



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การประยุกต์ใช้เชื้อราไมคอร์ไรซากับการทำสวนส้ม”

APPLICATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN CITRUS ORCHARD

โดย รศ.ดร. หนึ่ง เตียอำรุง และคณะ

กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การประยุกต์ใช้เชื้อรามายคอร์ไรซากับการทำสวนส้ม”

APPLICATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN CITRUS ORCHARD

คณะผู้วิจัย

1. รศ.ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

2. ดร. โสภณ วงศ์แก้ว

3. นายปรารภ พรหมมานพ

สังกัด

สถานวิจัย สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บริษัท เจริญโภคภัณฑ์โปรดิ๊วส์ จำกัด

ชุดโครงการ ดินและปุ๋ยพืชสวน

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

เชื้อราไมคอร์ไรซา (Arbuscular mycorrhiza fungi, AMF) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการส่งเสริมธาตุอาหารพืช และควบคุมโรคในระบบรากพืช ซึ่งเป็นโรคที่พบมากในสวนส้ม งานทดลองนี้ มีจุดมุ่งหมายเพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมี และยากำจัดโรคในระบบรากของส้ม ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ AMF ที่มีประสิทธิภาพในการดูดซับธาตุอาหารพืชเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของส้ม และลดการเกิดโรครากเน่าในส้มอันเนื่องมาจากเชื้อรา *Phytophthora* และเพื่อให้ได้กรรมวิธีการผลิตหัวเชื้อ AMF เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในส่วนส้มได้ ทำการทดลองทั้งในส้มพันธุ์, เชี่ยวหวาน และสายน้ำผึ้ง, และในส้มต้นตอ (rootstock), Cleopatra mandarin และ C-35 citrange การทดลองเริ่มด้วยการคัดแยก และจำแนกเชื้อ AMF จากสวนส้มในพื้นที่ต่างๆ และทำการเพิ่มจำนวนสปอร์เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยในรากส้มพันธุ์ และส้มต้นตอ จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อ AMF ที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสมต่อส้มพันธุ์ และส้มต้นตอ เมื่อได้สายพันธุ์ AMF ที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของส้มพันธุ์ต่างๆ หลังจากนั้น ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ AMF ในการยับยั้งโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* และทดสอบประสิทธิภาพการดูดใช้ธาตุอาหารพืชร่วมด้วย นอกจากนี้ ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์ AMF ที่คัดเลือกได้ โดยวิธีทางชีวโมเลกุล ผลการทดลองที่ได้ พบว่า การคัดแยก, เก็บ และจำแนกสปอร์ AMF ในสวนส้ม เชื้อ AMF ที่พบอยู่ใน 4 จินัส ได้แก่ *Glomus* sp., *Acaulospora* sp., *Gigaspora* sp. และ *Sclerocystis* sp. และสปอร์ของสายพันธุ์ *Glomus etunicatum* และ *Acaulospora tuberculata* สามารถเพิ่มจำนวนในพืชอาศัยข้าวโพด และข้าวฟ่างได้มากกว่าเชื้อ AMF สายพันธุ์อื่น อีกทั้งยัง พบว่า เชื้อ AMF ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความสามารถเข้าอาศัยในรากส้มทั้งส้มพันธุ์ และส้มต้นตอได้ และจากการทดสอบเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อส้มพันธุ์ และส้มต้นตอนั้น พบว่า เชื้อ AMF สายพันธุ์ *Gl. etunicatum* และหัวเชื้อทางการค้า Mycostar (*Glomus* sp.) มีค่า MEI (Mycorrhiza Efficiency Index) หรือมีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของส้มพันธุ์เชียวหวาน และสายน้ำผึ้งมากกว่าเชื้อ AMF สายพันธุ์อื่น ในขณะที่เชื้อ AMF สายพันธุ์ *Gl. etunicatum*, *A. tuberculata*, หัวเชื้อทางการค้า Mycostar (*Glomus* sp.) และหัวเชื้อกรรมวิธีการเกษตร (*Glomus* sp.) พบว่า มีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของส้มต้นตอ C-35 ในส่วนของเชื้อ AMF สายพันธุ์ *A. tuberculata*, หัวเชื้อทางการค้า Mycostar (*Glomus* sp.) และหัวเชื้อกรรมวิธีการเกษตร (*Glomus* sp.) พบว่า มีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของส้มต้นตอ Cleopatra และในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Phytophthora* นั้น พบว่า การใช้ AMF ร่วมกับการปลูกเชื้อ *Phytophthora parasitica* ในกิ่งตอนของส้มโชกุนที่ต่อกิ่งบนต้นตอ C-35 ช่วยยับยั้ง และชะลอความรุนแรงของโรคได้อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับกิ่งตอนที่ไม่ได้รับเชื้อ AMF และการจากการทดสอบประสิทธิภาพการดูดใช้ธาตุอาหารพืช พบว่า ดำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ AMF (*Gl. etunicatum* หรือ *A. tuberculata*) ร่วมกับการให้ปุ๋ย (NPK+micronutrient) และดำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย (NPK+micronutrient) เพียงอย่างเดียว ให้ผลการสะสมของธาตุ N, P, K, Fe, Cu และ Zn มากกว่า

ตำรับการทดลองอื่นๆ จากการจำแนกเชื้อ AM ที่มีประสิทธิภาพต่อการดูดใช้ธาตุอาหาร และยับยั้งโรครากเน่าได้นั้น หลังจากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของยีน Large Subunit Ribosomal (LSU rDNA) พบว่า เชื้อ AM สายพันธุ์ที่ 1 มีความเหมือนกับ *Gl. etunicatum* ซึ่งเป็นการช่วยยืนยันผลการจำแนกทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นได้ ในส่วนเชื้อ AM สายพันธุ์ที่ 2 พบว่า มีความเหมือนกับ AM ในตระกูล *Glomeromycete* นอกจากนี้จากการศึกษาศักยภาพการผลิตหัวเชื้อ AM โดยใช้วัสดุปลูกผสมชนิดต่างๆ โดยทำการปลูกในพืชอาศัยข้าวโพด และข้าวฟ่าง ผลที่ได้พบว่า ข้าวโพดที่ปลูกในวัสดุผสมเวอร์มิคูไลต์ และพีท ให้จำนวนสปอร์ *A. tuberculata* มากที่สุด ในขณะที่ ข้าวฟ่างที่ปลูกในวัสดุปลูกผสมเวอร์มิคูไลต์ และพีท ให้จำนวนสปอร์ *Gl. etunicatum* มากที่สุด

Abstract

In order to reduce amount of fertilizer used and severity of *Phytophthora* root rot in citrus orchards, mycorrhizal inoculation has been focused. The aims of study were to select the effective indigenous arbuscular mycorrhizal (AM) species on citrus growth and *Phytophthora* root rot suppression. The experiment was also carried out at determining the efficiency of the isolated AM fungi, as inoculants for citrus orchard. Citrus scions and rootstocks, Tangerine (*Citrus reticulata* Blanco), Shogun (*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun), and Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.), C-35 citrange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.×*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), were used throughout in the experiment. High effective indigenous AM strains were isolated, morphologically identified, and selected from various citrus orchards all over the country. To test whether isolated AM fungi are able to colonise into citrus root, citrus scions, Shogun and Tangerine, and C-35 citrange rootstock were inoculated with selected AM strains. Then, citrus scions and rootstocks were tested with the selected two AM species (that could colonise into citrus roots). They were genetically identified as *Glomus etunicatum* and *Acaulospora tuberculata*. In the mean time, the influence of *Gl. etunicatum* and *A. tuberculata* strains on suppression of *Phytophthora parasitica* isolated from citrus orchard was observed. The nutrients uptake experiment was also conducted. The results revealed that both AM species shown root colonization in scions and rootstock roots. Shogun and Tangerine inoculating *Gl. etunicatum* and commercial AM inoculant (Mycostar) spores provided the highest percentage of MEI (Mycorrhiza Efficiency Index), while AM strains, *Gl. etunicatum*, *A. tuberculata*, commercial AM inoculant (Mycostar), commercial AM inoculant (Agricultural Department, Thailand), showed the effectiveness on C-35 citrange growth. In Cleopatra mandarin, AM strain *A. tuberculata*, commercial AM inoculant (Mycostar), commercial AM inoculant (Agricultural Department, Thailand) performed high percentage of MEI, effective strains on citrus growth. These indicated that both AM strains, *Gl. etunicatum* and *A. tuberculata*, have an influence on citrus growth, suggesting that they are the highly effective strains. C-35 citrange rootstocks were found not to be heavily infected by *Phytophthora*. Rootstocks infected by both *P. parasitica* and selected AM fungi demonstrated root injury at low level. There were the greatest P content and percentage of AM colonization in rootstocks inoculating *Gl. etunicatum*, whereas treatment infecting *P. parasitica* provided the lowest P concentration. C-35 citrange rootstocks colonized by both *Gl.*

etunicatum and *P. parasitica* showed significant lower P content and AM colonization than that colonized by only *Gl. etunicatum*. C-35 citrange scions inoculating with *P. parasitica* showed severe symptom of root rot when compared to the control treatment while the scions inoculating with both AM fungi (*A. tuberculata* or *Gl. etunicatum*) and *P. parasitica* rendered lower root rot symptoms than that of *Phytophthora* treatment. They also indicated the low level of root rot symptom at first, and then healthy young shoot was restored. For nutrient uptake experiment indicated that treatments; citrus inoculating AM spores (*A. tuberculata* or *Gl. etunicatum*) and adding fertilizer (NPK+micronutrients), citrus that added only fertilizer (NPK+micronutrients), exhibited higher nutrients accumulation (N, P, K, Fe, Cu, and Zn) than other treatments. In addition, we found that the appropriate host plants for spore propagation are as maize (*Zea mays*) and Sorghum (*Sorghum vulgare*), grown in mixed substrate (vermiculite:peat) provided the highest *A. tuberculata* and *Gl. etunicatum* spore numbers, respectively.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza fungi, *Phytophthora*, Citrus rootstocks

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....A-B

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....C-D

สารบัญ.....E

สารบัญตาราง.....F-G

สารบัญภาพ.....H-K

บทที่ 1 บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....1
2. วัตถุประสงค์ของโครงการ.....3
3. ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยก และเก็บสปอร์ของ AM4
2. การเพิ่มจำนวน AM ในระบบรากพืช.....4
3. การทดสอบ AMF ที่สามารถเข้าสู่รากของกล้าต้นส้ม.....4
4. การคัดเลือก และทดสอบประสิทธิภาพสายพันธุ์ AMF
ที่เหมาะสมต่อส้มต้นตอ และส้มพันธุ์.....5
5. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งโรครากเน่าในระดับกระถาง.....6
6. การทดสอบประสิทธิภาพการดูดใช้ธาตุ N, P, K และ micronutrients ของ AM.....10
7. การจำแนกสายพันธุ์ของ AM ที่มีประสิทธิภาพที่ใส่ลงไปในการปลูก.....10
8. การศึกษาศักยภาพการผลิต AM inoculant.....11

บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดแยก และเก็บสปอร์ของ AM.....14
2. การเพิ่มจำนวน AM ในระบบรากพืช.....17
3. การทดสอบ AMF ที่สามารถเข้าสู่รากของกล้าต้นส้ม.....18
4. การคัดเลือก และทดสอบประสิทธิภาพสายพันธุ์ AMF
ที่เหมาะสมต่อส้มต้นตอ และส้มพันธุ์.....20
5. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งโรครากเน่าในระดับกระถาง.....39
6. การทดสอบประสิทธิภาพการดูดใช้ธาตุ N, P, K และ micronutrients ของ AM.....58
7. การจำแนกสายพันธุ์ของ AM ที่มีประสิทธิภาพที่ใส่ลงไปในการปลูก.....69
8. การศึกษาศักยภาพการผลิต AM inoculant.....69

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และเอกสารอ้างอิง.....72

ภาคผนวก.....77

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1	ปริมาณ available phosphorus ของตัวอย่างดินสวนส้มในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และนครราชสีมา.....16
2	การเพิ่มจำนวนสปอร์ AMF ในพีชอาศัย.....17
3	เปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AMF ในรากส้ม (Root colonization).....18
4	เปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AMF ในรากส้มกิ่งตอน (Root colonization).....19
5	ผลของ MEI (%), AM colonization (%) และ ปริมาณฟอสฟอรัส (% P) ในส้มสายพันธุ์สายน้ำผึ้ง และเขียวหวาน.....22
6	ผลของความสูง (cm), น้ำหนักสตราก (g), น้ำหนักสดลำต้น (g), น้ำหนักสดรวม (g), ความยาวของราก (cm), น้ำหนักแห้งของราก (g), น้ำหนักแห้งของลำต้น (g) และน้ำหนักแห้งรวม (g) ในส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง และเขียวหวาน.....25
7	ผลของอัตราส่วนความยาวลำต้น/ความยาวราก, อัตราส่วนน้ำหนักของลำต้น/น้ำหนักของราก, Specific root length (SRL) (cm/g) และอัตราส่วนพื้นที่ใบ/ความยาวของราก (LA/RL).....27
8	ผลของ MEI (%), AM colonization (%) และปริมาณฟอสฟอรัส (% P) ในส้มสายพันธุ์ C-35 และ Cleopatra.....32
9	ผลของความสูง (cm), น้ำหนักสตราก (g), น้ำหนักสดลำต้น (g), น้ำหนักสดรวม (g), ความยาวของราก (cm), น้ำหนักแห้งของราก (g), น้ำหนักแห้งของลำต้น (g) และน้ำหนักแห้งรวม (g) ในส้มพันธุ์ C-35 และ Cleopatra.....34-35
10	ผลของอัตราส่วนความยาวลำต้น/ความยาวราก, อัตราส่วนน้ำหนักของลำต้น/น้ำหนักของราก, Specific root length (SRL) (cm/g) และ อัตราส่วนพื้นที่ใบ/ความยาวของราก (LA/RL) ของส้มพันธุ์ C-35 และ Cleopatra.....36-37
11	แสดงผลน้ำหนักแห้งของราก (g) และปริมาณฟอสฟอรัส (%P) ในใบของส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนไซกุน.....53
12	แสดงผลการเข้าอยู่อาศัยของ AM (% Root colonization) ในรากของส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนไซกุน.....56
13	ค่า pH, EC, OM ในดินที่ใช้ปลูกส้มเขียวหวานเป็นระยะเวลา 3 เดือน.....59
14	ปริมาณ P, K, Fe, Mn, Cu, Zn ในดินที่ใช้ปลูกส้มเขียวหวานเป็นระยะเวลา 3 เดือน.....61

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
15	ค่าความสูง (cm), การเข้าอยู่อาศัยของ AM ในรากส้มเขียวหวาน (% AM colonization), ปริมาณ N(%), P(%) และ K(%) ในใบส้ม หลังจากการปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน.....63
16	ปริมาณ Micronutrients (Fe, Mn, Cu, Zn) ในใบส้มเขียวหวาน หลังจากการให้ AM และการให้ปุ๋ยเป็นระยะเวลา 3 เดือน.....65
17	สมบัติทางเคมีของดินที่เหมาะสมกับการปลูกส้ม.....66
18	ปริมาณธาตุอาหารในใบส้มในช่วงต่างๆ.....67
19	ผลของจำนวนสปอร์, ความชื้น และการเก็บรักษาในการผลิต AM inoculant.....71

สารบัญภาพ

รูปที่

หน้า

1.	กระบวนการการผลิต AM inoculant.....	13
2.	ตัวอย่างสปอร์ AMF จากตัวอย่างดินสวนส้มใน จ. เชียงใหม่ (1)-(8), ตัวอย่างสปอร์ AMF จากตัวอย่างดินสวนส้มใน จ. นครราชสีมา (9)-(15), ตัวอย่างสปอร์ AMF จากตัวอย่างดินสวนส้มใน จ. จันทบุรี (16)-(22), ตัวอย่างสปอร์ AMF จากตัวอย่างดินสวนส้มใน จ. นครปฐม.....	15
3	การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AMF ในรากส้มพันธุ์เขียวหวาน ที่ได้ทำการ propagate สปอร์ของ <i>A. tuberculata</i> เป็นเวลา 1 เดือน (V: vesicle, H: Hyphae).....	19
4	การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ชนิด ในรากส้มพันธุ์เขียวหวาน และรากส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ที่ได้ทำการ propagate สปอร์ของ AMF เป็นเวลา 3 เดือน.....	20
5	การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์เขียวหวานที่ได้ทำการ propagate ด้วยหัวเชื้อทางการค้า Mycostar เป็นเวลา 3 เดือน.....	20
6	การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์เขียวหวาน และรากส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ที่ได้ทำการ propagate ด้วย <i>Sclerocystis</i> sp. เป็นเวลา 3 เดือน.....	21
7	รูปแสดงสปอร์ AMF ที่แยกได้ จากหัวเชื้อ Mycostar ซึ่งเป็นหัวเชื้อทางการค้า.....	27
8	การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์ Cleopatra ที่ได้ทำการ ใส่สปอร์ของ <i>A. tuberculata</i> เป็นเวลา 3 เดือน.....	29
9	การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์ Cleopatra ที่ได้ทำการ ใส่สปอร์ของหัวเชื้อทางการค้า Mycostar เป็นเวลา 3 เดือน.....	29
10	การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์ Cleopatra ที่ได้ทำการ ใส่สปอร์ของ <i>Sclerocystis</i> sp. เป็นเวลา 3 เดือน.....	30
11	การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์ C-35 ที่ได้ทำการ ใส่สปอร์ของ <i>A. tuberculata</i> เป็นเวลา 3 เดือน.....	30
12	การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์ C-35 ที่ได้ทำการ ใส่สปอร์ของ <i>Gl. etunicatum</i> เป็นเวลา 3 เดือน.....	30
13	สวนส้มฉันทพร อ.วังน้ำเขียว จ. นครราชสีมา.....	39
14	ภาพสวนส้มเพชรพิมาย ส้มต้นที่อยู่กลางแจ้ง เป็นส้มที่มีอาการรากเน่า ต้นโทรม ขนาดทรงพุ่มเล็กกว่าต้นที่อยู่ข้างเดียว.....	40
15	ต้นส้มที่เป็นโรครากเน่า แสดงอาการปลายกิ่งแห้งตาย (die back).....	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่

หน้า

16	ลักษณะการเจริญของเชื้อที่แยกได้จากเนื้อเยื่อรากส้มที่แสดงอาการต้นโทรม รากเน่า เลี้ยงบนอาหาร modified corn meal agar (MCMA) อายุ 4 วัน หลังย้ายเชื้อ.....	41
17	ลักษณะ coenocytic hyphae และ swollen branching hypha ของเชื้อที่แยกได้ จากเนื้อเยื่อรากส้มที่แสดงอาการต้นโทรม-รากเน่า (ขยาย 400 x).....	41
18	Zöosporangium ของเชื้อราที่แยกได้จากเนื้อเยื่อรากส้มที่แสดงอาการต้นโทรม-รากเน่า หลังจากตัดชิ้นวั่นแช่ลงในน้ำกลั่นสกัดดินนาน 36 ชม. (สังเกต empty sporangia และ sporangium ที่กำลังปลดปล่อย zoospore) (ขยาย 100 x).....	41
19	sporangium ของเชื้อราที่แยกได้จากรากเน่าส้มกำลังจะปลดปล่อย zoospores (กำลังขยาย 400 x).....	42
20	ลักษณะการสร้าง sporangium ในเชื้อรา <i>Phytophthora citrophthora</i> ที่ได้รับ การกระตุ้นโดยการแช่ในน้ำกลั่นหนึ่งชั่วโมง (กำลังขยาย 100x).....	42
21	ใบส้มโชกุนแสดงอาการแผลชำบริเวณรอยตัด หลังจากแช่ในน้ำสกัดดินที่เดิมชิ้นวั่น ที่มีรอยเชื้อที่แยกได้จากรากส้มที่แสดงอาการต้นโทรม-รากเน่า นาน 62 ชั่วโมง.....	42
22	แสดงลักษณะ hyphal swelling ของเชื้อ <i>Phytophthora</i> ไอโซเลตที่แยก ได้จากสวนส้มพิจาย.....	43
23	ลักษณะสปอร์แรงเจียแบบ limoniform ของเชื้อ <i>Phytophthora</i> ไอโซเลตที่แยกจาก สวนส้มพิจาย หลังจากแช่ชิ้นวั่นใน sterilized 1% soil extract.....	44
24	ลักษณะสปอร์แรงเจียรูปร่างไม่แน่นอน (irregularly shaped) ที่พบหลังจากใส่ชิ้นวั่น ใน sterilized 1% soil extract.....	44
25	ส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุนหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ <i>Phytophthora citrophthora</i> ไอโซเลตพิจาย ด้วยวิธีเขื่อนเปลือกโคนต้นด้วยมิดเป็นแผลยาว 1 ซม. (ขวามือ) เทียบกับส้มที่ผ่านกรรมวิธีเดียวกันแต่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (ซ้ายมือ) บันทึกภาพหลังจากปลูกเชื้อ 5 สัปดาห์.....	45
26	ส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุนหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ <i>Phytophthora citrophthora</i> ไอโซเลตพิจาย ด้วยวิธีแทงโคนต้นด้วยเข็มฉีดยา (ขวามือ) เทียบกับส้มปกติ (ซ้ายมือ) บันทึกภาพหลังจากปลูกเชื้อ 5 สัปดาห์.....	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่

หน้า

27	ส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุนหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ <i>Phytophthora citrophthora</i> ไชโเลตพิมาย โดยไม่มีการทำแผล (ขวามือ) เทียบกับส้มปกติ (ซ้ายมือ) บันทึกภาพหลังปลูกเชื้อ 5 สัปดาห์.....	46
28	การตรวจสอบการเข้าทำลายรากส้มของเชื้อ <i>Phytophthora citrophthora</i> ด้วยวิธี baiting ด้วยใบส้มเขียวหวาน.....	46
29	ลักษณะของเชื้อ <i>P. citrophthora</i> ที่ขึ้นบนใบส้มเขียวหวานหลังจากย้ายจากจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีชิ้นส่วนของรากที่ได้จากต้นส้มที่ได้รับการปลูกเชื้อลงในน้ำกลั่นหนึ่งชั่วโมง.....	46
30	แสดงลักษณะรากของต้นส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งพันธุ์โชกุน เปรียบเทียบกันระหว่าง ดำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม และดำรับการทดลอง ที่ได้รับการปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i>	48
31	แสดงลักษณะรากของต้นส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งพันธุ์โชกุนที่ได้รับเชื้อ <i>P. parasitica</i> เปรียบเทียบกันระหว่างดำรับการทดลองที่มีการปลูกเชื้อ <i>A. tuberculata</i> ร่วมกับเชื้อ <i>P. parasitica</i> และดำรับการทดลองที่มีการปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i> อย่างเดียว.....	48
32	ลักษณะรากถอดปล้องของส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งพันธุ์โชกุนที่ได้รับเชื้อ <i>P. parasitica</i>	49
33	แสดงลักษณะของกิ่งตอนโชกุนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 ก่อน (A) และหลัง (B) ที่มีการปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i>	49
34	แสดงลักษณะต้น และใบของกิ่งตอนโชกุนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i>	49
35	แสดงลักษณะเส้นใบโปร่งของกิ่งตอนโชกุนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i>	50
36	แสดงลักษณะต้นของกิ่งตอนโชกุนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 เปรียบเทียบกันระหว่าง ดำรับการทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i> และดำรับการทดลอง ที่เป็นชุดควบคุม.....	50
37	แสดงลักษณะต้นของกิ่งตอนโชกุนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 เปรียบเทียบกัน ระหว่างดำรับการทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วย <i>P. parasitica</i> และดำรับการทดลอง ที่มีการปลูกเชื้อด้วย <i>A. tuberculata</i> ร่วมกับการปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i>	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่

หน้า

38	แสดงลักษณะกิ่งตอนโซกูบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 เปรียบเทียบกันระหว่าง ตำรับการทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วย <i>P. parasitica</i> และตำรับการทดลองที่มี การปลูกเชื้อด้วย <i>A. tuberculata</i> ร่วมกับการปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i>	51
39	แสดงลักษณะใบของกิ่งตอนโซกูบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 เปรียบเทียบกันระหว่าง ตำรับการทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วย <i>P. parasitica</i> และตำรับการทดลองที่มี การให้เชื้อ <i>A. tuberculata</i> ร่วมกับการปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i>	52
40	แสดงลักษณะใบจากกิ่งตอนโซกูบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 เปรียบเทียบกันระหว่าง ตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม, ตำรับการทดลองที่มีการปลูกเชื้อด้วย <i>A. tuberculata</i> ร่วมกับการปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i> และตำรับการทดลองที่มี การปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i> เพียงอย่างเดียว.....	52
41	แสดงการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ AM ในรากส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนโซกูบน ตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ <i>G. etunicatum</i>	54
42	แสดงการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ AM ในรากส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนโซกูบน ตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ <i>G. etunicatum</i> ร่วมกับการปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i>	54
43	แสดงการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ AM ในรากส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนโซกูบน ตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ <i>A. tuberculata</i>	54
44	แสดงการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ AM ในรากส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนโซกูบน ตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ <i>A. tuberculata</i> ร่วมกับการปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i>	55
45	แสดงลักษณะการคืนสภาพ (recovery) ของใบ และการแตกยอดอ่อนของกิ่งตอนโซกูบน บนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 ที่มีการให้เชื้อ <i>A. tuberculata</i> ร่วมกับการปลูกเชื้อ <i>P. parasitica</i> ...	57
46	รากส้มที่ได้รับการลงเชื้อ <i>A. tuberculata</i> เป็นเวลา 3 เดือน (100x).....	63
47	รากส้มที่ได้รับการลงเชื้อ <i>Gl. etunicatum</i> เป็นเวลา 3 เดือน (40x).....	63
48	PCR products จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสปอร์ของ AM จำนวน 2 สายพันธุ์ โดยใช้ specific AM primer.....	69

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย

ส้ม (Citrus) เป็นพืชผลเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ทำกรปลูกกันอย่างแพร่หลายในทวีปเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวัน รวมถึงประเทศไทย อย่างไรก็ตาม จากการสำรวจตั้งแต่ปี ค.ศ.1995 เป็นต้นมา พบว่า ผลผลิตจากกลุ่มประเทศในทวีปเอเชียมีปริมาณต่ำกว่าจากการผลิตของกลุ่มประเทศทางตะวันตก และยังมีค่าใช้จ่ายในการลงทุนสูงกว่าในกลุ่มประเทศทางตะวันตกอีกด้วย ผลผลิตส้มจากกลุ่มประเทศในทวีปเอเชีย เช่น ในประเทศเกาหลี สามารถผลิตได้ 26 เมตริกตันต่อเฮกตาร์ ประเทศไต้หวัน และประเทศไทย สามารถผลิตได้ 15 เมตริกตันต่อเฮกตาร์ ในขณะที่ กำลังการผลิตเฉลี่ยของกลุ่มทางประเทศตะวันตกสูงถึง 40-60 เมตริกตันต่อเฮกตาร์

สาเหตุที่ทำให้ผลผลิตของส้มจากกลุ่มประเทศในทวีปเอเชีย ซึ่งรวมทั้งประเทศไทยมีปริมาณต่ำ ได้แก่ สภาพภูมิอากาศของประเทศ ซึ่งค่อนข้างร้อน และมีความชื้นสูง ทำให้กลุ่มศัตรูพืช เช่น แมลง และจุลินทรีย์เข้าทำลายได้ดี โดยกลุ่มของโรคที่พบมาก ได้แก่ เชื้อราที่เข้าทำลายระบบราก เช่น *Phytophthora root rot* เป็นต้น ซึ่งในส่วนของประเทศไทยเองก็พบปัญหาในเรื่องของระบบรากของต้นส้มที่ไม่สมบูรณ์ เช่นเดียวกัน การแก้ปัญหาโดยทั่วไปของเกษตรกร ก็คือ การใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช หรือใช้ฮอร์โมนในการเร่งราก ซึ่งแน่นอนว่า จะส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นการเสียดุลการค้า โดยการนำเข้าสารเคมีจากต่างประเทศ หรือแม้แต่การคัดเลือกพันธุ์ส้มที่ต้านทานโรคที่มีการทำวิจัยกันบ้าง แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร อันเนื่องมาจากสายพันธุ์ที่ต้องการจะปรับปรุง ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่ถูกพัฒนามาจากการผ่าเหล่า (Mutation) จึงทำให้ยากต่อการผสม รวมไปถึงต้องใช้ระยะเวลาในการศึกษานาน

ดังนั้น หนทางหนึ่งที่จะช่วยทำให้สภาพของส้มมีความสมบูรณ์ ทั้งระบบราก รวมไปถึงคุณภาพของผลส้ม คือ การปรับปรุงชีวภาพ และการควบคุมศัตรูส้มด้วยชีววิธี ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนต่ำ ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในเชิงลบ และเป็นการอนุรักษ์ทรัพยากรในดินในระยะยาว

เชื้อรามายคอไรซา (Arbuscular Mycorrhiza Fungi : AMF) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในทั้งการส่งเสริมธาตุอาหาร และการควบคุมโรคที่ระบบราก ดังเช่น การใช้เชื้อรากลุ่ม AM จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดื่มน้ำ และสารอาหาร โดยเฉพาะกลุ่มแร่ธาตุ เช่น ฟอสฟอรัส สังกะสี และทองแดง ซึ่งจะส่งผลให้พืชมีความทนทานต่อปัจจัยทางกายภาพ เช่น ส่งเสริมให้กล้าเจริญได้ดีในดินที่มีความเค็มสูง และปัจจัยทางชีวภาพอื่นๆ (Smith และ Read, 1997; Melo และคณะ 2003) หรือในกรณีของโรครากเน่าในพืชที่เกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Phytophthora*, *Fusarium*, *Aphamomyces*, *Verticillium* และ *Sclerotium* และจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Erwinia carotovora* และที่สำคัญไปกว่านี้ *Pseudomonas syringae* ที่ทำให้เกิดโรครากเน่าในมะเขือเทศ ก็สามารถถูกยับยั้งได้เมื่อมีการใส่หัวเชื้อ AM ที่เหมาะสมลงไป (Hooker และคณะ 1994,

Garcia-Garrido และ Ocampo 1988, 1989)

จากรายงานของ Camprubi และ Calvet (1996) และ Fidelibus และคณะ (2000) พบว่า การใช้หัวเชื้อ AM บางชนิดที่ผลิตเป็นการค้า สามารถเพิ่มมวลของลำต้น ราก และจำนวนใบ รวมถึงเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงให้กับส้มในกลุ่ม *Citrus volkameriane* ที่ทำการปลูกในพื้นที่ปกติ และพื้นที่กึ่งทะเลทรายในประเทศสหรัฐอเมริกาได้ หรือในการศึกษาการใช้ AM จินัส *Glomus clarium* กับกล้าต้นส้ม *C. sinensis* L. ในประเทศตุรกี พบว่า การใช้หัวเชื้อ AM สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของส้มได้อย่างมีนัยสำคัญ รวมไปถึงมีการดูดซับธาตุอาหารที่เป็นสังกะสี และฟอสฟอรัสได้เป็นอย่างดี

(ข้อมูลจากhttp://www.toprak.org.tr/isd/can_66.htm)

นอกจากนี้ จากรายงานดั้งเดิมของ Graham (1986) ได้ยืนยันว่า การใช้ AM สามารถทำให้ต้นส้มดูดซึมธาตุฟอสฟอรัส และส่งผลให้ส้มมีการเจริญที่ดีได้ และในปี ค.ศ.1993 Peng และคณะ พบว่ากลุ่มเชื้อรา AM นี้สามารถทำให้ระบบรากของต้นส้มมีความสมบูรณ์ แม้จะอยู่ในสภาพดินที่มีธาตุฟอสฟอรัสจำกัด Davies และ Albrigo (1991) ยังพบว่า การใช้ AM จะช่วยส่งเสริมระบบรากของต้นส้มให้ทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ด้วยเช่นกัน ตัวอย่างของ AM ที่ใช้กับส้ม *Citrus aurantium* ได้แก่ *Gl. sinensis* พบว่า ส่วนใหญ่ส่งเสริมประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงให้กับต้นส้มมากกว่าที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อ AM หรือการใช้ AM ในกลุ่ม *Gl. intraradices* และ *Gl. etunicatum* กับต้นส้มในกลุ่ม *C. paradise* และ *C. volkameriane* พบว่า ทำให้ส้มมีระบบรากฝอยที่แข็งแรงขึ้น (Espeleta และคณะ 1999) นอกจากนี้การใช้ AM ในจินัส *Glomus* sp. สายพันธุ์ FL904 กับต้นส้ม *C. aurantium* พบว่า ทำให้ต้นส้มอยู่ในสภาวะที่แห้งแล้งได้นานถึง 42 วัน (Eissenstat และคณะ 1999) ในส่วนของส้ม Nemec และคณะในปี 1996 พบว่า การใช้เชื้อรา AM *Gl. intraradices* สามารถยับยั้งโรครากเน่าในส้ม (*C. sinensis* L. Osb.) อันเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* ได้ ตั้งแต่ 15-71% ตามพื้นที่ปลูกส้มต่างๆ

ดังนั้น จะเห็นได้ว่า การใช้ AM ซึ่งมีลักษณะที่เป็นทั้ง biofertilizer และ biocontrol agent เป็นที่ได้รับความนิยม โดยเฉพาะกับกลุ่มพืชเศรษฐกิจ เช่น ไม้ผล และพืชสวน (Jefferies และคณะ 2003) ในนานาประเทศโดยเฉพาะแถบสหรัฐอเมริกา และยุโรป ซึ่งคาดหวังกันว่า จะเป็นการลดการใช้ปุ๋ยเคมี และสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้อีกทางหนึ่ง

แต่อย่างไรก็ตาม ในส่วนของเกษตรกรไร้ส้มในประเทศไทยเอง ยังไม่มีการใช้ AM ซึ่งอาจมาจากสาเหตุที่ยังขาดข้อมูลวิจัยในการสนับสนุน และยิ่งไปกว่านั้น มีรายงานวิจัยหลายงานที่ระบุไว้ว่า การปนเปื้อนของสารโลหะหนัก หรือการใช้ยากำจัดศัตรูพืช มีผลต่อกลุ่มประชากรของ AM เช่น การใช้ sludge ที่มีการปนเปื้อนของสารโลหะหนักในกลุ่ม สังกะสี แคดเมียม ทองแดง นิเกิล และปรอท ทำให้จำนวนสปอร์ของ AM มีค่าลดลง และเมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพด้วยดัชนี Shannon Wiener พบว่า มีความหลากหลายลดลงเช่นเดียวกัน ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนจาก sludge ดังกล่าวในเมือง Braunschweig ประเทศเยอรมันนี (Del Val และคณะ 1999) หรือการใช้ยาฆ่าเชื้อรา Terrazole, Terraclor และยากำจัดไส้เดือนฝอย Fenamiphos กับต้นฝ้าย พบว่า ยาฆ่าเชื้อราทั้ง 2 ชนิดยับยั้งการเข้าสู่รากของ AM ชนิด *Gl.*

mosseae ในช่วง 4 สัปดาห์แรกของการปลูกเชื้อ AM แต่ยากำจัดได้เดือนฝอยไม่ได้ส่งผลกระทบในเชิงลบ (Pattinson และคณะ 1997) การใช้ยาฆ่าเชื้อราในกลุ่ม Copper oxychloride และ propiconazole ก็พบว่า มีผลกระทบในเชิงลบ ทั้งในส่วนของจำนวน และความหลากหลายทางชีวภาพของ AM ที่เข้าสู่ระบบรากของ ต้นสน Scot-pine (*Pinus sylvestris*) (Manninen และคณะ 1998) หรือการใช้ Benomyl ในปริมาณ 20 มก./ดิน 1 กก. ทำให้เกิดการยับยั้งการเข้าสู่ระบบรากของ AM ในพืชกลุ่ม oil-seed flax และข้าวบาร์เลย์ (Kahiluoto และ Vestberg 2000) ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของ AM ที่มี อยู่ในสภาพไร้อาหารในประเทศ ที่มีความเหมาะสม และมีประสิทธิภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญ การยับยั้ง โรคในระบบรากของต้นส้ม จากนั้นทำการทดสอบการผลิตในระดับที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้เพื่อทดแทน การใช้ปุ๋ย และสารเคมีบางส่วนต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 2.1 เพื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์ AM ในประเทศ ที่มีประสิทธิภาพในการดูดซับธาตุอาหารพืชเพื่อ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และลดการเกิดโรคที่ระบบรากของต้นส้ม
- 2.2 เพื่อให้ได้กรรมวิธีในการผลิตหัวเชื้อ AM

3. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 สามารถได้ AM ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นส้มรวมถึงทนทานต่อโรค ที่รบกวนระบบรากได้
- 3.2 มีส่วนลดการใช้ปุ๋ยเคมี และยากำจัดศัตรูพืช
- 3.3 มีส่วนลดการใช้ส้มพันธุ์ต้นต่อต้านทานโรค ซึ่งมีราคาแพง

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยก และเก็บสปอร์ของ AM

ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณไร่นาส้มของเกษตรกรในแหล่งปลูกส้มจังหวัดต่างๆ โดยแบ่งแต่ละตัวอย่างมาตัวอย่างละ 200 กรัม นำแต่ละตัวอย่างมาร่อนด้วยตะแกรง ขนาด 750, 250, 100 และ 50 μ M meshes ตามลำดับ นำแต่ละส่วนมาทำการแยกสปอร์โดยการปั่นเหวี่ยงร่วมกับสารละลายซูโครส 50% ตามวิธีการของ Brundett และคณะ (1994) และได้ทำการบันทึกจำนวนสปอร์ที่พบในแต่ละตัวอย่าง

2. การเพิ่มจำนวน AM ในระบบรากพืช

นำสปอร์ที่แยกได้มาทำการเพิ่มจำนวนโดยวิธี trap culture โดยใช้พืช 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และต้นหอมพร้อมกันไป โดยนำเมล็ดมาทำการ surface sterile เพาะลงในกระถางที่บรรจุทรายหนึ่งช่อ เชื้อแล้ว จากนั้นทำการใส่สปอร์ของ AM ในการทดลองนี้ การเพิ่มสปอร์จะใช้วิธีการเพิ่มจำนวนจากสปอร์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกัน (single type spore) ตามวิธีของ Morton และคณะ (1993) และเมื่อพืชมีอายุประมาณ 2-3 เดือน จึงนำรากมาทำการทดสอบ root colonization ด้วยการย้อมสี lactophenol trypan blue ตามวิธีการของ Koske และ Gemme (1989)

ในขั้นแรกได้ทดลองเพิ่มจำนวนเชื้อรา AMF ในรากข้าวโพด, ข้าวฟ่าง, ต้นหอม โดยมีจำนวนสปอร์ตั้งต้น 50 สปอร์/ต้น ดังนี้ *Entrophospora colombiana*, *Gl. etunicatum*, *Gl. sinuosum*, *Gl. intraradices*, *A. tuberculata*, *A. trapei*, *A. scrobiculata*, *Gigaspora calospora* และ *Sclerocystis* sp. โดยทำการปลูกเชื้อ AMF จำนวน 50 สปอร์/ต้น ในแต่ละสายพันธุ์

3. การทดสอบ AMF ที่สามารถเข้าสู่รากของกล้าต้นส้ม

งานทดลองส่วนนี้ เพื่อทดสอบว่าเชื้อ AMF ที่แยกได้มีความสามารถเข้าสู่รากส้มได้หรือไม่ โดยจะใช้ส้มพันธุ์ตระกูลเขียวหวาน รวมทั้งส้มที่ใช้เป็นพันธุ์ต้นตอ เนื่องจากส้มพันธุ์ต้นตอบางพันธุ์มีลักษณะต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อราในดินและ AMF ก็เป็นเชื้อราชนิดหนึ่ง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดลองเพื่อให้แน่ใจว่า AMF สามารถเข้าสู่ (infect) รากของส้มต่างๆ นี้ได้ การดำเนินงานได้นำเมล็ดส้มพันธุ์ต่างๆ กลุ่มส้มเขียวหวาน ได้แก่ เขียวหวาน สายน้ำผึ้ง เป็นต้น ส้มพันธุ์ต้นตอได้แก่ Troyer, Cleopatra นำเมล็ดพันธุ์ส้มเหล่านี้เพาะในกระบะทรายที่หนึ่งช่อเชื้อแล้ว เมื่อส้มมีอายุ 14 วันหลังออก นำมาย้ายปลูกลงในกระถางที่บรรจุทรายที่หนึ่งช่อเชื้อแล้ว จากนั้นนำ สปอร์จำนวนประมาณ 50 สปอร์ใส่ลงไป ทำการเพาะเลี้ยงในเรือนเพาะชำเป็นเวลาต่ออีก 45-60 วัน แล้วทำการทดสอบ root colonization

ในขั้นต่อมา ได้ทำการทดสอบความสามารถเข้าสู่กิ่งตอนของรากส้มเขียวหวาน และสายน้ำผึ้ง โดย

ทำการใส่สปอร์ AMF ที่แยกได้ จำนวน 50 สปอร์/ต้น และทำการเพาะเลี้ยงในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 30-45 วัน จากนั้นทำการทดสอบ root colonization

4. การคัดเลือก และทดสอบประสิทธิภาพสายพันธุ์ AMF ที่เหมาะสมต่อส้มต้นตอ และส้มพันธุ์

การทดสอบในส่วนนี้ ได้ทำการทดสอบในกิ่งตอนของส้มพันธุ์ ได้แก่ เชี่ยวหวาน และสายน้ำผึ้ง และทดสอบในส่วนของส้มต้นตอ ได้แก่ Cleopatra และ C-35 เพื่อคัดเลือก AMF ที่สามารถเข้าอยู่อาศัยในรากส้ม และเหมาะสมต่อส้มต้นตอและส้มพันธุ์นั้นๆ (เนื่องจากในการทดสอบนั้น ได้ใช้ต้นกล้าส้มพันธุ์ต้นตอจากทางบริษัท เจริญโภคภัณฑ์โปรดิ๊วส์ แต่ในช่วงของการคัดเลือก และทดสอบประสิทธิภาพสายพันธุ์ AMF ที่เหมาะสมต่อส้มต้นตอ พบว่า ต้นกล้าส้ม Troyer ที่จะใช้ในการทดสอบนั้น มีไม่เพียงพอต่อการทดสอบ ดังนั้นจึงเลือกใช้ส้มต้นตอพันธุ์ C-35 ทดแทนพันธุ์ Troyer)

4.1) การทดสอบสายพันธุ์ AMF ที่เหมาะสมต่อส้มพันธุ์

ในการทดลองส่วนนี้ ได้ทำการปลูกเชื้อรา AMF ชนิด *Gl. etunicatum*, *A. tuberculata* และนอกจากนี้ยังทำการทดสอบกับหัวเชื้อ AMF ทางการค้า Mycostar (สกุล *Glomus* sp.) และ *Sclerocystis* sp. ซึ่งเป็น AMF ที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา และพบว่า มีปริมาณสปอร์จำนวนมาก ดังนั้นจึงนำ AMF ทั้ง 4 ชนิดมาทดสอบในกิ่งตอนของส้มพันธุ์ 2 พันธุ์ ได้แก่ เชี่ยวหวาน และสายน้ำผึ้ง โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Complete randomize design (CRD) มี 3 ซ้ำ ทำการปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 3 เดือน โดยชุดควบคุม (Control treatment) ได้แก่ ดำรับการทดลองที่ไม่ใส่ AMF (Control treatment), ดำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 8-8-8 (N-P-K) เดือนละ 1 ครั้ง และดำรับการทดลองที่ใส่ AMF ชนิดต่างๆ ที่สามารถเข้ารากส้มได้ เพื่อที่จะนำมาวิเคราะห์หาค่า Mycorrhizal efficiency index (MEI) โดย $MEI = \frac{\text{น้ำหนักพืชที่ใส่ AM} - \text{น้ำหนักพืชที่ไม่ใส่ AM}}{\text{น้ำหนักพืชที่ใส่ AM}} \times 100$ / น้ำหนักพืชที่ใส่ AM และทำการวิเคราะห์แบบ one-way โดยใช้ ANOVA (Gianinazzi และคณะ 2002)

ในการทดลองนี้ ก่อนการใส่สปอร์ AMF นั้น ได้ทำการหาปริมาณฟอสฟอรัสในใบส้มของทั้งส้มพันธุ์ เชี่ยวหวาน และสายน้ำผึ้ง ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ P ทั้งหมด (Total phosphorus) โดยใช้วิธี Wet oxidation ด้วย Acid mixture ($\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4\text{-HClO}_4$) เพื่อย่อยสลายตัวอย่างพืช และทำการวิเคราะห์ปริมาณ P ในสารละลาย โดยใช้วิธี Colorimetric (Allen, 1974) และทำการวัดความสูงของต้นส้มเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง treatment หลังการทดลอง ซึ่งผลการวัดปริมาณฟอสฟอรัสในใบส้มพบว่า ปริมาณ P ในใบส้มพันธุ์เชียวหวานอยู่ในช่วง 0.3-0.8 % P และส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งอยู่ในช่วง 0.3-1.0 % P จากนั้นทำการวิเคราะห์ และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างดำรับการทดลองในแต่ละปัจจัยก่อนและหลังการปลูก ตามปัจจัยต่อไปนี้

1) ความสูง

- 2) น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของราก ลำต้น และน้ำหนักรวมทั้งต้น
- 3) ความยาวของราก
- 4) อัตราส่วนลำต้น/ราก (S/R), specific root length (SRL ซม./กรัม)
- 5) อัตราส่วนพื้นที่ของใบต่อความยาวของราก (LA/RL)
- 6) วัดจำนวน Root colonization ของเชื้อรา AM
- 7) ปริมาณฟอสฟอรัสในใบ (%P)

4.2) การทดสอบสายพันธุ์ AMF ที่เหมาะสมต่อส้มต้นตอ

ในส่วนของการทดสอบสายพันธุ์ AMF ที่เหมาะสมต่อส้มต้นตอนี้ วิธีการทดลอง ดำเนินการเช่นเดียวกันกับการทดสอบสายพันธุ์ AMF ในส้มพันธุ์ โดยใช้ AMF สายพันธุ์ *Gl. etunicatum*, *A. tuberculata*, *Sclerocystis* sp. , หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร (AM ที่แยกได้จากหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตรนี้ จัดอยู่ในสกุล *Glomus* sp.) ในส้มพันธุ์ต้นตอ Cleopatra และ C-35 หลังจากการปลูกในเรือนเพาะชำแล้ว ได้ทำการวัดปัจจัยต่างๆ เช่นเดียวกันกับหัวข้อ 4.1 การทดสอบสายพันธุ์ AMF ในส้มพันธุ์

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งโรครากเน่าในระดับกระถาง

5.1) การสำรวจความเสียหายเพื่อเก็บตัวอย่าง เช่น *Phytophthora* ในสวนส้ม

ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงพฤศจิกายน 2547 ได้ออกสำรวจพื้นที่ปลูกส้ม 5 แห่งคือ อ. โคกสำโรง จ. ลพบุรี, อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม, อ. ละหานทราย จ. บุรีรัมย์, รวมทั้ง อ. พิมาย และ อ. วังน้ำเขียว จ. นครราชสีมา

5.2) การแยกเชื้อและพิสูจน์สาเหตุจากโรคเน่า

จากอาการที่พบในสภาพสวน สันนิษฐานได้ว่าส้มที่แสดงอาการต้นโทรมและแห้งตาย น่าจะเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Phytophthora* (อำเภอวรรณ และคณะ 2527) จึงได้ทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินและราก ตามวิธีการของ Mitchell และ Kannasicher-Mitchell (1993) โดยใช้วิธีการล่อด้วยใบส้ม (baiting) และแยกจากเนื้อเยื่อรากโดยตรง โดยใช้สูตรอาหารต่างๆ 9 สูตร ซึ่งมีรายละเอียดตามวิธีการดังนี้

1.การล่อด้วยใบส้ม นำดินบริเวณรอบรากที่แสดงอาการ หรือชิ้นส่วนของรากที่แสดงอาการหนักประมาณ 5 กรัม ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ เติมน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปในจานๆ ละ 20 มล. เขย่าจานให้ดินละลาย นำใบส้มพันธุ์โชกุนที่ล้างด้วยน้ำสบู่ และผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วย NaOCl (Clorox 10%) แล้วใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ จานละ 1 ใบ โดยตัดใบเป็น 2 ส่วนหรือไม่ตัด บ่มจานไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง (22-28°C) จนใบส้มมีแผลช้ำน้ำเกิดขึ้น ผลการทดลองพบว่า ใบส้มในจานที่ใช้รากเป็นแหล่งเชื้อมีอัตราการติดเชื้อสูงกว่าในจานที่ใช้ดินเป็นแหล่งเชื้อ คือได้ใบติดเชื้อ 8 จาก 10 ใบ ขณะที่จานที่ใช้ดินเป็นแหล่งเชื้อได้ใบติดเชื้อเพียง 2 ใบจาก 10 ใบ โดยใบที่ตัดเป็น 2 ส่วน แสดงอาการช้ำน้ำลามจากรอยตัดภายในเวลา 36 ชั่วโมง

ขณะที่ไม่ตัดใช้เวลาานกว่า (มากกว่า 48 ชม.) เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นรอยชำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเส้นใย (coenocytic hypha) และ sporangia ของเชื้อ *Phytophthora* จำนวนมาก

2. การแยกเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้พยายามพัฒนาอาหารที่ใช้เลี้ยงและแยกเชื้อขึ้นเอง เนื่องจากไม่สามารถจัดหาองค์ประกอบของ *Phytophthora* Selective Medium (PSM) (Kannwischer and Mitchell, 1978) ได้ครบตามที่ระบุสูตรอาหารที่ใช้ทดลองได้แก่

2.1 Modified corn meal (MCMA) ประกอบด้วยน้ำสกัดจากเมล็ดข้าวโพดสด 100 กรัม รูน 18 กรัม ผสมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร (ดัดแปลงจากสูตรของ Tuite, 1969)

2.2 MCMA 1 ลิตร ผสม nystatin 50 มก. Carbendazin 10 มก. Procloraz 100 มก. Rifampicin 100 มก. และ Ampicillin 250 มก. (MCMA-1)

2.3 สูตร MCMA-1 ไม่ใส่ procloraz (MCMA-2)

2.4 สูตร MCMA-1 ใช้ PCNB แทน carbendazim (MCMA-3)

2.5 สูตร MCMA-3 ไม่ใส่ procloraz (MCMA-4)

2.6 สูตร MCMA-1 ใส่ cefloxacin แทน rifampicin (MCMA-6)

2.7 สูตร MCMA-1 ใส่ ketoconazole แทน carbendazim และ procloraz (MCMA-6)

2.8 สูตร MCMA ผสม ampicillin และ benomyl (10 mg/l) (MCMA-7)

2.9 สูตร MCMA ผสม ampicillin, benomyl และ iprodione (50 mg/l) (MCMA-8)

สารเคมีที่ใช้ผสมทั้งหมดเป็น pharmaceutical grade ที่จัดหาจากรายขายยา

การแยกเชื้อใช้ทั้งเนื้อเยื่อจากรากที่แสดงอาการชวรรอยต่อแผลใบที่ใช้ล่อบริเวณรอบต่อแผล ทั้งที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วย 1% Clorox และไม่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ พบว่าสูตรที่ 1 (MCMA) มีเชื้อแบคทีเรียขึ้นคลุมเนื้อเยื่อไม่สามารถใช้แยกได้ ขณะที่บางสูตรไม่มีเชื้อใด ๆ เจริญได้เลย การใช้สูตรที่ 2-4 (MCMA-3) แยกได้เชื้อ *Fusarium 3 species* และเฉพาะสูตรที่ 2.8 และ 2.9 แยกได้เชื้อ *Phytophthora* ทั้งจากเนื้อเยื่อรากและเนื้อเยื่อใบล่อ โดยอัตราการแยกได้จากเนื้อเยื่อไม่ฟอกสูงกว่าเนื้อเยื่อฟอก Clorox (12/20 เทียบกับ 2/20 เมื่อใช้รากเป็นแหล่งแยกเชื้อ และ 9/12 เทียบกับ 3/12 เมื่อใช้ใบล่อเป็นแหล่งแยกเชื้อ

5.3) การจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora*

ได้ทำการศึกษารายละเอียดทางสัณฐานวิทยา และชีววิทยาของเชื้อ *Phytophthora* ที่แยกได้จากส้มโชกุนที่แสดงอาการไหม้ และรากเน่าที่เกิดจากพื้นที่อำเภอยะนิง และทำการบันทึกผล

5.4) การพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของ *P. citrophthora*

เนื่องจากงานทดลองขั้นตอนต่อไปของโครงการ คือ การตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อ AMF ในการควบคุมโรครากเน่าจาก *Phytophthora* จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Phytophthora* ที่แยกได้เพื่อนำไปใช้สร้างสภาพดินปลูกติดเชื้อ หรือ hot spot ในการทดสอบประสิทธิภาพของการควบคุมโรค การทดลองในขั้นนี้ กระทำโดยเพิ่มปริมาณเชื้อ *P. citrophthora* ในอาหาร MCMA จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อไปใส่ลงในน้ำสกัดดิน 1% ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำเอาใบส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุนที่ฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวลงลอยในน้ำสกัดดิน เพื่อใช้ล่อการเข้าทำลายจากเชื้อ

P. citrophthora ซึ่งจะแสดงให้เห็นเป็นแผลช้ำน้ำบนเนื้อเยื่อใบภายใน 36 ชั่วโมง จากนั้นใช้ใบที่ติดเชื้อเป็น inoculum ปลูกเชื้อลงบนพืชตระกูลส้ม 3 ชนิด คือ ส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุน ส้มโอรุ่นทองดี และมะนาว โดยเปรียบเทียบวิธีปลูกเชื้อ 3 วิธี คือ

1. เชื้อนปลูกลำต้นบริเวณคอต้นด้วยมีดให้เป็นแผลยาว 1 ซม. ต้นละ 2 แผล
2. แทะเปลือกลำต้นบริเวณคอต้นด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 22 ลึก 5 มม. ต้นละ 4 แผล
3. ไม่ทำแผล

ทั้ง 3 วิธี ใส่ inoculum จำนวน 3 ใบต่อต้น บริเวณที่ทำแผล หรือตรงคอต้นในกรณีที่ไม่ทำแผล ใช้ดินคลุมบริเวณดังกล่าวหลังจากปลูกเชื้อ ทดสอบวิธีการละ 3 ต้น ในแต่ละชนิดพืช โดยใช้ส้มชนิดเดียวกันกับที่ทำแผล แต่ไม่ปลูกเชื้อเป็นต้นเปรียบเทียบ ส้มเขียวหวานที่ใช้เป็นกิ่งตอนอายุประมาณ 10 เดือน ปลูกในกระถางพลาสติกขนาด 12 นิ้ว ส้มโอ และมะนาว เป็นกิ่งตอนอายุประมาณ 1 ปี ปลูกในวงซีเมนต์ขนาด 30 นิ้ว

5.5) การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ AMF ในการยับยั้งโรครากเน่าที่เกิดจาก

เชื้อ *Phytophthora* ในส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 ที่มีการต่อกิ่งด้วยส้มพันธุ์โชกุน

ในการทดลอง ได้ทำการทดสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *P. citrophthora* และ *P. parasitica* และทดสอบการทำให้เกิดโรคในกิ่งตอนส้มโชกุนที่ต่อกิ่งบนต้นตอ C-35 ร่วมกับการทดสอบในส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 (ต่อกิ่งด้วยพันธุ์โชกุน) ซึ่งเป็นส้มปลอดโรคที่ได้มาจากบริษัท เจริญโภคภัณฑ์โปรดิ๊วส์ เพื่อใช้เป็นระบบทดสอบในการตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อ AMF ที่ได้เก็บรวบรวมไว้ ระบบทดสอบที่ได้นี้จะช่วยคัดเลือก AMF ไส้หลอดที่มีศักยภาพ อย่างไรก็ตาม จากการเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ และการชักนำให้เกิดโรคของเชื้อ *P. citrophthora* เพื่อใช้เป็น inoculum ในการปลูกลงบนต้นส้ม นั้น พบว่า เชื้อ *P. citrophthora* เกิดการสูญเสียความสามารถในการชักนำให้เกิดโรค เมื่อเปรียบเทียบกับ การแยกและทดสอบในครั้งแรก เชื้อเกิดความอ่อนแอ (weak) ในการทำให้เกิดโรค อีกทั้งยังพบว่า ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ความสามารถในการทำให้เกิดโรคน้อยลง ดังนั้นจึงทำการทดสอบด้วยเชื้อสายพันธุ์ *P. parasitica* เพียงอย่างเดียว ซึ่งขั้นตอนในการทดลองนี้ ได้ทำการปลูกเชื้อ AMF สายพันธุ์ *A. tuberculata* และ *Gl. etunicatum* จำนวน 100 สปอร์/ต้น ลงในส้มพันธุ์ต้นตอ C-35

(ต่อกิ่งพันธุ์โซกุน) ก่อนการปลูกเชื้อด้วย *P. parasitica* โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ หลังจากนั้น 1 เดือน จึงทำการปลูกเชื้อด้วย *P. parasitica* โดยใช้ใบที่ติดเชื้อเป็นกล้าเชื้อ (inoculum) โดยทำการปลูกเชื้อลงบริเวณโคนต้นส้มพันธุ์ต้นตอจำนวน 4 ใบ ซึ่งแยกเป็นดำรับการทดลองได้ดังต่อไปนี้

- 1) ส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 (ต่อกิ่งด้วยพันธุ์โซกุน) ที่ไม่มีการให้เชื้อ AMF และ *Phytophthora* (ชุดควบคุม)
- 2) ส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 (ต่อกิ่งด้วยพันธุ์โซกุน) ที่มีการให้เชื้อ *P. parasitica*
- 3) ส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 (ต่อกิ่งด้วยพันธุ์โซกุน) ที่มีการให้เชื้อ *A. tuberculata* + *P. parasitica*
- 4) ส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 (ต่อกิ่งด้วยพันธุ์โซกุน) ที่มีการให้เชื้อ *Gl. etunicatum* + *P. parasitica*
- 5) ส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 (ต่อกิ่งด้วยพันธุ์โซกุน) ที่มีการให้เชื้อ *A. tuberculata*
- 6) ส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 (ต่อกิ่งด้วยพันธุ์โซกุน) ที่มีการให้เชื้อ *Gl. etunicatum*

จากนั้นทำการให้น้ำตามปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์เพื่อให้เชื้อเข้าทำลาย และรดน้ำเป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นทำการสังเกตลักษณะของต้นส้ม และตรวจว่ามีอาการของการเกิดโรคอันเนื่องมาจากเชื้อ *P. parasitica* หรือไม่ ในกรณีที่เกิดโรคต้นส้มจะแสดงอาการของส่วนเหนือดิน คือ ใบบริเวณส่วนยอดสดในช่วงปลาย และเริ่มหลุดร่วงหลังจาก 4 สัปดาห์ จากนั้นจึงเกิดอาการตายลามจากปลายกิ่ง (die back)

ในส่วนของการทดลองขั้นต่อไปนี้ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสายพันธุ์ AMF ที่มีต่อการยับยั้งการเกิดโรคอันเนื่องมาจากเชื้อ *P. parasitica* ในกิ่งตอนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 (กิ่งพันธุ์โซกุน) ได้ทำการตอนกิ่งส้มพันธุ์โซกุนที่ต่อกิ่งบนต้นตอ C-35 โดยใช้ดินผสมขุยมะพร้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นลูกตอนสำหรับหุ้มกิ่งตอน (รูปที่ 32A) จากนั้นทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดราก ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 เดือน ในระหว่างนี้ได้ทำการให้น้ำ และสารละลายธาตุอาหาร (Hoagland solution) 1 ครั้ง/สัปดาห์ หลังจากที่เกิดเห็นรากอกบริเวณกิ่งตอนแล้ว จึงทำการปลูกเชื้อ AMF สายพันธุ์ *A. tuberculata* จำนวน 50 สปอร์/กิ่งตอน เพื่อให้เชื้อ AMF นี้ เข้าไปอาศัยในรากก่อนการให้เชื้อ *Phytophthora* หลังจากนั้นเป็นเวลา 1 เดือน จึงทำการปลูกเชื้อด้วย *P. parasitica* โดยใช้ใบที่ติดเชื้อเป็นกล้าเชื้อ โดยปลูกเชื้อลงในลูกตอนจำนวน 3 ใบ (รูปที่ 32B) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซึ่งแยกเป็นดำรับการทดลองได้ดังต่อไปนี้

- 1) กิ่งตอนโซกุน ที่ไม่มีการให้เชื้อ Mycorrhiza และ *Phytophthora* (ชุดควบคุม)
- 2) กิ่งตอนโซกุน ที่มีการให้เชื้อ *P. parasitica*
- 3) กิ่งตอนโซกุน ที่มีการให้เชื้อ *A. tuberculata* + *P. parasitica*
- 4) กิ่งตอนโซกุน ที่มีการให้เชื้อ *A. tuberculata*

จากนั้นทำการให้น้ำตามปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์เพื่อให้เชื้อเข้าทำลาย และรดน้ำเป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นทำการสังเกตลักษณะของกิ่งตอนส้ม ว่ามีอาการของการเกิดโรคอันเนื่องมาจากเชื้อ *P. parasitica* หรือไม่ ในกรณีที่เกิดโรคกิ่งตอนส้มจะแสดงอาการของโรคเช่นเดียวกันกับที่แสดงในส้มพันธุ์ต้น

ต่อ C-35 ดังที่ได้รายงานไปข้างต้น

6. การทดสอบประสิทธิภาพการดูดใช้ธาตุ N, P, K และ micronutrients ของ AM

ทำการทดลอง ณ บริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และใช้สัมพันธุ์เหี่ยวหวาน ซึ่งลักษณะดินที่ใช้ทดลองนั้นมีลักษณะเป็นดินร่วนปนทราย มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และได้มีการให้เชื้อ AM ที่คัดเลือกได้ ซึ่งได้แก่ *Gl. etunicatum* และ *A. tuberculata* ก่อนมีการให้ปุ๋ยเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomize design, CRD) แบ่งเป็น 7 ดำรับการทดลอง จำนวน 5 ซ้ำ ดังนี้

- 1) Control treatment: ชุดทดลองที่ไม่ใส่ทั้ง N, P, K, micronutrients และ AM
- 2) N, P, K treatment: ชุดทดลองที่มีการให้ N, P, K
- 3) N, P, K + micronutrient: ชุดทดลองที่มีการให้ N, P, K และ micronutrients
- 4) AM treatment: ชุดทดลองที่มีการให้เชื้อ AM ชนิด *Gl. etunicatum*
- 5) AM treatment: ชุดทดลองที่มีการให้เชื้อ AM ชนิด *A. tuberculata*
- 6) AM + N, P, K + micronutrients: ชุดทดลองที่มีการให้ทั้ง AM ชนิด *Gl. etunicatum* ร่วมกับการให้ N, P, K และ micronutrients
- 7) AM + N, P, K + micronutrients: ชุดทดลองที่มีการให้ทั้ง AM ชนิด *A. tuberculata* ร่วมกับการให้ N, P, K และ micronutrients

หลังจากนั้นทำการปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน มีการให้ปุ๋ยทุก 2 สัปดาห์ และทำการวัดปัจจัยต่างๆ ดังนี้

- 1) วิเคราะห์ธาตุอาหารในดิน ก่อนการปลูก และหลังการปลูก เพื่อหาค่าความแตกต่าง
- 2) วิเคราะห์ธาตุอาหารในใบสั้ม ก่อนการปลูก และหลังการปลูก เพื่อหาค่าความแตกต่าง
- 3) วัดความสูงของต้นสั้มก่อนปลูก และหลังปลูก และหาค่าความแตกต่าง
- 4) หา % การเข้าอยู่อาศัยของ AM ในรากสั้ม (% AM colonization)

7. การจำแนกสายพันธุ์ของ AM ที่มีประสิทธิภาพที่ใส่ลงไปในการปลูก

การทดลองนี้ได้นำสปอร์ของ AM ที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านมา มาทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เพื่อยืนยันผลร่วมกับการจำแนกทางสัณฐานวิทยา ว่า AM นั้นเป็นสายพันธุ์เดียวกันกับที่ใช้ในการทดลอง และเพื่อยืนยันว่า ผลที่เกิดขึ้นนั้น มาจากการใช้ AM ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจริงๆ ในขั้นต้น ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากสปอร์ของเชื้อรา AM ตามวิธีการของ (Schwarzott และ SchuBler, 2001) จากนั้น นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ Large Subunit Ribosomal (LSU rDNA) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ 2 คู่ primer ได้แก่ LR1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GA-3'), FLR2(5'-GTC GTT TAA AGC CAT TAC GTC-3') ซึ่งเป็น fungal primer (Trouvelot และคณะ 1999; van Tuinen และคณะ 1998) และคู่ที่ 2 ได้แก่ FLR3 (5'-TTG AAA GGG AAA CGA TTG AAG T-3'), FLR4

(5'-TAC GTC AAC ATC CTT AAC GAA-3') ซึ่งเป็น specific AM primer (Engels, 1993) จากนั้นทำการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR นี้ โดยใช้พลาสมิด pGEM T-easy vector (promega) ถ่ายเข้าสู่ *E.coli* (DH5 α) และทำการเลือกโคลนเพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบส (sequencing) ในขั้นต่อมา นำลำดับเบสที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจาก GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

8. การศึกษาศักยภาพการผลิต AM inoculant

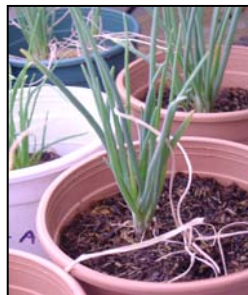
เนื่องจาก AMF ไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ได้ เพราะเป็นพวก obligate symbiosis ดังนั้นการขยายพันธุ์ทำได้โดยการอยู่ร่วมกันกับรากพืช การผลิต AM inoculant จำเป็นจะต้องหาพืชอาศัย (host) ที่ AM แต่ละชนิดที่ทำการคัดเลือกได้แล้วว่ามีประสิทธิภาพดีกับสัมผัส สามารถเข้าสู่ราก และผลิตสปอร์ได้มากที่สุด การวิจัยในส่วนนี้ จำเป็นจะต้องหาพืชที่มีรากมาก ซึ่งการทดลองนี้ จึงเลือกใช้ข้าวโพดและข้าวฟ่าง เป็นพืชอาศัย ในส่วนของวัสดุปลูกที่เอื้ออำนวยให้รากพืชเจริญเติบโตนั้น ได้ทำการทดลองใช้

- vermiculite + peat ในอัตราส่วน 3:1

- ดินร่วน + peat ในอัตราส่วน 3:1

โดยก่อนการปลูกพืช ได้นำวัสดุปลูกเหล่านี้ไปทำการฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นทำการปลูกพืช และลงเชื้อ AM ตลอดจนการผลิต inoculant และการเก็บรักษา inoculant ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ จะทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อตลอดทั้งกระบวนการ ดังแสดงในรูปที่ 1

Inoculum Experiment



Trap culture และ Spore collection



เพาะเมล็ดข้าวโพด และข้าวฟ่าง

50 เมล็ด/กระถาง



2-3 สัปดาห์



ย้ายกล้าพืชลงใน Cone-tainer (Sterilization by 10% Clorox)

โดยใช้วัสดุปลูก – Vermiculite (V) : Peat (P) (3:1)

- Sand (S) : Peat (P) (3:1)

โดยปลูกข้าวโพดจำนวน 10 ต้น/กระถาง

โดยปลูกข้าวฟ่างจำนวน 20 ต้น/กระถาง



ลงเชื้อ AM สปอร์ ใส่ลงไปบริเวณราก

- *Gl. etunicatum* 50 สปอร์/กระถาง

- *A. tuberculata* 100 สปอร์/กระถาง



6 สัปดาห์

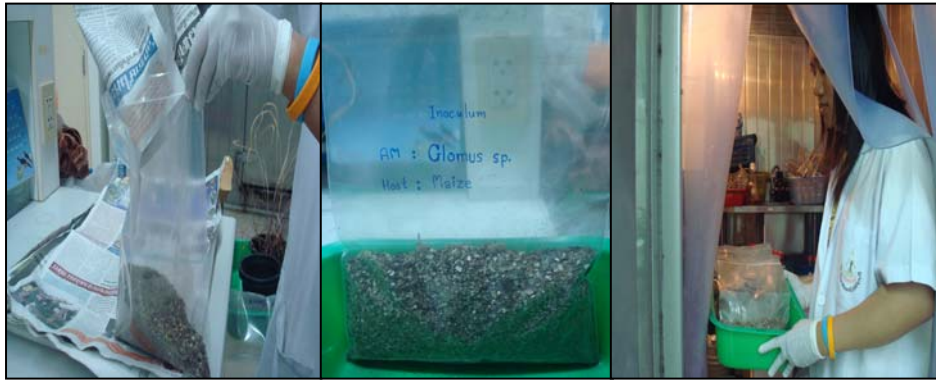
รดน้ำ 2 สัปดาห์



ตัดราก และดิน คลุกเคล้ากัน

(ฆ่าเชื้อทุกขั้นตอน)





Pack ใส่ถุง zip-lock และเก็บไว้ที่ 4 °c

- นับจำนวนสปอร์
- วัดความชื้น



4 สัปดาห์

- นับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิต
- วัดความชื้น
- นับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 5 เดือน

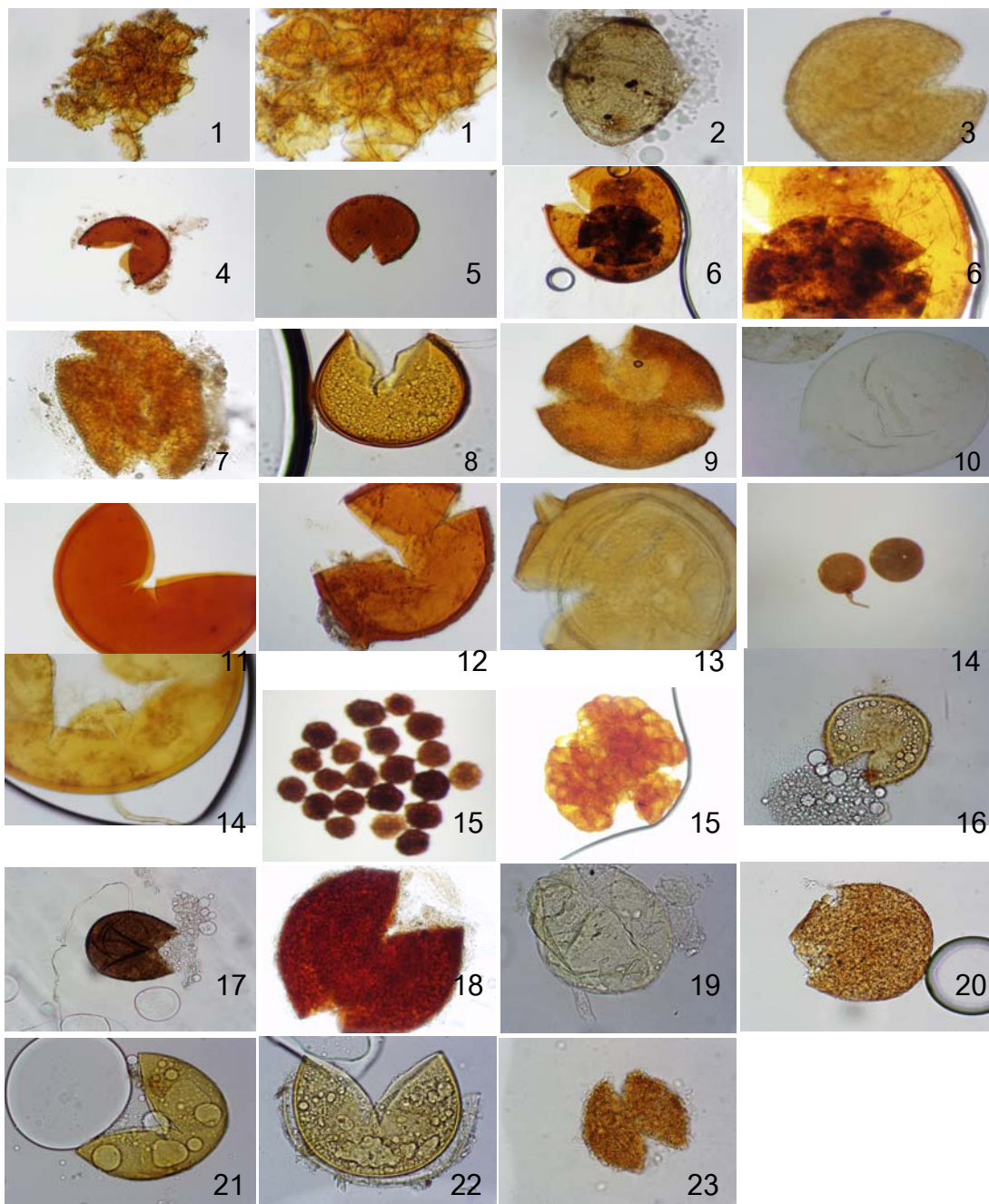
รูปที่ 1 กระบวนการการผลิต AM inoculant

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดแยก และเก็บสปอร์ของ AM

จากผลการคัดแยกเชื้อ การเก็บรวบรวม และการสำรวจความหลากหลายของเชื้อรา AMF จากการเก็บตัวอย่างดินในสวนส้มจำนวน 26 แหล่ง จากบริเวณพื้นที่จังหวัด นครราชสีมา, ลพบุรี, กำแพงเพชร, นครปฐม, จันทบุรี และเชียงใหม่ ทำการแยกลักษณะของสปอร์เชื้อ AMF เบื้องต้นโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้ดังนี้ ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ 6 ตัวอย่างดิน ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างในบริเวณสวนส้มชลธาร, สวนส้มไทยลานนา, สวนส้มอำเภอแม่อาว และสวนส้มอำเภอแมริม พบเชื้อ AMF สายพันธุ์ *Acaulospora scrobiculata*, *A. tuberculata*, *Glomus caledonium*, *Gl. etunicatum*, *Gl. microaggregatum*, *Gl. sinuosum*, *Gl. aggregatum*, และ *Entrophospora colombiana* จำนวนสปอร์เฉลี่ยตั้งแต่ 10-230 สปอร์/ดิน 100 กรัม ในพื้นที่จังหวัดลพบุรี 4 ตัวอย่างดิน พบเชื้อ AMF สายพันธุ์ *Gl. mosseae*, *Gl. etunicatum*, *Gl. intraradices*, *Gl. clarum*, *Gl. caledonium*, *Gl. tortuosum*, *Gl. sinuosum*, *Gl. microcarpus* และ *A. tuberculata* จำนวนสปอร์เฉลี่ยประมาณ 80 สปอร์/ดิน 100 กรัม ในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา 5 ตัวอย่างดิน ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างในบริเวณสวนส้มเพชรพิมาย อ.พิมาย และสวนส้ม อ.สูงเนิน พบเชื้อ AMF สายพันธุ์ *Gl. etunicatum*, *Gl. sinuosum*, *Gl. clarum*, *A. scrobiculata* และ *A. tuberculata* จำนวนสปอร์เฉลี่ยประมาณ 30-40 สปอร์/ดิน 100 กรัม ในพื้นที่จังหวัดจันทบุรี 6 ตัวอย่างดิน พบเชื้อ AMF สายพันธุ์ *A. scrobiculata*, *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum* และ *Scutellospora gregaria*. จำนวนสปอร์เฉลี่ยประมาณ 30 สปอร์/ดิน 100 กรัม ในพื้นที่จังหวัดกำแพงเพชร 4 ตัวอย่างดิน พบเชื้อรา AMF สายพันธุ์ *A. scrobiculata* และ *Gl. etunicatum* จำนวนสปอร์เฉลี่ยประมาณ 20 สปอร์/ดิน 100 กรัม ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม 1 ตัวอย่างดิน บริเวณ อ.นครชัยศรี พบเชื้อ AMF สายพันธุ์ *Gl. etunicatum*, *Gl. intraradices*, *A. tuberculata*, *Gl. sinuosum* และ *Sc. gregaria* จำนวนสปอร์เฉลี่ยประมาณ 50 สปอร์/ดิน 100 กรัม (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ตัวอย่างสปอร์ AMF จากตัวอย่างดินสวนส้มใน จ.เชียงใหม่ (1)-(8), ตัวอย่างสปอร์ AMF จากตัวอย่างดินสวนส้มใน จ. นครราชสีมา (9)-(15), ตัวอย่างสปอร์ AMF จากตัวอย่างดินสวนส้มใน จ. จันทบุรี (16)-(22), ตัวอย่างสปอร์ AMF จากตัวอย่างดินสวนส้มใน จ.นครปฐม

1) *Gl. microaggregatum* 2) *A. scrobiculata* 3) *Gl. aggregatum* 4) *A. tuberculata* 5) *Gl. etunicatum* 6) *Entrophospora colombiana* 7) *Gl. sinuosum* 8) *Gl. intraradices* 9) *Gl. sinuosum* 10) *A. scrobiculata* 11) *A. tuberculata* 12) *Gl. etunicatum* 13) *Gl. clarum* 14) *Gi. calospora* 15) *Sclerocystis* sp. 16) *Gl. clarum* 17) *A. tuberculata* 18) *Gl. aggregatum* 19) *A. trappei* 20) *Gl. sinuosum* 21) *Gl. etunicum* 22) *Gl. intraradices*, และ 23) *Gl. sinuosum*

จากการแยก และเก็บสปอร์เชื้อรา AMF จากพื้นที่สวนส้มต่าง ๆ พบว่าสายพันธุ์เชื้อรา AMF ที่มีพบส่วนใหญ่จัดอยู่ใน 4 จีนิส (*Glomus* sp., *Acaulospora* sp., *Gigaspora* sp. และ *Sclerocystis* sp.) ดังนี้ *A. tuberculata*, *Gl. aggregatum*, *Gl. sinuosum*, *Gl. caledonium*, *Gl. clarum*, *Gl. intraradices*, *Gl. mosseae*, *Gl. etunicatum*, *A. scrobiculata*, *Gi. calospora* และ *Sclerocystis* sp.

จากผลการเก็บรวบรวม และแยกจำนวน AMF ในตัวอย่างดินจากสวนส้มต่างๆ นั้น พบว่า ปริมาณสปอร์ต่อดิน 100 กรัมในแต่ละพื้นที่นั้นมีน้อยมาก อาจเนื่องมาจากดินบริเวณสวนส้มมีปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีสูง ทำให้มีปริมาณธาตุอาหารสะสมอยู่ในดินมาก โดยเฉพาะปริมาณฟอสฟอรัส ซึ่งจากการนำตัวอย่างดินจากสวนส้มในแต่ละพื้นที่มาทำการวิเคราะห์ พบว่า มีปริมาณ available phosphorus ในดินดังสรุปในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณ available phosphorus ของตัวอย่างดินสวนส้มในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และ นครราชสีมา

พื้นที่เก็บตัวอย่างดินสวนส้ม	ปริมาณ Phosphorus (ppm P หรือ mg kg ⁻¹)
ดินสวนส้มไทยลานนา เชียงใหม่	531.25
ดินสวนส้ม อำเภอมะนัง เชียงใหม่	481.00
ดินสวนส้มสามแยกอำเภอมะนัง เชียงใหม่	443.75
ดินสวนส้ม อำเภอชลธาร เชียงใหม่	450.00
ดินสวนส้มเพชรพิมาย อำเภอพิมาย นครราชสีมา	1,087.50

จากตารางที่ 1 พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสที่วิเคราะห์ได้นี้ มีผลต่อการเจริญของ AMF และ colonization ในราก จากรายงานการศึกษา พบว่า ระดับของฟอสฟอรัสที่สูงขึ้นในดิน ไม่เพียงแต่จะลดการงอกของสปอร์ และการเจริญของเส้นใย ระดับฟอสฟอรัสที่สูงขึ้นนี้ยังมีผลทำให้ colonization ของ AMF ในราก และการเจริญของเส้นใยนอกรากพืช (extraradical mycelium) ลดลงด้วย (Miranda และ Harris 1994).

นอกจากนี้ จากการศึกษ พบว่า ในรากของแตงกวา เมื่อระดับของฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้น (0, 15, 30, 60 และ 90 mg kg⁻¹ soil) จะมีผลทำให้ colonization ลดลงอย่างเห็นได้ชัด จาก 84% จนถึง 27% (Olsson et al., 1997) ซึ่งถ้าทำการเปรียบเทียบปริมาณฟอสฟอรัสจากตัวอย่างดินสวนส้ม(ตารางที่ 1) พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสที่วิเคราะห์ได้นี้ มีปริมาณสูง ซึ่งมีผลต่อการเจริญของ AMF และการ Colonization ในราก ดังนั้น จึงทำให้ได้ปริมาณ และชนิดของ AMF น้อยมากจากตัวอย่างดิน ดังนั้นจึงทำการเก็บสปอร์เพิ่มเติม จากตัวอย่างดินที่ปลูกพืชในตระกูลใกล้เคียงกับส้ม เช่น ดินที่ปลูกมะนาว หรือมะกรูด บริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา พบว่า มีปริมาณสปอร์จำนวนมาก ประมาณ 100 สปอร์/ดิน 100 กรัม เนื่องจากบริเวณนี้มีการใช้ปุ๋ยเคมีน้อย ดังนั้นจึงสามารถเก็บสปอร์ได้มากพอสมควรที่จะใช้เป็นสปอร์ตั้งต้น ในการเพิ่มจำนวนในพืชอาศัยที่เหมาะสมต่อไป

2. การเพิ่มจำนวน AM ในระบบรากพืช

ผลจากการเพิ่มจำนวนสปอร์ AMF พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์อยู่ในช่วง 50-100 สปอร์/ดิน 100 กรัม และจากการทดลองหลายครั้ง พบว่า AMF สายพันธุ์ *Gl. etunicum*, *A. tuberculata* และ *Gi. calospora* สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ดังนั้น ในขั้นต่อมา จึงทำการเพิ่มจำนวนสปอร์สายพันธุ์ดังกล่าวในรากต้นหอม, ข้าวฟ่าง และข้าวโพด โดยทำการ propagate สปอร์ จำนวน 50 สปอร์/ต้น ในแต่ละชนิดสปอร์

ผลจากการเพิ่มจำนวน AMF สปอร์ แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่า พืชอาศัยข้าวโพด และข้าวฟ่าง สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ของ *Gl. etunicum* และ *A. tuberculata* ได้มากกว่าในต้นหอม เฉลี่ยเท่ากับ 100 สปอร์/ดิน 100 กรัม ซึ่งในขั้นต่อไปนั้น สปอร์ที่เพิ่มจำนวนได้นี้ จะถูกนำไปทดสอบความสามารถในการเข้าสู่รากของกล้าต้นส้มต่อไป

ตารางที่ 2 การเพิ่มจำนวนสปอร์ AMF ในพืชอาศัย

ชนิด AMF	ข้าวโพด (จำนวนสปอร์/ดิน 100 กรัม)	ข้าวฟ่าง (จำนวนสปอร์/ดิน 100 กรัม)	ต้นหอม (จำนวนสปอร์/ดิน 100 กรัม)
<i>Glomus etunicum</i>	~ 100	~ 100	< 50
<i>Acaulospora calospora</i>	~ 100	~ 100	~ 50
<i>Gigaspora calospora</i>	70-80	70-80	< 50

และจากการทดสอบ root colonization พบว่า เปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของ AMF ในรากข้าวโพด, ข้าวฟ่าง และ ต้นหอม เท่ากับ 40, 30 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม จากการเพิ่มจำนวนสปอร์นั้น พบว่า มี AMF บางสายพันธุ์เท่านั้น เช่น *Glomus sp.*, *Acaulospora sp.*, *Gigaspora sp.* ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ดี ส่วน AMF สายพันธุ์อื่นๆ การเพิ่มจำนวนไม่ดีเท่าที่ควร อาจเนื่องมาจาก การควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆ ยังไม่เหมาะสมต่อการเจริญของ AMF สกุลนั้นๆ เช่น ปริมาณฟอสฟอรัส, pH ในดิน, ชนิด และอายุของพืชอาศัย, ความสมบูรณ์ของสปอร์ และจำนวนสปอร์ ตั้งต้นในการ propagate ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ มีผลต่อการเจริญของ AMF มาก จึงจำเป็นต้องควบคุมปัจจัยเหล่านี้ให้เหมาะสมต่อการเจริญของ AMF

3. การทดสอบ AMF ที่สามารถเข้าสู่รากของกล้าต้นส้ม

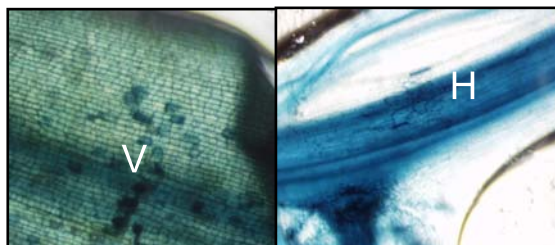
ผลจากการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AMF ในบางสายพันธุ์ ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีจากพืชอาศัย พบว่าเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AMF สายพันธุ์ *Gl. etunicatum* ในต้นส้มสายพันธุ์ Cleopatra เท่ากับ 60% ส่วนในส้มสายพันธุ์สายน้ำผึ้งเท่ากับ 50% และในส้มพันธุ์ Troyer เท่ากับ 40% เปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อสายพันธุ์ *A. tuberculata* ในรากส้มพันธุ์ Cleopatra เท่ากับ 50 % พันธุ์สายน้ำผึ้งเท่ากับ 60% และพันธุ์ Troyer เท่ากับ 70% ส่วนผลการทดสอบการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AMF สายพันธุ์ *A. trappei* พบว่าเท่ากับ 30%, 50% ในส้มพันธุ์ Cleopatra และพันธุ์สายน้ำผึ้งตามลำดับ และไม่พบว่ามี การเข้าอยู่อาศัยในส้มพันธุ์ Troyer (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AMF ในรากส้ม (Root colonization)

สายพันธุ์ AMF	สายพันธุ์ส้ม	Colonization (%)
<i>Glomus etunicatum</i>	Cleopatra	60
	Troyer	40
	สายน้ำผึ้ง	50
<i>Acaulospora tuberculata</i>	Cleopatra	50
	Troyer	70
	สายน้ำผึ้ง	60
<i>Acaulospora trappei</i>	Cleopatra	30
	Troyer	ND*
	สายน้ำผึ้ง	50

* Not detected (ไม่พบการเข้าอยู่อาศัยของ AMF)

ผลจากการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AMF นั้น (รูปที่ 3) พบว่า เปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AMF ชนิด *Gl. etunicatum* ในกิ่งตอนส้มเขียวหวานเท่ากับ 20% ส่วนในกิ่งตอนสายน้ำผึ้งเท่ากับ 30% และ เปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AMF ชนิด *A. tuberculata* ในกิ่งตอนส้มเขียวหวานเท่ากับ 10% ส่วนในกิ่งตอนส้มสายพันธุ์สายน้ำผึ้งเท่ากับ 40% (โดยมีชุดควบคุมเปรียบเทียบ) ดังตารางที่ 4



รูปที่ 3 การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AMF ในรากส้มพันธุ์เขียวหวาน ที่ได้ทำการ propagate สปอร์ของ *A. tuberculata* เป็นเวลา 1 เดือน (V: vesicle, H: Hyphae)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AMF ในรากส้มกิ่งตอน (Root colonization)

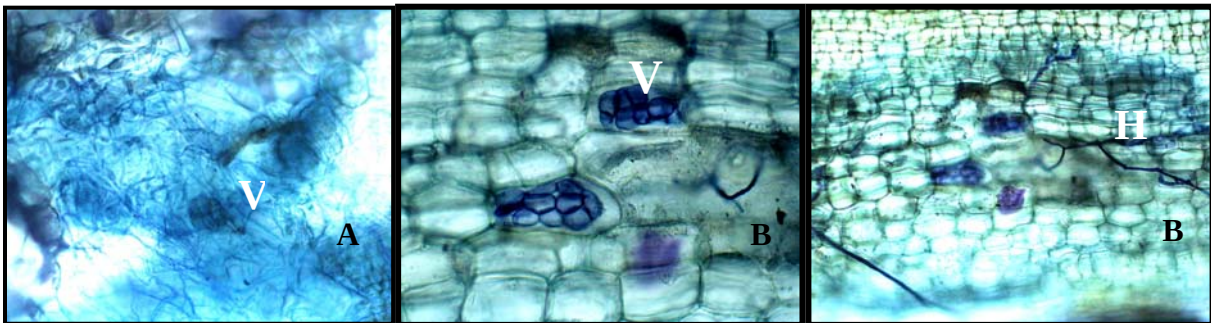
สายพันธุ์ AMF	สายพันธุ์ส้ม	Colonization (%)
<i>Glomus etunicatum</i>	สายน้ำผึ้ง	30
	เขียวหวาน	20
<i>Acaulospora tuberculata</i>	สายน้ำผึ้ง	40
	เขียวหวาน	10

จากผลการทดสอบความสามารถของ AMF ในการเข้าสู่รากส้มข้างต้น พบว่า การเข้าอาศัยของ AMF ในรากส้มดังแสดงในตารางที่ 3 มีค่ามากกว่าในส้มกิ่งตอนซึ่งแสดงในตารางที่ 4 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก สัมพันธุ์ Cleopatra, Troyer, และสายน้ำผึ้ง (ตารางที่ 3) ได้มาจากการเพาะเมล็ด และ 14 วันหลังจากเมล็ดงอก ได้ทำการลงเชื้อ AM ทันที ซึ่งในช่วงนั้นรากส้มยังเป็นรากอ่อน AMF สามารถเข้าอยู่อาศัยได้ง่ายกว่ารากแก่ อีกทั้งยังทำการปลูกเป็นระยะเวลานานกว่า 2 เดือน ซึ่งยาวนานกว่าการปลูกส้มกิ่งตอนเขียวหวาน และสายน้ำผึ้ง (ตารางที่ 4) ทำให้ความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยในรากส้มมากขึ้นตามระยะเวลาด้วย อย่างไรก็ตาม AMF ทั้ง 2 สายพันธุ์ *Gl. etunicatum* และ *A. tuberculata* สามารถเข้าสู่รากทั้งส้มพันธุ์ตระกูลเขียวหวาน และรากส้มพันธุ์ต้นต่อได้ ในขั้นตอนถัดมา จึงทำการเพิ่มจำนวนสปอร์ AMF สายพันธุ์ดังกล่าว ตามวิธีการ trap culture ในข้อ 2 เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป ในเรื่องของการคัดเลือกสายพันธุ์ AMF ให้มีความเหมาะสมต่อส้มต้นต่อ และส้มพันธุ์

4. การคัดเลือก และทดสอบประสิทธิภาพสายพันธุ์ AMF ที่เหมาะสมต่อส้มตันตอ และส้มพันธุ์

4.1) การทดสอบสายพันธุ์ AMF ที่เหมาะสมต่อส้มพันธุ์

ผลการวิเคราะห์ปัจจัยต่างๆ ได้ผลดังตารางที่ 5-7 และในส่วนของผลปริมาณฟอสฟอรัสในใบส้ม, ผลของเปอร์เซ็นต์ Root colonization, ค่า Mycorrhizal efficiency index (MEI) แสดงในตารางที่ 5 และการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ชนิดต่างๆ ในรากส้ม แสดงในรูปที่ 4-6



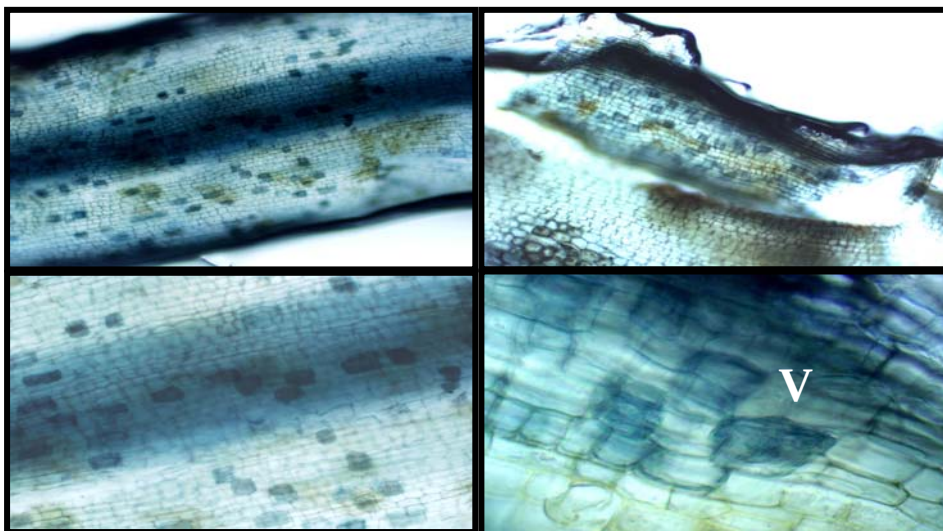
รูปที่ 4 การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ชนิด ในรากส้มพันธุ์เขียวหวาน และรากส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ที่ได้ทำการ propagate สปอร์ของ AMF เป็นเวลา 3 เดือน

A) รากส้มพันธุ์เขียวหวานที่ได้ทำการ propagate สปอร์ของ *A.tuberculata*

(V: vesicle) (กำลังขยาย 20X)

B) รากส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่ได้ทำการ propagate สปอร์ของ *Gl.etunicatum*

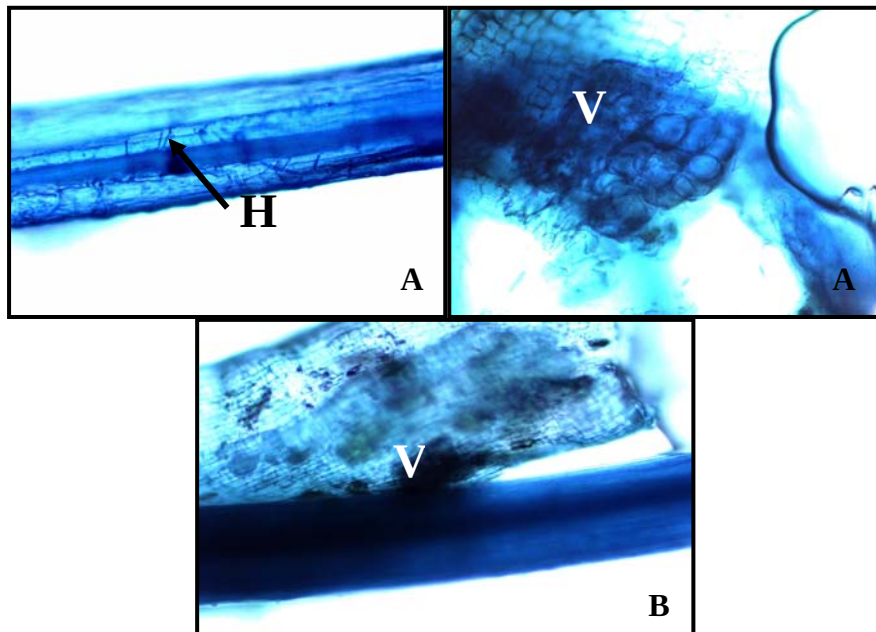
(V: vesicle, H: hypha) (กำลังขยาย 40X และ 20X)



รูปที่ 5 การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์เขียวหวานที่ได้ทำการ

propagate ด้วยหัวเชื้อทางการค้า Mycostar เป็นเวลา 3 เดือน

(V: vesicle) (กำลังขยาย 10X, 20X และ 40X)



รูปที่ 6 การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์เขียวหวาน และรากส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่ได้ทำการ propagate ด้วย *Sclercystis* sp. เป็นเวลา 3 เดือน

A) รากส้มพันธุ์เขียวหวานที่ได้ทำการ propagate สปอร์ของ *Sclercystis* sp.

(V: vesicle) (กำลังขยาย 20X)

B) รากส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่ได้ทำการ propagate สปอร์ของ *Sclercystis* sp.

(V: vesicle) (กำลังขยาย 10X)

MEI (Mycorrhizal efficiency index)

จากตารางที่ 5 ในส้มสายน้ำผึ้ง พบว่า ค่า MEI ของ *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum* และหัวเชื้อทางการค้า Mycostar มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่จะมีค่ามากกว่าค่ารับการทดลอง ที่มีการใส่เชื้อ *Sclercystis* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนของส้มเขียวหวาน พบว่า ค่ารับการทดลอง ที่มีการให้ *Sclercystis* sp., *Gl. etunicatum* และหัวเชื้อทางการค้า Mycostar จะมีค่า MEI มากกว่า *A. tuberculata*

Root colonization (%)

จากตารางที่ 5 ผลการเข้าอยู่อาศัยของ AM ในชุดควบคุม และค่ารับการทดลองที่มีการให้ ปุ๋ยเคมี นั้น พบว่า มีการเข้าอยู่อาศัยของ AM เนื่องจากกิ่งพันธุ์ที่ได้มานั้นได้มีการปลูกลงในวัสดุปลูกที่ประกอบด้วยแกลบ+กาบมะพร้าวแห้ง+ดิน ก่อนหน้าที่จะนำมาทำการทดลอง ดังนั้น จะพบการเข้าอยู่อาศัยของ AM บางส่วนในชุดควบคุม และค่ารับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมี

ในส่วนของการเข้าอยู่อาศัยของ AM ในรากส้มสายน้ำผึ้ง พบว่า *Gl. etunicatum*, *Sclerocystis* sp. และ Mycostar มีค่า % root colonization มากกว่าตำรับการทดลอง ที่มีการให้ *A. tuberculata*, ปุ๋ยเคมี และชุดควบคุม ในส่วนของชุดควบคุม และปุ๋ยเคมี พบว่า มี % root colonization ต่ำสุด และมีค่าไม่แตกต่างกัน

ในส่วนของการเข้าอยู่อาศัยของ AM ในรากส้มเขียวหวาน พบว่า *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum* และ *Sclerocystis* sp. มีค่า % root colonization มากกว่า หัวเชื้อทางการค้า Mycostar, ชุดควบคุม และ ปุ๋ยเคมี

ปริมาณฟอสฟอรัสในใบ (%P)

ปริมาณ P ในใบส้มสายน้ำผึ้ง พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ และในส่วนของส้มเขียวหวาน พบว่า ในใบส้มที่มีการให้ปุ๋ยเคมี และ *Gl. etunicatum* มีปริมาณ P มากกว่าในชุดควบคุม, *A. tuberculata*, *Sclerocystis* sp. และ Mycostar

ตารางที่ 5 ผลของ MEI (%), AM colonization (%) และ ปริมาณฟอสฟอรัส (% P)

ในส้มสายพันธุ์สายน้ำผึ้ง และเขียวหวาน

สายพันธุ์	Treatment	MEI* (%)	AM colonization (%)	ปริมาณ P (%)
สายน้ำผึ้ง	Control		31.83 ^a	0.165 ^a
	Fertilizer		34.83 ^a	0.076 ^a
	<i>A. tuberculata</i>	30.22 ^{b**}	48.9 ^b	0.075 ^a
	<i>Gl. etunicatum</i>	33 ^b	59.67 ^c	0.074 ^a
	<i>Sclerocystis</i> sp.	17.24 ^a	60.00 ^c	0.128 ^a
	Mycostar	31.7 ^b	61.73 ^c	0.090 ^a
เขียวหวาน	Control		37.06 ^a	0.038 ^a
	Fertilizer		35.33 ^a	0.125 ^b
	<i>A. tuberculata</i>	3.93 ^a	49.00 ^b	0.028 ^a
	<i>Gl. etunicatum</i>	39.88 ^b	49.16 ^b	0.124 ^b
	<i>Sclerocystis</i> sp.	23.17 ^{ab}	48.17 ^b	0.050 ^a
	Mycostar	32.15 ^b	39.50 ^a	0.013 ^a

* Mycorrhizal efficiency index (MEI) โดย MEI = (น้ำหนักพืชที่ใส่ AM - น้ำหนักพืชที่ไม่ใส่ AM) × 100 / น้ำหนักพืชที่ใส่ AM

** Means under each parameter followed by the same letter are not significantly different (P < 0.05) according to Duncan's multiple-range test.

ความสูง

ผลต่างความสูงของสั้มสายน้ำผึ้ง (หลังการให้ AM-ก่อนการให้ AM) พบว่า สั้มสายน้ำผึ้งที่มีการให้ปุ๋ยเคมี จะมีค่าความสูงมากกว่าชุดควบคุม, *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum*, *Sclerocystis* sp. และ Mycostar และในส่วนของสั้มเขียวหวาน พบว่า การให้หัวเชื้อ AM ทางการค้า Mycostar จะให้ค่า ผลต่างความสูงมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองอื่นๆ และในส่วนของชุดควบคุม, ปุ๋ยเคมี, *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum* และ *Sclerocystis* sp. มีค่าไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 6

น้ำหนักสดของราก

ในสั้มสายน้ำผึ้ง พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมี, *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum*, *Sclerocystis* sp. และชุดควบคุม มีค่าน้ำหนักสดของรากไม่แตกต่างกัน ส่วนตำรับการทดลองที่มีการให้ *Sclerocystis* sp. และ Mycostar มีค่าน้ำหนักสดของรากไม่แตกต่างกัน แต่ตำรับการทดลองที่มีการให้ Mycostar จะมีค่าน้ำหนักสดของรากมากกว่าตำรับการทดลอง ที่มีการให้ปุ๋ยเคมี, *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum* และชุดควบคุม

ในสั้มเขียวหวาน พบว่า ต้นสั้มที่มีการให้ *Gl. etunicatum* จะมีน้ำหนักสดของรากมากที่สุด ส่วนชุดควบคุม, ปุ๋ยเคมี และหัวเชื้อ Mycostar มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน และในส่วนของ *A. tuberculata* และ *Sclerocystis* sp. มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

น้ำหนักสดของลำต้น

ในสั้มสายน้ำผึ้ง พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมีมีค่าน้ำหนักสดของลำต้นมากที่สุด และตำรับการทดลอง ที่มีการให้ *Gl. etunicatum* มีค่าน้ำหนักน้อยที่สุด ส่วนในสั้มเขียวหวาน พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata* จะให้ค่าน้ำหนักสดของลำต้นน้อยที่สุด และมากที่สุดในตำรับการทดลองที่มีการให้หัวเชื้อ AM ทางการค้า Mycostar

น้ำหนักสดรวม

ในสั้มสายน้ำผึ้ง พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ *Gl. etunicatum* และ *Sclerocystis* sp. จะมีค่าน้ำหนักสดรวมน้อยที่สุด และตำรับการทดลองที่มีการให้ Fertilizer จะมีค่าน้ำหนักสดรวมมากที่สุด

ในส่วนของสั้มเขียวหวาน พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมี, *A. tuberculata*, *Sclerocystis* sp. และชุดควบคุม มีค่าน้ำหนักสดรวมไม่แตกต่างกัน ส่วนตำรับการทดลองที่มีการให้ *Gl. etunicatum*, หัวเชื้อ AM ทางการค้า Mycostar, *Sclerocystis* sp. และปุ๋ยเคมี มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ในส่วนของ *Gl.*

etunicatum และหัวเชื้อ AM ทางการค้า Mycostar พบว่า มีน้ำหนักสดรวมมากกว่าตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata* และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ความยาวของราก

จากตารางที่ 6 ในสัปดาห์น้ำผึ้ง พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย มีค่าความยาวรากน้อยที่สุดในขณะที่ตำรับการทดลอง ที่มีการให้หัวเชื้อ AM ทางการค้า Mycostar จะมีค่าความยาวรากมากที่สุด และในสัปดาห์หวาน พบว่า ตำรับการทดลอง ที่มีการให้ *A. tuberculata* และ *Gl. etunicatum* มีค่าความยาวรากมากที่สุด รองลงมา คือ ตำรับการทดลอง ที่มีการให้ *Sclerocystis* sp. และค่าที่น้อยที่สุด คือ ตำรับการทดลองที่มีการให้หัวเชื้อทางการค้า Mycostar

น้ำหนักแห้งของราก

ในสัปดาห์น้ำผึ้ง พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ *Sclerocystis* sp., *Gl. etunicatum*, *A. tuberculata*, ปุ๋ยเคมี และชุดควบคุม มีค่าน้ำหนักแห้งของรากไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ ตำรับการทดลองที่มีการให้ *Gl. etunicatum*, *Sclerocystis* sp., หัวเชื้อทางการค้า Mycostar มีค่าน้ำหนักแห้งของรากไม่แตกต่างกัน แต่ตำรับการทดลองที่มีการให้หัวเชื้อทางการค้า Mycostar จะมีค่าน้ำหนักแห้งของรากมากกว่าตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata*, ปุ๋ยเคมี และชุดควบคุม

ในสัปดาห์หวาน พบว่า ตำรับการทดลอง ที่มีการให้ *A. tuberculata* และ *Gl. etunicatum* มีค่าน้ำหนักแห้งของรากมากที่สุด และตำรับการทดลอง ที่มีการให้หัวเชื้อ Mycostar มีค่าน้ำหนักแห้งของรากน้อยที่สุด

น้ำหนักแห้งของลำต้น

ในสัปดาห์น้ำผึ้ง พบว่า ตำรับการทดลอง ที่มีการให้ *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum*, *Sclerocystis* sp. หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และชุดควบคุม มีค่าน้ำหนักแห้งของลำต้นไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมี มีค่าน้ำหนักแห้งของลำต้นมากที่สุด

ในสัปดาห์หวาน พบว่า ตำรับการทดลอง ที่มีการให้ *Gl. etunicatum* และหัวเชื้อทางการค้า Mycostar จะมีค่าน้ำหนักแห้งของลำต้นมากที่สุด ในขณะที่ตำรับการทดลอง ที่มีการให้ *A. tuberculata* และชุดควบคุม มีค่าน้ำหนักแห้งของลำต้นน้อยที่สุด

น้ำหนักแห้งรวม

ในสัปดาห์น้ำผึ้ง พบว่า ตำรับการทดลอง ที่มีการให้ *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum*, *Sclerocystis* sp. หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และชุดควบคุม มีค่าน้ำหนักแห้งรวมไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ตำรับการทดลอง ที่มีการให้ปุ๋ยเคมี มีค่าน้ำหนักแห้งรวมสูงที่สุด

ในส้มเขียวหวาน พบว่า ตำรับการทดลอง ที่มีการให้ *Gl. etunicatum* มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งรวมมากที่สุด ในขณะที่ตำรับการทดลอง ที่มีการให้ *A. tuberculata* และชุดควบคุม มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งรวมน้อยที่สุด

ตารางที่ 6 ผลของความสูง (cm), น้ำหนักสดราก (g), น้ำหนักสดลำต้น (g), น้ำหนักสดรวม (g), ความยาวของราก (cm), น้ำหนักแห้งของราก (g), น้ำหนักแห้งของลำต้น (g) และน้ำหนักแห้งรวม (g) ในส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง และเขียวหวาน

สายพันธุ์	Treatment	ความสูง (cm)	น้ำหนักสดของราก (g)	น้ำหนักสดของลำต้น (g)	น้ำหนักสดรวม (g)	ความยาวของราก (cm)	น้ำหนักแห้งของราก (g)	น้ำหนักแห้งของลำต้น (g)	น้ำหนักแห้งรวม (g)
สายน้ำผึ้ง	Control	1.33 a*	11.9 a	66.73 ab	78.63 ab	24.00 abc	3.06 a	30.10 a	33.16 a
	Fertilizer	34.50 b	5.50 a	122.93 c	128.43 c	15.26 a	3.13 a	68.56 b	71.7 b
	<i>A. tuberculata</i>	4.00 a	11.23 a	77.83 ab	89.06 ab	19.86 ab	3.13 a	39.06 a	42.2 a
	<i>Gl. etunicatum</i>	5.16 a	12.13 a	52.93 a	64.40 a	29.80 bcd	4.80 ab	29.93 a	34.06 a
	<i>Sclerocystis</i> sp.	7.16 a	17.53 ab	59.63 ab	77.16 a	34.43 cd	5.93 ab	34.23 a	40.16 a
	Mycostar	5.10 a	24.76 b	84.33 b	109.10 bc	38.46 d	6.56 b	42.67 a	49.23 a
เขียวหวาน	Control	0.374 a	3.40 a	102.10 ab	105.50 a	15.23 bc	4.23 bc	50.33 a	54.56 a
	Fertilizer	0.297 a	3.16 a	127.46 bc	130.63 ab	12.33 ab	1.06 a	72.86 ab	73.93 abc
	<i>A. tuberculata</i>	0.142 a	9.53 b	91 a	104.43 a	34.23 d	5.13 c	51.73 a	56.86 a
	<i>Gl. etunicatum</i>	0.219 a	23.60 c	128.20 bc	151.80 b	38.43 d	6.10 c	85.13 b	91.23 c
	<i>Sclerocystis</i> sp.	0.333 a	8.26 b	115.83 abc	124.10 ab	18.33 c	1.93 ab	69.93 ab	63.63 ab

	Mycostar	1.004 b	3.90 a	146.56 c	150.43 b	7.40 a	1.36 a	79.76 b	81.16 bc
--	----------	---------	--------	----------	----------	--------	--------	---------	----------

* Means under each parameter followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple-range test.

อัตราส่วนความยาวลำต้น/ความยาวราก

จากตารางที่ 7 ในสัณฐานน้ำผึ้ง พบว่า ตำรับการทดลอง ที่มีการให้ปุ๋ยเคมี และ *A. tuberculata* จะมีค่าอัตราส่วนความยาวลำต้น/ความยาวรากมากที่สุด และมากกว่าตำรับการทดลองที่มีการให้ *Sclerocystis* sp. ที่ซึ่งมีค่าเฉลี่ยน้อยที่สุด ในส่วนของสัณฐานหวาน พบว่า ตำรับการทดลอง ที่มีการให้ *A. tuberculata* และ *Gl. etunicatum* จะมีค่าอัตราส่วนความยาวลำต้น/ความยาวรากน้อยที่สุด และน้อยกว่าชุดควบคุม ที่ซึ่งมีค่าเฉลี่ยมากที่สุด

อัตราส่วนน้ำหนักลำต้น/น้ำหนักของราก

จากตารางที่ 7 ในสัณฐานน้ำผึ้ง พบว่า ตำรับการทดลอง ที่มีการให้ *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum*, *Sclerocystis* sp., หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และชุดควบคุมมีค่าอัตราส่วนน้ำหนักของลำต้น/น้ำหนักของราก ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และมีค่าน้อยกว่า treatment ที่มีการให้ ปุ๋ยเคมี ในขณะที่ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมีมีค่าอัตราส่วนน้ำหนักของลำต้น/น้ำหนักของรากมากที่สุด

ในสัณฐานหวาน พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum* และ *Sclerocystis* sp. มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ และมีค่าน้อยกว่าตำรับการทดลองที่มีการให้หัวเชื้อทางการค้า Mycostar, ปุ๋ยเคมี และชุดควบคุม

Specific root length (SRL)

ในสัณฐานน้ำผึ้ง พบว่า ค่า SRL ในแต่ละชุดควบคุม ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนในสัณฐานหวาน พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ *Gl. etunicatum* จะมีค่า SRL น้อยที่สุด ในขณะที่ชุดควบคุมมีค่า SRL มากที่สุด

อัตราส่วนพื้นที่ใบ/ความยาวของราก (LA/RL)

ในสัณฐานน้ำผึ้ง พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ *Sclerocystis* sp., *Gl. etunicatum*, ปุ๋ยเคมี และชุดควบคุมมีค่า LA/RL ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และมีค่ามากที่สุด ในขณะที่ ตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata* และ Mycostar มีค่าไม่แตกต่างกัน และมีค่าน้อยกว่าตำรับการทดลองอื่นๆ

ในสัณฐานหวาน พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ *Sclerocystis* sp., *Gl. etunicatum*, *A. tuberculata*, ปุ๋ยเคมี และชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ และมีค่าน้อยกว่าตำรับการทดลองที่มีการให้หัวเชื้อทางการค้า Mycostar (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลของอัตราส่วนความยาวลำต้น/ความยาวราก, อัตราส่วนน้ำหนักของลำต้น/น้ำหนักของราก, Specific root length (SRL) (cm/g) และ อัตราส่วนพื้นที่ใบ/ความยาวของราก (LA/RL)

สายพันธุ์	Treatment	อัตราส่วน ความยาว ลำต้น/ ความยาว ราก	อัตราส่วน น้ำหนักของ ลำต้น/ น้ำหนักของ ราก	Specific root length (SRL) (cm/g)	อัตราส่วนพื้นที่ ใบ/ความยาว ของราก (LA/RL)
สายนํ้าผึ้ง	Control	3.16 ^{ab*}	9.23 ^a	2.86 ^a	0.297 ^b
	Fertilizer	7.76 ^b	22.60 ^b	2.83 ^a	0.282 ^b
	<i>A. tuberculata</i>	4.53 ^b	7.16 ^a	1.83 ^a	0.251 ^{ab}
	<i>Gl. etunicatum</i>	2.46 ^{ab}	5.23 ^a	3.60 ^a	0.293 ^b
	<i>Sclerocystis</i> sp.	1.96 ^a	3.40 ^a	1.96 ^a	0.276 ^b
	Mycostar	2.26 ^{ab}	3.67 ^a	1.56 ^a	0.156 ^a
เขี้ยวหวาน	Control	16.43 ^b	30.13 ^b	4.63 ^c	0.374 ^a
	Fertilizer	9.50 ^{ab}	40.30 ^b	3.90 ^{bc}	0.297 ^a
	<i>A. tuberculata</i>	2.40 ^a	8.80 ^a	3.16 ^{abc}	0.142 ^a
	<i>Gl. etunicatum</i>	3.20 ^a	5.43 ^a	1.63 ^a	0.219 ^a
	<i>Sclerocystis</i> sp.	5.90 ^{ab}	15.36 ^a	2.33 ^{ab}	0.332 ^a
	Mycostar	10.83 ^{ab}	42.00 ^b	2.2 ^{ab}	1.004 ^b

* Means under each parameter followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple-range test.

การทดลองในส่วนนี้ ได้มีการนำหัวเชื้อ AMF ที่มีการผลิตในเชิงพาณิชย์ (MYCOSTAR®) มาใช้ในการทดสอบด้วย โดยทำการคัดแยก และรวบรวมเชื้อ AMF โดยการร่อนผ่านตะแกรง ซึ่งพบว่า เชื้อส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Glomus* sp. จำนวนสปอร์ต่อ carrier 1 กรัม เท่ากับ 30-40 สปอร์ รูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงสปอร์ AMF ที่แยกได้ จากหัวเชื้อ
Mycostar ซึ่งเป็นหัวเชื้อทางการค้า

ในส่วนของการศึกษาผลของ AMF สายพันธุ์ต่างๆ ต่อสัมพันธุ์ เมื่อพิจารณาจากค่า MEI พบว่า ในลัมสายน้ำผึ้งที่ใส่เชื้อ AM ชนิด *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum* และ หัวเชื้อทางการค้า Mycostar จะมีค่า MEI สูงที่สุด และในลัมเขียวหวานที่ใส่เชื้อ *Gl. etunicatum* และหัวเชื้อทางการค้า Mycostar พบว่ามีค่า MEI สูงที่สุด โดยค่า % MEI นี้ เป็นค่าที่ใช้บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของเชื้อรา AM ที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืช (Gianinazzi และคณะ 2002)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อรา AM ชนิด *Gl. etunicatum* และหัวเชื้อทางการค้า Mycostar มีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของต้นลัมทั้ง 2 สายพันธุ์ มากกว่า AM ชนิดอื่น และจากผล AM colonization พบว่า *Gl. etunicatum*, *Sclerocystis* sp. และหัวเชื้อทางการค้า Mycostar มีความสามารถในการเข้าอาศัยในรากลัมสายน้ำผึ้งมากที่สุด (~59-61%) ในขณะที่ในลัมเขียวหวาน AM สายพันธุ์ *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum* และ *Sclerocystis* sp. สามารถเข้าอาศัยในรากได้ดีกว่าหัวเชื้อทางการค้า Mycostar (~48-49%) และเมื่อทำการพิจารณาปริมาณ P (%) ร่วมด้วย พบว่า ในลัมสายน้ำผึ้ง ปริมาณ P ในแต่ละตำรับการทดลอง มีค่าแทบจะไม่แตกต่างกัน ซึ่งโดยปกติแล้ว ถ้าปริมาณการเข้าอยู่อาศัยของ AM ในรากสูง ปริมาณ P ในใบ ควรจะสอดคล้องกันด้วย แต่อย่างไรก็ตาม อาจเป็นเพราะว่า AM ที่มีการเข้าอยู่อาศัยในรากสูงนั้น อาจเกิดการสร้าง arbuscule น้อย (arbuscule เป็นบริเวณที่มีการแลกเปลี่ยนธาตุอาหาร และเป็นบริเวณที่มีการส่งผ่าน P ให้แก่พืช) (Smith และคณะ 2003, 2004) ดังนั้น ปริมาณ P ในแต่ละ treatment จึงไม่แตกต่างกัน และในส่วนของลัมเขียวหวานนั้น พบว่า ลัมที่มีการให้ *Gl. etunicatum* นั้น จะมีปริมาณ P สูง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการ colonization ที่มีค่าสูงเช่นเดียวกัน และในลัมเขียวหวานที่มีการให้ปุ๋ยเคมีนั้น พบว่า ปริมาณ P ที่มีค่าสูงนี้ อาจเนื่องมาจากการใส่ปุ๋ยเคมีนั่นเอง

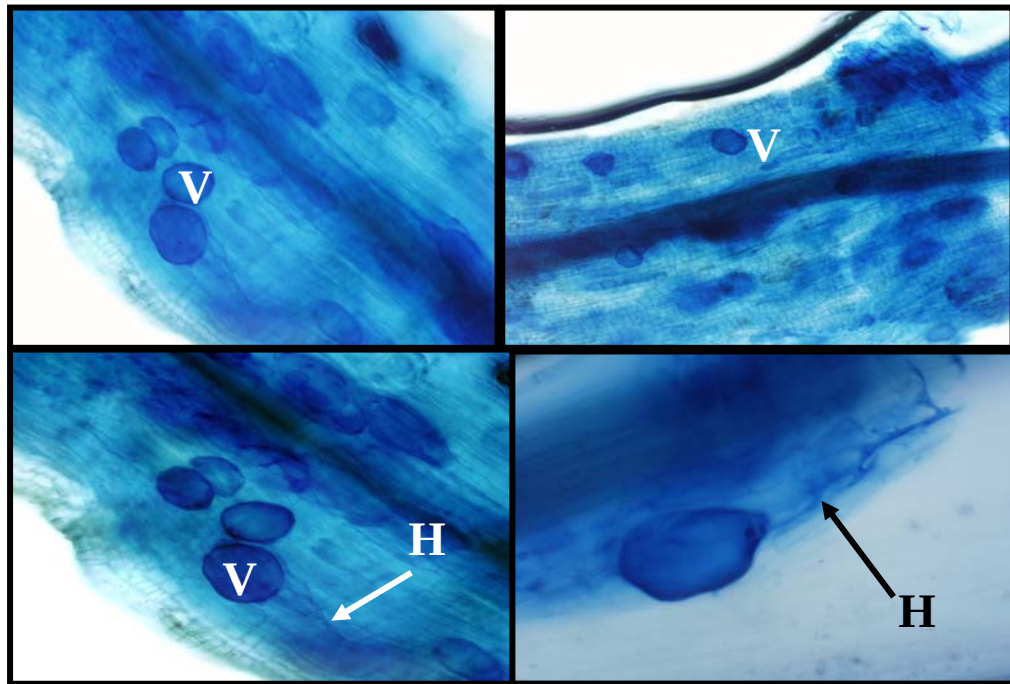
ในการวิเคราะห์ปริมาณ P ในลัมลัมนั้นได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ P ในใบพืช ซึ่งการวิเคราะห์พืชในไม้ผลส่วนใหญ่ นั้น พบว่า จะนิยมใช้ใบพืชเป็นตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ เพราะ ธาตุอาหารไนโบสามารถเป็นตัวสะท้อนถึงการเจริญเติบโต และปริมาณธาตุอาหารพืชได้ นอกจากนี้การเก็บตัวอย่างใบยังทำได้ง่าย และไม่ทำความเสียหายแก่ต้นพืช (สุมิตรา ภู่วโรดม, 2544) และในการเก็บใบพืชเพื่อนำมาวิเคราะห์นั้น จะทำการเก็บใบที่แผ่ขยายเต็มที่ (mature leaves) ที่อยู่ได้ยอดลงมา หรืออาจเก็บ Young fully open leave และนอกจากนี้จะนิยมเก็บตัวอย่างใบก่อนที่จะพืชจะออกดอก (Jones et al., 1971)

ในส่วนของวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ P ในพืช การย่อยสลายตัวอย่างพืช โดยใช้วิธี Wet oxidation (wet ashing) นี้ เนื่องจาก การย่อยด้วยวิธีนี้จะไม่มีการสูญเสียของ P หรือธาตุพวกโลหะ โดยการระเหิด (เมื่อเทียบกับ dry ashing ซึ่งจะสูญเสียธาตุอาหารระหว่างการย่อย โดยการระเหิด) วิธีนี้ทำได้ค่อนข้างรวดเร็ว สามารถทำเป็นงานประจำได้ และสามารถวิเคราะห์หาธาตุได้หลายธาตุอาหารจากการย่อยตัวอย่างเพียงครั้งเดียว แต่อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อเสีย คือ อาจเกิดอันตรายจากการระเบิด (explosion) ของ

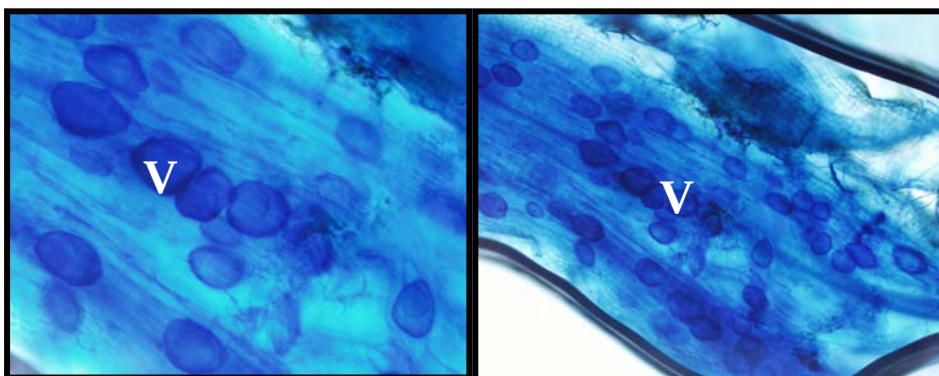
สารประกอบพวก Strong oxidizing ที่ใช้ โดยเฉพาะ Perchloric acid และวิธีนี้ไม่ค่อยเหมาะสมกับการวิเคราะห์จุลธาตุ เพราะการใช้กรดปริมาณมาก จะทำให้เกิดการปนเปื้อนได้สูง (Allen, 1974)

4.2) การทดสอบสายพันธุ์ AMF ที่เหมาะสมต่อสัมต้นตอ

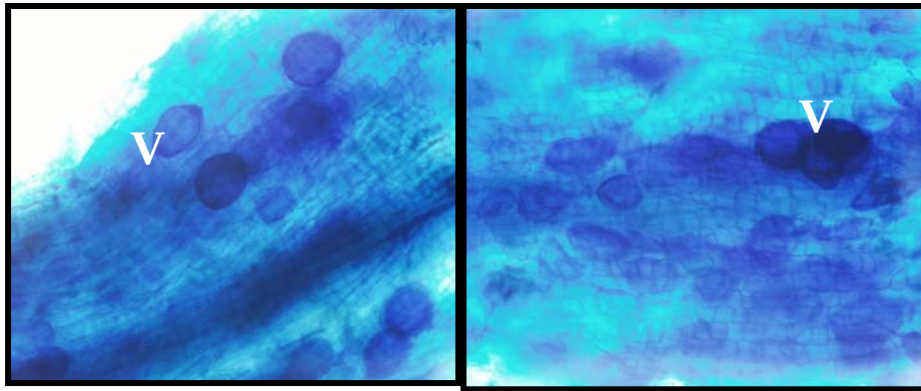
ผลการทดสอบสายพันธุ์ AMF ที่เหมาะสมต่อสัมต้นตอ แสดงในตารางที่ 8-10 และผลของปริมาณฟอสฟอรัสในใบส้ม, ผลของเปอร์เซ็นต์ root colonization, ค่า Mycorrhizal efficiency index (MEI) แสดงในตารางที่ 8 และการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ชนิดต่างๆ ในรากส้ม แสดงในรูปที่ 8-12



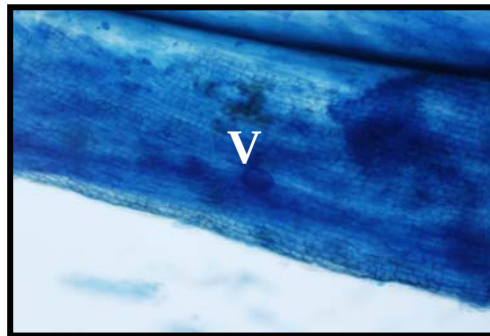
รูปที่ 8 การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์ Cleopatra ที่ได้ทำการใส่สปอร์ของ *A. tuberculata* เป็นเวลา 3 เดือน
(V: vesicle, H: hypha) (กำลังขยาย 40X และ 20X)



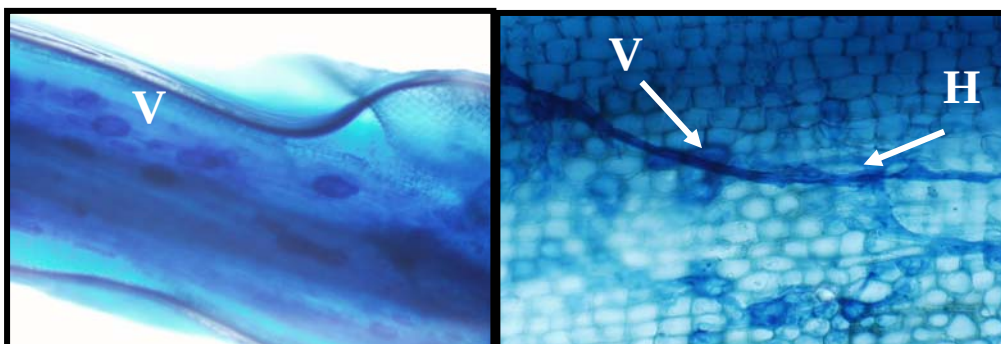
รูปที่ 9 การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์ Cleopatra ที่ได้ทำการ
ใส่สปอร์ของหัวเชื้อทางการค้า Mycostar เป็นเวลา 3 เดือน
(V: vesicle) (กำลังขยาย 40X และ 20X)



รูปที่ 10 การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์ Cleopatra ที่ได้ทำการ
ใส่สปอร์ของ *Sclerocystis* sp. เป็นเวลา 3 เดือน
(V: vesicle) (กำลังขยาย 40X)



รูปที่ 11 การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์ C-35 ที่ได้ทำการ
ใส่สปอร์ของ *A. tuberculata* เป็นเวลา 3 เดือน
(V: vesicle) (กำลังขยาย 20X)



รูปที่ 12 การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้มพันธุ์ C-35 ที่ได้ทำการ
ใส่สปอร์ของ *Gl. etunicatum* เป็นเวลา 3 เดือน
(V: vesicle, H: hypha) (กำลังขยาย 20X และ 40X)

MEI (Mycorrhizal efficiency index)

จากตารางที่ 8 ในสัณสายพันธุ์ C-35 พบว่า ค่า MEI ของ *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum* และหัวเชื้อทางการค้า Mycostar มีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่ดำรับการทดลองที่มีการให้หัวเชื้อกรมวิชาการเกษตรมีค่า MEI สูงที่สุด ในส่วนของสัณสายพันธุ์ Cleopatra พบว่า ดำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata* จะมีค่า MEI สูงที่สุด รองลงมา คือ ดำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อรา AM ชนิด *Sclerocystis* sp. และดำรับการทดลองที่มีการให้หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร พบว่า มีค่า MEI ใกล้เคียงกัน

Root colonization (%)

จากตารางที่ 8 ผลการเข้าอยู่อาศัยของ AM ในชุดควบคุม และดำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมีนั้น พบว่า มีการเข้าอยู่อาศัยของ AM เนื่องจากกึ่งพันธุ์ที่ได้มานั้นได้มีการปลูกลงในวัสดุปลูกที่ประกอบด้วย แกลบ+กาบมะพร้าวแห้ง+ดิน ก่อนหน้าที่จะนำมาทำการทดลอง ดังนั้น จะพบการเข้าอยู่อาศัยของ AM บางส่วนในชุดควบคุม และดำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมี

ในส่วนของผลการเข้าอยู่อาศัยของ AM ในรากสัณสายพันธุ์ C-35 พบว่า ดำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata* มีค่า % root colonization มากกว่าดำรับการทดลองที่มีการให้หัวเชื้อทางการค้า Mycostar อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีค่าน้อยกว่าดำรับการทดลองที่มีการให้หัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร ซึ่งพบว่าเป็นดำรับการทดลองที่มี % root colonization สูงที่สุด ในส่วนของชุดควบคุม และดำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมี พบว่า มี % root colonization ต่ำสุด

ในส่วนของผลการเข้าอยู่อาศัยของ AM ในรากสัณสายพันธุ์ Cleopatra พบว่า *Sclerocystis* sp. และหัวเชื้อทางการค้า Mycostar มีค่า % root colonization สูงที่สุด และยังมีค่ามากกว่าดำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata* และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร ในขณะที่ชุดควบคุม และดำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมี พบว่า มี % root colonization ต่ำที่สุด คือ 21.73% และ 34.33% ตามลำดับ

ปริมาณฟอสฟอรัสในใบ (%P)

ปริมาณ P ในใบสัณสายพันธุ์ Cleopatra ของทุกดำรับการทดลอง พบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ และในส่วนของสัณสายพันธุ์ C-35 พบว่า ใบสัณที่มีการให้ปุ๋ยเคมีมีปริมาณ P มากกว่าในชุดควบคุม และหัวเชื้อทางการค้า Mycostar ในขณะที่ *Gl. etunicatum* ให้ผลของปริมาณ P มากที่สุดในดำรับการทดลองที่มีการใส่เชื้อรา AM และปริมาณ P มีค่าใกล้เคียงกับดำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมี และนอกจากนี้ ยังพบว่า *A. tuberculata* และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร มีปริมาณ P ไม่แตกต่างจากทั้งดำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมี และดำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลของ MEI (%), AM colonization (%) และปริมาณฟอสฟอรัส (% P)

ในส้มสายพันธุ์ C-35 และ Cleopatra

สายพันธุ์	Treatment	MEI (%)	AM colonization (%)	ปริมาณ P (%)
C-35	Control		19.30 ^a	0.0350 ^a
	Fertilizer		24.53 ^b	0.1213 ^b
	<i>A. tuberculata</i>	20.52 ^{a*}	49.23 ^d	0.0486 ^{ab}
	<i>Gl. etunicatum</i>	17.67 ^a	44.93 ^{cd}	0.112 ^{ab}
	Mycostar	12.56 ^a	42.80 ^c	0.0310 ^a
	กรมวิชาการเกษตร	33.31 ^b	60.80 ^e	0.0417 ^{ab}
Cleopatra	Control		21.73 ^a	0.0743 ^a
	Fertilizer		34.33 ^b	0.0600 ^a
	<i>A. tuberculata</i>	29.45 ^c	68.80 ^c	0.0902 ^a
	<i>Sclerocystis</i> sp.	25.79 ^b	85.50 ^d	0.1805 ^a
	Mycostar	16.22 ^a	82.13 ^d	0.1343 ^a
	กรมวิชาการเกษตร	17.61 ^a	72.03 ^c	0.2303 ^a

* Means under each parameter followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple-range test.

ความสูง

จากตารางที่ 9 ผลต่างความสูงของส้มสายพันธุ์ C-35 และ Cleopatra (หลังการให้ AM-ก่อนการให้ AM) พบว่า ในส้มสายพันธุ์ C-35 ทั้ง 6 ได้รับการทดลอง ซึ่งได้แก่ ชุดควบคุม, ได้รับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมี, *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum*, *Sclerocystis* sp., หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร มีค่าผลต่างความสูงไม่แตกต่างกัน ในส่วนของส้มสายพันธุ์ Cleopatra พบว่า ได้รับการทดลองที่เป็นชุดควบคุมมีผลต่างความสูงต่ำที่สุด ในขณะที่ได้รับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมีมีค่าผลต่างความสูงมากที่สุด และใกล้เคียงกับการทดลองที่มีการให้เชื้อรา AM ทั้ง 4 ชนิด คือ *A. tuberculata*, *Sclerocystis* sp., หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร

น้ำหนักสดของราก

ในส้มสายพันธุ์ C-35 และ Cleopatra พบว่า ในทุกการทดลองมีค่าน้ำหนักสดของรากไม่แตกต่างกัน โดยจะมีค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 12-18 กรัม และ 24-39 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9

น้ำหนักสดของลำต้น

จากตารางที่ 9 ผลการชั่งน้ำหนักสดของลำต้น พบว่า ส้มสายพันธุ์ C-35 ที่มีการให้ตำรับการทดลองต่างๆ จะมีค่าน้ำหนักสดของลำต้นไม่แตกต่างกัน ซึ่งจะมีค่าน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 17-29 กรัม

ในส่วนของส้มสายพันธุ์ Cleopatra พบว่า น้ำหนักสดของลำต้นในตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมีมีค่าสูงที่สุด คือ 54.71 กรัม โดยจะมีค่าแตกต่างจากส่วนของตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม, A. *tuberculata*, *Sclerocystis* sp., หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

น้ำหนักสดรวม

ในส้มสายพันธุ์ C-35 พบว่า ทุกๆ ตำรับการทดลองมีค่าน้ำหนักสดรวมไม่แตกต่างกัน โดยจะมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 29-45 กรัม และในส่วนของส้มสายพันธุ์ Cleopatra พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมีมีค่าน้ำหนักสดรวมสูงที่สุด คือ 93.79 กรัม โดยจะแตกต่างจากตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม, A. *tuberculata*, *Sclerocystis* sp., หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 9

ความยาวของราก

จากตารางที่ 9 ในส้มสายพันธุ์ C-35 พบว่า ในทุกตำรับการทดลองมีค่าความยาวของรากใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 31-45 เซนติเมตร ในส่วนของส้มสายพันธุ์ Cleopatra พบว่า ค่าความยาวรากของตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมีมีค่าน้อยที่สุด ซึ่งแตกต่างจากตำรับการทดลองที่มีการให้หัวเชื้อกรมวิชาการเกษตรที่มีค่าความยาวของรากสูงที่สุด คือ 32.5 เซนติเมตร และนอกจากนี้ยังมีค่าแตกต่างจากตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุมด้วย ในขณะที่ตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุมนี้มีค่าความยาวของรากใกล้เคียงกับตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อรา AM ชนิด *Sclerocystis* sp. และหัวเชื้อทางการค้า Mycostar

น้ำหนักแห้งของราก

ส้มสายพันธุ์ C-35 และ Cleopatra พบว่า ในทุกตำรับการทดลองมีค่าน้ำหนักแห้งของราก ไม่แตกต่างกัน โดยจะมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3-5 กรัม และ 8-12 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9

น้ำหนักแห้งของลำต้น

จากตารางที่ 9 พบว่า น้ำหนักแห้งลำต้นของ C-35 ในทุกตำรับการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 8-14 กรัม ในขณะที่ส้มสายพันธุ์ Cleopatra พบว่า ตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม, หัวเชื้อทางการค้า mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร มีค่าน้ำหนักแห้งของลำต้นไม่แตกต่างกัน และมี

ค่าน้อยกว่าตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata*, *Sclerocystis* sp., หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร ในขณะที่ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมีมีค่าน้ำหนักแห้งของลำต้นสูงที่สุด คือ 25.10 กรัม

น้ำหนักแห้งรวม

ค่าน้ำหนักแห้งรวมของส้มสายพันธุ์ C-35 พบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 9-19 กรัม ในขณะที่ส้มสายพันธุ์ cleopatra พบว่า ตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุมมีค่าน้ำหนักแห้งรวมต่ำที่สุด คือ 22.59 กรัม ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างจากตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata*, หัวเชื้อทางการค้า mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร

ในขณะเดียวกัน ตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata*, หัวเชื้อทางการค้า mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร ให้ผลของน้ำหนักแห้งรวมไม่แตกต่างจากตำรับการทดลองที่มีการให้ *Sclerocystis* sp. แต่มีค่าน้ำหนักแห้งรมน้อยกว่าตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมี ซึ่งเป็นตำรับการทดลองที่มีค่าน้ำหนักแห้งรวมสูงที่สุด คือ 37.94 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลของความสูง (cm), น้ำหนักสดราก (g), น้ำหนักสดลำต้น (g), น้ำหนักสดรวม (g), ความยาวของราก (cm), น้ำหนักแห้งของราก (g), น้ำหนักแห้งของลำต้น (g) และน้ำหนักแห้งรวม (g) ในส้มพันธุ์ C-35 และ Cleopatra

สายพันธุ์	Treatment	ความสูง (cm)	น้ำหนักสดของราก (g)	น้ำหนักสดของลำต้น (g)	น้ำหนักสดรวม (g)	ความยาวของราก (cm)	น้ำหนักแห้งของราก (g)	น้ำหนักแห้งของลำต้น (g)	น้ำหนักแห้งรวม (g)
C-35	Control	7.16a*	18.03a	26.92a	44.96a	44.66a	4.65a	8.57a	13.23a
	Fertilizer	5.66a	10.52a	25.54a	36.06a	33.33a	3.90a	13.34a	17.25a
	<i>A. tuberculata</i>	6.00a	15.79a	23.37a	39.16a	42.00a	5.04a	10.96a	16.01a
	Mycostar	5.83a	12.25a	17.67a	29.93a	31.33a	4.23a	8.56a	12.8a
	กรมวิชาการเกษตร	7.66a	16.22a	29.46a	45.67a	32.33a	5.18a	14.34a	19.52a

ตารางที่ 9 ผลของความสูง (cm), น้ำหนักสดราก (g), น้ำหนักสดลำต้น (g), น้ำหนักสดรวม (g), ความยาวของราก (cm), น้ำหนักแห้งของราก (g), น้ำหนักแห้งของลำต้น (g) และน้ำหนักแห้งรวม (g) ในส้มพันธุ์ C-35 และ Cleopatra (ต่อ)

(g) ใน ส้มพันธุ์ C- 35 และ Cleopatra สายพันธุ์	Treatment	ความ สูง (cm)	น้ำหนัก สดของ ราก (g)	น้ำหนัก สดของ ลำต้น (g)	น้ำหนัก สดรวม (g)	ความ ยาวของ ราก (cm)	น้ำหนัก แห้ง ของ ราก (g)	น้ำหนัก แห้ง ของลำ ต้น (g)	น้ำหนัก แห้ง รวม (g)
C-35	<i>Gl. etunicatum</i>	7.83a	13.19a	19.28a	32.48a	37.33a	4.33a	8.83a	13.15a
Cleopatra	Control	2.00a	31.21a	35.45a	66.67a	30.33bc	8.73a	13.86a	22.59a
	Fertilizer	7.17b	39.08a	54.71b	93.79b	23.0a	12.84a	25.10c	37.94c
	<i>A. tuberculata</i>	5.16ab	30.00a	40.21a	70.22a	24.0ab	10.96a	18.71b	29.67ab
	<i>Sclerocystis</i> sp.	6.16b	28.74a	39.46a	68.21a	26.67abc	10.65a	20.22b	30.88bc
	Mycostar	6.00b	27.36a	35.98a	63.34a	26.43abc	8.95a	17.06ab	26.01ab
	กรมวิชาการเกษตร	6.00b	24.66a	32.46a	59.98a	32.5c	9.91a	16.02ab	25.89ab

* Means under each parameter followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple-range test.

อัตราส่วนความยาวลำต้น/ความยาวราก

จากตารางที่ 10 ในส้มสายพันธุ์ C-35 และ Cleopatra พบว่า ในทุกตำรับการทดลอง ซึ่งได้แก่ ชุดควบคุม, ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมี, ตำรับการทดลองที่มีการใส่เชื้อ *A. tuberculata*, ตำรับการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อทางการค้า Mycostar, ตำรับการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร, ตำรับการทดลองที่มีการใส่เชื้อ *Gl. etunicatum* และ *Sclerocystis* sp. มีค่าอัตราส่วนความยาวลำต้น/ความยาวราก ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อัตราส่วนน้ำหนักลำต้น/น้ำหนักของราก

จากผลการวัดอัตราส่วนน้ำหนักของลำต้น/น้ำหนักของรากของส้มพันธุ์ C-35 พบว่า ตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม, ตำรับการทดลองที่มีการใส่เชื้อ *A. tuberculata*, ตำรับการทดลองที่มีการใส่หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และ ตำรับการทดลองที่มีการใส่เชื้อ *Gl. etunicatum* มีค่าอัตราส่วนน้ำหนักของลำต้น/น้ำหนักของราก ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งยังมีค่าไม่แตกต่างจากตำรับการทดลองที่มีการให้หัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร นอกจากนี้ยังพบว่า มีค่าน้อยกว่าตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในขณะเดียวกัน ส้มสายพันธุ์ Cleopatra พบว่า มีค่าอัตราส่วนน้ำหนักลำต้น/น้ำหนักของราก ไม่แตกต่างกันในทุกตำรับการทดลองดังแสดงในตารางที่ 10

Specific root length (SRL)

จากตารางที่ 10 พบว่า ทั้งในส้มสายพันธุ์ C-35 และ Cleopatra มีค่า SRL ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกๆ ตำรับการทดลอง

อัตราส่วนพื้นที่ใบ/ความยาวของราก (LA/RL)

ในส้มสายพันธุ์ C-35 พบว่า ค่าอัตราส่วนพื้นที่ใบ/ความยาวของราก มีค่าไม่แตกต่างกันในทุกตำรับการทดลอง ในขณะเดียวกัน ส้มสายพันธุ์ Cleopatra พบว่า ตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม, ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมี, *Sclerocystis* sp., หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร มีค่าอัตราส่วนพื้นที่ใบ/ความยาวของรากไม่แตกต่างกัน และมีค่าน้อยกว่าตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลของอัตราส่วนความยาวลำต้น/ความยาวราก, อัตราส่วนน้ำหนักของลำต้น/น้ำหนักของราก, Specific root length (SRL) (cm/g) และ อัตราส่วนพื้นที่ใบ/ความยาวของราก (LA/RL) ของส้มพันธุ์ C-35 และ Cleopatra

สายพันธุ์	Treatment	อัตราส่วน ความยาว ลำต้น/ ความยาว ราก	อัตราส่วน น้ำหนักของ ลำต้น/ น้ำหนักของ ราก	Specific root length (SRL) (cm/g)	อัตราส่วนพื้นที่ ใบ/ความยาว ของราก (LA/RL)
C-35	Control	1.8200 ^{a*}	2.08 ^a	2.5133 ^a	0.2800 ^a
	Fertilizer	2.6400 ^a	3.36 ^b	3.6300 ^a	0.2633 ^a

สายพันธุ์	Treatment	อัตราส่วน ความยาว ลำต้น/ ความยาว ราก	อัตราส่วน น้ำหนักของ ลำต้น/ น้ำหนักของ ราก	Specific root length (SRL) (cm/g)	อัตราส่วนพื้นที่ ใบ/ความยาว ของราก (LA/RL)
C-35	<i>A. tuberculata</i>	2.2200 ^a	2.17 ^a	2.7100 ^a	0.2250 ^a
	Mycostar	2.6800 ^a	2.13 ^a	2.5633 ^a	0.2633 ^a
	กรมวิชาการเกษตร	1.2490 ^a	2.71 ^{ab}	2.1800 ^a	0.3333 ^a
	<i>Gl. etunicatum</i>	2.2367 ^a	2.02 ^a	2.9533 ^a	0.2900 ^a
Cleopatra	Control	2.4466 ^a	1.61 ^a	1.0567 ^a	0.2913 ^a
	Fertilizer	3.3600 ^a	2.05 ^a	0.6630 ^a	0.4733 ^a
	<i>A. tuberculata</i>	4.7067 ^a	1.74 ^a	0.7220 ^a	0.7033 ^b
	<i>Sclerocystis</i> sp.	3.3866 ^a	1.95 ^a	1.0930 ^a	0.3533 ^a
	Mycostar	2.8417 ^a	1.91 ^a	1.1037 ^a	0.3533 ^a
	กรมวิชาการเกษตร	3.0166 ^a	1.67 ^a	1.3526 ^a	0.2867 ^a

* Means under each parameter followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple-range test.

ในส่วนของการศึกษาผลของ AMF สายพันธุ์ต่างๆ ต่อสัมพันธ์ต้นตอ เมื่อพิจารณาจากค่า MEI ของสัมพันธ์ต้นตอ C-35 ที่มีการใส่เชื้อรา AM ชนิด *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum*, หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร และในสัมพันธ์ต้นตอ Cleopatra ที่มีการใส่เชื้อรา AM ชนิด *A. tuberculata*, *Sclerocystis* sp., หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการ สามารถสรุปได้ว่า เชื้อรา AM ชนิด *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum*, หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการ ให้ผลต่อ % MEI ของสัมพันธ์สายพันธุ์ C-35 ใกล้เคียงกัน ในขณะที่เชื้อรา AM ชนิด *A. tuberculata*, *Sclerocystis* sp., หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการ ให้ผลต่อ % MEI ของสัมพันธ์สายพันธุ์ Cleopatra ไม่แตกต่างเช่นเดียวกัน โดยค่า % MEI นี้เป็นค่าที่ใช้บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของเชื้อรา AM ที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืช (Gianinazzi และคณะ 2002) ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อรา AM ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ *A. tuberculata*, *Gl. etunicatum*, หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการ เกษตร มีผลต่อการเจริญเติบโตของสัมพันธ์สายพันธุ์ C-35 ใกล้เคียงกันในทางสถิติ เช่นเดียวกับกับ เชื้อ AM ชนิด *A. tuberculata*, *Sclerocystis* sp., หัวเชื้อทางการค้า Mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร ที่พบว่า มีผลต่อการเจริญเติบโตของสัมพันธ์สายพันธุ์ Cleopatra ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ

จากผล AM colonization พบว่า หัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร มีความสามารถในการเข้าอาศัยในราก สัมสายพันธุ์ C-35 มากที่สุด (60.8%) ในขณะที่ในสัมสายพันธุ์ Cleopatra พบว่า AM ชนิด *Sclerocystis* sp. และหัวเชื้อทางการค้า Mycostar สามารถเข้าอาศัยในรากได้ดีกว่า AM ชนิดอื่น (82-85%)

เมื่อทำการพิจารณาปริมาณ P (%) ร่วมด้วย พบว่า ในสัมสายพันธุ์ C-35 ปริมาณ P ในแต่ละตำรับการทดลอง นอกเหนือจากการทดลองที่เป็นชุดควบคุม และตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมีนั้น มีค่าสอดคล้องไปในทางเดียวกันกับความสามารถในการเข้าอาศัยในราก นั่นคือ เมื่อปริมาณการเข้าอยู่อาศัยของ AM ในรากสูง ปริมาณ P ในใบควรมีปริมาณสูงสอดคล้องกันด้วย และเมื่อพิจารณาผลของปริมาณ P (%) ในตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมีร่วมกับเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัย พบว่า เป็นไปในทางตรงกันข้าม นั่นคือ ถึงแม้ว่าเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยมีค่าน้อย แต่ในส่วนของปริมาณ P (%) กลับมีค่ามากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองอื่นๆ จากผลนี้ อาจเนื่องมาจากการใส่ปุ๋ย ทำให้ปริมาณ P ในใบสูงตามไปด้วย ในขณะที่ ในสัมสายพันธุ์ Cleopatra กลับพบว่า ปริมาณ P (%) ในแต่ละตำรับการทดลอง มีค่าแทบจะไม่แตกต่างกัน ซึ่งโดยปกติแล้ว ถ้าปริมาณการเข้าอยู่อาศัยในรากสูง ปริมาณ P ในใบควรจะสอดคล้องกันด้วย แต่อย่างไรก็ตาม อาจเป็นเพราะว่า AM ที่มีการเข้าอยู่อาศัยสูงในรากนั้น อาจเกิดการสร้าง arbuscules (arbuscule เป็นบริเวณที่มีการแลกเปลี่ยนธาตุอาหาร และเป็นบริเวณที่มีการส่งผ่าน P ให้แก่พืช) (Smith และคณะ 2003, 2004) ในระดับที่เท่ากันกับตำรับการทดลองที่มีเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยน้อยกว่า ดังนั้น ปริมาณ P ในแต่ละตำรับการทดลองจึงไม่แตกต่างกันนัก

ในส่วนของผลค่าปัจจัยอื่นๆ เช่น น้ำหนักสด, น้ำหนักแห้ง, SRL, LA/RL ในสัมสายพันธุ์ C-35 นั้น พบว่า ตำรับการทดลองต่างๆ แทบจะให้ผลไม่แตกต่างกันเลย เมื่อเทียบกับการใช้สัมพันธุ์สายน้ำผึ้ง และเขียวหวาน ในการทดลองดังที่ได้รายงานไปเมื่อครั้งที่แล้ว ซึ่งในการใช้ค่าปัจจัย เช่น SRL และ LA/RL นี้ สามารถนำมาใช้เพื่อประเมินผลการเจริญเติบโตของพืชร่วมกับปัจจัยอื่นๆ ได้ด้วยเช่นกัน ในส่วนของค่า SRL นั้น เป็นค่าอัตราส่วนของความยาวรากต่อหน่วยน้ำหนักแห้งของราก ซึ่งเป็นค่าที่ใช้บ่งบอกถึงความสามารถในการได้มาซึ่งน้ำ และธาตุอาหารของพืชนั้นๆ โดยในการพิจารณาค่าปัจจัยของรากนี้ ควรพิจารณาทั้งทางปริมาณ และคุณภาพ กล่าวคือ พิจารณาทั้งน้ำหนักแห้งของราก (biomass) และความยาวของราก (Johnson และคณะ 1996; Wiltse และคณะ 1998) จากผลการศึกษาวิจัย พบว่า ค่าความยาวของรากนั้น จะมีผลอย่างมากต่อความสามารถในการดูดน้ำ และธาตุอาหารของพืช โดยจะมีผลมากกว่าค่าของน้ำหนักรากด้วย (Boot และ Mensink 1990) และในส่วนของค่า LA/RL นั้น เป็นค่าที่ใช้บ่งบอกถึงความสามารถในการเจริญเติบโตของพืชแบบแข่งขันกันระหว่างยอดพืช (เช่น ใบ) ซึ่งอยู่เหนือดิน และระหว่างรากพืช ซึ่งอยู่ในดิน (Clements และคณะ 1929) จากการศึกษา ถ้าไม่พิจารณาถึงหน้าที่ในการเก็บสะสม และลำเลียงอาหารของพืชแล้ว พบว่า พื้นที่ใบจะสัมพันธ์กับหน้าที่ในการสังเคราะห์แสง และความยาวของรากพืชจะสัมพันธ์กับหน้าที่ในการหาแหล่งอาหารภายในดิน (Tilman, 1988)

จากผลการทดลองที่ได้นี้ อาจเนื่องมาจากสัมสายพันธุ์ C-35 เป็นสัมพันธุ์ต้นต่อที่ซึ่งมีความต้านทานโรค ทำให้การใส่เชื้อรา AM ไม่ค่อยมีผลต่อค่าปัจจัยต่างๆ มากนัก ในขณะที่ สัมสายพันธุ์ Cleopatra พบว่า

ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยเคมีมีผลต่อค่าน้ำหนักสดของลำต้น, น้ำหนักสดรวม, น้ำหนักแห้งของลำต้น และน้ำหนักแห้งรวม โดยจะมีค่ามากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองอื่นๆ เนื่องมาจากผลของการใส่ปุ๋ย

5) การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งโรครากเน่าในระดับกระถาง

5.1) การสำรวจความเสียหายเพื่อเก็บตัวอย่าง เช่น *Phytophthora* ในสวนส้ม

ในระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงพฤศจิกายน 2547 ผลการสำรวจพื้นที่ปลูกส้ม 5 แห่ง คือ อ. โคกสำโรง จ. ลพบุรี, อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม, อ. ละหานทราย จ. บุรีรัมย์, รวมทั้ง อ. พิมาย และ อ. วังน้ำเขียว จ. นครราชสีมา พบว่า มีการระบาดของโรครุนแรงมากเฉพาะที่สวนส้มอภัยพร ต. วังหมี่เหิน อ. วังน้ำเขียว และสวนส้มเพชรพิมาย ต. นิคมพัฒนา อ. พิมาย จ. นครราชสีมา และจากการสัมภาษณ์ผู้ดูแลสวนส้มอภัยพร พื้นที่ปลูก 340 ไร่ ปลูกพันธุ์โชกุนและส้มเขียวหวานเป็นหลัก ส้มอายุประมาณ 2.5 ปี พบว่าตั้งแต่เริ่มสร้างสวนจนถึงปัจจุบันต้องขุดส้มที่เป็นโรครากเน่าทิ้งแล้วถึง 2,300 ต้น คิดเป็นค่าเสียหายถึง 4.6 ล้านบาท (ค่าดูแลรักษาระยะเวลา 2 ปี ค่าถอนทำลายและปลูกใหม่ประมาณ 2,000 บาทต่อต้น) สภาพของสวนแสดงดังรูปที่ 13 สำหรับสวนส้มเพชรพิมายมีส้มโชกุน และส้มเขียวหวานประมาณ 43 ไร่ อายุส้มประมาณ 4 ปี เป็นการปลูกจากกิ่งตอนโดยไม่ใช้ต้นตอ (stock) เก็บเกี่ยวผลผลิตแล้ว 3 ครั้ง พบส้มโชกุนอาการต้นโทรม 8 เปอร์เซ็นต์ ต้นส้มดังกล่าวจะมีขนาดเล็กกว่าปกติ (รูปที่ 14) ออกผลจำนวนมาก แต่ผลจะร่วงก่อนสุกแก่ ใบร่วงและปลายกิ่งตาย (die back) (รูปที่ 15) รากบริเวณที่อยู่ใกล้ผิวดินบางส่วนเน่า เปลือกกรากฉ่ำน้ำและเปื่อยยุ่ย อาการเน่าลามจากปลายรากเข้าสู่โคนต้น ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินและรากทั้งที่แสดงอาการเน่าและรากปกติจากสวนส้มทั้ง 2 แห่ง เพื่อนำมาแยกเชื้อและพิสูจน์สาเหตุ



รูปที่ 13 สวนส้มอภัยพร อ. วังน้ำเขียว จ. นครราชสีมา สังเกตต้นส้มบางส่วนใบแก่ขาวมื่อสุดของภาพมีขนาดเล็กกว่าต้นอื่นๆ ในแถว เนื่องจากเป็นส้มที่ปลูกใหม่แทนต้นที่ตายจากโรครากเน่า และสังเกตแถวส้มบริเวณตอนกลางและซ้ายมือของภาพบริเวณแถวด้านหลังจะมีส้มหายไปเป็นหย่อมๆ เช่นกัน



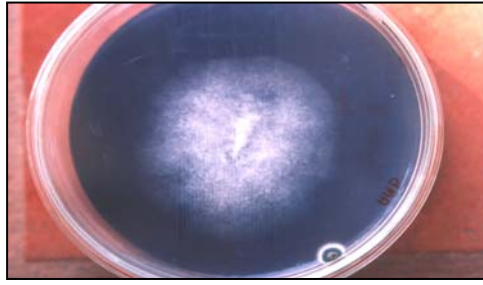
รูปที่ 14 ภาพสวนส้มเพชรพิมาย ส้มต้นที่อยู่ในกลางแถว เป็นส้มที่มีอาการรากเน่า ต้นโทรม ขนาดทรงพุ่มเล็กกว่าต้นที่อยู่ข้างเดียว



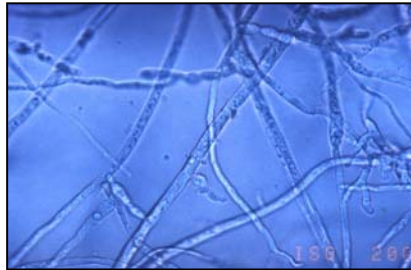
รูปที่ 15 ต้นส้มที่เป็นโรครากเน่า แสดงอาการปลายกิ่งแห้งตาย (die back)

5.2) การแยกเชื้อและพิสูจน์สาเหตุจากโรคเน่า

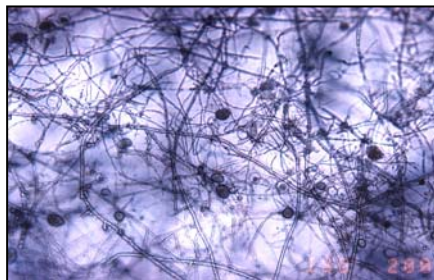
การตรวจสอบลักษณะของเชื้อหลังจากย้ายลงเลี้ยงในอาหาร MCMA มีลักษณะการเจริญดังปรากฏในรูปที่ 16 การตรวจลักษณะของเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยประเภทไม่มีผนังกัน (coenocytic hypha) เส้นใยบริเวณที่แตกแขนงบวมพอง ซึ่งเป็นลักษณะเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora citrophthora* แต่ไม่พบการสร้าง sporangium บนอาหารแข็งเลย แต่เมื่อนำเอาชิ้นของวุ้นบริเวณที่มีเส้นใยปกคลุมใส่ลงในน้ำสกัดจากดิน (soil extract 1%) แล้วบ่มไว้ 24 ชั่วโมง ในอุณหภูมิห้องในที่มืด พบว่าเชื้อสร้าง sporangium และ zoospores แสดงในภาพที่ 17, 18 และ 19 ขณะที่การใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อธรรมชาติกระตุ้นให้สร้างสปอร์ได้น้อยมาก (1 sporangium/plate) (รูปที่ 20) การพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรคด้วยใบส้ม พบว่าเชื้อที่แยกได้สามารถเข้าทำลายใบส้ม โดยทำให้เกิดแผลฉ่ำน้ำลักษณะเดียวกันกับที่พบบนราก หรือกับใบที่ใช้ล่อเชื้อจากดิน รูปที่ 21) การตรวจดูลักษณะของ sporangium, chlamydspsore ขนาดของเส้นใย ลักษณะการแตกกิ่งของเส้นใย อัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และลักษณะอื่น ๆ พบว่า เชื้อดังกล่าวน่าจะเป็น *Phytophthora citrophthora*



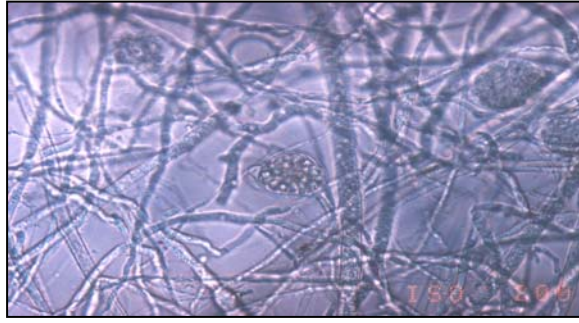
รูปที่ 16 ลักษณะการเจริญของเชื้อที่แยกได้จากเนื้อเยื่อรากส้มที่แสดงอาการต้นโทรม รากเน่า เลี้ยงบนอาหาร modified corn meal agar (MCMA) อายุ 4 วัน หลังย้ายเชื้อ



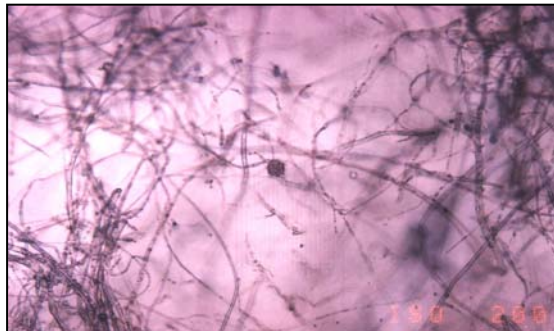
รูปที่ 17 ลักษณะ coenocytic hyphae และ swollen branching hypha ของเชื้อที่แยกได้จากเนื้อเยื่อรากส้มที่แสดงอาการต้นโทรม-รากเน่า (ขยาย 400 x)



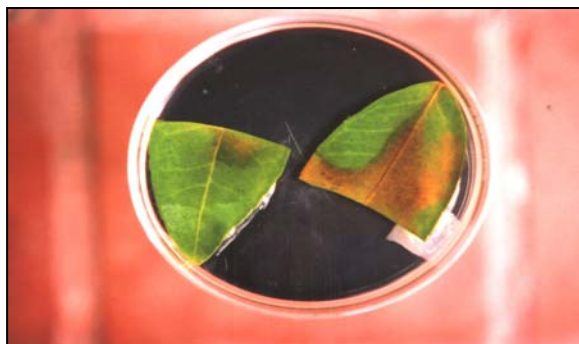
รูปที่ 18 Zoösporangium ของเชื้อราที่แยกได้จากเนื้อเยื่อรากส้มที่แสดงอาการต้นโทรม-รากเน่า หลังจากตัดชิ้นงู้นแช่ลงในน้ำกลั่นสกัดดินนาน 36 ชม. (สังเกต empty sporangia และ sporangia ที่กำลังปลดปล่อย zoospore) (ขยาย 100 x)



รูปที่ 19 sporangium ของเชื้อราที่แยกได้จากรากเน่าส้มกำลังจะปลดปล่อย zoospores (กำลังขยาย 400 x)



รูปที่ 20 ลักษณะการสร้าง sporangium ในเชื้อรา *Phytophthora citrophthora* ที่ได้รับการกระตุ้นโดยการแช่ในน้ำกลั่นหนึ่งชั่วโมง (สังเกตจำนวน sporangium มีน้อยมาก เมื่อเทียบกับภาพที่ 6) (กำลังขยาย 100x)



รูปที่ 21 ใบส้มโชกุนแสดงอาการแผลซ้ำบริเวณรอยตัด หลังจากแช่ในน้ำสกัดดินที่เดิมขึ้นงู้นที่มีรอยเชื้อที่แยกได้จากรากส้มที่แสดงอาการต้นโทรม-รากเน่า นาน 62 ชั่วโมง

5.3) การจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora*

ผลจากการศึกษารายละเอียดทางสัณฐานวิทยา และชีววิทยาของเชื้อ *Phytophthora* ที่แยกได้จากส้มโชกุนที่แสดงอาการไหม้ และรากเน่าที่เกิดจากพื้นที่อำเภอฟิมมาย ได้ข้อสรุปดังนี้

ลักษณะของเส้นใย เมื่อเลี้ยงในอาหาร modified corn meal agar (MCMA) ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ในที่มืด พบว่า เส้นใยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 5 วัน ลักษณะเส้นใยคล้ายใยสำลี (cottony) สีขาว ค่อนข้างหยาบ อัตราการเจริญ 7.5 ± 1.8 มม./วัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเส้นใย 3.5-7 ไมครอน ไม่พบ sporangia หรือ oospore ในอาหารแข็ง แต่เมื่อตัดชิ้นวันที่มีเชื้อเจริญนำไปใส่ลงในน้ำสกัดดิน 1% ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว พบว่า สามารถกระตุ้นให้เชื้อสร้าง sporangia จำนวนมาก ภายในเวลา 36 ชม. ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ในที่มืด นอกจากนั้นยังพบ hyphal swelling รูปร่างกลมขนาด 3-5 ไมครอน บนเส้นใยบางส่วนด้วย (รูปที่ 22)

ลักษณะของ sporangia หลังจากถูกกระตุ้นด้วยน้ำสกัดดิน เชื้อสร้าง sporangia ลักษณะค่อนข้างหลากหลายตั้งแต่เป็นรูปลูกมะนาว (limoniform), รูปไข่ (ovoid), กลม (globous) ไปจนถึงรูปร่างไม่แน่นอน (irregularly shaped) (ภาพที่ 23 และ 24) ขนาด sporangia $45 \pm 12 \times 30 \pm 7$ ไมครอน อัตราส่วนความยาว : ความกว้าง 1.6 : 1 sporangia สร้างเดี่ยวบริเวณปลายของก้านชู (sporangiophore) มี papilla เห็นชัดเจน และเป็นประเภทไม่หลุดเป็นอิสระ (non caduceus)

จากลักษณะของเส้นใย และ sporangia สรุปได้ว่า เชื้อที่แยกได้น่าจะเป็น *Phytophthora citrophthora* (Erwin และ Ribiero, 1996) แต่ไม่น่าจะใช้ *P. parasitica* เนื่องจากเชื้อ isolate ที่แยกได้จากพืชมายไม่พบว่า สร้าง chlamydospores ทั้งในสภาพอาหารแข็ง หรือหลังจากถูกย้ายมาไว้ในน้ำสกัดดิน ความสามารถในการสร้าง chlamydospores เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้แยกเชื้อ 2 ชนิดนี้ออกจากกัน (Timmer และ Menge, 1993) เชื้อ *P. parasitica* ได้รับการรายงานว่าเป็นสาเหตุของโรคโคนเน่า และรากเน่าของส้มเขียวหวานในประเทศไทย (สุพัตรา, 2529; อ่ำไพบรรณ และคณะ 2527)



รูปที่ 22 แสดงลักษณะ hyphal swelling ของเชื้อ *Phytophthora* ไอโซเลตที่แยกได้จากสวนส้มฟิมมาย



รูปที่ 23 ลักษณะสปอร์แรงเจียแบบ limoniform ของเชื้อ *Phytophthora* ไอโซเลตที่แยกจาก
สวนส้มพิมาย หลังจากแช่ขึ้นวุ้นใน sterilized 1% soil extract



รูปที่ 24 ลักษณะสปอร์แรงเจียรูปร่างไม่แน่นอน (irregularly shaped) ที่พบหลังจากใส่ขึ้นวุ้น
ใน sterilized 1% soil extract

5.4) การพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของ *P. citrophthora*

จากผลการทดลองการพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของ *P. citrophthora* พบว่า เฉพาะ ส้มเขียวหวาน ซึ่งปลูกในกระถาง และเก็บในสภาพเรือนทดลอง มีความอ่อนแอต่อการเกิดโรคที่สุด และการใช้มิดเจียนเปลือกบริเวณคอดิน เป็นวิธีปลูกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ ทำให้พืชทดสอบทั้ง 3 ต้น แสดงอาการ ขณะที่วิธีที่เหลือทำให้พืชทดสอบ 2/3 เป็นโรค สำหรับส้มโอ และมะนาวที่ปลูกในวงซีเมนต์ ตรวจไม่พบความผิดปกติจากส่วนที่อยู่เหนือดิน แต่พบอาการเน่ากับรากบางส่วน

อาการของส่วนเหนือดินที่ตรวจพบเกิดขึ้นหลังจากปลูกเชื้อประมาณ 3 สัปดาห์ คือ ใบบริเวณส่วนยอดผลดในช่วงปลาย และเริ่มหลุดร่วงหลังจาก 4 สัปดาห์ จากนั้นจึงเกิดอาการตายลามจากปลายกิ่ง (die back) คล้ายกันกับอาการที่ปรากฏในพื้นที่ปลูกอำเภอพิมาย อาการตายลามจากปลายกิ่งเกิดขึ้นรุนแรงที่สุดในส้มเขียวหวานที่ปลูกเชื้อโดยวิธีเฉือนด้วยมีด (รูปที่ 25) ขณะที่วิธีอื่นอาการไม่รุนแรง (รูปที่ 26 และ 27) เมื่อตรวจดูบริเวณราก พบว่า เปลือกกรอบรอยแผลมีลักษณะขำน้ำ และรากแขนงบริเวณที่อยู่ใกล้เคียงเปื่อยยุ่ย เมื่อนำดินบริเวณรอบจุดที่ปลูกเชื้อ และเนื้อเยื่อรากมาใส่ลงในน้ำกลั่นหนึ่งชั่วโมงแล้วล่อเชื้อ (bait) ด้วยใบส้มเขียวหวาน โดยการแช่ใบส้มที่ทำแผลโดยใช้เข็มฉีดยาแทงลงบนผิวใบ 2 จุด/ใบ (รูปที่ 28) แชนนาน 48

ชั่วโมง แล้วย้ายลงแช่ต่อในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อตรวจการเข้าทำลายของเชื้อ พบว่า ทั้งดินและรากจากพืชทดสอบทุกชนิดยังมีการปรากฏอยู่ของเชื้อ *P. citrophthora* (รูปที่ 29)



รูปที่ 25 ส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุนหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ *Phytophthora citrophthora* ไอโซเลตพิมาย ด้วยวิธีเจือปนเปลือกโคนต้นด้วยมีดเป็นแผลยาว 1 ซม. (ขวามือ) เทียบกับส้มที่ผ่านกรรมวิธีเดียวกันแต่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (ซ้ายมือ) บันทึกภาพหลังจากปลูกเชื้อ 5 สัปดาห์



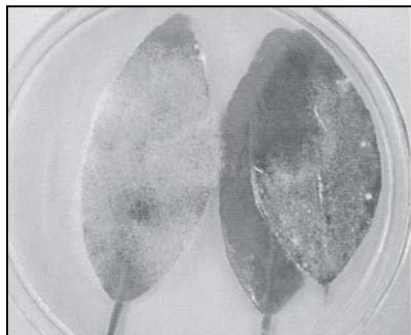
รูปที่ 26 ส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุนหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ *Phytophthora citrophthora* ไอโซ เลตพิมาย ด้วยวิธีแทงโคนต้นด้วยเข็มฉีดยา (ขวามือ) เทียบกับส้มปกติ (ซ้ายมือ) บันทึกภาพหลังจากปลูกเชื้อ 5 สัปดาห์



รูปที่ 27 ส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุนหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ *Phytophthora citrophthora* ไอโซเลตพืชมาย โดยไม่มีการทำแผล (ขวามือ) เทียบกับส้มปกติ (ซ้ายมือ) บันทึกภาพหลังปลูกเชื้อ 5 สัปดาห์



รูปที่ 28 การตรวจสอบการเข้าทำลายรากส้มของเชื้อ *Phytophthora citrophthora* ด้วยวิธี baiting ด้วยใบ ส้มเขียวหวาน



รูปที่ 29 ลักษณะของเชื้อ *P. citrophthora* ที่ขึ้นบนใบส้มเขียวหวานหลังจากย้ายจากจานเลี้ยงเชื้อที่มี ชิ้นส่วนของรากที่ได้จากต้นส้มที่ได้รับการปลูกเชื้อลงในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

5.5) การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ AMF ในการยับยั้งโรครากเน่าที่เกิดจาก

เชื้อ Phytophthora ในส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 ที่มีการต่อกิ่งด้วยส้มพันธุ์โชกุน

ผลการทดลองจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ AMF ในการยับยั้งโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ Phytophthora ในส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 ที่มีการต่อกิ่งด้วยส้มพันธุ์โชกุน พบว่า ส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 นี้ แสดงอาการของการเกิดโรคอันเนื่องมาจากเชื้อ *P. parasitica* ไม่เด่นชัด ถึงแม้ว่าได้ทำการปลูกเชื้อลงไปอีก 2 ครั้งแล้วก็ตาม ดังนั้น จึงทำการขุดรากเพื่อดูลักษณะของราก ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบรากของต้นที่เป็นชุดควบคุมกับรากของต้นที่ได้รับเชื้อ Phytophthora พบว่า รากของต้นที่ได้รับเชื้อ Phytophthora มีลักษณะถอดปล้อง เปื่อย และรากมีลักษณะขาด, สันกุดกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรากของต้นที่เป็นชุดควบคุม (รูปที่ 30 และ 31) ในขณะที่เมื่อทำการเปรียบเทียบรากของต้นที่ได้รับเชื้อ *A. tuberculata* + Phytophthora กับรากของต้นที่ได้รับเชื้อ Phytophthora อย่างเดียว พบว่าให้ผลการทดสอบในลักษณะเดียวกัน (รูปที่ 32) ในขณะที่ผลการทดลองให้ผลเช่นเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างรากของต้นที่ได้รับเชื้อ *Gl. etunicatum* + Phytophthora กับรากของต้นที่ได้รับเชื้อ Phytophthora

ในส่วนของการทดสอบประสิทธิภาพของสายพันธุ์ AMF ที่มีต่อการยับยั้งการเกิดโรคอันเนื่องมาจากเชื้อ *P. parasitica* ในกิ่งตอนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 (กิ่งพันธุ์โชกุน) นั้น จากการตอนกิ่งส้มพันธุ์โชกุนที่ต่อกิ่งบนต้นตอ C-35 โดยใช้ดินผสมขุยมะพร้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นลูกตอนสำหรับหุ้มกิ่งตอนแสดงในรูปที่ 33A หลังจากนั้นทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดราก ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 เดือน ในระหว่างนี้ได้ทำการให้น้ำ และสารละลายธาตุอาหาร (Hoagland solution) 1 ครั้ง/สัปดาห์ หลังจากที่ได้สังเกตเห็นรากออกบริเวณกิ่งตอนแล้ว ได้ทำการปลูกเชื้อ AMF สายพันธุ์ *A. tuberculata* จำนวน 50 สปอร์/กิ่งตอน เพื่อให้เชื้อ AMF นี้ เข้าไปอาศัยในรากก่อนการให้เชื้อ Phytophthora หลังจากนั้นเป็นเวลา 1 เดือน ได้ทำการปลูกเชื้อด้วย *P. parasitica* โดยใช้ใบที่ติดเชื้อเป็นกล้าเชื้อ โดยปลูกเชื้อลงในลูกตอนจำนวน 3 ใบ ดังแสดงในรูปที่ 33B

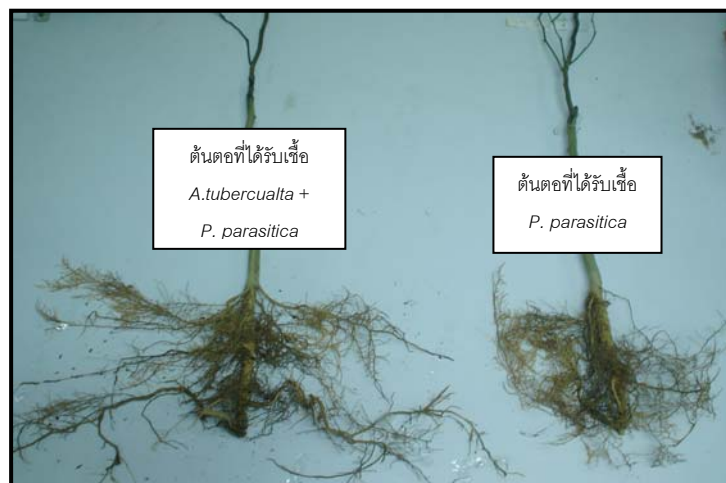
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสายพันธุ์ AMF ที่มีต่อการยับยั้งการเกิดโรคอันเนื่องมาจากเชื้อ *P. parasitica* ในกิ่งตอนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 (กิ่งพันธุ์โชกุน) นั้น พบว่า กิ่งตอนโชกุนที่ได้รับเชื้อ *P. parasitica* มีลักษณะอาการใบร่วง ต้นโทรม ใบเหลืองทั่วทั้งใบ (รูปที่ 34) ในบางต้นนั้น พบว่า เกิดอาการรุนแรงโดยตายลามจากปลายกิ่ง (die back) จนตายทั่วทั้งกิ่งตอนนั้น นอกจากนี้ยังพบอาการเส้นใบโปร่งอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 35) ซึ่งเป็นอาการอันเนื่องมาจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายรุนแรง ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบกับกิ่งตอนที่เป็นชุดควบคุม พบว่า ในกิ่งตอนของชุดควบคุม ลักษณะต้นไม่โทรม และใบยังคงเขียว ไม่มีอาการเหลือง (รูปที่ 36)

เมื่อทำการเปรียบเทียบกิ่งตอนที่ได้รับเชื้อ *P. parasitica* กับกิ่งตอนที่ได้รับเชื้อ *A. tuberculata* + *P. parasitica* พบว่า กิ่งตอนที่ได้รับเชื้อ *P. parasitica* มีลักษณะอาการใบเหลืองทั้งกิ่ง และเริ่มมีอาการตายลามจากปลายกิ่ง (die back) ในขณะที่กิ่งตอนที่ได้รับทั้งเชื้อ *A. tuberculata* และ *P. parasitica* แสดงลักษณะของอาการการเกิดโรคเล็กน้อย กล่าวคือ มีลักษณะใบเหลืองเล็กน้อย ที่ยอดใบยังคงเขียว ไม่

แสดงอาการใบร่วง หรือต้นโทรม นอกจากนี้ยังพบการแตกใหม่ของยอดอ่อน (รูปที่ 37-39) และเมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะใบของกิ่งตอนระหว่างชุดควบคุม, กิ่งตอนที่ได้รับเชื้อ *P. parasitica* และกิ่งตอนที่ได้รับเชื้อ *A. tuberculata* + *P. parasitica* พบว่า เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน โดยในใบจากกิ่งตอนที่เป็นชุดควบคุม ลักษณะใบ และเส้นใบเขียวปกติ ในขณะที่ใบจากกิ่งตอนที่ได้รับเชื้อ *P. parasitica* พบว่า ใบแสดงอาการเหลืองทั่วทั้งใบ เส้นใบโปร่งอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และในส่วนของใบจากกิ่งตอนที่ได้รับทั้งเชื้อ *A. tuberculata* และ *P. parasitica* พบว่า แสดงอาการเส้นใบเหลืองเล็กน้อย ใบยังคงมีสีเขียว ใกล้เคียงกับใบจากกิ่งตอนที่เป็นชุดควบคุม (รูปที่ 40)



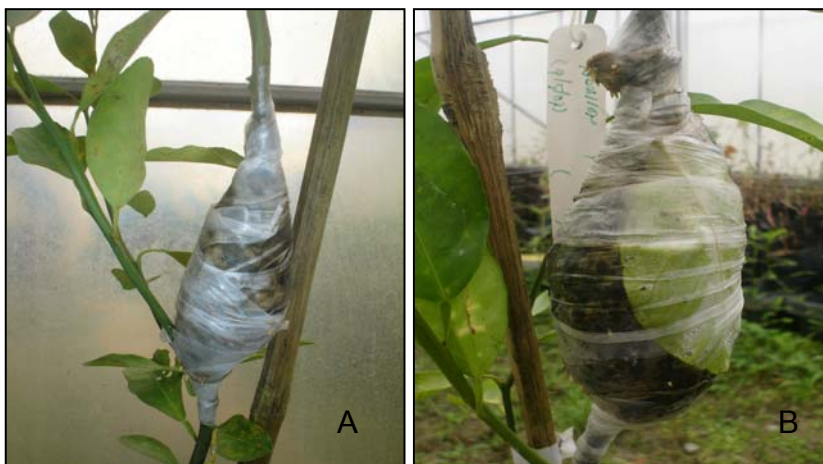
รูปที่ 30 แสดงลักษณะรากของต้นส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งพันธุ์โชกุน เปรียบเทียบกันระหว่าง ดำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม และดำรับการทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อ *P. parasitica*



รูปที่ 31 แสดงลักษณะรากของต้นส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งพันธุ์โชกุนที่ได้รับเชื้อ *P. parasitica* เปรียบเทียบกันระหว่างดำรับการทดลองที่มีการปลูกเชื้อ *A. tuberculata* ร่วมกับเชื้อ *P. parasitica* และดำรับการทดลองที่มีการปลูกเชื้อ *P. parasitica* อย่างเดียว



รูปที่ 32 ลักษณะรากถอดปล้องของส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งพันธุ์โชกุนที่ได้รับเชื้อ *P. parasitica*



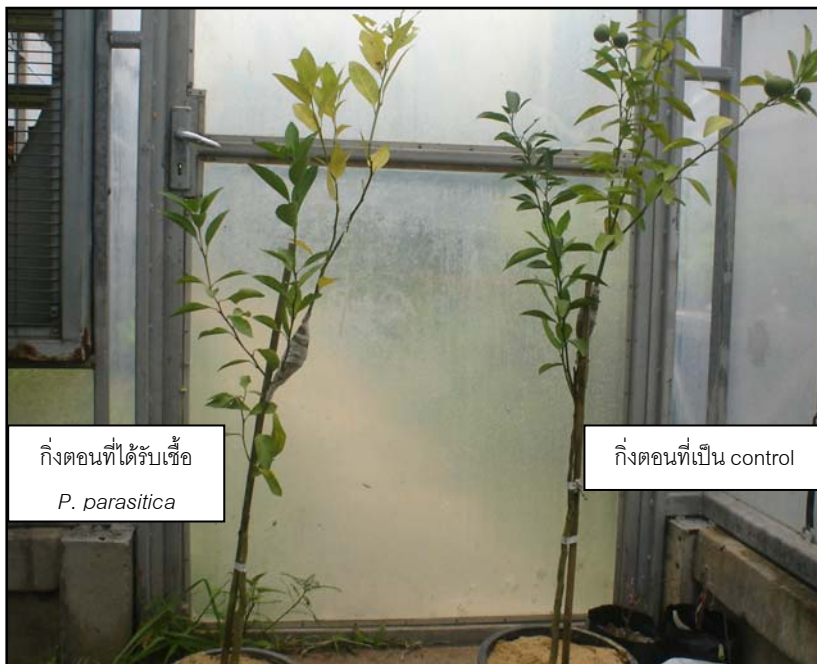
รูปที่ 33 แสดงลักษณะของกิ่งตอนโชกุนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 ก่อน (A) และหลัง (B) ที่มีการปลูกเชื้อ *P. parasitica*



รูปที่ 34 แสดงลักษณะต้น และใบของกิ่งตอนโชกุนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ *P. parasitica*



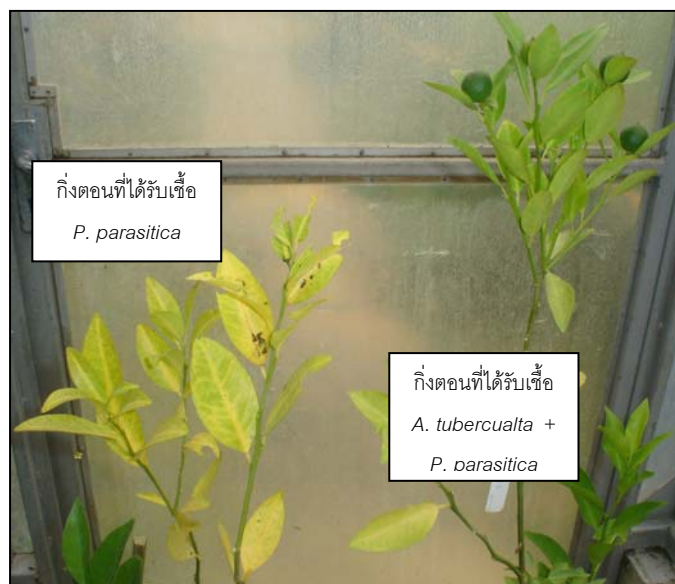
รูปที่ 35 แสดงลักษณะเส้นใบโป่งของกิ่งตอนไซกุนบนส้มพันธุ์
ต้นตอ C-35 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ *P. parasitica*



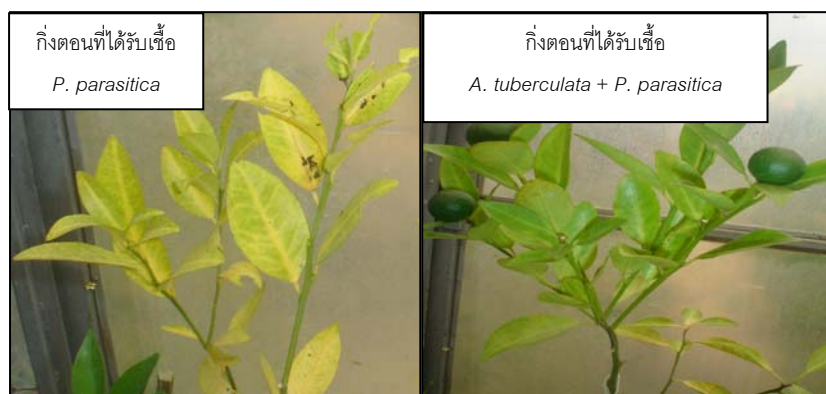
รูปที่ 36 แสดงลักษณะต้นของกิ่งตอนไซกุนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 เปรียบเทียบกัน
ระหว่างตำรับการทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อ *P. parasitica* และตำรับการทดลองที่เป็น
ชุดควบคุม



รูปที่ 37 แสดงลักษณะต้นของกิ่งตอนไซกุนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 เปรียบเทียบกันระหว่างตำรับการทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วย *P. parasitica* และตำรับการทดลองที่มีการปลูกเชื้อด้วย *A. tuberculata* ร่วมกับการปลูกเชื้อ *P. parasitica*



รูปที่ 38 แสดงลักษณะกิ่งตอนไซกุนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 เปรียบเทียบกันระหว่างตำรับการทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วย *P. parasitica* และตำรับการทดลองที่มีการปลูกเชื้อด้วย *A. tuberculata* ร่วมกับการปลูกเชื้อ *P. parasitica*



รูปที่ 39 แสดงลักษณะใบของกิ่งตอนโชกุนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 เปรียบเทียบกันระหว่างตำรับการทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วย *P. parasitica* และตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *A. tuberculata* ร่วมกับการปลูกเชื้อ *P. parasitica*



รูปที่ 40 แสดงลักษณะใบจากกิ่งตอนโชกุนบนส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 เปรียบเทียบกันระหว่างตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม, ตำรับการทดลองที่มีการปลูกเชื้อด้วย *A. tuberculata* ร่วมกับการปลูกเชื้อ *P. parasitica* และตำรับการทดลองที่มีการปลูกเชื้อ *P. parasitica* เพียงอย่างเดียว

ในการวัดการเกิดโรคอันเนื่องมาจากเชื้อ *P. parasitica* จากการทดลองนี้ พบว่าไม่สามารถวัดในเชิงปริมาณได้ วัดได้เพียงในเชิงคุณภาพเท่านั้น (สังเกตการณ์เกิดอาการของโรคอันเนื่องมาจากการเข้าทำลายของเชื้อ) เนื่องจากในการทดลองได้มีการทำซ้ำเพียง 4 ซ้ำ และอาการของโรคที่เกิดขึ้นก็ยังไม่เด่นชัดมากนัก จำเป็นต้องใช้ระยะเวลานานจนกว่าต้นส้มจะแสดงอาการของโรคขึ้น ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจวัดน้ำหนักแห้งของราก และปริมาณฟอสฟอรัสในใบ รวมถึงการวัดเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของ AM ในราก (root colonization) เพื่อหาความแตกต่างระหว่างตำรับการทดลอง และใช้เป็นข้อมูลเพื่อยืนยันผลร่วมด้วย ผลการวัดน้ำหนักแห้งของราก และปริมาณฟอสฟอรัสในใบได้ผลดังนี้

น้ำหนักแห้งของราก

ส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนโชกุน พบว่า ในทุกตำรับการทดลอง มีค่าน้ำหนักแห้งของราก ไม่แตกต่างกัน โดยจะมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง ~2.6-4.1 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 11

ปริมาณฟอสฟอรัสในใบ (%P)

จากตารางที่ 11 พบว่า ใบส้มในตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *Gl. etunicatum* ร่วมกับเชื้อ *P. parasitica* นั้น มีปริมาณ P สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองอื่นๆ และในส่วนของการทดลองที่เป็นชุดควบคุม, ตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *A. tuberculata* และตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *A. tuberculata* ร่วมกับเชื้อ *P. parasitica* นั้น พบว่า มีปริมาณ P ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ ตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *P. parasitica* เพียงอย่างเดียว พบว่า มีปริมาณ P ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทุกตำรับการทดลอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *Gl. etunicatum* ร่วมกับเชื้อ *P. parasitica*

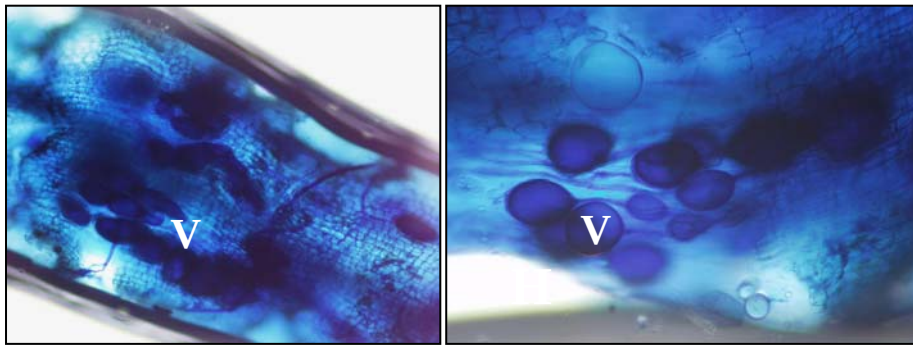
ตารางที่ 11 แสดงผลน้ำหนักแห้งของราก (g) และปริมาณฟอสฟอรัส (%P) ในใบของส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนโชกุน

สายพันธุ์	Treatment	น้ำหนักแห้งของราก (g)	ปริมาณ P* (%)
ส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนโชกุน	Control	3.4667 ^{a**}	0.5302 ^{ab}
	<i>A. tuberculata</i>	3.1000 ^a	0.5458 ^{ab}
	<i>Gl. etunicatum</i>	4.1333 ^a	0.6840 ^{bc}
	<i>A. tuberculata</i> + <i>P. parasitica</i>	3.2333 ^a	0.5248 ^{ab}
	<i>Gl. etunicatum</i> + <i>P. parasitica</i>	4.1000 ^a	0.8171 ^c
	<i>P. parasitica</i>	2.6667 ^a	0.3945 ^a

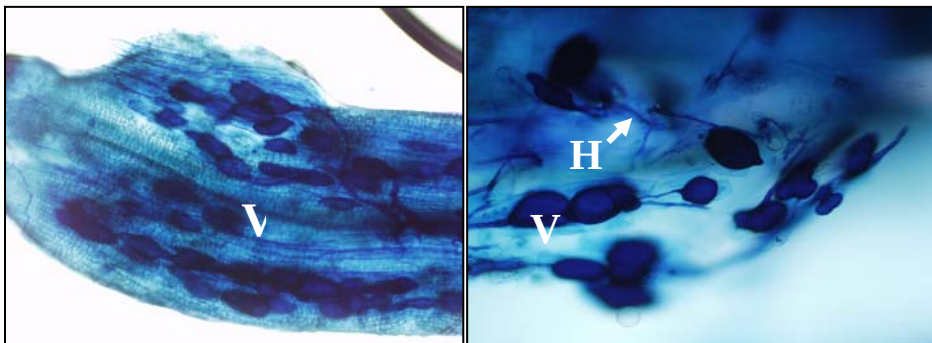
* ผลต่างของปริมาณ P = ปริมาณ P หลังการปลูกที่ซึ่งมีการให้ AM และ *P. parasitica* – ปริมาณ P ก่อนการปลูก

** Means under each parameter followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple-range test.

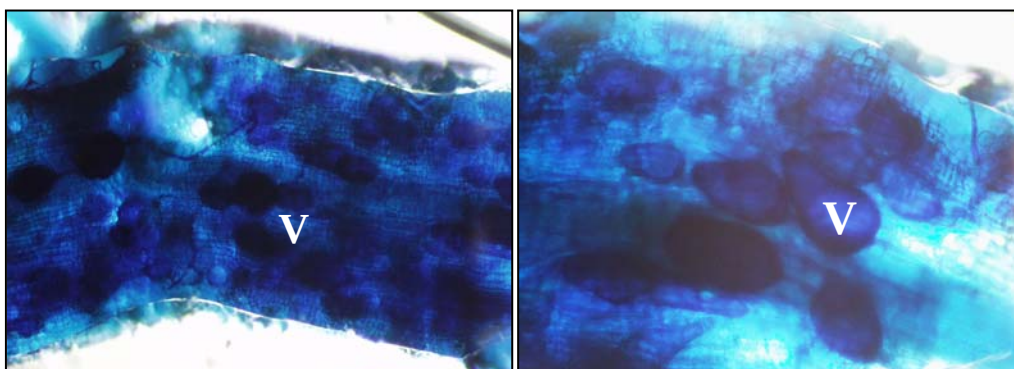
ผลการการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ AM ในราก (% Root colonization) เพื่อยืนยันผลร่วมกับปริมาณ P ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 41-44 และตารางที่ 12



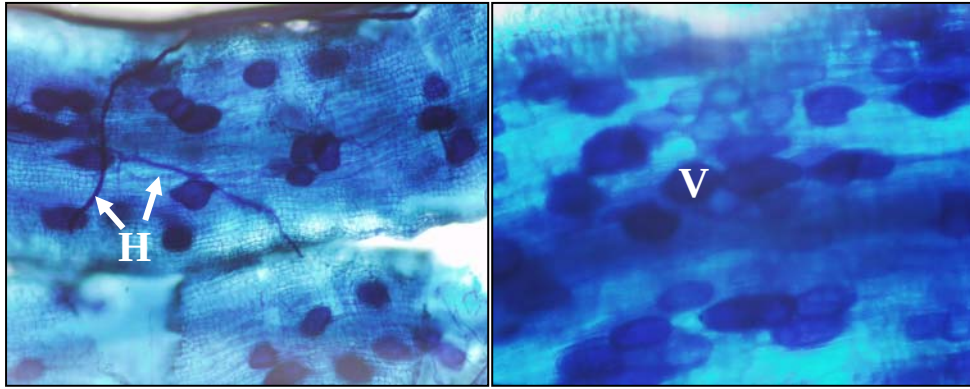
รูปที่ 41 แสดงการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ AM ในรากส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนโชกุนใน
 ได้รับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *G. etunicatum*
 (V: vesicle, H: hypha) (กำลังขยาย 10x และ 20x)



รูปที่ 42 แสดงการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ AM ในรากส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนโชกุนใน
 ได้รับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *G. etunicatum* ร่วมกับการปลูกเชื้อ *P. parasitica*
 (V: vesicle, H: hypha) (กำลังขยาย 10x และ 20x)



รูปที่ 43 แสดงการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ AM ในรากส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนโชกุนใน
 ได้รับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *A. tuberculata*
 (V: vesicle, H: hypha) (กำลังขยาย 10x และ 20x)



รูปที่ 44 แสดงการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ AM ในรากส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนโชกุนใน
 ดำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *A. tuberculata* ร่วมกับการปลูกเชื้อ *P. parasitica*
 (V: vesicle, H: hypha) (กำลังขยาย 10x และ 20x)

การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ AM (% Root colonization)

จากตารางที่ 12 ผลการเข้าอยู่อาศัยของ AM ในชุดควบคุม และดำรับการทดลองที่มีการปลูกเชื้อ
 ด้วย *P. parasitica* นั้น พบว่า มีการเข้าอยู่อาศัยของ AM เนื่องจากจากพันธุ์ต้นตอที่ได้มานั้นได้มีการปลูกลงใน
 วัสดุปลูกที่ประกอบด้วยแกลบ+กาบมะพร้าวแห้ง+ดิน ก่อนหน้าที่จะนำมาทำการทดลอง ดังนั้น จะพบ
 การเข้าอยู่อาศัยของ AM บางส่วนในชุดควบคุม และดำรับการทดลองที่มีการปลูกเชื้อ *P. parasitica* (~
 30-35%)

ในส่วนของการเข้าอยู่อาศัยของ AM ในดำรับการทดลองอื่น พบว่า ดำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ
Gl. etunicatum มีค่า % root colonization สูงที่สุด คือ 94% ซึ่งมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับดำรับการ
 ทดลองที่มีการให้เชื้อ *A. tuberculata* ในขณะที่ดำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *Gl. etunicatum* ร่วมกับการ
 ปลูกเชื้อ *P. parasitica* พบว่า มีค่า % root colonization ใกล้เคียงกับดำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *A.*
tuberculata คือ 86.18% และ 82.13% ตามลำดับ และในส่วนของดำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม และ
 ดำรับการทดลองที่มีการปลูกเชื้อ *P. parasitica* พบว่า มีค่า % root colonization ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าต่ำ
 ที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับดำรับการทดลองอื่น คือ 30.51% และ 35.09% ตามลำดับ

ตารางที่ 12 แสดงผลการเข้าอยู่อาศัยของ AM (% Root colonization) ในรากของส้มพันธุ์
ต้นตอ C-35 กิ่งตอนโชกุน

สายพันธุ์	Treatment	Root colonization (%)
ส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนโชกุน	Control	30.51 ^{a*}
	<i>A. tuberculata</i>	82.13 ^c
	<i>Gl. etunicatum</i>	94.48 ^d
	<i>A. tuberculata</i> + <i>P. parasitica</i>	63.46 ^b
	<i>Gl. etunicatum</i> + <i>P. parasitica</i>	86.18 ^c
	<i>P. parasitica</i>	35.09 ^a

* Means under each parameter followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple-range test.

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ AMF ในการยับยั้งโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ Phytophthora ในการทดลองส่วนนี้ พบว่า ผลของปริมาณ P ใน treatment ที่มีการให้เชื้อ AMF ทั้งที่เป็นสายพันธุ์ *A. tuberculata* และ *Gl. etunicatum* ร่วมกับการให้เชื้อ Phytophthora (*P. parasitica*) นั้น จะให้ผลของปริมาณ P ในใบสูงกว่าตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ Phytophthora (*P. parasitica*) เพียงอย่างเดียว ซึ่งผลของปริมาณ P นี้สอดคล้องไปในทางเดียวกันกับอาการเกิดโรคของส้มพันธุ์ต้นตอ C-35 กล่าวคือ รากของต้นที่ได้รับเชื้อ Phytophthora เพียงอย่างเดียว มีลักษณะถอดปล้อง เปื่อย และรากมีลักษณะชด, สั้น กุดกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรากของต้นที่เป็นชุดควบคุม และรากของต้นที่มีการให้เชื้อ AMF ร่วมกับเชื้อ Phytophthora

จากผลการทดลองในส่วนของส้มพันธุ์ต้นตอนั้น แม้ทำการปลูกเชื้อบริเวณโคนต้นหลายครั้งแล้ว แต่การเกิดโรคกลับแสดงไม่เด่นชัด จำเป็นต้องขุดรากเพื่อสังเกต เนื่องมาจากเป็นพันธุ์ต้านทานโรค จึงมีความสามารถในการต้านทานการเข้าทำลายของโรครากเน่าโคนเน่า ซึ่งเมื่อทำการทดลองลักษณะเดียวกันในกิ่งตอน พบว่า กิ่งตอนของกิ่งพันธุ์โชกุนที่ต่อกิ่งอยู่บนต้นตอนั้น มีความอ่อนแอต่อโรคอันเนื่องมาจากเชื้อ *P. parasitica* จึงเกิดอาการของโรคอย่างเด่นชัด และรวดเร็วกว่าในส้มพันธุ์ต้นตอที่มีการปลูกเชื้อบริเวณโคนต้น

นอกจากนี้ พบว่า ในกิ่งตอนที่มีการให้เชื้อ *Phytophthora* อย่างเดียว พบว่ามีอาการของเส้นใบไปร่งร่วมด้วย อันเนื่องมาจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย ซึ่งพบว่า ลักษณะการเกิดโรครากเน่านี้แสดงอาการรุนแรงกว่าในกิ่งตอนที่มีการให้เชื้อ AM ร่วมด้วย

ในส่วนกิ่งตอนที่มีการให้ทั้งเชื้อ AM และ *Phytophthora* ร่วมกัน พบว่า มีการคืนสภาพ (recovery) ของใบ และมีการแตกยอดอ่อนของกิ่งตอนนั้นๆ (รูปที่ 45) เป็นการชะลอ และยับยั้งการเกิดโรคอันเนื่องมาจากเชื้อ *Phytophthora* ที่ก่อให้เกิดโรครากเน่าในส้มได้ อาจนำไปสู่การใช้ AM กับกิ่งตอนปกติที่ไม่ต้านทานโรค ทดแทนการใช้พันธุ์ต้นตอปลอดโรค ที่ซึ่งแม้จะมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรครากเน่าโคนเน่าได้ดี แต่สัมผัสพันธุ์ต้นตอปลอดโรคเหล่านี้มีราคาแพงเมื่อเทียบกับกิ่งตอนปกติที่ไม่ต้านทานโรค



รูปที่ 45 แสดงลักษณะการคืนสภาพ (recovery) ของใบ และการแตกยอดอ่อนของกิ่งตอน

ไซกอนบนสัมผัสพันธุ์ต้นตอ C-35 ที่มีการให้เชื้อ *A. tuberculata* ร่วมกับการปลูกเชื้อ

P. parasitica

จากผลของการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ AM (% root colonization) ในรากสัมผัสพันธุ์ต้นตอ C-35 กิ่งตอนไซกอนนั้น พบว่า ผลที่ได้สอดคล้องกับผลของปริมาณ P ในใบ กล่าวคือ ค่า % root colonization ให้ผลไปในทางเดียวกันกับผลของปริมาณ P ดังนี้ ดำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ AMF ทั้งที่เป็นสายพันธุ์ *A. tuberculata* และ *Gl. etunicatum* ร่วมกับการให้เชื้อ *Phytophthora* (*P. parasitica*) นั้น จะให้ผลของทั้งปริมาณ P ในใบ และ % root colonization สูงกว่าดำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *Phytophthora* (*P. parasitica*) เพียงอย่างเดียวอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งผลของปริมาณ P และ % root colonization นี้สอดคล้องไปในทางเดียวกันกับอาการเกิดโรคของสัมผัสพันธุ์ต้นตอ C-35 กล่าวคือ รากของต้นที่ได้รับเชื้อ *Phytophthora* เพียงอย่างเดียว มีลักษณะถอดปล้อง เปื่อย และรากมีลักษณะชด, สันนิษฐานว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรากของต้นที่มีการให้เชื้อ AMF ร่วมกับเชื้อ *Phytophthora* ทำให้การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ AM ลดน้อยลงไปด้วย และเมื่อ

ทำการเปรียบเทียบ % root colonization ระหว่างตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ AMF เพียงอย่างเดียว กับ ตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ AMF ร่วมกับ Phytophthora (*P. parasitica*) พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ AMF จะมี % root colonization สูงกว่าตำรับการทดลองที่มีการให้ทั้งเชื้อ AMF ร่วมกับ Phytophthora (*P. parasitica*) ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการแข่งขัน และแย่งพื้นที่ในการเข้าอยู่อาศัยภายใน รากของเชื้อราทั้งคู่ ซึ่งจะส่งผลต่อค่าปริมาณ P ในทิศทางเดียวกัน ผลนี้สอดคล้องกับการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา ของ Davis และ Menge (1981) ซึ่งพบว่า การเข้าอยู่อาศัยของ *G. fasciculatum* ลดลง ในรากของส้มที่มีการให้เชื้อ *P. parasitica* และจากผลนี้จะส่งผลให้ปริมาณ P ลดลงเช่นเดียวกัน

6. การทดสอบประสิทธิภาพการดูดใช้ธาตุ N, P, K และ micronutrients ของ AM

จากการทดสอบประสิทธิภาพการดูดใช้ธาตุ N, P, K และ micronutrients ของ AM ผลการวิจัยต่างๆ ทั้งในดิน และพืช ได้ผลดังตารางที่ 13-16 และการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อรา AM ในรากส้ม ดังแสดงใน รูปที่ 46 และ 47

pH, EC ($\mu\text{S/cm}$), OM (%) ในดิน

หลังจากการปลูกส้มเป็นเวลา 3 เดือน ได้นำตัวอย่างดินมาวิเคราะห์หาค่า pH, EC ($\mu\text{S/cm}$) และ OM (%) ดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่า ค่า pH ในดินมีค่าใกล้เคียงกันในทุกตำรับการทดลอง โดยอยู่ระหว่าง pH 6.28-6.32 ยกเว้นตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata* มีค่า pH ต่ำกว่าตำรับการทดลองอื่นๆ ในส่วนของค่า EC พบว่า ในทุกตำรับการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 89-111 $\mu\text{S/cm}$

ในส่วนของค่าวิเคราะห์ OM นั้น พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ N, P, K + micronutrients มีค่า OM ต่ำที่สุด คือ 0.4125% เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองอื่นๆ ในขณะที่ตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata* มีค่า OM สูงที่สุด คือ 0.74% ส่วนตำรับการทดลองอื่นๆ นั้นมีค่า OM ใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 0.53%-0.61%

ตารางที่ 13 ค่า pH, EC, OM ในดินที่ใช้ปลูกส้มเขียวหวานเป็นระยะเวลา 3 เดือน

สายพันธุ์	Treatment	pH	EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	OM (%)
เขียวหวาน	Control	6.3075 ^{b*}	107.75 ^a	0.60 ^{ab}
	<i>Gl. etunicatum</i>	6.3075 ^b	89.225 ^a	0.5375 ^{ab}
	<i>A. tuberculata</i>	6.19 ^a	108.275 ^a	0.7400 ^b
	<i>Gl. etunicatum</i> . + NPK+micronutrient	6.3275 ^b	108.0875 ^a	0.5950 ^{ab}
	<i>A. tuberculata</i> + NPK+micronutrient	6.2825 ^{ab}	107.8625 ^a	0.5325 ^{ab}
	NPK + micronutrient	6.3075 ^b	111.875 ^a	0.4125 ^a
	NPK	6.3175 ^b	109.875 ^a	0.6150 ^{ab}

* Means under each parameter followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple-range test.

ฟอสฟอรัส (P, ppm) ในดิน

จากตารางที่ 14 พบว่า ปริมาณ P ที่เป็นประโยชน์ในดิน จะมีค่าสูงที่สุด คือ 63.3025 ppm ในตำรับการทดลองที่มีการให้ *Gl. etunicatum* ร่วมกับการให้ปุ๋ย NPK+ micronutrients และมีค่าต่ำสุด (21.5975 ppm) ในตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม ในขณะที่ตำรับการทดลองที่มีการให้ AM ซึ่งได้แก่ *Gl. etunicatum* และ *A. tuberculata* และตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK+ micronutrients พบว่ามีค่า P ที่เป็นประโยชน์ใกล้เคียงกัน แต่มีค่าน้อยกว่าตำรับการทดลองที่มีการให้ทั้ง *Gl. etunicatum* ร่วมกับ NPK+ micronutrients อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โพแทสเซียม (K, ppm) ในดิน

จากปริมาณ K ในดิน (ตารางที่ 14) พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK และ micronutrients ทุกตำรับการทดลองเป็นกลุ่มที่มีค่า K สูงที่สุด และใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 86-108 ppm ซึ่งตำรับการทดลอง

ที่มีการให้ปุ๋ย NPK และ micronutrients นี้ มีค่า K มากกว่าตำรับการทดลองที่เป็นชุดทดลอง, ตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ AM (*Gl. etunicatum* และ *A. tuberculata*) อย่างเห็นได้ชัด ผลที่ได้นี้ คาดว่า ปริมาณ K ที่แตกต่างกันในแต่ละตำรับการทดลอง น่าจะเป็นผลเนื่องมาจากการให้ปุ๋ย NPK และ micronutrients มากกว่าการให้เชื้อ AM

Micronutrients

เหล็ก (Fe, ppm) ในดิน

จากปริมาณ Fe ในดิน ดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ NPK เพียงอย่างเดียว จะให้ค่า Fe ต่ำที่สุด (8.8050 ppm) และมีค่าใกล้เคียงกับตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม, ตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ AM (*Gl. etunicatum* และ *A. tuberculata*), ตำรับการทดลองที่มีการให้ *Gl. etunicatum* ร่วมกับ NPK+micronutrients ในขณะที่ตำรับการทดลอง ซึ่งมีการให้ *A. tuberculata* ร่วมกับ NPK+micronutrients ให้ผลของค่า Fe สูงที่สุดอย่างเห็นได้ชัด คือ 31.02 ppm เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองอื่นๆ

แมงกานีส (Mn, ppm) ในดิน

ปริมาณ Mn ในดิน ในตารางที่ 14 พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK+micronutrients มีค่า Mn สูงที่สุด คือ 22.045 ppm ในขณะที่ตำรับการทดลองที่มีการให้ *Gl. etunicatum* และตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม มีค่า Mn น้อยที่สุด และทั้ง 2 ตำรับการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน ในส่วนของตำรับการทดลองที่มีการให้ *Gl. etunicatum* ร่วมกับ NPK+micronutrients นั้น มีค่า Mn มากกว่าชุดควบคุม และตำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *Gl. etunicatum* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีค่าน้อยกว่าตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK+micronutrients อย่างเห็นได้ชัด ในส่วนของตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata* เพียงอย่างเดียว, ตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata* ร่วมกับปุ๋ย NPK+micronutrients, และตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK เพียงอย่างเดียว จะมีค่า Mn ใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 4.81-6.41 ppm

ทองแดง (Cu, ppm) ในดิน

ในส่วนของ Cu ในดิน นั้น พบว่า ในทุกตำรับการทดลองให้ค่า Cu ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่า อยู่ระหว่าง 0.0020-0.0085 ppm

สังกะสี (Zn, ppm) ในดิน

ค่า Zn ในดิน จากตารางที่ 14 พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK+micronutrients นั้น ให้ค่า Zn สูงที่สุด คือ 9.81 ppm รองลงไป คือ ตำรับการทดลองที่มีการให้ *Gl. etunicatum* ร่วมกับ NPK+

micronutrients ซึ่งให้ค่า Zn เท่ากับ 4.18 ppm และค่า Zn ที่น้อยที่สุด (~1.3-1.5 ppm) พบในตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม และตำรับการทดลองที่มีการให้ AM (*Gl. etunicatum*, *A. tuberculata*)

ตารางที่ 14 ปริมาณ P, K, Fe, Mn, Cu, Zn ในดินที่ใช้ปลูกส้มเขียวหวานเป็นระยะเวลา 3 เดือน

สายพันธุ์	Treatment	P* (ppm)	K* (ppm)	Fe* (ppm)	Mn* (ppm)	Cu* (ppm)	Zn* (ppm)
เขียวหวาน	Control	21.5975 ^{a**}	45.6200 ^a	10.3675 ^a	2.3467 ^a	0.0057 ^a	1.3550 ^a
	<i>Gl. etunicatum</i>	48.8100 ^b	50.4950 ^a	12.7175 ^a	3.02 ^a	0.0020 ^a	1.3885 ^a
	<i>A. tuberculata</i>	46.1600 ^b	47.4950 ^a	12.3225 ^a	5.91 ^{ab}	0.0023 ^a	1.5292 ^a
	<i>Gl. etunicatum</i> + NPK+micronutrient	63.3025 ^c	92.120 ^b	12.7175 ^a	11.095 ^b	0.0037 ^a	4.1890 ^b
	<i>A. tuberculata</i> + NPK+micronutrient	55.31625 ^{bc}	108.87 ^b	31.02 ^b	6.41 ^{ab}	0.0067 ^a	2.8422 ^{ab}
	NPK + micronutrient	44.9725 ^b	99.620 ^b	22.4725 ^{ab}	22.045 ^c	0.0085 ^a	9.8112 ^c
	NPK	55.2875 ^{bc}	86.7450 ^b	8.8050 ^a	4.81 ^{ab}	0.0023 ^a	2.2075 ^{ab}

* ผลต่างของปริมาณธาตุอาหารในดิน = ปริมาณธาตุอาหารในดินหลังการปลูกที่มีการให้ AM และปุ๋ยเคมี - ปริมาณธาตุอาหารในดินก่อนปลูก

** Means under each parameter followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple-range test.

ความสูง (cm)

ผลต่างความสูงของต้นส้มเขียวหวาน (ตารางที่ 15) พบว่า มีค่าใกล้เคียงกันทุกตำรับการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกตำรับการทดลอง

AM colonization (%)

จากตารางที่ 15 ผลการเข้าอยู่อาศัยของ AM ในตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม, ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK+micronutrients, และตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK นั้น พบว่า มีการเข้าอยู่อาศัยของ AM เนื่องจากกึ่งพันธุ์ที่ได้มานั้นได้มีการปลูกลงในวัสดุปลูกที่ประกอบด้วยแกลบ+กาบมะพร้าวแห้ง+

ดิน ก่อนหน้าที่จะนำมาทำการทดลอง ดังนั้นจะพบการเข้าอยู่อาศัยของ AM บางส่วน (~15%) ใน treatment เหล่านั้น ทั้งที่ไม่มีการให้ AM ในระหว่างการทดลอง

ในส่วนของการดำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata* ร่วมกับ NPK+micronutrients พบว่า มีค่าการเข้าอยู่อาศัยของ AM สูงที่สุด คือ 58.82% รองลงมา ได้แก่ ดำรับการทดลองที่มีการใส่เชื้อ *Gl. etunicatum* เพียงอย่างเดียว ซึ่งให้ค่าการเข้าอยู่อาศัยของ AM ในราก เท่ากับ 55.43% และดำรับการทดลอง ที่มีการให้ *Gl. etunicatum* ร่วมกับปุ๋ย NPK+micronutrients จะให้ค่าการเข้าอยู่อาศัยของ AM ในราก เท่ากับ 51.97% ซึ่งมีค่าน้อยกว่าดำรับการทดลองที่มีการให้ *Gl. etunicatum* เพียงอย่างเดียว การเข้าอยู่อาศัยของ AM (*Gl. etunicatum* และ *A. tuberculata*) ในรากส้มเขียวหวาน นั้น แสดงในรูปที่ 46-47

ไนโตรเจน (%N) ในใบ

จากตารางที่ 15 ผลของปริมาณ N ในใบส้มเขียวหวาน พบว่า ดำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม และดำรับการทดลองที่มีการให้ AM ทั้งที่เป็น *Gl. etunicatum* และ *A. tuberculata* นั้น จะให้ค่า N ต่ำที่สุด และพบว่าให้ค่าต่ำกว่าดำรับการทดลองที่มีการให้ AM (*Gl. etunicatum*, *A. tuberculata*) ร่วมกับ NPK+micronutrients, ดำรับการทดลองที่มีการให้ NPK+micronutrients, และดำรับการทดลองที่มีการให้ ปุ๋ย NPK เพียงอย่างเดียว อย่างเห็นได้ชัด

ฟอสฟอรัส (%P) ในใบ

ผลของปริมาณ P ในใบส้มเขียวหวาน (ตารางที่ 15) พบว่า ให้ค่า P ในใบไม่แตกต่างกันในทุกดำรับ การทดลอง

โพแทสเซียม (%K) ในใบ

ผลของปริมาณ K ในใบส้ม พบว่า ดำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม, ดำรับการทดลองที่มีการให้ AM ทั้ง *Gl. etunicatum* และ *A. tuberculata* จะให้ค่า K ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับดำรับการทดลองอื่นๆ ในขณะที่ ค่า K ในใบ ที่มีค่าสูงที่สุด จะพบในดำรับการทดลองที่มีการให้เชื้อ *A. tuberculata* ร่วมกับปุ๋ย NPK+micronutrients และดำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK+micronutrients

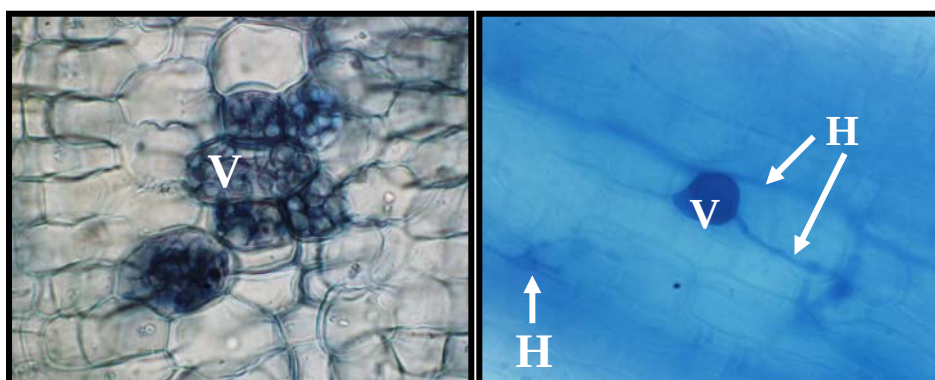
ตารางที่ 15 ค่าความสูง (cm), การเข้าอยู่อาศัยของ AM ในรากส้มเขียวหวาน (% AM colonization), ปริมาณ N(%), P(%) และ K(%) ในใบส้ม หลังการปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน

สายพันธุ์	Treatment	ความสูง* (cm)	AM colonization (%)	N** (%)	P** (%)	K** (%)
เขียวหวาน	Control	7.50 ^{a†}	15.3325 ^a	0.0467 ^a	0.0367 ^a	0.0867 ^a
	<i>Gl. etunicatum</i>	7.83 ^a	55.4325 ^c	0.0475 ^a	0.0925 ^a	0.0450 ^a
	<i>A. tuberculata</i>	8.53 ^a	56.08 ^{cd}	0.2675 ^a	0.1075 ^a	0.0900 ^a
	<i>Gl. etunicatum</i> + NPK +micronutrient	8.00 ^a	51.9725 ^b	0.7750 ^b	0.1300 ^a	0.8950 ^{bc}
	<i>A. tuberculata</i> + NPK +micronutrient	7.73 ^a	58.82 ^d	0.8725 ^b	0.1450 ^a	1.1300 ^c
	NPK + micronutrient	7.27 ^a	15.3050 ^a	0.9375 ^b	0.1000 ^a	1.1100 ^c
	NPK	9.07 ^a	15.5450 ^a	0.6775 ^b	0.1050 ^a	0.6325 ^b

* ผลต่างความสูง (cm) ของส้มเขียวหวาน = ความสูงหลังการปลูกซึ่งมีการให้ AM และปุ๋ย - ความสูงก่อนการปลูก

** ผลต่างของปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนในใบส้ม = ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนในใบส้มหลังการปลูกซึ่งมีการให้ AM และปุ๋ย - ปริมาณธาตุอาหารก่อนการปลูก

† Means under each parameter followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple-range test.



รูปที่ 46 รากส้มที่ได้รับการลงเชื้อ

A. tuberculata เป็นเวลา 3 เดือน
(100x), V: vesicle

รูปที่ 47 รากส้มที่ได้รับการลงเชื้อ

Gl. etunicatum เป็นเวลา 3 เดือน
(40x), V: vesicle, H: hyphae

Micronutrients

เหล็ก (Fe, ppm) ในใบ

จากตารางที่ 16 แสดงผลของปริมาณ Fe ในใบส้มเขียวหวาน ซึ่งพบว่า ตำรับการทดลองที่มีการใส่เชื้อ AM ทั้ง *Gl. etunicatum* และ *A. tuberculata* ร่วมกับการให้ปุ๋ย NPK+micronutrients, และตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK+micronutrients นั้น ให้ค่า Fe ในใบส้มมากกว่าตำรับการทดลองที่มีการใส่เชื้อ AM (*Gl. etunicatum* และ *A. tuberculata*) เพียงอย่างเดียว, ตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK, และตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แมงกานีส (Mn, ppm) ในใบ

จากการวัดค่า Mn ในใบส้ม ทั้งก่อน และหลังการปลูกนั้น พบว่า ในใบส้มทุกตำรับการทดลอง ไม่พบปริมาณ Mn ในใบส้มเลย

ทองแดง (Cu, ppm) ในใบ

ผลของปริมาณ Cu ในใบ (ตารางที่ 16) พบว่า ในตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม ไม่พบปริมาณ Cu ในใบส้มเลย ในขณะที่ตำรับการทดลองที่มีการใส่เชื้อ AM (*Gl. etunicatum* และ *A. tuberculata*) ร่วมกับปุ๋ย NPK+micronutrients และตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK+micronutrients มีค่าใกล้เคียงกัน และมีค่ามากกว่าตำรับการทดลองที่มีการใส่เชื้อ AM (*Gl. etunicatum* และ *A. tuberculata*) เพียงอย่างเดียว และตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สังกะสี (Zn, ppm) ในใบ

จากตารางที่ 16 ผลของปริมาณ Zn ในใบส้ม พบว่า ค่าสูงสุดพบในตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK+micronutrients คือ 40.35 ppm รองลงมา คือ ปริมาณ Zn เท่ากับ 17.63 ppm ในตำรับการทดลองที่มีการใส่เชื้อ *A. tuberculata* ร่วมกับ NPK+micronutrients ในขณะที่ปริมาณ Zn ต่ำสุด พบในตำรับการทดลองที่เป็นชุดควบคุม, ตำรับการทดลองที่มีการให้ AM (*Gl. etunicatum* และ *A. tuberculata*) เพียงอย่างเดียว, ตำรับการทดลองที่มีการให้ *Gl. etunicatum* ร่วมกับ NPK+micronutrients, และตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ย NPK

ตารางที่ 16 ปริมาณ Micronutrients (Fe, Mn, Cu, Zn) ในใบส้มเขียวหวาน หลังจากการให้ AM และการให้ปุ๋ยเป็นระยะเวลา 3 เดือน

สายพันธุ์	Treatment	Fe** (ppm)	Mn** (ppm)	Cu** (ppm)	Zn** (ppm)
เขียวหวาน	Control	2.5025 ^{a†}	ND*	0.0000 ^a	1.5125 ^a
	<i>Gl. etunicatum</i>	6.0500 ^a	ND	0.0375 ^a	1.8162 ^a
	<i>A. tuberculata</i>	5.0825 ^a	ND	0.0250 ^a	1.7475 ^a
	<i>Gl. etunicatum</i> + NPK+micronutrient	18.3025 ^b	ND	0.2000 ^{ab}	6.5237 ^a
	<i>A. tuberculata</i> + NPK+micronutrient	18.6075 ^b	ND	0.3300 ^b	17.6307 ^b
	NPK + micronutrient	15.4133 ^b	ND	0.2387 ^{ab}	40.3587 ^c
	NPK	1.9700 ^a	ND	0.0137 ^a	2.9562 ^a

* Not detected

** ผลต่างของปริมาณธาตุในใบส้ม = ปริมาณธาตุในใบส้มหลังการปลูกซึ่งมีการให้ AM และปุ๋ย – ปริมาณธาตุก่อนการปลูก

† Means under each parameter followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple-range test.

จากผลการวิเคราะห์ธาตุอาหารในดินหลังปลูกส้มเป็นระยะเวลา 3 เดือน เมื่อพิจารณา พบว่า ในตำรับการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยร่วมด้วย (ตำรับการทดลอง NPK, NPK+micronutrients, AM+NPK+micronutrients) จะมีค่าปริมาณธาตุอาหารในดินสูงกว่าปริมาณธาตุอาหารในตำรับการทดลองที่ไม่มีการให้ปุ๋ย (ชุดควบคุม และตำรับที่มีการใส่เชื้อ AM) ทั้งนี้เนื่องจากผลจากการใส่ปุ๋ยนั่นเอง และจากคุณสมบัติและปริมาณธาตุอาหารในดิน ถ้าพิจารณาในส่วนของคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการปลูกส้ม พบว่าค่า pH มีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 6.19-6.32, ค่า EC อยู่ในช่วง 89-111 $\mu\text{S}/\text{cm}$ และค่า OM อยู่ในช่วง 0.53-0.74% ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ค่า pH และ EC ของดินที่วิเคราะห์ได้นี้ อยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการปลูกส้ม โดยค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.0-6.5 และค่า EC หรือค่าสภาพการนำไฟฟ้า ควรมีค่าน้อยกว่า หรือเท่ากับ 2 dS/m หรือ 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (เปรมปรี 2544) แต่ในส่วนของคุณสมบัติอินทรีย์วัตถุ (OM) พบว่า ปริมาณ OM ในดินที่วิเคราะห์ได้ มีค่าต่ำกว่าปริมาณ OM ที่เหมาะสมต่อการปลูกส้ม ซึ่งควรมีค่า

มากกว่า 3% (เปรมปรี 2544) ทั้งนี้เนื่องมาจากการทดลองนี้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการดูดใช้ธาตุอาหารของ AM จึงเลือกใช้ดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำมาทำการทดสอบ และในส่วนของธาตุอาหารที่วิเคราะห์ได้พบว่า ปริมาณ P, K และ Fe อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการปลูกส้ม แต่ปริมาณ Cu มีค่าต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมในทุกตำรับการทดลอง และในส่วนของปริมาณ Mn และ Zn จะพบค่าที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการปลูกส้มในตำรับการทดลองที่มีการให้ปุ๋ยร่วมด้วย สมบัติทางเคมี และปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการปลูกส้มแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 สมบัติทางเคมีของดินที่เหมาะสมกับการปลูกส้ม (เปรมปรี 2544)

ปัจจัย	ระดับที่เหมาะสม
pH	6.0-6.5
EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	< 2
OM (%)	> 3
P (ppm)	< 80
K (ppm)	< 144.3
Fe (ppm)	> 2
Mn (ppm)	4-45
Zn (ppm)	2-10
Cu (ppm)	> 1

จากการพิจารณาผลต่างของปริมาณธาตุอาหารในใบส้มหลังการปลูกเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่า ปริมาณ N และ K ในตำรับการทดลองที่มีการให้ AM ร่วมกับปุ๋ย และตำรับที่มีการให้ปุ๋ยเพียงอย่างเดียว (NPK+micronutrients และ NPK) จะให้ค่าสูงกว่าตำรับการทดลองอื่นๆ ถึงแม้ว่าเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการปลูกส้ม (ตารางที่ 18) จะให้ค่าต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมก็ตาม ในส่วนของปริมาณ P ในใบส้ม ถึงแม้ว่าในทุกตำรับการทดลองจะไม่มีค่าแตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาปริมาณ P ในใบส้มที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสม พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ทั้ง AM และปุ๋ย มีปริมาณ P อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการปลูกส้ม คือ อยู่ในช่วง 0.12-0.16% (ตารางที่ 18) จากผลที่ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการให้ทั้งปุ๋ยร่วมกับ AM

ในส่วนของคุณาธาตุ (Fe, Cu, Zn) ถึงแม้ว่าปริมาณธาตุอาหารที่วิเคราะห์ได้ในใบส้มจะต่ำกว่าปริมาณที่เหมาะสมต่อการปลูกส้ม (แสดงในตารางที่ 18) ก็ตาม แต่ถ้าพิจารณาในแต่ละตำรับการทดลอง จะเห็นได้ชัดว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ AM ร่วมกับ NPK+micronutrients และตำรับการทดลองที่มีการให้ NPK+micronutrients อย่างเดียว จะมีการสะสม Fe, Cu และ Zn มากกว่าตำรับการทดลองอื่นๆ และถ้าพิจารณาปริมาณ Fe และ Zn ในดินกับปริมาณ Fe และ Zn ในใบส้ม จะพบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ AM ร่วมกับ NPK+micronutrients และตำรับการทดลองที่มีการให้เพียง NPK+micronutrients จะให้ค่าสอดคล้องไปในทางเดียวกัน คือ จะมีค่า Fe และ Zn มากกว่าในตำรับการทดลองอื่นๆ นั้นอาจแปลความหมายได้ว่า ปริมาณ Fe และ Zn ในดินซึ่งมีปริมาณมากกว่าตำรับการทดลองอื่น และมีปริมาณเหมาะสมต่อต้นส้ม นั้น น่าจะส่งผลให้เกิดการดูดใช้ และสะสม Fe และ Zn ในใบส้มได้ดีกว่าตำรับการทดลองที่ไม่มีการให้ NPK+micronutrients และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างตำรับการทดลองที่มีการให้ AM ร่วมกับ NPK+micronutrients กับตำรับการทดลองที่มีการให้ NPK+micronutrients เพียงอย่างเดียว พบว่า ตำรับการทดลองที่มีการให้ *A. tuberculata* ร่วมกับ NPK+micronutrients จะมีปริมาณ Cu สะสมในใบพืชเท่ากับ 0.33 ppm ซึ่งมากกว่าในตำรับการทดลองที่มีการให้ NPK+micronutrients เพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกันกับปริมาณ Fe ถึงแม้ว่าจะเกิดการสะสมของ Fe ใกล้เคียงกันทางสถิติในตำรับการทดลองที่มีการให้ AM (*Gl. etunicatum*, *A. tuberculata*) ร่วมกับ NPK+micronutrients และตำรับการทดลองที่มีการให้เพียง NPK+micronutrients กลับพบว่า ในตำรับการทดลองที่มีการให้ AM ร่วมกับปุ๋ย จะให้ค่า Fe ประมาณ 18 ppm ซึ่งมากกว่าในตำรับการทดลองที่มีการให้เพียง NPK+micronutrients

ตารางที่ 18 ปริมาณธาตุอาหารในใบส้ม ในช่วงต่าง ๆ

ช่วงของธาตุอาหารพืชในใบ	ปริมาณธาตุอาหาร						
	N (%)	P (%)	K (%)	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Zn(ppm)	Cu (ppm)
ขาดแคลน	< 2.20	< 0.09	< 0.70	< 35	< 17	< 17	< 3
ต่ำ	2.20-2.40	0.09-0.11	0.70-1.10	36-59	18-24	18-24	3-4
เหมาะสม	2.50-2.70	0.12-0.16	1.20-1.70	60-120	25-100	25-100	5-16
สูง	2.80-3.00	0.17-0.29	1.80-2.30	121-200	101-300	101-300	17-20
มากเกินไปจนจำเป็น	> 3.00	> 0.30	> 2.40	> 200	> 500	> 500	> 20

(World Fertilizer Use Manual, <http://www.fertilizer.org/ifa/publicat/html/pubman/citrus.htm>)

ผลการทดสอบการดูดใช้ธาตุอาหารไนโบลิ้มของ AM นี้ ยังพบว่า ในส่วนของ micronutrients ให้ผล การสะสมที่แตกต่างกันไนโบลิ้มชัดเจนกว่าไน macronutrients (N, P, K) โดยเฉพาะไนดำรับการทดลองที่มีการ ให้ *A. tuberculata* ร่วมกับ NPK+micronutrients จะพบการสะสมของ Fe และ Cu มากกว่าไนดำรับการ ทดลองที่มีการให้ AM เพียงอย่างเดียว และมากกว่าดำรับการทดลองที่มีการให้เพียงปุ๋ย NPK+micronutrients อย่างเดียว นั้นอาจหมายถึง *A. tuberculata* มีประสิทธิภาพในการดูดใช้ Fe และ Cu ได้ดีกว่า ไนขณะที่ธาตุอื่น ประสิทธิภาพการดูดใช้ยังเห็นไม่ชัดเจนนัก

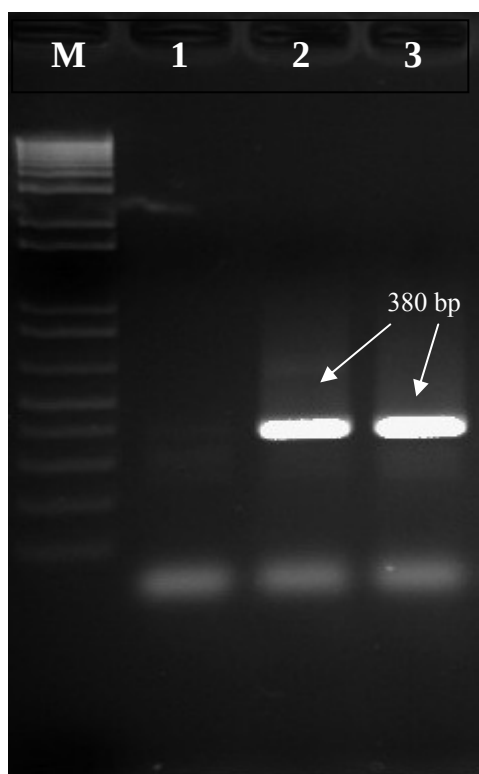
จากผลการทดสอบการดูดใช้ธาตุอาหารนี้ พบว่า ปริมาณธาตุอาหารไนดินเพียงอย่างเดียวไม่ สามารถบ่งบอกสถานะที่แท้จริงของธาตุอาหารที่พืชดูดขึ้นไปใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะไนไม้ผลที่มีอายุ ยาวนานเช่นลิ้ม เนื่องจากธาตุอาหาร แต่ละชนิดมีธรรมชาติไนดินแตกต่างกัน บางชนิดเมื่อใส่เพิ่มลงไปไนรูป ของปุ๋ยจะถูกดูดยึดด้วยคอลลอยด์ดินได้ดี เช่น พวกแคลไออนบางชนิด และไม่ถูกดูดยึดจากคอลลอยด์ดิน เช่น พวกแอนไออน ซึ่งจะสูญเสียไปจากดิน บริเวณรากพืชได้ง่าย ธาตุบางชนิดทำปฏิกิริยาตกตะกอนกับ สารอื่นๆ ที่มีอยู่ในดินทั้งไนสภาพที่ดินเป็นกรด และเป็นด่าง เช่น ฟอสฟอรัส พืช แต่ละชนิดและแต่ละช่วง ของการเจริญเติบโตต้องการธาตุอาหารไนปริมาณและสัดส่วนที่แตกต่างกัน ความไม่สมดุลของธาตุอาหาร จะกระทบต่อความเป็นประโยชน์ และการดูดใช้ธาตุอาหารของพืช เนื่องจากธาตุแต่ละชนิดมีทั้งส่งเสริม และ ขัดขวางความเป็นประโยชน์ซึ่งกันและกัน ถ้าดินมีปริมาณฟอสฟอรัสมากเกินไปจะทำให้พืชขาดสังกะสีได้ (He และคณะ 2003)

จากผลการทดสอบการดูดใช้ธาตุอาหารนี้ ถ้าพิจารณาพร้อมกับส่วนของการทดสอบการยับยั้งโรคราก เน่า (Phytophthora) ของ AMF พบว่า การคืนสภาพ (recovery) ของไน และการแตกยอดอ่อนของกิ่งตอน ลิ้มที่มีการให้เชื้อ AM ร่วมกับ *P. parasitica* ได้นั้น น่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการดูดใช้ธาตุอาหาร ด้วย กล่าวคือ นอกจากความสามารถไนการยับยั้งเชื้อ Phytophthora โดยการเข้าแย่งชิงพื้นที่ไนการเข้าอยู่ อาศัยไนรากแล้ว AM น่าจะมีความสามารถในการดูดใช้ธาตุอาหารให้แก่พืชอีกด้วย จากผลของการคืน สภาพของ และการแตกยอดอ่อนของลิ้ม น่าจะเป็นผลจากการที่ AM สามารถดูดใช้ธาตุอาหารไนดินให้แก่ พืช ซึ่งธาตุอาหารเหล่านั้น พบว่า เป็นองค์ประกอบสำคัญ และมีบทบาทสำคัญกระบวนการต่างๆ ที่มีผลกับ การเจริญเติบโตของพืชทั้งสิ้น เช่น กระบวนการหายใจ และสังเคราะห์แสง ตัวอย่างเช่น ธาตุ Fe มีความสำคัญต่อระบบเอนไซม์ไนกระบวนการหายใจ และสังเคราะห์แสง (Zekri และ Obreza, Available from: <http://edisifas.ufl.edu/ss419>), ธาตุ Zn เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของคาร์บอน เป็นองค์ประกอบของ เอนไซม์หลายชนิด เช่น เอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการสร้างคลอโรฟิลล์ ช่วยให้กระบวนการสังเคราะห์แสง เป็นไปอย่างปกติ และยังช่วยส่งเสริมการดูดน้ำของพืชของพืชอีกด้วย (ยงยุทธ 2540; Zekri และ Obreza, Available from: <http://edisifas.ufl.edu/ss419>), ธาตุ Cu เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์หลายชนิด มีหน้าที่ สำคัญไนการสร้างคลอโรฟิลล์ และกระบวนการสังเคราะห์แสง และอาจมีหน้าที่สำคัญต่อเมแทบอลิซึมไน รากพืช (จากการศึกษา พบว่า ความเข้มข้นของ Cu ไนรากลิ้ม มีค่าสูงกว่าไนโบลิ้มถึง 5-10 เท่า) (Zekri และ Obreza, Available from: <http://edisifas.ufl.edu/ss419> ; มัณฑนีย์ 2546) ดังนั้น การดูดใช้ธาตุอาหารของ

AM จึงมีส่วนช่วยให้เกิดการคืนสภาพของใบส้ม จากใบสีเหลืองกลายเป็นใบสีเขียวได้ และยังทำให้เกิดการแตกยอดอ่อนอีกด้วย ในขณะที่ ต้นส้มที่ได้รับเชื้อ *Phytophthora* เพียงอย่างเดียว จะพบอาการใบเหลืองบริเวณเส้นกลางใบ, ไม่ค่อยมีการแตกใบ, รากมีลักษณะถอดปล้อง ขดสั้นกุด และในบางต้นที่มีอาการรุนแรงพบว่า ใบร่วง กิ่งแห้งตายจากปลาย (die back) อาการเหล่านี้ เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Phytophthora* บริเวณรากของต้นส้ม ทำให้รากสูญเสียความสามารถในการดูดน้ำ และธาตุอาหาร จึงแสดงอาการเช่นเดียวกับการขาดธาตุอาหารพืชนั่นเอง

7. การจำแนกสายพันธุ์ของ AM ที่มีประสิทธิภาพที่ใส่ลงไปในการส้ม

ผลจากปฏิกิริยา PCR พบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 380 คู่เบส (รูปที่ 48) และหลังจากการนำลำดับเบสที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจาก GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ผลที่ได้พบว่า AM สายพันธุ์ที่ 1 มีความเหมือนกับ *Gl. etunicatum* เท่ากับ 72% (FJ687414) ในขณะที่ AM สายพันธุ์ที่ 2 มีความเหมือนกับ AM ในตระกูล Glomeromycete เท่ากับ 71% (FJ687415)



รูปที่ 48 PCR products จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสปอร์ของ AM จำนวน 2 สายพันธุ์ โดยใช้ specific AM primer, FLR3-FLR4 approximately 380 bp :
M = 100 bp marker, Lane 1 = negative control, Lane 2 = AM สายพันธุ์ 1 (*Gl. etunicatum*), Lane 3 = AM สายพันธุ์ 2 (*A. tuberculata*)

8. การศึกษาศักยภาพการผลิต AM inoculant

ผลการทดลองการผลิต AM inoculant แสดงในตารางที่ 19 ซึ่งได้ผลดังนี้

จำนวนสปอร์ (สปอร์/วัสดุรองรับ 100 กรัม) เริ่มต้น หลังการเก็บ inoculum

จากตารางที่ 19 พบว่า พืชอาศัยที่เป็นข้าวโพดในวัสดุปลูก V+P จะให้จำนวนสปอร์ของ *A. tuberculata* มากกว่าในวัสดุปลูก S+P คือ 1,450 สปอร์/วัสดุรองรับ 100 กรัม ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับจำนวนสปอร์ของ AM ของกรมวิชาการเกษตร ในขณะเดียวกัน ข้าวฟ่างที่ปลูกใน V+P ให้จำนวนสปอร์ของ *A. tuberculata* เท่ากับ 1,216 สปอร์/วัสดุรองรับ 100 กรัม ซึ่งมากกว่าจำนวนสปอร์ที่ปลูกในวัสดุ S+P อย่างเห็นได้ชัด ในส่วนของการผลิต inoculum ของเชื้อ *Gl. etunicatum* พบว่า ในข้าวฟ่างซึ่งปลูกในวัสดุ V+P จะให้สปอร์ของ *Gl. etunicatum* มากกว่า (1,200 สปอร์/วัสดุรองรับ 100 กรัม) ในวัสดุปลูก S+P (85 สปอร์/วัสดุรองรับ 100 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเช่นเดียวกัน วัสดุปลูก V+P ที่ซึ่งปลูกข้าวโพด จะให้จำนวนสปอร์มากกว่า วัสดุปลูก S+P อย่างเห็นได้ชัด

จากผลของจำนวนสปอร์ที่ผลิตได้นี้ พบว่า วัสดุปลูก V+P เหมาะสำหรับการใช้ผลิต AM inoculum มากกว่า วัสดุปลูก S+P อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งในการผลิต inoculum ชนิด *A. tuberculata* นั้น พืชอาศัยที่เหมาะสมที่สุด คือ ข้าวโพด ที่ทำการปลูกในวัสดุปลูก V+P ในขณะที่ การผลิต inoculum ชนิด *Gl. etunicatum* นั้น พืชอาศัยที่เหมาะสม คือ ข้าวฟ่าง ที่ทำการปลูกในวัสดุปลูก V+P เช่นเดียวกัน อนึ่ง ในระหว่างการทดลอง พบว่า วัสดุปลูก V+P มีความพรุนดี เหมาะแก่การยึดเกาะของราก และเส้นใยของ AM เป็นอย่างมาก หลังจากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เส้นใยของ AM นั้น แผ่กระจาย ยึดเกาะ และผลิตสปอร์ ทั่วทุกพื้นที่ของเวอร์มิคูไลต์ ด้วยคุณสมบัตินี้ จึงทำให้วัสดุปลูก V+P ให้จำนวนสปอร์ที่มากกว่าวัสดุอย่างอื่น

จำนวนสปอร์ (สปอร์/วัสดุรองรับ 100 กรัม) หลังการเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 เดือน

จากตารางที่ 19 ในส่วนของการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนั้น พบว่า ใน 3 เดือนแรกของการเก็บ จำนวนสปอร์ในเกือบทุกตำรับการทดลองยังคงมีชีวิตเท่ากับจำนวนสปอร์เริ่มต้น ไม่พบการลดลงของจำนวนสปอร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นตำรับการทดลองที่ผลิต *Gl. etunicatum* ในข้าวฟ่างที่ปลูกในวัสดุ V+P พบว่ามีการลดลงของสปอร์ในเดือนที่ 3 หลังจากการเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเช่นเดียวกัน ตำรับการทดลองที่ผลิต *A. tuberculata* ในข้าวโพดที่ปลูกในวัสดุ S+P พบว่า มีการลดลงของสปอร์ในเดือนที่ 2 หลังจากการเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะมีการลดลงในเดือนที่ 4 และ 5 แต่ก็ไม่ได้ลดลงมากนัก ยังคงมีจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตรอดอยู่อีกมาก

ความชื้น (%)

ผลของความชื้นของ inoculum พบว่า ในตำรับการทดลองที่ผลิต *A. tuberculata* ในข้าวโพดที่ปลูกในวัสดุ V+P ให้ค่าความชื้นสูงที่สุด คือ 14.27 ซึ่งมีเท่ากับค่าความชื้นของ inoculum ทางการค้า และ

เมื่อสังเกต พบว่า วัสดุปลูก S+P จะให้ค่าความชื้นน้อยกว่าวัสดุปลูก V+P เนื่องจาก ทราาย จะมีความชื้นน้อยกว่าเวอร์มิคูไลท์ จึงทำให้วัสดุผสมที่ได้มีความชื้นแตกต่างกัน

ตารางที่ 19 ผลของจำนวนสปอร์, ความชื้น และการเก็บรักษาในการผลิต AM inoculant

ลำดับ	<i>Gl. etunicatum</i>				<i>A. tuberculata</i>				AM กรม วิชาการ เกษตร
	ข้าวฟ่าง		ข้าวโพด		ข้าวฟ่าง		ข้าวโพด		ดินร่วน ปน ทราย
	V+P*	S+P**	V+P	S+P	V+P	S+P	V+P	S+P	
จำนวนสปอร์เริ่มต้น หลังการเก็บ inoculum (สปอร์/วัสดุรองรับ 100 กรัม) จำนวนสปอร์หลัง การเก็บในอุณหภูมิ 4 °C (สปอร์/วัสดุรองรับ 100 กรัม)	1200 c 1200 c	85 a 85 c	390 b 390 b	105 a 105 b	1216 c 1216 b	110 a 110 b	1450 d 1400 b	93 a 93 c	1500 d
จำนวนสปอร์ 1 เดือน หลังจากการ เก็บในอุณหภูมิ 4°C	1185 c [†]	77 c	385 b	99 b	1200 b	100 b	1400 b	86 bc	
จำนวนสปอร์ 2 เดือน หลังจากการ เก็บในอุณหภูมิ 4°C	1180 c	71 c	379 b	92 b	1198 b	99 b	1392 b	75 b	
จำนวนสปอร์ 3 เดือน หลังจากการ เก็บในอุณหภูมิ 4°C	1102 b	68 c	374 b	89 b	1190 b	92 b	1390 b	70 b	
จำนวนสปอร์ 4 เดือน หลังจากการ เก็บในอุณหภูมิ 4°C	968 a	53 b	298 a	63 a	1003 a	82 b	1294 a	63 ab	
จำนวนสปอร์ 5 เดือน หลังจากการ เก็บในอุณหภูมิ 4°C	952 a	40 a	291 a	57 a	987 a	50 a	1287 a	56 a	
ความชื้น (%)	5.91 b	1.7 a	9.85 c	1.53 a	7.97 bc	2.69 ab	14.27 d	1.9 a	15 d

* V+P: วัสดุปลูกที่เป็น vermiculite ผสมกับ peat ในอัตราส่วน 3:1

** S+P: วัสดุปลูกที่เป็น ดินทราย ผสมกับ peat ในอัตราส่วน 3:1

[†] Means under each parameter followed by the same letter are not significantly different (P < 0.05) according to Duncan's multiple-range test.

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และเอกสารอ้างอิง

- มัทนีย์ เศรษฐภักดี: คำอธิบายศัพท์ ดินและปุ๋ย. คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ปทุมธานี. หน้า 52, 2546.
- เปรมปรี ฤณ สงขลา: คู่มือการทำสวนส้มอย่างมืออาชีพ. เคหะเกษตร, กรุงเทพมหานคร. หน้า 76-91, 2544.
- ยงยุทธ โอสภสภ: ธาตุอาหารพืช ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 424 หน้า, 2540.
- สุพัตรา อินทวิมลศรี, 2529. โรครากเน่าและโคนเน่าของส้มเขียวหวาน และการควบคุมด้วยสารเคมี, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุมิตรา ภู่วโรดม (2544). เอกสารประกอบการฝึกอบรม “กลยุทธ์การจัดการธาตุอาหารพืชสู่รายได้ที่ยั่งยืน” สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- อำไพวรรณ ภราดรพันธุ์วัฒน์, วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, วิเชียร กำจายภัย, สุพัฒน์ อรรถธรรม และนิพนธ์ ทวีชัย (2527) โรคส้มในประเทศไทย. พันธุ์พืช 2527
- Brundrett, M., M., Melville, L., and Peterson, L. (1994) Practical methods in mycorrhizal research. Mycologue Publications. 128:103–108.
- Allen, S.E. (ed.) (1974) Chemical Analysis of Ecological Materials. John Wiley and Sons. New York.
- Boot, R.G.A. and Mensink, M. (1990) Size and morphology of root systems of perennial grasses from contrasting habitats as affected by nitrogen supply. Plant and Soil 129, 291-299.
- Camprubi, A. and Calvet, C. 1996. Isolation and screening of mycorrhizal fungi from citrus nurseries and orchards and inoculation studies. HortScience 31: 366-369.
- Clements, F.E., Weaver, J.E. and Hanson, H.C. 1929. Plant Competition: an analysis of community functions. Carnegie Institute, Washington, DC, US.
- Davies, F. S. and Albrigo, L. G. 1991. Citrus. In: Atherton, J. and Rees, A. (eds.) Crop Production Science in Horticulture. Vol. 2. CAB International, Wallingford, UK.
- Davis, R. M. and Menge, J. A. (1981) Phytophthora parasitica inoculation and intensity of vesicular-arbuscular mycorrhizae in citrus. New Phytologist 87, 705-715.
- Del Val, C., Barea, J. M. and Azcon-Aguilar, C. 1999. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. Appl. Environ. Microbio. 65: 718-723

- Engels WR (1993) Contributing software to the Internet: the Amplify program. *Trends Biochem Sci* 18:448–450
- Eissenstat, D. M., Whaley, E. L., Volder, A. and Wells, C. F. 1999. Recovery of citrus surface roots following prolonged exposure to dry soil. *J. Exp. Bot.* 50: 1845-1854.
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, U.S.A.
- Espeleta, J. F., Eissenstat, D. M. And Graham, J. H. 1999. Citrus root responses to localized drying soil: a new approach to studying mycorrhizal effects on the root of mature trees. *Plant Soil*. 206: 1-10.
- Fidelibus, M.W., Martin, C.A., Wright, G.C., and Stutz, J.C. 2000. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal communities on growth of “Volkamer” lemon in continually moist or periodically dry soil. *Scientia Horticultural*. 84: 127-140.
- Garcia-Garrido J.M., and Ocampo, J. A. 1988. Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on the growth of tomato plants. *New Phytol.* 110, 551-555.
- Garcia-Garrido J.M., and Ocampo, J. A. 1989. Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on a damage caused by *Pseudomonas syringae* *Soil. Biol. Bio-derm.* 21, 165-167.
- Gianinazzi, S., Schuepp, H., Barea, J. M., Haselwandter, K., (2002) *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Birkhauser Verlag, Switzerland, 262-265.
- Graham, J. H. 1986. Citrus mycorrhizae: potential benefits and interactions with pathogens. *HortScience* 21: 1302-1306.
- He, Z. L., Calvert, D.V., Alva, A. K., Banks, D. J. and Li, Y. C. Threahold of Leaf Nitrogen for Optimum Fruit Production and Quality in Grapefruit. *Soil Sci. Soc. Am.J.* 67:583-588, 2003.
- Hooker, J.E., Jaizme-Vega, M. And Atkinson, D. 1994. Control of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. In Gianiaazzi S., Schuepp. H. (eds.). *Impact of Arbuscular Mycorrhiza on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystem*. ALS, Birkhauser Verlag, Basel. Pp 191-200.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K. and Barea, J. M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol Fertil Soils*. 37, 1-16.

- Johnson, L.D., Marquez-Ortiz, J.J., Barnes, D.K. and Lamb, J.F.S. (1996) Inheritance of root traits in alfalfa. *Crop Science* 36, 1482-1487.
- Jones, Jr. J.B., R.L. Large, D.B. Pfleger and H.S. Klosky. (1971) How to Properly sample for plant analysis. *Crops Soils* 23: 15-18.
- Kahiluoto, H. and Vestberg, M. 2000. Creation of a non-mycorrhizal control for a bioassay of AM effectiveness. Benomyl application and soil sampling time. *Mycorrhiza*. 9: 259-270
- Koske, R.E., and Gemma, J.N., (1989) A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92, 486-505.
- Manninen, A. M., Laatikainen, T. and Holopainen, T. 1998. Condition of Scot pine fine roots and mycorrhiza after fungicide application and low-level of one exposure in a 2- year field experiment. *Trees-Structure and function*. 12: 347-355.
- Melo., A.M.Y., O.J. Saggin, Jr. and L.C. Maia, 2003. Tolerance of mycorrhized banana (*Musa* sp. cv. Pacovan) plantlets to saline stress. *Agric, Eco. And Envi.* 95, 343-348.
- Miranda, J. C. C., and P. J. Harris. (1994) Effects of soil phosphorus on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*
- Mitchell, D. J. and Kannwisher-Mitchell, M. E. (1993) *Phytophthora* in singleton, L. L., Mihail, J. D., and Rush, C. M. (eds) *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. APS U.S.A.
- Morton, J.B., Bentivenga S. P. and W. W. Wheeler, (1993) Germplasm in the international collection of arbuscular and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (INVAM) and procedures of culture development, documentation and storage. *Mycotaxon*. 48, 491-528.
- Nemec, S., Datnoff, L. E. and Standberg, J. 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixed to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Production*. 8, 735-742.
- Olsson P. A., Baath E. and Jakobsen V., (1997) Phosphorus Effects on the Mycelium and Storage Structures of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus as Studied in the Soil and Roots by Analysis of Fatty Acid Signatures. *Apply Environmental Micorbiology* 63: 3531–3538

- Pattinson, G. S., Warton, D. I., Misman, R. and McGee, P. A. 1997. The fungicide Terrazole and Terraclor and the nematicide Fenamiphos have little effect on root colonization by *Glomus mosseae* and growth of cotton seedling. *Mycorrhiza*. 7: 155-159
- Peng, S. D. M., Eissenstat, J. H., Graham, K., Williams, and Hodge, N. C. 1993. Growth depression in mycorrhizal citrus at high-phosphorus supply. *Plant Physiol*. 101: 1063-1071.
- Schwarzott, D., Schußler, A., 2001. A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza* 10, 203-207.
- Smith SE, Read, D.J., 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London, pp. 453-469.
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2003) Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol* 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 Phytol* 162:511–524
- Tilman, D. (1988) *Plant strategies and the dynamics and structure of plant communities*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Timmer, L.W. and Menge, J.A. 1993. Phytophthora Induced Diseases. In Whiteside, J.O.; Garnsey, S.M. and Timmer, L.W. (eds). *Compendium of Citrus Diseases*. APS Press, U.S.A.
- Trouvelot S, van Tuinen D, Hijri M, Gianinazzi-Pearson V (1999) Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* 8:203–206
- Tuite, J. 1969. *Plant pathological methods*. Burgess pub., U.S.A.
- van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V (1998) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol Ecol* 7:879–88

Wiltse, C.C., Rooney, W.L., Chen, Z., Schwab, A.P. and Banks, M.K. (1998) Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *Journal of Environmental Quality* 27, 169-173

World Fertilizer Use Manual; Citrus (*Citrus* spp., ect) [cite 4/10/2005] Available from: <http://www.fertilizer.org/ifa/publicat/html/pubman/citrus.htm>

Zekri, M and Obreza, T.: Plant Nutrients for Citrus Tree. [cite 1/6/2006] Available from: <http://edisifas.ufl.edu/ss419>

ภาคผนวก

กิจกรรมที่วางแผน	วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1. การคัดแยกและเก็บสปอร์ของ AM	คัดแยก และเก็บสปอร์จากสวนส้มเพื่อนำไปเพิ่มจำนวนให้ได้มากที่สุด	เก็บตัวอย่างดินจากสวนส้มเก็บสปอร์ และคัดแยก AMF	คัดแยก และเก็บสปอร์ AMF ได้จำนวน 4 จีโนส ได้แก่ <i>Glomus</i> sp., <i>Acaulospora</i> sp., <i>Gigaspora</i> sp., และ <i>Sclerocystis</i> sp.
2. การเพิ่มจำนวน AM ในระบบรากพืช	เพื่อเพิ่มจำนวน AMF สปอร์ในระบบรากให้ได้มากที่สุด	เพิ่มจำนวน AMF สปอร์ที่ได้จากการเก็บและคัดแยกจากสวนส้มในระบบรากพืช (ข้าวโพด, ข้าวฟ่าง, ต้นหอม) โดยวิธี trap culture	AMF สปอร์ สายพันธุ์ <i>Gl. etunicatum</i> และ <i>A. tuberculata</i> สามารถเพิ่มจำนวนในพืชอาศัย ข้าวโพดและข้าวฟ่างได้ดี
3. การทดสอบ AM ที่สามารถเข้าสู่รากของกล้าต้นส้ม	เพื่อทดสอบเชื้อ AMF ว่า มีความสามารถเข้าสู่รากส้มพันธุ์ และส้มต้นตอได้หรือไม่	ทดสอบเชื้อ AMF สายพันธุ์ <i>Gl. etunicatum</i> และ <i>A. tuberculata</i> ในส้มพันธุ์เขียวหวาน, สายน้ำผึ้ง, Cleopatra, และ Troyer	เชื้อ AMF สายพันธุ์ <i>Gl. etunicatum</i> และ <i>A. tuberculata</i> สามารถเข้าอาศัยในรากของส้มพันธุ์ และส้มต้นตอได้
4. การคัดเลือกสายพันธุ์ AM ที่เหมาะสมต่อกล้ากิ่งตอนของต้นส้ม	เพื่อคัดเลือก AMF ที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสมต่อส้มพันธุ์ และส้มต้นตอ	ทดสอบเชื้อ AMF สายพันธุ์ <i>Gl. etunicatum</i> , <i>A. tuberculata</i> , <i>Sclerocystis</i> sp., หัวเชื้อทางการค้า mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตร ในส้มพันธุ์เขียวหวาน, สายน้ำผึ้ง, และส้มต้นตอ Cleopatra, C-35	- เชื้อ AMF สายพันธุ์ <i>Gl. etunicatum</i> และหัวเชื้อทางการค้า Mycostar มีค่า MEI หรือมีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของส้มสายพันธุ์เขียวหวาน และสายน้ำผึ้งได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น

ภาคผนวก (ต่อ)

กิจกรรมที่วางแผน	วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
5. การทดสอบกล้าของต้นส้มกับ AM ในส้มปลอดโรคที่ติดต่อกับส้มพันธุ์ดีแล้ว และประสิทธิภาพการยับยั้งโรครากเน่า	เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ AM ที่คัดเลือกได้ ในการยับยั้งโรครากเน่า	- สำรวจ จำแนก และพิสูจน์ความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อ <i>Phytophthora</i> ในส้มเขียวหวาน - ทดสอบความสามารถของ AM สายพันธุ์ <i>Gl. etunicatum</i> และ <i>A. tuberculata</i> ในการยับยั้งเชื้อ <i>P. parasitica</i> ในส้มต้นตอ C-35 - ทดสอบความสามารถของ AM สายพันธุ์ <i>Gl. etunicatum</i> และ <i>A. tuberculata</i> ในการยับยั้งเชื้อ <i>P. parasitica</i> บนกิ่งตอนส้มโชกุนที่ซึ่งต่อกิ่งบนต้นตอ C -35	- เชื้อ AMF สายพันธุ์ <i>Gl. etunicatum</i>, <i>A. tuberculata</i>, หัวเชื้อทางการค้า mycostar และหัวเชื้อกรมวิชาการเกษตรมีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของส้มสายพันธุ์ C-35 ในขณะที่เชื้อ AM สายพันธุ์ <i>A. tuberculata</i>, <i>Sclerocystis</i> sp., หัวเชื้อทางการค้า mycostar และ หัวเชื้อกรมวิชาการเกษตรมีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของส้มพันธุ์ Cleopatra - สามารถแยกเชื้อ <i>P. citrophthora</i> และ <i>P. parasitica</i> ได้ และเชื้อทั้ง 2 สามารถทำให้เกิดอาการเน่ารากเน่าในส้มได้ คือ เกิดอาการตายลามจากปลายกิ่ง (die back) - ความสามารถในการยับยั้ง <i>P. parasitica</i> ของ AM ทั้ง 2 สายพันธุ์ ในส้มต้นตอ C-35 แสดงอาการไม่เด่นชัดนักในส่วนของต้นและใบ ส่วนในรากพบว่า รากส้ม ที่มีการให้ <i>P. parasitica</i> ลักษณะรากถดถอยลดลง และสั้นกว่ารากส้มที่มีการให้ AM ร่วมกับ <i>P. parasitica</i> - เชื้อ AM สายพันธุ์ <i>A. tuberculata</i> ที่มีการให้ร่วมกับเชื้อ <i>P. parasitica</i> บนกิ่งตอนส้มโชกุน สามารถยับยั้ง และชะลอความรุนแรงของเชื้อ <i>P. parasitica</i> ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกิ่งตอนที่ได้รับเพียงเชื้อ <i>P. parasitica</i>

ภาคผนวก (ต่อ)

กิจกรรมที่ วางแผน	วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
6. การทดสอบประสิทธิภาพการดูดใช้ธาตุ N, P, K และ micronutrients ของ AM	เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ AM ในการดูดใช้ธาตุอาหารพืช	ทดสอบประสิทธิภาพของ AM สายพันธุ์ <i>Gl. etunicatum</i> และ <i>A. tuberculata</i> ร่วมกับการให้ปุ๋ย NPK และ micronutrients ในส้มพันธุ์เขียวหวาน	- การให้ AM ร่วมกับปุ๋ย และการให้ปุ๋ยเพียงอย่างเดียว (NPK+micronutrients และ NPK) ให้ผลการสะสม N และ K สูงกว่าตัวรับการทดลองอื่นๆ - การให้ AM ร่วมกับ NPK+micronutrients และการให้ NPK+micronutrients เพียงอย่างเดียว ให้ผลการสะสม Fe, Cu และ Zn มากกว่าตัวรับการทดลองอื่นๆ
7. การจำแนกสายพันธุ์ของ AM ที่มีประสิทธิภาพ	เพื่อจำแนกสายพันธุ์ AM ที่มีประสิทธิภาพโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล	สกัดดีเอ็นเอจากสปอร์ AM และเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ LSU rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ 2 คู่ primer จากนั้นทำการโคลน, วิเคราะห์หาลำดับเบส และนำมาเปรียบเทียบฐานข้อมูล	เชื้อ AM สายพันธุ์ที่ 1 มีความเหมือนกับ <i>Gl.etunicatum</i> เท่ากับ 72% (FJ687414) ในขณะที่เชื้อ AM สายพันธุ์ที่ 2 มีความเหมือนกับ AM ในตระกูล Glomeromycete เท่ากับ 71% (FJ687415)
8. การศึกษาศักยภาพการผลิต AM inoculant	เพื่อผลิต AM inoculant	ใช้วัสดุปลูกผสมระหว่างเวอร์มิคูไลต์ และพีท, ดินร่วน และพีท ในอัตราส่วน 3:1 โดยเลือกใช้ข้าวโพด และข้าวฟ่างเป็นพืชอาศัย	พืชอาศัยที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเชื้อ <i>A. tuberculata</i> คือ ข้าวโพด ที่ทำการปลูกในวัสดุปลูก V+P ในขณะที่การผลิต inoculum ชนิด <i>Gl. etunicatum</i> นั้น พืชอาศัยที่เหมาะสม คือ ข้าวฟ่าง ที่ทำการปลูกในวัสดุปลูก V+P
9. จัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์	จัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์	จัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์	รายงานฉบับสมบูรณ์

