รายงานผลการทดลองเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

กิจกรรม : การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพของประเทศไทย

กิจกรรมย่อย : การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

3. ชื่อการทดลอง : การตรวจวิเคราะห์ปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าโดยวิธี MPN

: Analysis of Estimate Arbuscular Mycorrhiza Population to Determine the Most Probable Number Counts

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์[1]

ผู้ร่วมงาน : มณฑิกานธิ์ สังข์น้อย[2] ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง[1]

5. บทคัดย่อ

เนื่องจากเป็นที่ทราบกันทั่วโลกว่าปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่ามีประโยชน์กับพืชที่สำคัญทางการเกษตรหลายชนิด ในประเทศไทยมีการใช้ปุ๋ยชีวภาพนี้กันมากขึ้นเรื่อย ๆ จึงมีผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าจำหน่ายหลายรูปแบบเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการทดลองหาวิธีวิเคราะห์ปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในผลิตภัณฑ์รูปแบบต่างๆ โดยวิธีหาค่า Most probable number (MPN) เพื่อใช้ในการประเมินปริมาณของอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในผลิตภัณฑ์ที่มีการผลิตทั้งแบบใช้สปอร์ เส้นใย หรือรากพืชที่มีราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าอาศัยอยู่ในรูปเม็ด การทดลองนี้วางแผนแบบ CRD มี 4 ซ้ำ 4 กรรมวิธี เพื่อประเมินปริมาณของราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าโดยใช้ตัวเจือจาง (diluent) 4 ชนิด คือ ดิน ทราย ดินผสมทรายและเวอมิคูไลท์ ทำให้เจือจางเป็นชุดระดับแบบ two-fold serial dilution จำนวน 160 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณราในตัวเจือจาง ดินผสมทราย ดิน ทราย และเวอมิคูไลท์ เท่ากับ 605 176 152 และ 152 ต่อกรัม ตามลำดับ โดยที่จำนวนสปอร์อาบัสคูลาไมโคไรซ่าที่ตรวจนับด้วยวิธี direct count พบสปอร์เท่ากับ 15 14 12 และ 2 สปอร์ต่อน้ำหนักดิน 1 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการจำแนกด้วยวิธี phylogenetic โดยใช้ตำแหน่งยีน 18S rRNA สามารถจำแนกราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าได้ถึงระดับชนิด (species)

Abstract

There are numerous reports in literature on utilization of mycorrhizal fungi for enhancing crop productions. In Thailand VA mycorrhizal products were applied in many cultivation fields. Recently, several formulations of mycorrhizal product were developed and released to farmer. In order to analysis of estimate arbuscular mycorrhiza population by using the Most Probable Number (MPN) method, it was investigated to count the spores, hyphae and infected roots from product. CRD design with 4 treatments 4 replications were used in the experiment. Soil, sand, vermiculite and mixture of soil and sand were used as diluents. One hundred and sixty samples were diluted by using the two-fold serial dilution technique. Results revealed that numeration of arbuscular mycorrhiza population in soil, sand, vermiculite and mixture of soil and sand were 605, 176, 152 and 152 spore/g respectively. However, the direct count was significant in 4 treatments, which showed 15, 14, 12 and 2 spore/g respectively. The amplification of the 18S rRNA gene amplification via PCR was used to identify VA mycorrhiza into species level.

---

[1] กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
[2] ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา

6. คำนำ

ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าสามารถนับว่ามีประโยชน์กับพืชที่สำคัญทางการเกษตรหลายชนิดทั้งพืชไร่ พืชสวน และพืชผัก (สุภาพร, 2549 ; ออมทรัพย์และคณะ, 2529; ออมทรัพย์และสุภาพร, 2539; Rhodus and Gerdemann, 1978; Thamsurakul *et al.* 2000) โดยเชื้อช่วยจะเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับธาตุอาหารแก่พืช จึงช่วยลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมี เพิ่มการมีชีวิตรอดของต้นกล้า และยังมีผลทางด้านการป้องกันโรคพืชที่เกิดจากราที่เกิดกับระบบรากพืช (Davis, 1980)

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าเป็นการตรวจนับปริมาณที่มีชีวิต และการจำแนกสกุลหรือชนิดสปอร์ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในปุ๋ยชีวภาพไมโคไรซ่า ให้เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 เพื่อแยกสปอร์จากดินมีหลายวิธี ได้แก่ วิธี Wet Sieving and Decanting (Gerdemann, 1975; เอกสารคู่มือวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ, 2551) วิธี flotation-adhesion (Sutton and Barron, 1972) แล้วนำไปตรวจนับจำนวนสปอร์ (direct count) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และวิธี Most Probable Number (MPN) เป็นการคาดคะเนจำนวนมากที่สุดของราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าที่อาจจะมีได้ในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพ โดยเริ่มด้วยการเจือจางเป็นชุดระดับ (serial dilution) ด้วยการเติมตัวเจือจาง (diluent) ลงในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพให้มีการกระจายตัวของเชื้อราอย่างสม่ำเสมอ ในทุกระดับการเจือจางที่แตกต่างกัน และนำไปปลูกร่วมกับข้าวโพดในแก้วเพาะ ตรวจนับจำนวนแก้วเพาะที่มีการเข้าอาศัยของเชื้อราในรากข้าวโพด นำไปอ่านผล

ในตารางดัชนี MPN ค่าในตารางนี้เป็นค่าจากการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อประเมินปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าที่มีชีวิตอยู่ในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า (Fischer and Yates, 1963)

การจำแนกสกุลราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าโดยวิธีสัณฐานวิทยาจาก Dichotomous key for separation of Genera (Schenck and Perez, 1987) ที่ใช้ในปัจจุบันเป็นวิธีการที่ต้องใช้นักวิจัยที่มีประสบการณ์และมีความชำนาญค่อนข้างสูง และใช้เวลานานในการจำแนกตามวิธีเดิม ในปัจจุบันการศึกษาการจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยใช้ specific primer จับส่วนของยีน small subunit (SSU) rRNA internal transcribed spacer (ITS) และ large subunit (LSU) rRNA ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้ในระดับชนิด (Gamper *et al*., 2009; Helgason *et al*., 1998; Lee *et al*., 2008; Stockinger *et al*., 2009) เนื่องจากใช้เวลาน้อยกว่าวิธีเดิมและได้รับการยอมรับในระดับสากล

7. วิธีการดำเนินงาน

- อุปกรณ์

1. ปุ๋ยชีวภาพไมโคไรซ่า
2. ตัวเจือจาง ได้แก่ ดิน ทราย ดินผสมทราย และเวอมิคูไลท์
3. ชั้นแสงปลูกพืช
4. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
5. ตะแกรงร่อนขนาด 425 และ 45 ไมครอน

- วิธีการ

1. ระเบียบวิธีการวิจัย การหาวัสดุเจือจางในการนับแบบ MPN วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 4 ซ้ำ 4 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าผสมกับทราย

กรรมวิธีที่ 2 ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าผสมกับดิน

กรรมวิธีที่ 3 ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าผสมกับดินผสมทราย

กรรมวิธีที่ 4 ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าผสมกับเวอมิคูไลท์

2. การผลิตปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

เพิ่มปริมาณหัวเชื้อ (*Glomus intraradices*) ในกระถาง (pot culture method) โดยใช้กระถางสะอาดและวัสดุปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยอบด้วยไอน้ำ 3 ครั้งๆ ละ 3 ชั่วโมง ที่ความร้อน 80 องศาเซลเซียส วัสดุปลูกที่เหมาะคือ ดินผสมทรายในอัตราส่วน 1:1 ใส่ลงในกระถาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 นิ้ว ให้ระดับต่ำจากปากกระถางประมาณ 2 นิ้ว แล้วโรยหัวเชื้อให้กระจายทั่วพื้นที่หน้าตัดของกระถางปริมาณสปอร์ที่ใช้ประมาณ 200 สปอร์ต่อกระถาง เมื่อโรยเชื้อแล้วกลบด้วยดินประมาณ 1 นิ้ว พืชอาศัยที่ดี ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง พืชตระกูลหญ้า และถั่วเหลือง ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดพืชอาศัยก่อนปลูกด้วยการแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3-5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้เมล็ดประมาณ 5-10 เมล็ด โรยให้กระจายหลังจากนั้นกลบเมล็ดด้วยดินอีกครั้ง รดน้ำทันทีด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ รดน้ำทุกวัน ใส่ Modified Hoagland's solution ความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่ง 3 ครั้ง/สัปดาห์ เมื่อพืชอาศัยอายุ 3 เดือน สุ่มเก็บตัวอย่างดินนับปริมาณสปอร์ เก็บเกี่ยวเฉพาะกระถางที่มีปริมาณสปอร์ในดิน 25 สปอร์ต่อน้ำหนักดิน 1 กรัม โดยการตัดพืชบริเวณเหนือดินและปล่อยให้ดินแห้งในร่ม หลังจากดินแห้งคลุกดินแต่ละกระถางให้ทั่ว เก็บหัวเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องในถุงพลาสติก ใช้ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า (สุภาพร, 2549)

3. วิธีการศึกษาวัสดุเจือจาง

3.1 ชั่งปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าที่ผลิตได้ น้ำหนัก 50 กรัม ผสมกับตัวทำเจือจางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50 กรัม ใส่ในขวดแก้วปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า เพื่อให้ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่ากระจายอย่างสม่ำเสมอ นาน 30 นาที จะได้ปุ๋ยชีวภาพที่มีการเจือจาง 2^{-1} จากนั้น ชั่ง 50 กรัม ผสมกับตัวเจือจาง 50 กรัม

จะได้ปุ๋ยชีวภาพที่มีการเจือจาง 2^{-2} ทำให้เจือจางเป็นชุดระดับแบบ two-fold serial dilution ความเข้มข้นของตัวเจือจางต่อเชื้อราใช้อัตราส่วน 1:1, $1:^{1}/_{2}$, $1:^{1}/_{4}$, $1:^{1}/_{8}$, $1:^{1}/_{16}$, $1:^{1}/_{32}$, $1:^{1}/_{64}$, $1:^{1}/_{128}$ โดยใช้ดินเป็นตัวเจือจาง

3.2 ชั่งปุ๋ยชีวภาพแต่ละระดับความเจือจางตั้งแต่ 2^{-1} ถึง 2^{-8} น้ำหนัก 5 กรัม แต่ละระดับทำ 5 ซ้ำใส่ถุงพลาสติก

3.3 เตรียมวัสดุปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว น้ำหนัก 300 กรัม ใส่แก้วเพาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร จำนวน 40 แก้วเพาะต่อ 1 ตัวเจือจาง

3.4 ทำให้เกิดหลุมกลางแก้วเพาะโดยตักวัสดุปลูกออก 3 กรัม นำปุ๋ยชีวภาพแต่ละระดับความเจือจาง (ข้อ 2) ใส่ลงหลุมใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อนคีบเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว จำนวน 5 เมล็ด ลงในแก้วเพาะใช้วัสดุปลูกที่ตักออก 3 กรัม กลบเมล็ด รดน้ำทันทีด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางไว้ในโรงเรือนกระจก

3.5 ทำตามขั้นตอน 1-6 แต่เปลี่ยนตัวเจือจางเป็น ทราย ดินผสมทราย และเวอมิคูไลท์

หมายเหตุ วัสดุปลูกในแก้วเพาะที่ใช้ในการวิเคราะห์ MPN จะเป็นชนิดเดียวกันกับตัวเจือจางเสมอ

4. การศึกษาวิธีการนับเพื่อคำนวณปริมาณแบบ MPN

4.1 เมื่ออายุครบ 6 สัปดาห์ วัดปริมาณเข้าอาศัยในราก โดยวิธีของ Philips และ Hayman (1970) โดยนำรากมาล้างดินออกแล้วต้มในสารละลายโพแทสเซียมไฮดอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้รากใสเห็นเซลล์รากได้ชัดเจนขึ้น ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างรากด้วยน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง แล้วย้อมสีรากด้วย trypan blue lactic –glycerol solution ตรวจสอบการเข้าอาศัยในราก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ โดยวิธี slide method (Giovanetti and Mosse, 1980)

4.2 นับจำนวนแก้วเพาะ ค่าที่ได้เป็นโอกาสการเข้าอาศัยหรือไม่การเข้าอาศัยในรากของราอาบัสคูลาไมโครไรซ่า นำไปอ่านผลในตารางดัชนี MPN โดยใช้ตาราง VIII2 ของ Fisher และ Yates (Fisher and Yates,1963)

5. การศึกษาวิธีการนับแบบ direct count

5.1 นับจำนวนสปอร์ในปุ๋ยชีวภาพระดับความเจือจาง 2^{-1}- 2^{-8} นำมาร่อนแยกสปอร์โดยวิธี Wet Sieving and Decanting (Gerdemann, 1975) ปริมาณ 100 กรัม ใส่บีกเกอร์และเทน้ำกรองปริมาตร 500 มล. คนสารละลายตัวอย่างไปทางเดียวเป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 2-3 วินาที เทสารละลายลงในตะแกรงขนาด 425 ไมครอน และไหลผ่านลงมายังตะแกรงขนาด 45 ไมครอน ซึ่งเรียงซ้อนอยู่ด้านล่าง ตะกอนที่ยังเหลือในบีกเกอร์ให้ทำซ้ำโดยเติมน้ำลงไป 400 มิลลิลิตร แล้วคนไปทางเดียวเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 2-3 วินาที เทสารละลายลงในตะแกรงขนาด 425 ไมครอน และ 45 ไมครอน ซึ่งเรียงซ้อนกันอยู่ จากนั้นฉีดน้ำล้าง ตะกอนบนตะแกรงขนาด 425 ไมครอน จนแน่ใจว่าตะกอนขนาดเล็กได้หลุดผ่านลงไปในตะแกรงขนาด 45 ไมครอน นำตะกอนบนตะแกรงขนาด 425 ไมครอน เทใส่ลงในจานเพาะเชื้อพร้อมน้ำ แล้วนำไปตรวจสปอร์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

5.2 ตะกอนบนตะแกรงขนาด 45 ไมครอนนำไปใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 50 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้งแล้วเติมน้ำเชื่อม 50% จนครบ 50 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้ตะกอนละลายผสมกับน้ำเชื่อม นำไป ปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นจะเกิดการตกตะกอน เทสารละลาย ส่วนบน ลงใตะแกรง ขนาด 45 ไมครอน เท

ตะกอนที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง ใช้น้ำฉีดล้างตะกอนบนตะแกรงขนาด 45 ไมครอน 3-4 ครั้ง จนน้ำที่ผ่านตะแกรงใส เท ตะกอนบนตะแกรงที่ได้ลงในจานเพาะเชื้อพร้อมน้ำ แล้วนำไปตรวจสปอร์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

6. การจำแนกสกุลและชนิดราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

6.1 เตรียมสปอร์ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

นำตัวอย่างสปอร์ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าที่แยกด้วยวิธีของ Gerdemann (1975) และคัดเลือกสปอร์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

6.2 ฆ่าเชื้อบริเวณผิวสปอร์ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

นำสปอร์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 5.1 ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. ซึ่งภายในมีน้ำนึ่งฆ่าจำนวน 10 มล. จากนั้นใส่ tween 20 จำนวน 1 หยด นำไปแช่ในเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำทิ้ง ใส่ Chloramine T และ Streptomycin + Gentamycin อย่างละ 1 มล. เขย่าเบาๆ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อีก 1 นาที เทน้ำทิ้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง

6.3 การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้ forceps ขนาดเล็กคีบสปอร์ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอใสในหลอดขนาด 0.2 มล. ซึ่งภายในบรรจุ ultrapure water นึ่งฆ่าจำนวน 5 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตทิปกดสปอร์ราให้แตกออก จะได้ DNA template

6.4. การหาลับดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

เตรียม PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของยีน 18S rRNA ให้ได้ความเข้มข้นอย่างน้อย 40 ng/µl และเตรียม primer AML1 (forward primer) และ AML2 (reverse primer) ความเข้มข้น 10 pmol/µl ต่อตัวอย่างที่ต้องการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นเตรียมปฏิกิริยาของการอ่านลำดับ นิวคลีโอท์ ประกอบด้วย PCR product ของยีน 18S rRNA, Taq DNA polymerase, Primer, dNTP ที่มี ddNTP เป็นส่วนผสม นำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่อง PCR โดยมีลำดับของปฏิกิริยาดังนี้

Primer NS1: 5′-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3′

NS4: 5′-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3′

AML1: 5′-ATCAACTTTCGATGGTAGGAT-3′

AML2: 5′-GAACCCAAACACTTTGGT-3′

<u>รอบที่ 1</u>

ขั้นตอนที่ 1 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นตอนที่ 2 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
55 องศาเซลเซียส 40 วินาที
72 องศาเซลเซียส 1 นาที
} 40 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

ขั้นตอนที่ 4 4 องศาเซลเซียส

<u>รอบที่ 2</u>

ขั้นตอนที่ 1 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นตอนที่ 2 94 องศาเซลเซียส 1 นาที
50 องศาเซลเซียส 1 นาที
72 องศาเซลเซียส 1 นาที
} 30 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

ขั้นตอนที่ 4 4 องศาเซลเซียส

ตกตะกอนตัวอย่างด้วย Ethanol/Sodium acetate แล้วนำตัวอย่างที่ตกตะกอนละลายกลับด้วย Hi-Di Formamide 15 µl ต้มตัวอย่างที่ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที แช่น้ำแข็งทันทีนานประมาณ 5 นาที แล้วเข้าเครื่องอ่านลำดับเบส (DNA sequencer) โดยที่เครื่องอ่านลำดับเบสจะตรวจจับ Fluorescent dye ที่ติดไว้ที่ ddNTP แล้วอ่านค่าออกมาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์

7. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ทำการเปรียบเทียบกับฐาน ข้อมูลของ Genbank จากเวปไซต์ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เลือก ที่ BLAST แล้วเลือกที่ Nucleotide BLAST (blastn) จากนั้นใส่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จะแสดงตามลำดับความคล้ายคลึงกันจากมากไปหาน้อย

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. วัสดุเจือจางในการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไมโคไรซ่า

ผลการศึกษาสารเจือจางในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไมโคไรซ่าพบว่าจำนวนราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าที่ประเมินได้ จากการใช้วัสดุเจือจางต่างชนิดกัน คือ ดินผสมทราย ดิน ทราย และเวอมิคูไลท์ ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี MPN จำนวน 160 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ทำให้ได้ปริมาณราต่างกัน การใช้ดินผสมทรายเป็นตัวเจือจางทำให้ได้ปริมาณราสูงที่สุด รองลงมาคือ ดิน ทราย และเวอมิคูไลท์ 605 176 152 และ 152 ต่อกรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 1-2 และตารางที่ 2)

2. วิธีการนับปริมาณ

จำนวนสปอร์ของราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าที่ประเมินได้จากวิธี direct count จำนวน 16 ตัวอย่าง (ภาพที่ 3) จากการใช้ตัวเจือจางต่างชนิดกัน คือ ดินผสมทราย ดิน ทราย และเวอมิคูไลท์ มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 15 14 12 และ 2 สปอร์ต่อน้ำหนักดิน 1 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การประเมินปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในดินผลการประเมินจะมีค่ามากกว่าการนับจำนวนสปอร์โดยตรงเนื่องจาก

รวมส่วนขยายพันธุ์ (สปอร์ เส้นใย และชิ้นส่วนรากที่มีราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าเข้าอาศัย) ทั้งหมดในดิน (Porter,1979; Powell,1980; Daniels *et al*., 1981) ทำให้ได้ค่าใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่าการนับจำนวนสปอร์ (Porter,1979) การประเมินด้วยวิธี MPN พบว่าการทดลองที่ดีควรเพิ่มจำนวนซ้ำและลดจำนวนอัตราส่วนลง และมีปัจจัยมากมายที่ส่งผลต่อวิธี MPN (Wilson and Trinick, 1982; Morton, 1985; Adelman and Morton, 1986; Graham and Fardelmann, 1986; Morton, 1985; Adelman and Morton, 1986; Graham and Fardelmann, 1986; An *et al.*, 1990; O' Donnell *et al.*, 1992) การประเมินจำนวนเชื้อด้วยเทคนิค MPN ประมาณส่วนขยายพันธุ์ที่มีชีวิต ปัจจัยที่ส่งผลต่อวิธี MPN คือสภาแวดล้อมในช่วงทำการทดลอง ทั้งอุณหภูมิ และระยะเวลาในการเจริญในพืชอาศัย มีผลต่อการประเมิน เพราะมีผลทั้งการเจริญของรากพืชอาศัยและการเข้าอาศัยของเชื้อ (Wilson 1982) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ประเมินด้วย MPN ของเชื้อ *G. monosporus* ค่าที่ประเมินต่ำใน 2 สัปดาห์แรก แต่จะสูงสุดที่เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ ถ้า 15 องศาเซลเซียส ค่า MPN เพิ่มก็ต่อเมื่อให้เวลาเพิ่มขึ้นแต่ 2 สัปดาห์ไม่พบในเชื้อ *G. tenuis* ทั้งอุณหภูมิ 15 และ 20c (Wilson 1982) วิธีนี้ยังขึ้นกับระดับความเจือจางที่เลือกใช้ Wilson and Trinick, 1982

การเลือกใช้วิธีการนับปริมาณแบบ MPN มีข้อพิจารณา 3 ข้อ ได้แก่ สปอร์มีขนาดเล็กยากต่อการแยกมานับด้วยวิธีการนับ เช่นสปอร์ของ *G. tenuis* (Greenall) Hall (Hall, 1977) ไมโคไรซ่าบางชนิดไม่สร้างสปอร์ (Baylis, 1969) สปอร์มีขนาดใหญ่พอที่จะแยกมานับได้แต่ความสามารถในการเพิ่มปริมาณในเป็นสปอร์ต่ำ (Clarke and Mosse, 1978) และช่วยประเมินเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตแต่วิธีใช้กล้องอาจสบสนระหว่างเซลล์มีชีวิตและไม่มีชีวิต (Woomer *et al.,* 1988) ดังนั้นค่าที่ได้ควรจะมีการพิจารณาความสัมพันธ์กันหลายๆ ด้านก่อนสรุป อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในการประเมินปริมาณอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในดินธรรมชาติในกระถางขยายเชื้อ และในรูปผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อต่ำหรือเชื้ออยู่ในรูปส่วนขยายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่สปอร์ได้

3. วิธีการจำแนก

การศึกษาการจัดจำแนกราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าด้วยวิธีการจำแนกด้วยวิธี phylogenetic โดยใช้ตำแหน่งยีน 18S rRNA จากการสกัดดีเอ็นเอจากสปอร์ โดยใช้ไพร์เมอร์ NS1 NS4 AML1 และ AML2 ที่จำเพาะในการจำแนกสกุล-ชนิดของราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า พบว่าสามารถจำแนกได้ในระดับชนิด (species level) คือ *Glomus etunicatum* และในระดับสกุล (genus) ได้แก่ *Glomus* sp. และ *Acaulospora* sp. (ภาพที่ 4) Lee *et al*. (2008) รายงานการศึกษาการจัดจำแนกราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า (Glomeromycota) จากตัวอย่างรากพืช 3 ชนิดที่ใช้ล่อให้ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าเข้าอาศัย (trap cultures) พบว่าไพรเมอร์ AML1 และ AML2 ซึ่งมีความจำเพาะกับไฟลั่ม Glomeromycota และสามารถจำแนกราได้ 23 ชนิด และ Krüger *et al.* (2009) ศึกษาการสกัดดีเอ็นเอจากสปอร์และรากพืช โดยใช้ไพรเมอร์ SSUmAf และ LSUmAr ในการทำ PCR รอบแรก และ SSUmCf และ LSUmBr ในการทำ Nested PCR ใช้เป็น barcoding primer สำหรับราในไฟลั่ม Glomeromycota

ตารางที่ 1 ปริมาณการเข้าอาศัยของราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในรากข้าวโพด

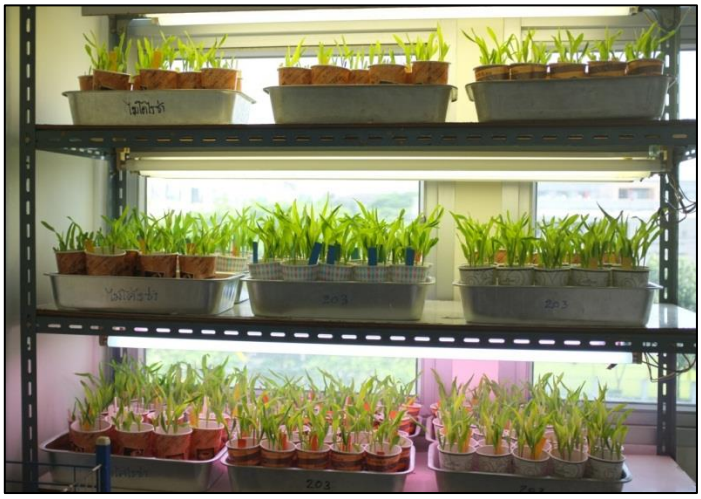
ปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไร	จำนวนรากที่พบราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

ซ่า /ตัวเจือจาง 50 กรัม	ทราย	ดิน	ทรายผสมดิน	เวอมิคูไลท์
50.00	5	5	5	5
25.00	4	5	5	4
12.50	3	4	5	4
6.25	3	3	4	3
3.12	3	2	4	3
1.56	2	2	3	2
0.78	1	1	2	0
0.39	0	0	0	0
รวม	21	22	28	21

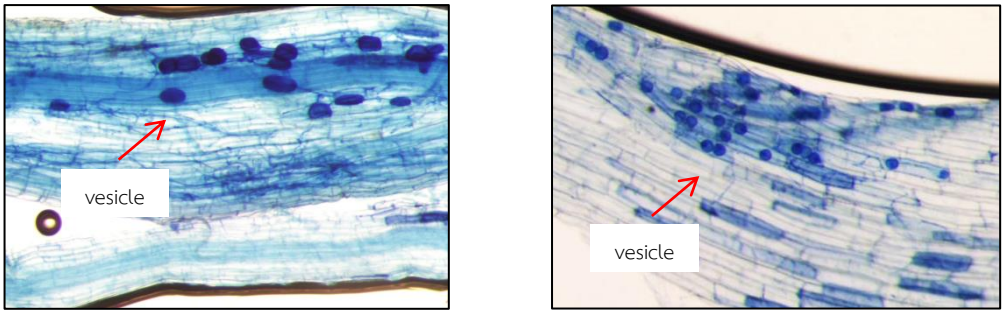
*หมายเหตุคำนวณปริมาณตามวิธีของ Fisher and Yates (1963)

ตารางที่ 2 ปริมาณสปอร์ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในนับด้วยวิธี Wet sieving และ MPN

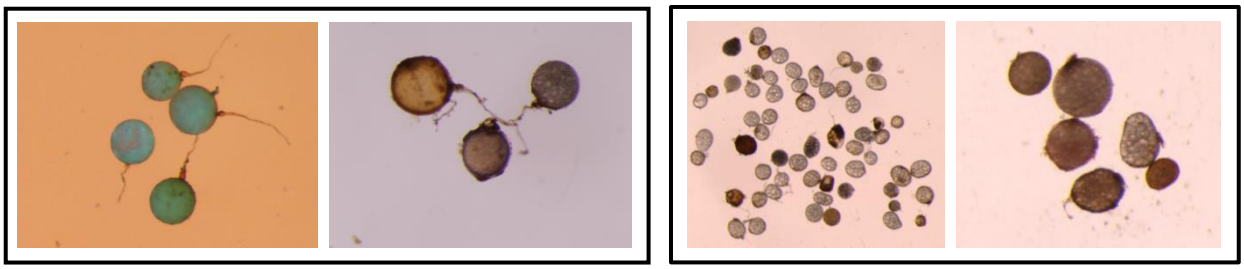
Diluent type	No. of spore/1 g diluent (wet sieving)	No. of propagule/1 g diluent (MPN two-fold dilution)
Soil+ Sand	15 a	605
Soil	14 b	176
Sand	12 c	152
เวอมิคูไลท์	2 d	152
cv	5.6	-



ภาพที่ 1 การปลูกข้าวโพดเพื่อการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Most Probable Number (MPN)

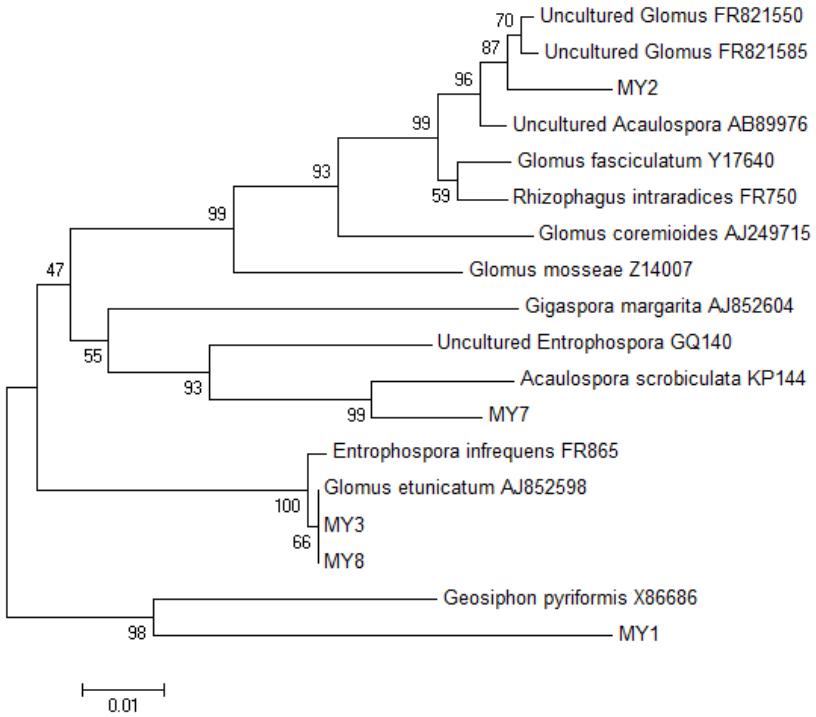


ภาพที่ 2 ลักษณะของราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในรากพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ



Gigaspora sp. (A) *Glomus* sp. (B)

ภาพที่ 3 ลักษณะของสปอร์ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ



ภาพที่ 4 Neighbor-joining phylogenetic analysis โดยศึกษายีน 18S rRNA แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า และสายพันธุ์อ้างอิง (Reference strains)

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าด้วยวิธี MPN โดยใช้ดินผสมทรายเป็นตัวเจือจางมีจำนวนราอาบัสคูลาไมโคไรซ่ามีความน่าจะเป็นคือ 605 ต่อกรัม และวิธีการจำแนกราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าด้วยวิธีการจำแนกด้วยวิธี phylogenetic โดยใช้ตำแหน่งยีน 18S rRNA สามารถจำแนกราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าได้ในถึงระดับชนิด

ดังนั้นผลจากการทดลองนี้ทำให้ได้ดินผสมทรายเป็นตัวเจือจางที่เหมาะสมในการนับปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า ในการวิเคราะห์ปริมาณปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าโดยวิธี MPN จำนวน 1 ชนิด และได้วิธีการจัดจำแนกด้วยวิธีวิเคราะห์ phylogenetic 1 วิธี ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการจำแนกชนิดเชื้อราและเป็นที่ยอมรับในระดับนานชาติ

ข้อเสนอแนะ

-

เอกสารอ้างอิง

คู่มือการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ. 2551. กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทาการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 45 หน้า.

สุภาพร ธรรมสุระกุล. 2549. ผลของรา วี-เอ ไมโคไรซ่าต่อการเจริญเติบโตของหน่อไม้ฝรั่ง. ว. วิชาการเกษตร 24 (2) : 211-223.

ออมทรัพย์ นพอมรวดี, สุภาพี ธรรมสุระกุล, สมเพชร เจริญสุข, และเย็นใจ วสุวัต. 2529. การคัดเลือกเชื้อ วี-เอ ไมโคไรซ่าที่มีประสิทธิภาพในการดูดธาตุฟอสฟอรัสของถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง. ผลงานวิจัยประจำปี 2529 เล่มที่ 1. กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ออมทรัพย์ นพอมรวดี และสุภาพร ธรรมสุระกุล. 2539. ผลการใช้ EM ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา วี-เอ ไมโคไรซ่า วิทยาสารเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์. 30(5): 183-186.

Davis, R.M. 1980. Influence of *Glomus fasciculatum* on *Thielaviopsis basicala* root rot of citrus. Plant Disease. 64: 839–840.

Fischer, R.A. and F. Yates. 1963. Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical research. Hafner Press. New York.

Gamper, H., C. Walker and A. Schüssler. 2009. *Diversispora celata* sp. nov.: molecular ecology and phylotaxonomy of an inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungus. New Phytologist. 182: 495-506.

Gerdermann, J.W. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizae. *In*. the development and function of root (Ed. By J.G. Torrey and D.T. Clarkson), pp. 575- 591. Academic Press. New York.

Giovanneti, M., and B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring Vesicular-arbuscolar mycorrhizal infection in roots. New Phytologist. 84: 489-500.

Helgason, T., T.J. Daniell, R. Husband, A.H. Fitter and J.P.W. Young. 1998. Ploughing up the wood wide web? Nature. 394: 431.

Krüger, M., H. Stockinger, C. Krüger and A. Krüger. 2009. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist. 183: 212-223.

Lee, J., S. Lee and J.P.W. Young. 2008. Improved PCR primers for the detection and Identification of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiology Ecology. 65: 339-349.

Rhodes, L.H. and J.W. Gerdemann, Translocation of calcium and phosphate by external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Soil Science. 126 (2).

Schenck, N.C. and Y. Perez. 1987. Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi. Second. International Culture Collection of VA Mycorrhizal Fungi (INVAM). University of Florida, Gainesville, Florida.

Stockinger, H., C. Walker and A. Schüssler. 2009. *Glomus interadices* DAOM197198, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus interadices*. New Phytologist. 183(4): 1176-1187.

Sutton, J. and G.L. Barron. 1972. Population dynamics of Endogone spores in soil. Canadian Journal of Botany. 50: 1909-1914.

Thamsurakul, S., O. Nopamonbodi, S. Charoensook and S. Roenrungroeng. 2000. Increasing pineapple yield using VA Mycorrhizal Fungi. Acta Hort. 529: 199-202.