รายงานผลการทดลองเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการ วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

กิจกรรม การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพของประเทศไทย

กิจกรรมย่อย การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การจำแนกสกุลอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา 4 ชนิด

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Genera Identification of Arbuscular Mycorrhizas

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นิศารัตน์ ทวีนุต	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	บุณฑริก ฉิมชาติ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	กนกอร บุญพา	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์สกุลราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาด้วยวิธีชีวโมเลกุล ได้เปรียบเทียบกับการตรวจวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา โดยคัดเลือกสปอร์ตามลักษณะการเกิดสปอร์ ได้แก่ Glomus Acaulospora Entrophospora Scutellospora และ Gigaspora พร้อมกันนั้น สกัดดีเอ็นเอจากสปอร์เดี่ยวของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละชนิด ได้ตัวอย่างดีเอ็นเอ 14 ตัวอย่าง นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณอนุรักษ์ small subunit (SSU) rDNA-ITS-Large subunit (LSU) rDNA ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อรากลุ่มอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เมื่อได้ดีเอ็นเอที่ต้องการ นำมาถ่ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าแบคทีเรีย *E. coli* จากนั้นนำดีเอ็นเอที่โคลนได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ด้วยวิธีไฟโลเจเนติค ซึ่งพบว่าวิธีวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลมีความสอดคล้องกับวิธีทางสัณฐานวิทยาและสามารถตรวจสอบได้ในระดับที่สูงกว่าถึงระดับชนิด

Comparison of molecular and morphological analyses had concomitant done, in this study. Each single spore of arbuscular mycorrhizal fungi; Glomus, Acaulospora, Entrophospora, Scutellospora and Gigaspora, was selected for morphology and DNA extraction. Forteen-DNA samples were amplified by PCR using specific primer of arbuscular mycorrhizal fungi. PCR products,

partial SSU rDNA-ITS-LSU rDNA, were cloned and sequenced for phylogenetic analysis. Here we present that the results of biological molecular analysis are in accord with that of morphological features. In addition, it can detect to species level.

6. คำนำ

อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhizas) เป็นราในดินที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชกลุ่ม vascular plants แบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) โดยที่ราช่วยให้พืชดูดธาตุอาหารไปใช้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ธาตุอาหารหลักฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นธาตุที่ถูกตรึงได้ง่ายในดิน อีกทั้งยังช่วยในการต้านทานโรคที่อยู่ในดิน รวมไปถึงลดภาวะความตรึงเครียดให้กับพืช เช่น ต้านทานสารโลหะหนัก และความทนแล้ง เป็นต้น (Siddiqui and Pichtel, 2008) ดังนั้นรานี้จึงถูกผลิตเพื่อเป็นปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) ที่ใช้แพร่หลายในการเกษตร

ในปัจจุบันมีการผลิตปุ๋ยชีวภาพอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อการค้าเพิ่มมากขึ้น สิ่งที่สำคัญคือ ผลิตภัณฑ์เหล่านั้นต้องได้มาตรฐานการผลิตตามพระราชบัญญัติปุ๋ย ปี 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ตามมาตรา 32/1 ข้อ 3 ซึ่งกล่าวไว้ว่า ปุ๋ยชีวภาพที่ผลิตขึ้นโดยมีชนิดของจุลินทรีย์ไม่ตรงตามที่ขึ้นทะเบียนไว้หรือที่ระบุไว้ในฉลากให้ถือว่าเป็นปุ๋ยชีวภาพปลอม ดังนั้นวิธีการตรวจสอบชื่อสกุลของปุ๋ยชีวภาพอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ผลิตมาเพื่อการค้า จึงมีความสำคัญเพื่อให้สอดคล้องตามกฎหมายที่กำหนดไว้

โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะอยู่ในรูปแบบวัสดุพาที่บรรจุรวมอยู่กับสปอร์ เส้นใย และส่วนของรากพืช โดยธรรมชาติของราชนิดนี้เมื่อมีการผลิตในสภาพแวดล้อมและพืชอาศัยที่แตกต่างกันจะทำให้ลักษณะของสปอร์ เช่น สี และขนาด แตกต่างกันไป เมื่อนำมาบรรจุในรูปแบบผลิตภัณฑ์และมีการเคลื่อนย้ายหรือขนส่งจะทำให้ลักษณะของสปอร์เกิดความเสียหายและมีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากในการตรวจสอบปุ๋ยชีวภาพอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยใช้วิธีการดูลักษณะของสปอร์เพียงอย่างเดียว อาจทำให้มีความผิดพลาดได้ หากต้องการลักษณะที่สมบูรณ์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะต้องนำส่วนของรานั้นไปเพิ่มปริมาณในพืชอาศัยอีกครั้ง ซึ่งเป็นขั้นตอนที่จะต้องใช้เวลานานและมีความยุ่งยากเพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันวิธีการทางชีวโมเลกุลเป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษากับสิ่งมีชีวิตมากมายและยังเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง รวมไปถึงการนำมาใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้อย่างถูกต้อง ด้วยเหตุนี้จึงได้นำวิธีทางชีวโมเลกุลมาปรับใช้ในการวิเคราะห์และตรวจสอบปุ๋ยชีวภาพอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในผลิตภัณฑ์เพื่อให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องและรวดเร็ว

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการจำแนกและศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด Small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) เป็นยีนแรกที่ถูกใช้ในการวิเคราะห์ราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซา เพราะเป็นส่วนที่มีความหลากหลายและเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) (Simon et al., 1992) และได้มีการศึกษาดีเอ็นเออื่น เช่น Genomic DNA และ ITS (Reddy et al., 2005) เพิ่มขึ้นมาตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นการวิเคราะห์ rRNA gene ยังเป็นการศึกษาบรรพบุรุษ และวิวัฒนาการ ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้อีกด้วย (Redecker et al.,

2000, Redecker and Raab, 2006) ต่อมาได้มีการพัฒนา โดยใช้ rDNA markers ได้แก่ SSU rDNA, ITS และ LSU rDNA และ partial (beta)- tubulin gene มาใช้ในการจัดกลุ่มใหม่ให้ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอยู่ในไฟลัม (Phylum) Glomeromycota รวมไปถึงมีชื่อสกุลที่มีความหลากหลายเพิ่มมากขึ้นไปด้วย (Schüßler et al., 2001, Sharmah et al., 2010, Oehl et al., 2011, Krüger et al., 2011) จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเป็นวิธีหนึ่งที่จะเป็นประโยชน์อย่างมาก ในการตรวจสอบปุ๋ยชีวภาพอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้มีความถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

เครื่องปั่นเหวี่ยง กล้องจุลทรรศน์ กล้องถ่ายภาพ ไมโครไปเปต เครื่องล้างความถี่สูง เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เครื่องอิเล็คโทรโฟรีซีส เครื่องวิเคราะห์เจล สารเคมี

- วิธีการ

1. การเตรียมสปอร์ราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซา

แยกสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาตามลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ จากนั้นนำสปอร์ไปทำสไลด์โดยการย้อมสีด้วยสารละลาย PVLG และสารละลาย Melzer แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง พร้อมกันนี้นำสปอร์แต่ละชนิดไปทำความสะอาดด้วยเครื่องล้างความถี่สูงเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

นำสปอร์เดี่ยวของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามาบดให้แตกในหลอดทดลอง จากนั้นสกัดดีเอ็นและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo SCIENTIFIC™) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่หนึ่ง ใช้ไพรเมอร์ SSUmAf-LSUmAr (ตารางผนวก 1) โดยมีสภาวะดังนี้ initial denaturation ที่ 98°C 5 นาที; denaturation ที่ 98°C 5 วินาที, annealing ที่ 57°C 5 วินาที, extention ที่ 72°C 36 วินาที จำนวน 40 รอบ; final extention ที่ 72°C 3 นาที นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มดีเอ็นเอครั้งที่หนึ่ง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่หนึ่ง ด้วยไพรเมอร์ SSUmCf – LSUmBr (ตารางผนวก 1) โดยมีสภาวะดังนี้ initial denaturation ที่ 98°C 5 นาที; denaturation ที่ 98°C 5 วินาที, annealing ที่ 59°C 5 วินาที, extention ที่ 72°C 35 วินาที จำนวน 40 รอบ; final extention ที่ 72°C 3 นาที ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ นำไปตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

3. การโคลนผลผลิตดีเอ็นเอและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปถ่ายเข้าแบคทีเรีย *Escherichia coli* โดยใช้ CloneJET PCR Cloning Kit และ TransformAid (Thermo SCIENTIFIC™) จากนั้นตรวจสอบโคลนด้วยวิธีพีซีอาร์ และ Agarose gel electrophoresis และคัดเลือกโคลนที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4. การวิเคราะห์ด้วยวิธีไฟโลเจเนติค (Phylogenetic analysis)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปจัดเรียงด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ค้นหาข้อมูลที่มีลำดับสายดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกันจากฐานข้อมูลดีเอ็นเอ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) และสร้างแผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติค

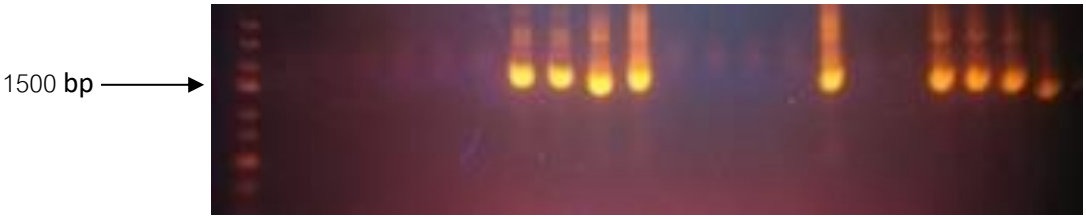
- เวลาและสถานที่

ปี 2554 - 2558 กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

เตรียมสปอร์ราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาโดยดูลักษณะสปอร์และการเกิดสปอร์ ได้สกุลดังนี้ Glomus Acaulospora/Entrophospora และ Gigaspora/Scutellospora และได้นำแต่ละสปอร์ไปสกัดดีเอ็นเอ ได้ตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมด 14 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ SSU rDNA- ITS- LSU rDNA ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 1,500 bp (ภาพที่ 1) ผลิตภัณฑ์ที่ได้นำไปถ่ายเข้าแบคทีเรีย *E. coli* แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากผลการการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้สายดีเอ็นเอประมาณ 300-400 bp ที่สามารถนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติคได้ (ภาพที่ 2) จากการเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบสกุลด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาและทางชีวโมเลกุล (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 2) พบว่า ตัวอย่าง DNA1 และ DNA14 ที่มีสัณฐานแบบ Gigaspora หรือ Scutellospora มีความคล้ายกับดีเอ็นเอของ Racocetra 84% และ 89% ตัวอย่าง DNA7 คล้ายกับ Cetraspora 90% ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งสาม จัดอยู่ในตระกูลเดียวกัน คือ Racocetraceae ทั้งนี้สกุล Racocetra และ Cetraspora ได้เปลี่ยนแปลงชื่อมาจากสกุล Scutellospora (Oehl et al., 2008, Redecker et al., 2013) ตัวอย่าง DNA2 มีความคล้ายกับ *Glomus aggregatum* (JF439138) 88% ส่วนตัวอย่าง DNA4 DNA5 และ DNA11 มีความคล้ายกับ *Acaulospora scrobiculata* (FR692353) 82 85 และ 84% ตามลำดับ ตัวอย่าง DNA3 DNA6 DNA9 DNA10 DNA12 และ DNA13 ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้เนื่องจากได้ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์คุณภาพต่ำ

จากผลการทดลอง จะเห็นว่าความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอตัวอย่างกับดีเอ็นเอในฐานข้อมูลมีค่าค่อนข้างต่ำ ตั้งแต่ 82-90% เนื่องมาจากผลของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้คุณภาพไม่ดีพอ แต่ถึงแม้ว่าจะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวเพียง 300-400 bp มาวิเคราะห์ก็ตาม ผลการจัดจำแนกที่ได้จากวิธีชีวโมเลกุลก็ยังสามารถจำแนกในระดับสกุลได้เจาะจงมากกว่าวิธีทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นหากมีการเตรียมการวิเคราะห์ในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ให้มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น จะทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีไฟโลเจเนติกมีความถูกต้องและแม่นยำ และสามารถจำแนกได้ถึงระดับ species ได้



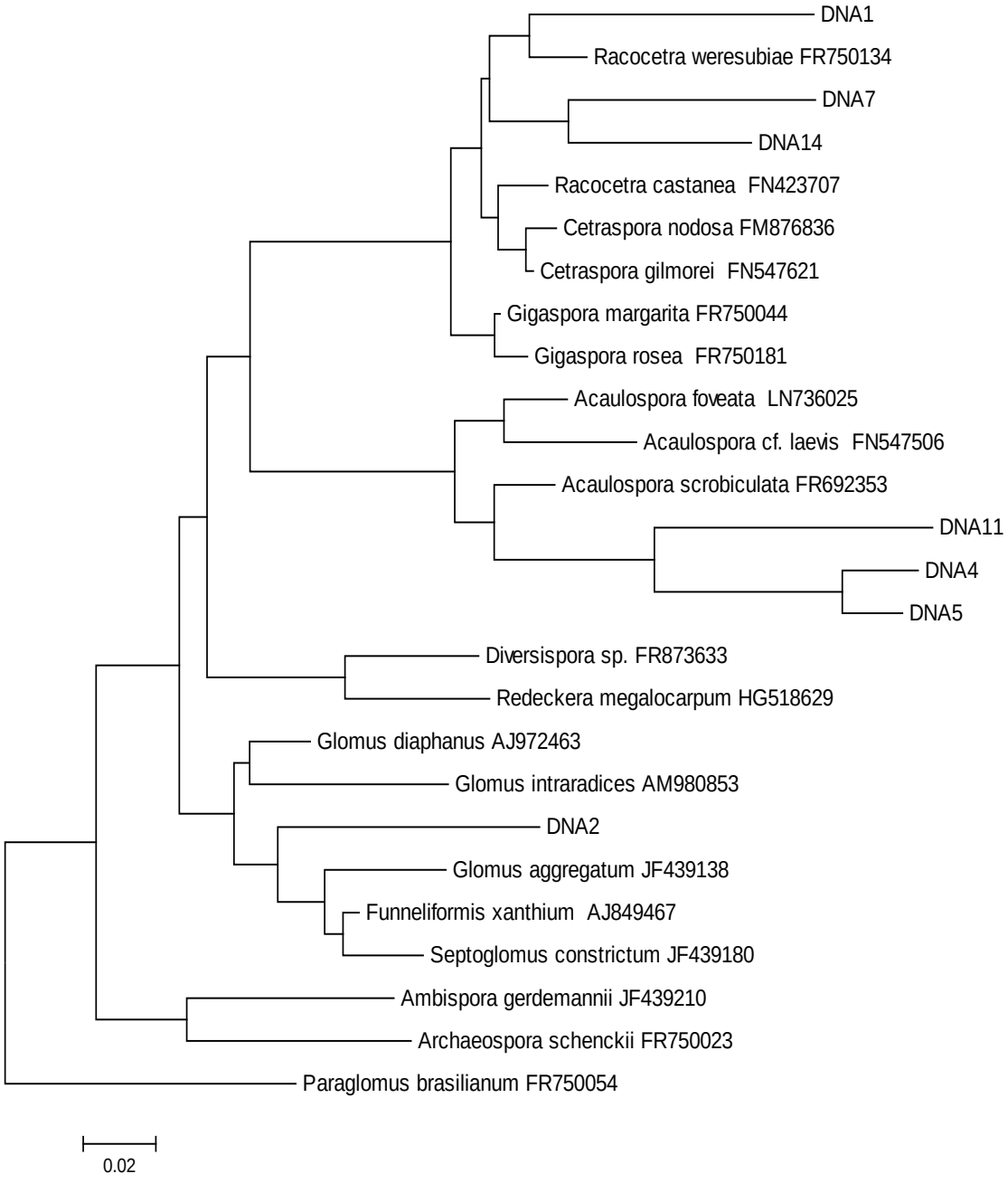
ภาพที่ 1 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการจำแนกสกุลราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทางสัณฐานวิทยาและทางชีวโมเลกุล

ตัวอย่าง	สกุล		ลักษณะสปอร์
	สัณฐานวิทยา	ชีวโมเลกุล (%identity)	
DNA1	Gigaspora หรือ Scutellospore	Racocetra (84%)	
DNA2	Glomus	Glomus (88%)	
DNA3	Acaulospora หรือ Entrophospora	-	

DNA4	Acaulospora หรือ Entrophospora	Acaulospora (82%)	
DNA5	Acaulospora หรือ Entrophospora	Acaulospora (85%)	
DNA6	Gigaspora หรือ Scutellospore	-	
DNA7	Gigaspora หรือ Scutellospore	Cetraspora (90%)	
DNA9	Acaulospora หรือ Entrophospora	-	
DNA10	Glomus	-	
DNA11	Acaulospora หรือ Entrophospora	Acaulospora (84%)	
DNA12	Glomus	-	
DNA13	Glomus	-	
DNA14	Gigaspora หรือ Scutellospore	Racocetra (89%)	

- : ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มีคุณภาพต่ำไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้



ภาพที่ 2 แผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติก ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา สร้างจากสายดีเอ็นเอบริเวณ partial SSU rDNA-ITS-LSU rDNA

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีชีวโมเลกุล โดยใช้สายดีเอ็นเอที่ได้จากบริเวณอนุรักษ์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา มีความสอดคล้องกับวิธีทางสัณฐานวิทยา แต่สามารถวิเคราะห์ได้ละเอียดกว่าไปจนถึงระดับ species

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ผลิตเพื่อการค้า ได้แม่นยำ ถูกต้องและรวดเร็ว

11. เอกสารอ้างอิง

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

Oehl, F., F.A. de Souza and E. Sieverding. 2008. Revision of Scutellospora and description of five new genera and three families in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes. Mycotaxon106: 311-360.

Oehl, F., G.A. Silva, B.T. Goto, L.C. Maia, and E. Sieverding. 2011. Glomeromycota: two new classes and a new order. Mycotaxon 116: 365–379.

Reddy, S.R., P.K. Pindi, and S.M. Reddy. 2005. Molecular methods for research on arbuscular mycorrhizal fungi in India: problems and prospects. Current Science 89: 1699–1709.

Redecker, D and P. Raab. 2006. Phylogeny of the glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. Mycologia 98(6): 885-895.

Redecker, D., A. Schüßler, H. Stockinger, S. Stürmer, J. Morton, and C. Walker. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Mycorrhiza doi:10.1007/s00572-013-0486-y.

Redecker, D., R. Kodner, and L.E. Graham. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. Science289: 1920-1921.

Schüßler, A., D. Schwarzott, and C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol. Res. 105(12): 1413–1421.

Sharmah, D., D.K. Jha, and R. R. Pandey. 2010. Molecular approaches in arbuscular mycorrhizal research: a review. Journal of Phytology 2(7): 75–90.

Siddiqui, Z.A. and J. Pichtel. 2008. *In:* Siddiqui, Z.A., M.S. Akhtar, and K. Futai (ed.) Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry. Springer Science + Business Media B.V. pp. 1-35.

Simon, L., M. Lalonde, and T.D. Bruns. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. Applied and Environmental Microbiology: 291–295.

12. ภาคผนวก

ตารางผนวก 1 ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Krüger, 2009)

Primer	Nucleotide sequence (5’ – 3’)	nt
SSUmAf1	TGG GTA ATC TTT TGA AAC TT**Y** A	22
SSUmAf2	TGG GTA ATC TT**R** TGA AAC TTC A	22
SSUmAf	Mix of SSUmAf1-2 (equimolar)	22
SSUmCf1	TCG CTC TTC AAC GAG GAA TC	20
SSUmCf2	TAT TGT TCT TCA ACG AGG AAT C	22
SSUmCf3	TAT TGC TCT T**N**A ACG AGG AAT C	22
SSUmCf	Mix of SSUmCf1-3 (equimolar)	20-22
LSUmAr1	GCT CAC ACT CAA ATC TAT CAA A	22
LSUmAr2	GCT CTA ACT CAA TTC TAT CGA T	22
LSUmAr3	TGC TCT TAC TCA AAT CTA TCA A A	23
LSUmAr4	GCT CTT ACT CAA ACC TAT CGA	21
LSUmAr	Mix of LSUmAr1-4 (equimolar)	21-23
LSUmBr1	**D**AA CAC TCG CAT ATA TGT TAG A	22
LSUmBr2	AAC ACT CGC ACA CAT GTT AGA	21
LSUmBr3	AAC ACT CGC ATA CAT GTT AGA	21
LSUmBr4	AAA CAC TCG CAC ATA TGT TAG A	22
LSUmBr5	AAC ACT CGC ATA TAT GCT AGA	21
LSUmBr	Mix LSUmBr1-5 (equimolar)	21-22