งของลำต้น และ ใบ) มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน (น้ำหนักแห้งของราก) และมวลชีวภาพรวม (น้ำหนักแห้งของลำต้น ใบ และราก) ในพริตเมนต์ที่ใส่ดินหัวเชื้อ CR, NN, CR+NN มีการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมันดีกว่าพริตเมนต์ชุดควบคุม สอดคล้องกับหลายๆ ผลการศึกษาที่พบว่าการใส่หัว

เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาช่วยกระตุ้นการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมันให้ดีขึ้น Motta & Munéva (2005) รายงานว่ากล้าปาล์มน้ำมันอายุ 570 วัน ที่ใส่หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา มีการเจริญของทางความสูงมากกว่ากล้าที่ไม่ได้รับการใส่หัวเชื้อถึง 3 เท่า Blal et al. (1990) พบว่ากล้าปาล์มน้ำมันที่เพาะจากเนื้อเยื่อ และได้รับการใส่หัวเชื้อราและให้ปุ๋ย rock phosphate ร่วม มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นสูงกว่ากล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ใส่หัวเชื้อ 4-5 เท่า Widiastuti & Tarhardi (1993) พบว่าการใส่หัวเชื้อราให้กับกล้าปาล์มน้ำมันช่วยให้การเจริญและการดูดแร่ธาตุโดยเฉพาะอย่างยิ่ง P ในพืชสูงขึ้นถึงร้อยละ 37-44 และมีอัตราการรอดตายของกล้าปาล์มน้ำมันเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ Widiastuti & Tarhardi (1993) ยังพบว่าปริมาณปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ใส่ให้กับกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อรา *Gi. margarita* มีจำนวนลดลงด้วย Zakaria (2006) รายงานว่า กล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อรา มีการเจริญเติบโตดี และสามารถนำไปปลูกลงในแปลงได้เร็วกว่ากล้าปาล์มที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อถึง 4 เดือน Schultz (2001) ทดสอบการใส่หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 12 ชนิด ให้กับกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเนื้อเยื่อ พบว่าการใส่หัวเชื้อราให้กับกล้าปาล์มน้ำมันทำให้อัตราการรอดตายของกล้าปาล์มน้ำมันในเรือนเพาะชำสูงขึ้น ถึงร้อยละ 83-100 แต่ขึ้นอยู่กับชนิดของรา โดยรา *A. mellea* และ *G. mosseae* ทำให้กล้าปาล์มน้ำมันทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และรอดตายได้มากกว่าชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบผลทางสถิติของแต่ละทรีตเมนต์ที่ใส่ดินหัวเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุม กลับพบว่าในหลาย ๆ พารามิเตอร์ที่ใช้วัดการเจริญของกล้าไม้ เช่น เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับคอรากของลำต้น มวลชีวภาพส่วนเหนือดิน มวลชีวภาพส่วนใต้ดิน มวลชีวภาพรวม มีค่าเฉลี่ยของบางทรีตเมนต์ที่ใส่ดินหัวเชื้อ และชุดควบคุมมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นดินหัวเชื้อ CR+NN ที่ให้ค่าเฉลี่ยดังกล่าวสูงกว่าทุกทรีตเมนต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เนื่องจากมาจากชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แตกต่างกันอาจมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมันได้แตกต่างกัน Schultz (2001) พบว่าการใส่หัวเชื้อราให้กับกล้าปาล์มน้ำมันทำให้การเจริญทางความสูงของกล้าปาล์มน้ำมันเพิ่มขึ้นแตกต่างกัน 2-2.5 เท่าขึ้นอยู่กับชนิดของรา โดยการใส่หัวเชื้อราบางชนิด เช่น *Gi. gigantea* มีการเจริญทางความสูงไม่แตกต่างไปจากชุดควบคุมที่ไม่ใส่หัวเชื้อ Schultz (2001) ยังพบว่าอัตราการเจริญทางความสูง (ต่อวัน) น้ำหนักสดส่วนเหนือดินและใต้ดิน น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดินและใต้ดิน จำนวนใบ ของกล้าปาล์มน้ำที่ได้รับ การใส่หัวเชื้อราชนิดต่างๆ จะมีค่าสูงกว่ากล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้รับการใส่หัวเชื้อ โดยราแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญในด้านต่างๆ ของกล้าปาล์มน้ำมันที่ต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของราด้วย นอกจากนี้ Meddad-Hamza et al (2010) พบว่ากล้าต้นมะกอก (olive seedling) ที่ใส่หัวเชื้อรา *G. mosseae* และ *G. intraradices* เมื่ออายุ 9 เดือน มีการเจริญที่ต่างกัน โดยกล้าที่ได้รับหัวเชื้อรา *G. mosseae* มีอัตราการเจริญของมวลชีวภาพสูงกว่ากล้าที่ได้รับหัวเชื้อรา *G. intraradices*

ดังนั้นการคัดเลือกชนิด หรือสายพันธุ์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่เหมาะสม ที่มีสมบัติการติดเชื้อในรากพืชสูง และมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของกล้าปาล์มน้ำในด้านต่างๆ ได้ดี จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นเนื่องจากโดยธรรมชาตินั้น ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีความสัมพันธ์กับรากพืชมีอยู่มากมายหลายชนิด ราแต่ละชนิดก็จะมีผลต่อพืชอาศัยในทางที่ต่างกัน การคัดเลือกชนิดของรา หรือสายพันธุ์ที่เหมาะสมให้กับพืชจึงเป็นเรื่องที่จำเป็นอย่างยิ่ง Trappe (1977) กล่าวว่า เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกราสายพันธุ์ที่เหมาะสม นั้น

จะแตกต่างกันไป แล้วแต่ความต้องการ ซึ่งอาจจะพิจารณาจาก ความสามารถในการดูดซึมธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืช, ความทนทานต่อความเป็นพิษของดิน, ความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัย (host specificity), ความชื้น, อุณหภูมิ, ความเป็นกรดต่าง (pH) ในระหว่างปัจจัยเหล่านี้ อุณหภูมิ และ pH ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของราหรือสายพันธุ์ราที่เหมาะสมนั้น โดยราควรจะปรับตัวให้เข้ากับอุณหภูมิ และ pH ของดินหรือสับสเตรตในเรือนเพาะชำหรือสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพนิเวศของแต่ละพื้นที่ปลูกได้เป็นอย่างดีทีเดียว

สรุป

รายงานวิจัยฉบับนี้เป็นรายงานการวิจัยฉบับแรกที่ได้ใช้วิธีทางชีวโมเลกุลด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับรา ร่วมกับวิธีทางสัณฐานวิทยา เพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่สร้างสปอร์ภายในดิน และอยู่ในรากของปาล์มน้ำมันของประเทศไทย จากจำนวนโคลนกว่า 700 โคลน จัดกลุ่มก่อนคัดเลือกมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนทั้งสิ้น 78 โคลน ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดยการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับฐานข้อมูลนานาชาติ (GenBank) พบว่าสามารถระบุชนิดของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ถูกต้องชัดเจนในระดับ genus และ/หรือ species ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 95-99% จากลักษณะปาล์มน้ำมันซึ่งเป็นพืชที่มีระบบรากฝอย มีรากที่แตกแขนงทอดไปตามแนวนอน และประสานกันอย่างหนาแน่นอยู่ที่บริเวณผิวดิน ไม่มีขนราก ดังนั้นการดูดน้ำและแร่ธาตุของปาล์มน้ำมันจึงต้องพึ่งพาราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในการทำหน้าที่แทน การศึกษาครั้งนี้พบว่า ในดินรอบรากปาล์มน้ำมันมีราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่หลากหลายชนิด บางชนิดเป็นชนิดที่พบได้ทั่วไป บางชนิดอาจเป็นชนิดใหม่ที่ไม่เคยรายงานมาก่อน เมื่ออยู่ในรากพืชราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมันได้แตกต่างกัน ดังนั้นการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ของราที่เหมาะสมจึงจำเป็นอย่างยิ่ง เมื่อได้สายพันธุ์ราที่เหมาะสม การเตรียมหัวเชื้อรากก็สามารถเพิ่มปริมาณและทำได้ในเรือนเพาะชำ การประยุกต์ใช้หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะช่วยปรับปรุงกล้าปาล์มน้ำมันให้มีคุณภาพดีขึ้น สามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อยู่รอดปลอดภัยเมื่อย้ายนำไปปลูกได้ และยังสามารถทดแทนหรือเพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมี โดยเฉพาะปุ๋ยฟอสเฟตในขั้นตอนของการผลิตพืช ทำให้ต้นทุนการผลิตพืชน้อยลงแล้ว ยังเป็นการปรับปรุงคุณภาพของดิน และสอดคล้องกับนโยบายของ The Roundtable on Sustainable Palm Oil (RSPO) ที่กำหนดให้สมาชิกสวนปาล์มหรือผู้ผลิตน้ำมันปาล์มที่ได้มาตรฐาน จะต้องมีการจัดการสวนปาล์มน้ำมันที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จึงจะได้รับการรับรองคุณภาพมาตรฐานจากRSPO อีกด้วย

- ชาย โฆรวิส และสุรกิตติ ศรีกุล. 2547. เอกสารวิชาการปาล์มน้ำมัน: ประวัติและความเป็นมา. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-14.
- ณัฐวรารักษ์ สงวนราชทรัพย์. 2530. ชนิดและผลของเชื้อราเวสสิคูลา อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้บางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ธงชัย มาลา. 2541. การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา VAM ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการดูดกินฟอสฟอรัสในข้าวโพดและถั่วเหลือง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 19 หน้า.
- สุเทพ พูนสวัสดิ์ และโกวิท ยันตรศาสตร์. 2541. การใช้เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในการปลูกป่า. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 19 หน้า.
- สุนัดดา โยมญาติ. 2545. ผลของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและราเคโดไมคอร์ไรซา *Pisolithus sp.* สายพันธุ์คัดต่อการกระตุ้นการเจริญของกล้าไม้ยูคาลิปตัส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- ไพรัตน์ พิมพ์ศิริกุล. 2540. การใช้เชื้อราไวโอไมคอร์ไรซาร่วมกับจุลินทรีย์ละลายฟอสฟอรัสเพื่อเพิ่มผลผลิตของถั่วเหลืองที่ปลูกเชื้อไรโซเบียม. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 17 หน้า.
- พรพิมล อธิปัญญาคม. 2531. ชนิดและการเพิ่มปริมาณเชื้อราเวสสิคูลา อาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซาและผลของเชื้อราต่อการเจริญเติบโตของส้ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- Abbott LK, Robson AD. 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 35: 121-150.
- Ahlu EM, Gollette A, Gianinazzi-Pearson V, Nonaka M. 2006. Coocuring plants forming distinct arbuscular mycorrhizal morphologies harbor similar AM fungal species. *Mycorrhizas* 17: 37-49.
- Anonymous. 2003. *Ganoderma* versus mycorrhizas. Oil palm bulletin. November No. 47. <http://palmoilis.mpob.gov.my/publications/opb47.html>
- Azcón-Aguilar C, Barea JM. 1996. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia horticulture* 68: 1-24.
- Bianciotto V, Bonfante P. 1992. Quantification of the nuclear DNA content of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 96: 1071-1076.
- Blal B, Gianinazzi-Pearson V. 1990. Interest of endomycorrhizae for the production of micropropagated oil palm clones. *Agricultural, Ecosystem & Environment* 29 (1-4): 39-43.
- Blal B, Morel C, Gianinazzi-Pearson V, Fardeau JC, Gianinazzi S. 1990. Influence of vesicular- arbuscular mycorrhizae on phosphate fertilizer efficiency in two tropical acid soils planted with micropropagated oil palm (*Elaeis guineensis* jacq.). *Biology and fertility of soils* 9: 43-48.
- Borowicz VA. 2001. Do arbuscular mycorrhiza fungi alter plant-pathogen relations? *Ecology* 82: 3057-3068.

- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR monograph, Canberra, Australia.
- Brundrett M. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plant: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant & Soil* 320: 37-77.
- Bever JD, Schultz PA, Pringle A, Morton JB. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi: More diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *Bioscience* 51: 923 - 931.
- Böstler B, Renker C, Kahmen A, Buscot F. 2006. Species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in two mountain meadows with differing management types and level of plant biodiversity. *Biology & Fertility of Soils* 42: 286-298.
- Cardoso IM, Boddington C, Janssen BH, Oenema O, Kuyper TW. 2003. Distribution of mycorrhizal fungal spores in soils under agroforestry and monocultural coffee systems in Brazil. *Agroforestry Systems* 58: 33-43.
- Clap JP, Young JPW, Merryweather JW, Fitter AHL. 1995. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytologist* 130: 259-265.
- Clap JP, Rodriguez A, Dodd JC. 2001. Inter-and intra-isolate rRNA large subunit variation in *Glomus coronatum* spores. *New Phytologist* 149: 539-554.
- Corley, R.H.V. & Tinker, P.B. (2003). The Oil Palm. 4th Edition. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK. 592pp.
- Daniels BA, Skipper HD. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In Schenck NC (ed.), *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, St.Paul, Minnesota, 29-35.
- Corner EJH. 1966. The natural history of palms. Weidenfeld & Nicolson, London.
- Dodd JC, Dougall TA, Clapp JP, Jeffries P. 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant community establishment at Samphire Hoe, Kent, UK-the reclamation platform created during the building of the channel tunnel between France and the UK. *Biodiversity and Conservation* 11: 39-58.
- Duffy EM, Cassells AC. 2000. The effect of inoculation of potato (*Solanum tuberosum* L.) microplants with arbuscular mycorrhizal fungi on tuber yield and tuber size distribution. *Applied Soil Ecology* 15: 137-144.
- Fitter AH. 2005. Darkness visible: Reflections on underground ecology. *Journal of Ecology* 93: 231-243.
- Fortuna P, Citernesi AS, Morini S, Vitagliano C, Giovannetti M. 1996. Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphate fertilization on shoot apical growth of micropropagated apple and plum rootstocks. *Tree Physiology* 16 (9): 757-763.
- Gerdemann JW, Nicolson TH. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transaction of British Mycological Society* 46: 235-244.

- Gnekow M, Marschner H. 1989. Role of VA-mycorrhiza in growth and mineral nutrition of apple (*Malus pumila* var. *domestica*) rootstock cuttings. *Plant and Soil* 119: 285-293.
- Gosling P, Hodge A, Goodlass G, Bending GD. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi for organic farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 113: 17-35.
- Grace EJ, Cotsaftis O, Tester M, Smith FA, Smith SE. 2009. Arbuscular mycorrhizal inhibition of growth in barley cannot be attributed to extent of colonization, fungal phosphorus uptake or effects on expression of plant phosphate transporter genes. *New Phytologist* 181: 938-949.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Harley JL, Smith SE. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Helgason T, Daniell T, Husband R, Fitter A, Young JPW. 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431.
- Helgason T, Merryweather J, Denison J, Wilson P, Young JPW, Fitter A. 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90: 371-384.
- Hempel S, Renker C, Buscot F. 2007. Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root, and soil communities in a grassland ecosystem. *Environmental Microbiology* 9: 1930-1938.
- Hijri M, Sanders IR. 2004. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Genetics and Biology* 41: 253-261.
- Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H. 1998. Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. *Genome* 41: 422-428.
- Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard E. 2002. Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhizas* 12: 225-234.
- Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of soils* 37: 1-16.
- Koide RT, Mosse B. 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14: 145-163.
- Kowalchuk GA, De Souza FA, Van Veen JA. 2002. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal and dunes. *Molecular Ecology* 11: 571-581.
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüßler A. 2009. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 183: 212-223.

- Kuo S. 1996. Phosphorus. In Bigham JM (ed.) Methods for soil analysis, Part1. Chemical method. SSSA, Madison, WI, 869-920.
- Lee PJ, Koske RE. 1994. *Gigaspora gigantea*: seasonal, abundance and ageing of spores in a sand dune. *Mycological Research* 98: 453-457.
- Lee J, Lee S, Young JPW. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 339-349.
- Li L, Li T, Zhao Z. 2007. Differences of arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community between a cultivated land, an old field, and a never-cultivated field in a hot and arid ecosystem of southwest China. *Mycorrhiza* 17: 655-665.
- Li X, Marschner H, George E. 1991. Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. *Plant & Soil* 136: 49-57.
- Lovato PE, Gianinazzi-Pearson V, Trouvelot A, Gianinazzi S. 1996. The state of art of mycorrhizas and micropropagation. *Advanced Horticulture Science* 10: 46-52.
- Mäder P, Vierheilig H, Streitwolf-Engel T, Boller T, Frey P, Christie P, Wiemken A. 2000. Transport of ¹⁵N from a soil compartment separated by a polytetrafluoroethylene membrane to plant roots via the hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 146: 155-161.
- Meddad-Hamza A, Beddiar A, Gollotte A, Lemoine MC, Kuszala C, Gianinazzi. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi improve the growth of olive trees and their resistance to transplantation stress. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 9(8): 1159-1167.
- Meharg AA, Cairney JWG. 2000. Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments. *Advance in Ecological Research* 30: 69-112.
- Menge JA, Timmer LW. 1982. Procedure for Inoculation of Plants with vesicular-arbuscular mycorrhizae in the laboratory, greenhouse, and field. In Schenck NC (ed.), *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, St.Paul, Minnesota, 59-68.
- Miller RM, Jastrow JD. 1992. The application of VA mycorrhizae to ecosystem restoration and reclamation. In Allen MF (ed.) *Mycorrhizal functioning*. Chapman & Hall, London, England, 438-467.
- Miyasaka SC, Habte M, Friday JB, Johnson EV. 2003. *Manual on arbuscular mycorrhizal fungus production and inoculation techniques*. University of Hawaii at Manoa.
- Motta DV, Munévar FM. 2005. Response of oil palm seedlings to mycorrhization. *Palmas Journal*. 26, 11.
- Mukerji KG, Manoharachary C, Chamola BP. 2002. *Techniques in mycorrhizal studies*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Nadarajah P. 1980. Species of endogonaceae and mycorrhizal association of *Elaeis guineensis* and *Theobroma cacao*. In: Mikola, P. (Ed), Tropical mycorrhiza research. Clarendon Press, Oxford, pp 232-237.
- Nadarajah P, Nawawi A. 1993. Mycorrhizal status of epiphytes in Malaysian oil palm plantations. *Mycorrhiza* 4: 21-25.
- Nandakwang P, Elliott S, Dell B, Teaumroong N, Lumyong S. 2008. Arbuscular mycorrhizal status of indigeneous tree species used for restore seasonally dry tropical forest in Northern Thailand. *Research Journal of Microbiology* 3: 51-61.
- Querejeta JI, Egerton-Warburton LM, Allen MF. 2007. Hydraulic lift may buffer rhizosphere hyphae against the negative effects of severe soil drying in a California Oak savanna. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 409-417.
- 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 Environmental Microbiology* 69: 2816-2824.
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Boller T, Wiemken A. 2004. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138: 574-583.
- Oehl F, Redecker D, Sieverding E. 2005. *Glomus badium*, a new sporocarpic mycorrhizal fungal species from European grassland with higher soil pH. *Journal of Applied Botany & Food Quality-Angewandte Botanik* 79: 38-43.
- Rillig MC. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science* 84: 355-363.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhizal: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*. 6: 763-775.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of British Mycological Society*. 55(1): 158-161.
- Phosri C, Rodriguez A, Sanders IR, Jeffries P. 2010. The role of mycorrhizas in more sustainable oil palm cultivation. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 135: 187-193.
- Redecker D. 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73-80.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921.
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD. 2000b. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 276-284.

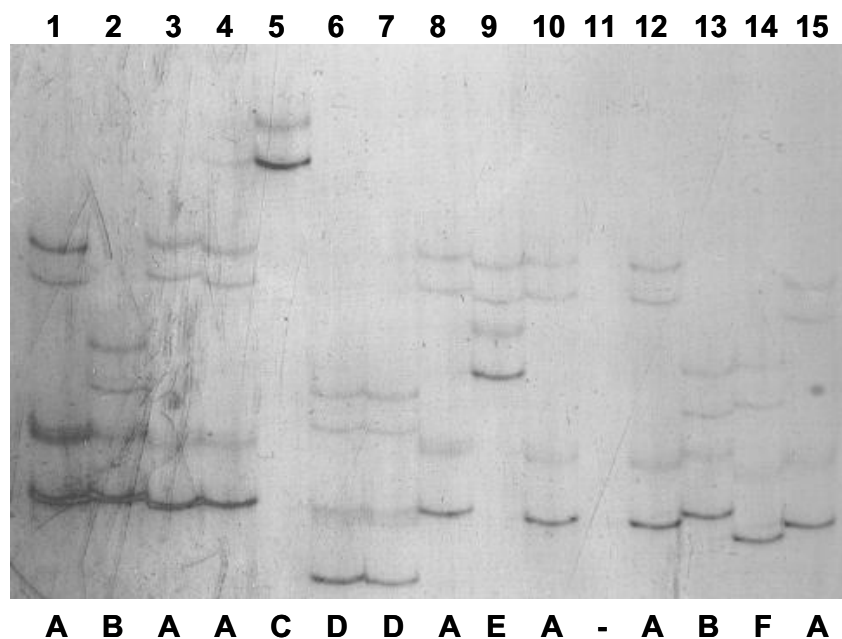
- Renker C, Blanke V, Buscot F. 2005. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by fertilizer plant. *Environmental Pollutant* 135: 255-266.
- Renker C, Heinrichs J, Kaldorf M, Buscot F. 2003. Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza* 13: 191-198.
- Roundtable on Sustainable Palm Oil, 2007. RSPO principles and criteria for sustainable palm oil production. RSPO paper, pp. 1-53. http://www.rspo.org/resource_centre/RSPO%20Principles%20&%20Criteria%20Document.pdf (accessed 4 January, 2009)
- Rodriguez A, Dougall T, Dodd JC, Clap JP. 2001. The large subunit ribosomal RNA genes of *Entrophospora infrequens* comprise sequences related to two different glomalean families. *New Phytologist* 152:159-167.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, vol. i. 2nd edition. Cold spring harbor laboratory press. Isbn 0-87969-309-6.
- Sawaki H, Sugawara K, Saito M. 1998. Phylogenetic position of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora gerdemannii*, and its synanamorph *Glomus leptotichum*, based upon 18S rRNA gene sequence. *Mycoscience* 39: 477-480.
- Schenck NC, Perez N. 1987. *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi*. University of Florida, Gainesville, Florida, USA.
- Schüßler A. 2001. Analysis of partial Glomales SSU rRNA genes: implications for primer design and phylogeny. *Mycological research* 105: 5-15.
- Schüßler A, Walker C. 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. (Electronic version freely available online at www.amf-phylogeny.com)
- Schultz, C. (2001). Effect of (vesicular-) arbuscular mycorrhiza on survival and post vitro development of micropropagated oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.). In Faculty of Agricultural Sciences (University of Göttingen), pp. 143.
- Setiadi Y, Jeffries P, Dodd JC. 2000. The application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to improve tree legume establishment in a nickel mine site in Indonesia. *Indonesian Journal of Biotechnology*, special issue: 359-367.
- Shepherd KD, JEFwa J, Wilson J, Ndufa JK, Ingleby K, Mbuthu KW. 1996. Infection potential of farm soils as mycorrhizal inocula for *Leucaena leucocephala*. *Biology & Fertility of soil* 22: 16-21.
- Sieverding E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhizal management in tropical agrosystems. German Technical co-operation (GZT). Eschborn, Germany.
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 291-295.

- Siqueira J, Saggin-Junior OJ, Flores-Aylas WW, Guimaraes PTG. 1998. Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. *Mycorrhiza* 7; 293-300.
- Smith SE, Read DJ. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Amsterdam; Boston: Academic Press.
- Smith GW, Skipper HD. 1979. Comparison of methods to extract spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science Society of American Journal* 43: 722-725.
- Smith FA, Grace EJ, Smith SE. 2009. More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 182: 347-358.
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. 2003. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology* 133: 16–20.
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. 2004. Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist* 162: 511-524.
- Straker CJ, Hilditch AJ, Rey MEC. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *South African Journal of Botany* 76: 102-111.
- Sýkorová Z, Ineichen K, Wiemken A, Redecker D. 2007. The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza* 18: 1-14.
- Sylvia DM, Hammond LC, Bennett JM, Hass JH, Linda SB. 1993. Field response of Maize to a VAM fungus and water management. *Agron. J.* 85: 193-198.
- Tekmar-Dohrmann. 2000. Installation and operation of the 183 boat sampling module with Phoenix 8000. Document part number 14-722-074. Tekmar-Dohrmann, Cincinnati, OH.
- Thomas GW. 1996. Soil pH and soil acidity. In Bigham JM (ed.) *Methods for soil analysis, Part 1. Chemical method*. SSSA, Madison, WI, 475-490.
- Tommerup IC. 1992. Methods for the study of the population biology of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. in: Norris JR, Read DJ & Varma AK (ed.), *Method in Microbiology*. vol. 24. *Techniques for the study of mycorrhizas*, Academic Press, London, 23-51.
- Trappe, J. M. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annual Reviews of Phytopathology* 15 : 203-222.
- Youpensuk S, Lumyong S, Dell B, Rerkasem B. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of *Macaranga denticulata* Muell. Arg. And their effect on the host plant. *Agroforestry Systems* 60: 239-246.

- Youpensuk S, Lordkaew S, Rerkasem B. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with tangerine (*Citrus reticulata*) in Chiang Mai province, northern Thailand, and their effects on the host plant. *ScienceAsia* 34: 259-264.
- van der Heijden MGA, Sanders IR. 2003. Mycorrhizal ecology. Second Edition. Ecological studies, Springer, pp. 157-469.
- Van Tuinen D, Zhao B, Gianinazzi-Pearson V. 1998. PCR in studies of AM fungi: from primers to application. In Varma AK (ed.), *Mycorrhizas manual*, Springer, Berlin, 386-400.
- Varma A, Schuepp H. 1995. Mycorrhization of the commercially important micropropagated plants. *Critical Reviews in Biotechnology* 15 (3-4): 313-328.
- Viera A, Glenn MG. 1990. DNA content of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores. *Mycologia* 82: 263-267.
- Widiastuti H, Tarhadi JS. 1993. Effect of vesicular arbuscular mycorrhizal inoculation on the growth and nutrient uptake of micropropagated oil palm. *Menara Perkebunan* 61 (3): 56-60.
- Wubet T, Weiß M, Kottke, Oberwinkler F. 2003. Morphology and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in wild and cultivated yew (*Taxus baccata*). *The Canadian Journal Of Botany* 81: 255-266.
- Zakaria A. 2006. Soil-enhancing technologies for improving crop productivity in Malaysia and considerations for their use. Proceedings of an International workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use. Land Development Department, Bangkok 10900, Thailand, 16-20 October 2006, pp.1-14.
- Zeze A, Ophel-Keller K, Smith S. 1998. DNA isolation and development of molecular tools for identification and detection of VA mycorrhizal fungi. In Varma AK (ed.), *Mycorrhizas manual*, Springer, Berlin, 373-385.

ภาคผนวก ก

ตัวอย่างการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้จากการโคลนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ D2 และ บางส่วนของ SSU, ITS และบางส่วนของ LSU จากสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และรากปาล์มน้ำมัน ด้วยเทคนิค SSCP

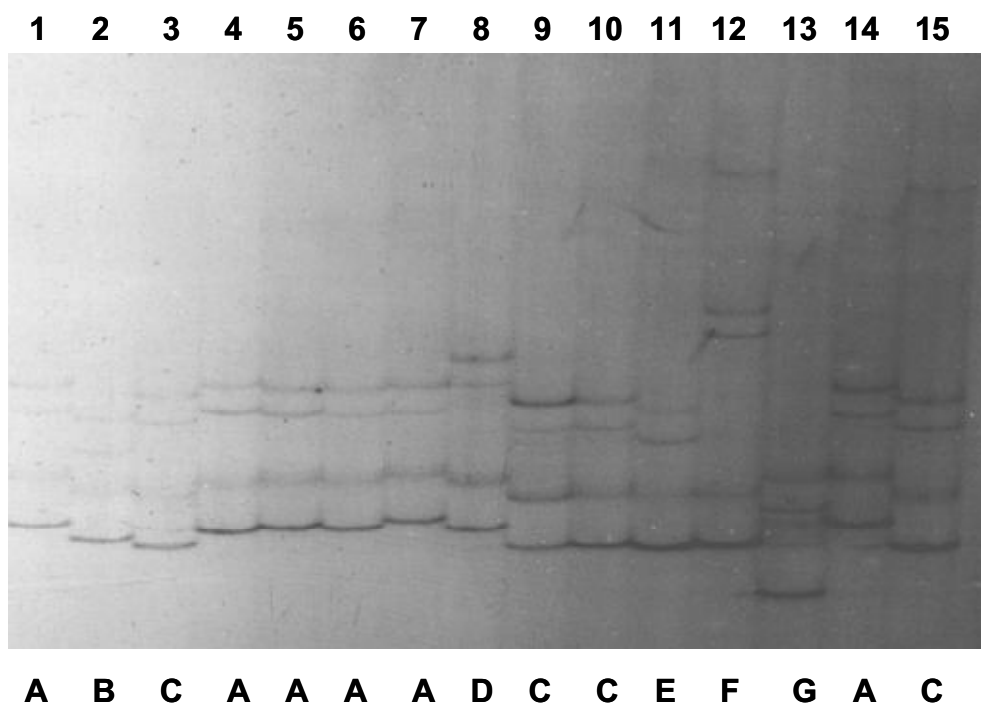


รูปภาคผนวก ก1 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์เจล SSCP ของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจาก จ.เชียงราย จำนวน 15 โคลน (CRns_C2-1 ถึง CRns_C2-15) สามารถจัดกลุ่มได้ 6 กลุ่ม (A – F) ตามลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วย silver

ตารางภาคผนวก ก1 ตารางแสดงการจัดกลุ่มของโคลนสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจาก จ.เชียงราย ชุดที่ 1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP (รูปภาคผนวก ก1)

SSCP profile	Clone	Selected to sequence	BLAST result
A	CRns_C2-1	Sequenced	<i>Acaulospora tuberculata</i> (98%)
	CRns_C2-3	Sequenced	<i>Acaulospora tuberculata</i> (98%)
	CRns_C2-4	-	-
	CRns_C2-8	-	-
	CRns_C2-10	-	-
	CRns_C2-12	-	-
	CRns_C2-15	Sequenced	<i>Acaulospora tuberculata</i> (98%)
B	CRns_C2-2	Sequenced	<i>Acaulospora tuberculata</i> (97%)
	CRns_C2-13	-	-
C	CRns_C2-5	Sequenced	ND
D	CRns_C2-6	Sequenced	<i>Glomus etunicatum</i> (97%)
	CRns_C2-7	Sequenced	Uncultured <i>Gigaspora</i> (97%)
E	CRns_C2-9	Sequenced	ND
F	CRns_C2-14	sequenced	<i>Acaulospora tuberculata</i> (96%)

หมายเหตุ: ND = not determined (ผล sequences ไม่สามารถอ่านได้)



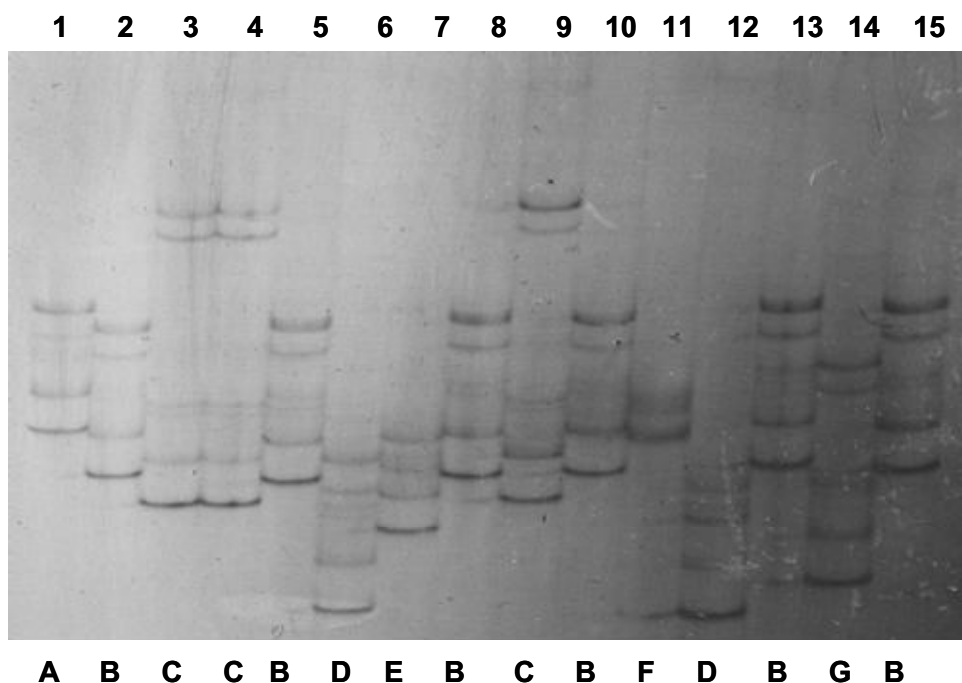
รูปภาคผนวก ก2 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์เจล SSCP ของสปอร์ราอาร์บัสคูลารีไมคอร์ไรซาจาก จ.เชียงราย จำนวน 15 โคลน (CRns_C3-1 ถึง CRns_C3-15) สามารถจัดกลุ่มได้ 7 กลุ่ม (A – G) ตามลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วย silver staining

ตารางภาคผนวก ก2 ตารางแสดงการจัดกลุ่มของโคลนสปอร์ราอาร์บัสคูลารีไมคอร์ไรซาจาก จ.เชียงราย ชุดที่ 2 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP (รูปภาคผนวก ก2)

SSCP profile	Clone	Selected to sequence	BLAST result
A	CRns_C3-1	Sequenced	Uncultured <i>Gigaspora</i> (98%)
	CRns_C3-4	Sequenced	Uncultured <i>Gigaspora</i> (98%)
	CRns_C3-5	-	
	CRns_C3-6	-	
	CRns_C3-7	-	
	CRns_C3-14	-	
B	CRns_C3-2	Sequenced	Uncultured <i>Gigaspora</i> (97%)
C	CRns_C3-3	Sequenced	Uncultured <i>Gigaspora</i> (97%)

	CRns_C3-9	Sequenced	Uncultured <i>Gigaspora</i> (97%)
	CRns_C3-10	-	
	CRns_C3-15	-	
D	CRns_C3-8	Sequenced	Uncultured <i>Gigaspora</i> (98%)
E	CRns_C3-11	Sequenced	<i>Gigaspora rosea</i> (95%)
F	CRns_C3-12	sequenced	<i>Gigaspora rosea</i> (96%)
G	CRns_C3-13	sequenced	ND

หมายเหตุ: ND = not determined (ผล sequences ไม่สามารถอ่านได้)

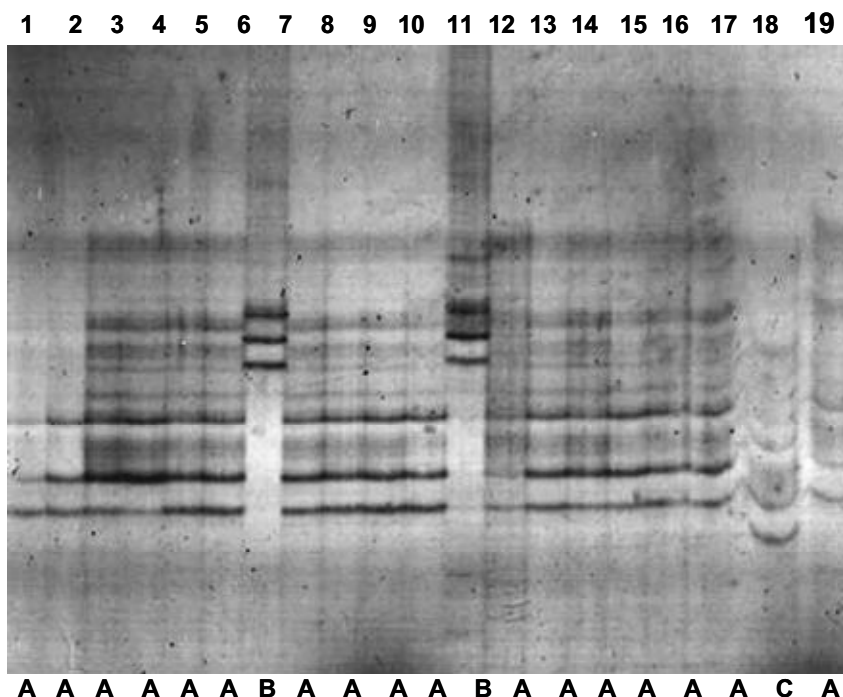


รูปภาคผนวก ก3 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์เจล SSCP ของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจาก จ.น่าน จำนวน 15 โคลน (NNns_C6-1 ถึง NNns_C6-15) สามารถจัดกลุ่มได้ 7 กลุ่ม (A – G) ตามลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วย silver staining

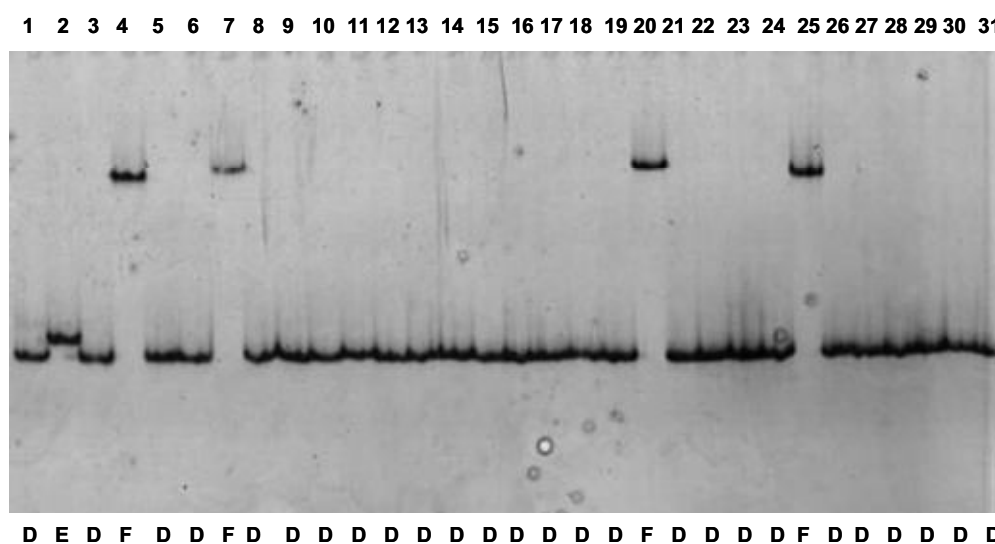
ตารางภาคผนวก ก3 ตารางแสดงการจัดกลุ่มของโคลนสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจาก จ.น่าน ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP (รูปภาคผนวก ก3)

SSCP profile	Clone	Selected to sequence	BLAST result
A	NNns_C6-1	Sequenced	<i>Glomus mosseae</i> (99%)
B	NNns_C6-2	Sequenced	<i>Glomus mosseae</i> (97%)
	NNns_C6-5	Sequenced	<i>Glomus versiforme</i> (low similarity)
	NNns_C6-8	Sequenced	<i>Acaulospora tuberculata</i> (97%)
	NNns_C6-10	-	-
	NNns_C6-13	Sequenced	<i>Glomus manihotis</i> (low similarity)
	NNns_C6-15	Sequenced	<i>Glomus mosseae</i> (99%)
C	NNns_C6-3	Sequenced	<i>Glomus versiforme</i> (low similarity)
	NNns_C6-4	-	-
	NNns_C6-9	-	-
D	NNns_C6-6	Sequenced	<i>Acaulospora tuberculata</i> (99%)
	NNns_C6-12	-	-
E	NNns_C6-7	Sequenced	<i>Acaulospora tuberculata</i> (98%)
F	NNns_C6-11	Sequenced	ND
G	NNns_C6-14	Sequenced	<i>Acaulospora tuberculata</i> (98%)

หมายเหตุ: ND = not determined (ผล sequences ไม่สามารถอ่านได้)



รูปภาคผนวก ก4 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์เจล SSCP ของรากปาล์มน้ำมันจาก จ.ฉะเชิงเทรา จำนวน 19 โคลน ชุดที่ 1 สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม (A – C) ตามลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วย silver staining



รูปภาคผนวก ก5 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์เจล SSCP ของรากปาล์มน้ำมันจาก จ.ฉะเชิงเทรา จำนวน 31 โคลน ชุดที่ 2 สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม (D – F) ตามลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วย silver staining

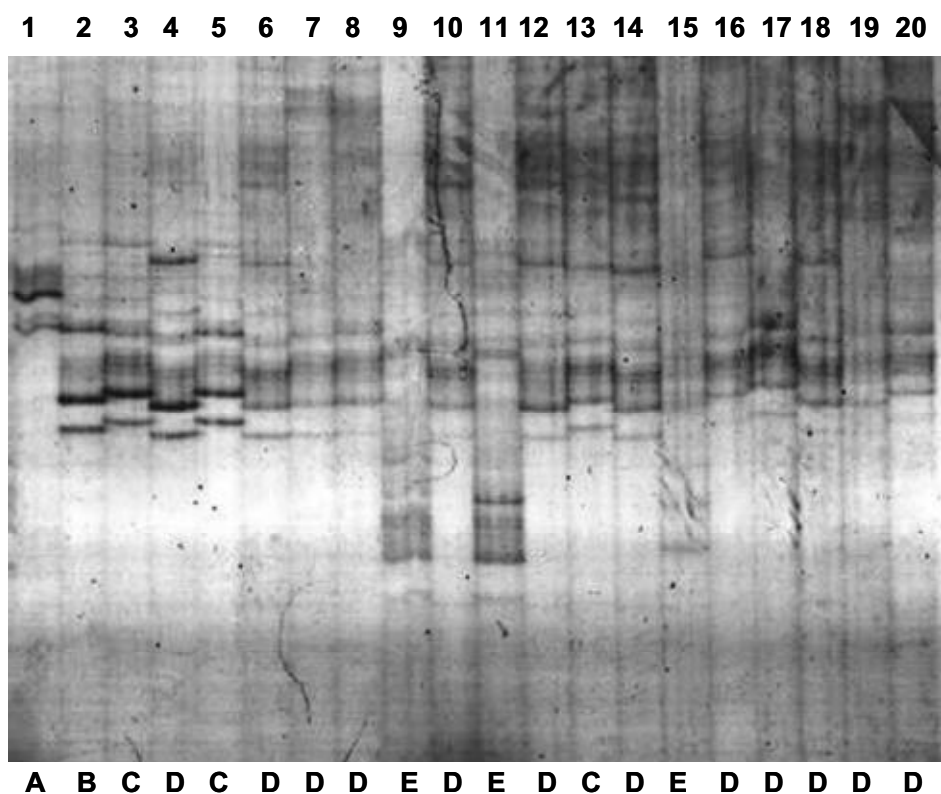
ตารางภาคผนวก ก4 ตารางแสดงการจัดกลุ่มของรากปาล์มน้ำมันจาก จ.ฉะเชิงเทรา ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP (รูปภาคผนวก ก4-5)

SSCP profile	Clone	Selected to sequence	BLAST result
A	CSnr_C17-1	Sequenced	<i>Scutellospora heterogama</i> (94%)
	CSnr_C17-2	Sequenced	<i>Scutellospora heterogama</i> (97%)
	CSnr_C17-3	-	-
	CSnr_C17-4	-	-
	CSnr_C17-5	-	-
	CSnr_C17-6	-	-
	CSnr_C17-8	-	-
	CSnr_C17-9	-	-
	CSnr_C17-11	-	-
	CSnr_C17-13	-	-
	CSnr_C17-15	-	-
	CSnr_C17-22	-	-
	CSnr_C17-24	-	-
	CSnr_C17-25	-	-
	CSnr_C17-26	-	-
	CSnr_C17-27	-	-
B	CSnr_C17-7	-	-
	CSnr_C17-12	Sequenced	Uncultured <i>Glomus</i> (93%)
C	CSnr_C17-28	Sequenced	ND
D	CSnr_C17-32	Sequenced	<i>Scutellospora heterogama</i> (94%)
	CSnr_C17-34	-	-
	CSnr_C17-36	-	-
	CSnr_C17-37	-	-

	CSnr_C17-40	-	-
	CSnr_C17-41	-	-
	CSnr_C17-42	-	-
	CSnr_C17-43	-	-
	CSnr_C17-44	-	-
	CSnr_C17-45	-	-
	CSnr_C17-46	-	-
	CSnr_C17-48	-	-
	CSnr_C17-49	-	-
	CSnr_C17-50	-	-
	CSnr_C17-51	-	-
	CSnr_C17-52	-	-
	CSnr_C17-54	-	-
	CSnr_C17-56	-	-
	CSnr_C17-57	-	-
	CSnr_C17-59	-	-
	CSnr_C17-61	-	-
	CSnr_C17-62	-	-
	CSnr_C17-63	-	-
	CSnr_C17-64	-	-
	CSnr_C17-65	-	-
	CSnr_C17-67	-	-
E	CSnr_C17-33	Sequenced	<i>Scutellospora reticulate</i> (95%)

F	CSnr_C17-35	Sequenced	<i>Glomus</i> sp. (95%)
	CSnr_C17-38	-	-
	CSnr_C17-53	-	-
	CSnr_C17-60	-	-

หมายเหตุ: ND = not determined (ผล sequences ไม่สามารถอ่านได้)



รูปภาคผนวก ก6 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์เจล SSCP ของรากปาล์มน้ำมันจาก จ.น่าน จำนวน 20 โคลน สามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม (A – D) ตามลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วย silver staining

ตารางภาคผนวก ก5 ตารางแสดงการจัดกลุ่มของโคลนรากปาล์มน้ำมันจาก จ.น่าน ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP (รูปภาคผนวก ก6)

SSCP profile	Clone	Selected to sequence	BLAST result
A	NNnr_C18-4	Sequenced	<i>Glomus sinuosum</i> (97%)
B	NNnr_C18-9	Sequenced	Uncultured <i>Glomus</i> (94%)
C	NNnr_C18-11	Sequenced	Uncultured <i>Glomus</i> (88%)
	NNnr_C18-16	-	-
	NNnr_C18-61	-	-
D	NNnr_C18-14	Sequenced	Uncultured <i>Glomus</i> (88%)
	NNnr_C18-17	-	-
	NNnr_C18-18	-	-
	NNnr_C18-43	-	-
	NNnr_C18-58	-	-
	NNnr_C18-62	-	-
	NNnr_C18-65	-	-
	NNnr_C18-64	Sequenced	Uncultured <i>Glomus</i> (87%)
	NNnr_C18-69	Sequenced	Uncultured <i>Glomus</i> (95%)
	NNnr_C18-72	-	-
	NNnr_C18-79	-	-
E	NNnr_C18-19	Sequenced	<i>Scutellospora nodusa</i> (96%)
	NNnr_C18-46	Sequenced	<i>Scutellospora gilmorei</i> (94%)
	NNnr_C18-57	-	-

หมายเหตุ: ND = not determined (ผล sequences ไม่สามารถอ่านได้)

ตารางภาคผนวก ก6 ตารางแสดงการจัดกลุ่มของโคลนรากปาล์มน้ำมันจาก จ.ตราด ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP (ไม่ได้แสดงรูป)

SSCP profile	Clone	Selected to sequence	BLAST result
A	TRnr_C16-1	Sequenced	Uncultured <i>Paraglomus</i> (87%)
	TRnr_C16-3	Sequenced	Uncultured <i>Paraglomus</i> (87%)
	TRnr_C16-6	-	-
	TRnr_C16-8	-	-
	TRnr_C16-9	-	-
	TRnr_C16-10	-	-
	TRnr_C16-12	Sequenced	Uncultured <i>Paraglomus</i> (87%)
	TRnr_C16-17	-	-
	TRnr_C16-19	-	-
	TRnr_C16-20	-	-
	TRnr_C16-21	-	-
	TRnr_C16-22	-	-
	TRnr_C16-23	-	-
	TRnr_C16-26	-	-
	TRnr_C16-29	-	-
	TRnr_C16-30	-	-
	TRnr_C16-31	-	-
	TRnr_C16-34	-	-
	TRnr_C16-35	-	-
	TRnr_C16-36	-	-
	TRnr_C16-38	-	-
	TRnr_C16-39	-	-
	TRnr_C16-43	-	-

	TRnr_C16-44	-	-
	TRnr_C16-45	-	-
	TRnr_C16-47	-	-
	TRnr_C16-49	-	-
	TRnr_C16-50	-	-
	TRnr_C16-53	-	-
	TRnr_C16-57	-	-
	TRnr_C16-58	-	-
	TRnr_C16-61	-	-
	TRnr_C16-63	-	-
	TRnr_C16-67	-	-
	TRnr_C16-68	-	-
	TRnr_C16-70	-	-
B	TRnr_C16-28	Sequenced	Uncultured <i>Glomus</i> (89%)
C	TRnr_C16-40	Sequenced	<i>Scutellospora gilmorei</i> (94%)
	TRnr_C16-48	Sequenced	<i>Scutellospora gilmorei</i> (94%)
	TRnr_C16-60	-	-
	TRnr_C16-62	-	-
	TRnr_C16-65	-	-
D	TRnr_C16-69	Sequenced	<i>Scutellospora gilmorei</i> (95%)

ตารางภาคผนวก ก7 ตารางแสดงการจัดกลุ่มของโคลนรากปาล์มน้ำมันจาก จ.หนองคาย ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP (ไม่ได้แสดงรูป)

SSCP profile	Clone	Selected to sequence	BLAST result
A	NKnr_C15-2	Sequenced	<i>Scutellospora gilmorei</i> (89%)
B	NKnr_C15-6	Sequenced	<i>Scutellospora nodusa</i> (96%)
	NKnr_C15-23	Sequenced	<i>Scutellospora gilmorei</i> (98%)
	NKnr_C15-25	-	-
	NKnr_C15-28	-	-
	NKnr_C15-29	-	-
	NKnr_C15-30	-	-
C	NKnr_C15-9	-	-
	NKnr_C15-10	Sequenced	<i>Scutellospora gilmorei</i> (95%)
	NKnr_C15-11	-	-
	NKnr_C15-12	-	-
	NKnr_C15-13	-	-
	NKnr_C15-14	-	-
	NKnr_C15-19	-	-
	NKnr_C15-20	-	-
	NKnr_C15-22	-	-

ภาคผนวก ข
ผลงานตีพิมพ์

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* jacq.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง เนื่องจากผลตอบแทนของการปลูกปาล์มน้ำมันดีกว่าการปลูกพืชชนิดอื่น เช่น ยางพารา และการทำนาข้าว จึงเป็นแรงจูงใจให้เกษตรกรขยายพื้นที่ปลูก ประกอบกับมีโครงการเปลี่ยนพื้นที่ปลูกปาล์มทั่วประเทศ โดยกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้มีแผนกำหนดพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันใหม่ในประเทศขึ้น และในปัจจุบันได้มีการศึกษาความเป็นไปได้ของการปลูกปาล์มน้ำมัน เช่นในพื้นที่ตัวอย่างภาคเหนือ และตะวันออกเฉียงเหนือแล้ว นอกจากนี้การเกิดภาวะวิกฤตราคาน้ำมันแพงขึ้น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ทำให้ปาล์มน้ำมันกลายมาเป็นพืชที่มีบทบาทสำคัญกับนโยบายวาระแห่งชาติด้านพลังงานของประเทศ ด้วยความหวังเพื่อการนำมาผลิต "ไบโอดีเซล" ซึ่งจะสามารถลดภาระการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงบางส่วนจากต่างประเทศได้

การผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันให้มีคุณภาพและมาตรฐาน เพื่อรองรับการปลูกในแต่ละฤดูกาลจึงเป็นปัจจัยสำคัญ ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ขายโดยทั่วไปมีราคา 80-120 บาท/ต้น ถ้าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่นำไปปลูกใหม่มีคุณภาพต่ำ มีอัตราการตายสูง การเจริญเติบโตเป็นไปอย่างช้า และแคระแกรน หรือโดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าในดินมีฟอสฟอรัสต่ำหรือถูกตรึงอยู่ในดินจะส่งผลให้ปาล์มน้ำมันมีผลผลิตต่ำลงด้วย ซึ่งจะมีผลทำให้เกษตรกรต้องสูญเสียเงินลงทุนจำนวนมาก โครงการล้มเหลว และไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร นอกจากนี้พื้นที่ที่มีการปลูกปาล์มน้ำมันยังคงเป็นพื้นที่ว่างเปล่า พื้นที่ป่า หรือเคยปลูกพืชอย่างอื่นมาก่อนแนวทางการเพิ่มพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันของประเทศในแต่ละพื้นที่อาจจะต้องประสบปัญหา หากขาดการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันระหว่างราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาและระบบรากของปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีระบบรากฝอย มีรากที่แตกแขนงทอดไปตามแนวนอน และประสานกันอย่างหนาแน่นอยู่ที่บริเวณผิวดิน ไม่มีขนราก ดังนั้นการดูดน้ำและแร่ธาตุของปาล์มน้ำมันจึงต้องพึ่งพาราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในการทำหน้าที่แทน การใส่ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับพืชจะช่วยให้ธาตุอาหารเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่พืชดูดไปใช้ได้ง่ายขึ้น

จากที่กล่าวข้างต้นคณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความสำคัญของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและการศึกษาการนำไปประยุกต์ใช้ทางการเกษตร เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของพืช ว่ามีบทบาทและความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพของประเทศไทย ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักคือ การใช้ความรู้ที่ได้จากการวิจัย เพื่อช่วยพัฒนาการผลิตแบบเกษตรยั่งยืน โดยการใช้จุลินทรีย์ที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้ถูกคัดเลือกโดยธรรมชาติว่าเหมาะสมกับภูมิอากาศและสภาวะแวดล้อมในประเทศไทย เพื่อที่จะใช้ผลิตเป็นหัวเชื้อสำหรับเพาะให้กับกล้าไม้ในแปลงเพาะ ก่อนย้ายนำไปปลูก ซึ่งจะช่วยเร่งอัตราการเจริญเติบโตของพืช และเพื่อทดแทนหรือเพื่อการลดการใช้ปุ๋ยเคมีโดยเฉพาะปุ๋ยฟอสเฟตในขั้นตอนของการผลิตพืช ทำให้ต้นทุนการผลิตพืชน้อยลงแล้ว ยังเป็นการปรับปรุงคุณภาพของดินด้วย

การสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างดินได้ดำเนินการในช่วงฤดูฝนในปี 2550 จากพื้นที่ขยายการปลูกปาล์มน้ำมันในพื้นที่ 5 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย ฉะเชิงเทรา น่าน หนองคาย และตราด เมื่อคัดแยก และจำแนกชนิดของสปอร์ราในดินบริเวณรอบราก โดยลักษณะทางสัณฐานและด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (Polymerase Chain Reaction ; PCR จากยีนบริเวณ Small sub unit (SSU rDNA), Internal Transcribed Spacer (ITS) และ บางส่วนของบริเวณ Large subunit (LSU rDNA)) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับราในไฟลัม Glomeromycota เพื่อใช้ในการตรวจสอบชนิดของราในรากของปาล์มน้ำมันจากพื้นที่ 5 จังหวัด ผลการศึกษาพบว่าดีเอ็นเอ (pcr product) ที่ได้มีขนาด ประมาณ 1,500 เบสแพร์ (bp) การโคลนชิ้นตัวอย่างดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ด้วยวิธีขั้นสูง (PCR-Single Strand Conformation Polymorphisms, PCR-SSCP) พบว่าโคลนที่ได้มีความหลากหลายต่างกันในแต่ละพื้นที่ เมื่อคัดเลือกโคลนจำนวน 53 โคลน ที่มีผลการวิเคราะห์ของ PCR-SSCP ต่างกัน ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ประกอบกับข้อมูลทางสัณฐานพบว่า ในรากปาล์มน้ำมัน และสปอร์ที่เก็บรวบรวมจากดินรอบรากปาล์มน้ำมันในพื้นที่ขยายการปลูกปาล์มน้ำมันทั้ง 5 จังหวัด ประกอบด้วยราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา สกุล *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Paraglomus* และ *Scutellospora* จำนวนไม่น้อยกว่า 13 ชนิด และอาจมีราชนิดใหม่อีก 2 ชนิด ได้แก่ uncultured *Glomus* sp. และ uncultured *Gigaspora* sp. ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนจากดินรอบรากแปลงปลูกปาล์มน้ำมันของประเทศไทย

ผลของการใส่หัวเชื้อให้กับกล้าปาล์มน้ำมัน เพื่อทดสอบการสร้างไมคอร์ไรซาและการตอบสนองการเจริญเติบโตในด้านต่างๆ ของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ภายใต้สภาวะเรือนกระจก พบว่าหัวเชื้อราทั้ง 3 ชนิดสามารถสร้างไมคอร์ไรซากับกล้าปาล์มน้ำมันได้ดี มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืชสูง ระหว่างร้อยละ 88.9-92.3 ดังนั้นมีแนวโน้มโดยรวมของการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นชัดเจนสำหรับกล้าปาล์มน้ำมันที่ใส่หัวเชื้อเมื่อเทียบกับกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ใส่หัวเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตรวจสอบชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ติดเชื้อในรากกล้าปาล์มน้ำมันโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างจำนวน 25 โคลนพบว่าเป็นรา *Glomus intraradices* และ *Scutellospora nodosa*

รายงานวิจัยฉบับนี้เป็นรายงานการวิจัยฉบับแรกที่ได้ใช้วิธีทางชีวโมเลกุลด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับรา ร่วมกับวิธีทางสัณฐานวิทยาเพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่สร้างสปอร์ภายในดิน และอยู่ในรากของปาล์มน้ำมันของประเทศไทย จากจำนวนโคลนกว่า 700 โคลน จัดกลุ่มก่อนคัดเลือกมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนทั้งสิ้น 78 โคลน ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดยการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับฐานข้อมูลนานาชาติ (GenBank) พบว่าสามารถระบุชนิดของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ถูกต้องชัดเจนในระดับ genus และ/หรือ species ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 95-99% การศึกษาครั้งนี้พบว่า ในดินรอบรากปาล์มน้ำมันมีราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่หลากหลายชนิด บางชนิดเป็นชนิดที่พบได้ทั่วไป บางชนิดอาจเป็นชนิดใหม่ที่ไม่เคยรายงานมาก่อน เมื่ออยู่ในรากพืชราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของกล้าปาล์มน้ำมันได้แตกต่างกัน ดังนั้นการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ของราที่เหมาะสมจึงจำเป็นอย่างยิ่ง เมื่อได้สายพันธุ์ราที่เหมาะสม การเตรียมหัวเชื้อราก็สามารถเพิ่มปริมาณและทำได้ในเรือนเพาะชำ การประยุกต์ใช้หัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะช่วยปรับปรุงกล้าปาล์มน้ำมันให้มีคุณภาพดีขึ้น สามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อยู่รอดปลอดภัยเมื่อย้ายนำไปปลูกได้ และยังสามารถทดแทนหรือเพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมีโดยเฉพาะปุ๋ยฟอสเฟตในขั้นตอนของการผลิตพืช ทำให้

ต้นทุนการผลิตพืชน้อยลงแล้ว ยังเป็นการปรับปรุงคุณภาพของดิน และสอดคล้องกับนโยบายของ The Roundtable on Sustainable Palm Oil (RSPO) ที่กำหนดให้สมาชิกสวนปาล์มหรือผู้ผลิตน้ำมันปาล์มที่ได้มาตรฐาน จะต้องมีการจัดการสวนปาล์มน้ำมันที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จึงจะได้รับการรับรองคุณภาพมาตรฐานจาก RSPO อีกด้วย