# บทนำ

ความสำเร็จของโครงการหลวง ในการเปลี่ยนวิธีการใช้ที่ดินในที่สูงจากการปลูกฝิ่นมาเป็นการผลิตพืชผัก ผลไม้และดอกไม้เมืองหนาว ทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มมากขึ้นและมีการค้ายาเสพติดน้อยลง แต่การเปิดตลาดการค้าเสรีในโลกปัจจุบันโดยเฉพาะการแข่งขันกับประเทศจีน ทำให้เกษตรกรทั่วโลกต้องมีการปรับตัวในหลายๆด้าน โดยเฉพาะประเทศที่มีรายได้หลักมาจากการเกษตร อย่างเช่นประเทศไทย เนื่องจากการเกษตรแบบดั้งเดิมของไทยไม่มีความได้เปรียบในตลาดโลก ในแง่การผลิตสินค้าทางการเกษตร ทำให้ขณะนี้มีสินค้าทางการเกษตร ทะลักเข้ามาจากจีนเป็นจำนวนมาก ที่เห็นเด่นชัด เช่น หอม กระเทียม และผลไม้เมืองหนาว ซึ่งไม่ใช่ประเทศไทยเพียงประเทศเดียวที่ได้รับผลกระทบดังกล่าว แม้แต่การผลิตแครอทในประเทศออสเตรเลีย ทั้งเพื่อการส่งออกและบริโภคภายในประเทศ ก็ไม่สามารถแข่งขันกับประเทศจีนได้ เพราะประเทศจีนมีความได้เปรียบทั้งพื้นที่เพาะปลูกซึ่งมากกว่า ค่าจ้างแรงงานต่ำกว่า และมีความก้าวหน้าทางวิชาการด้านการเกษตรมากขึ้น ดังนั้น ในภาวะการแข่งขันเพื่อจะเป็นประเทศผู้นำในตลาดสินค้าเกษตร ประเทศไทยจะต้องมีการพัฒนาสินค้าและนำพืชใหม่ที่ให้ผลผลิตดีและมีคุณภาพสูงมาสู่ตลาด เช่น พืชที่นำไปผลิตเป็นพลังงานชีวภาพ เช่นสบู่ดำ พืชเพื่อการบริโภค เช่น ข้าวไร่ ถั่ว งา กาแฟ เป็นต้น รวมทั้งมีการจัดการพื้นที่เพาะปลูกเดิมให้มีประสิทธิภาพและปลอดภัยเพื่อจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืน อีกทั้งผลิตผลจากระบบเกษตรอินทรีย์ยังมีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ผลิตผลทางการเกษตรที่ไม่มีการตกค้างจากสารเคมีและยาปราบศัตรูพืช ซึ่งเป็นแนวทางของระบบเกษตรอินทรีย์ คือสิ่งที่ผู้บริโภคต้องการมากในปัจจุบัน

การใช้ปุ๋ยเคมีสังเคราะห์และการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืชเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช จะทำให้เกิดปัญหาทั้งทางการแพทย์ ทางการเกษตรและสภาพแวดล้อมได้เนื่องจากสารเคมีจะทำลายโครงสร้างของดิน ทำให้เกิดสารตกค้างทั้งในดิน แหล่งน้ำและผลิตผล ซึ่งจะส่งผลต่อผู้บริโภค เกษตรกรผู้ใช้ก็จะได้รับผลกระทบโดยตรงในเรื่องสุขภาพ และจะต้องเสียค่าใช้จ่ายสำหรับสารเคมีเหล่านี้ในราคาสูงไม่คุ้มค่าทั้งชีวิตและค่าใช้จ่ายที่เสียไป การจัดการเรื่องความอุดมสมบูรณ์ของดินและการเติบโตที่ดีของพืชอย่างมีประสิทธิภาพ เป็นสิ่งหนึ่งที่จะต้องเร่งทำในขณะที่ประเทศไทยกำลังได้รับผลกระทบอย่างมากจากราคาน้ำมันที่สูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบทั้งในภาคธุรกิจการเกษตรและอุตสาหกรรมที่ใช้ผลผลิตทางการเกษตร

วิธีการบำรุงดินที่มีประสิทธิภาพสามารถทำได้หลายวิธี เช่นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาทำปุ๋ยบำรุงดิน การเพิ่มความแข็งแรงให้กับพืชโดยใช้จุลินทรีย์กลุ่มไรโซเบียม (rhizobium) การใช้เชื้อราไมคอร์ไรซา(mycorrhizal fungi) ทั้งเชื้อราเอนโดมายคอร์ไรซา (endo-mycorrhiza) และเชื้อราเอกโตมายคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) ซึ่งเป็นทั้งปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) ตัวป้องกันทางชีวภาพ (bioprotector) ตัวควบคุมทางชีวภาพ (bioregulator) ในการควบคุมโรคพืชโดยใช้จุลินทรีย์จากธรรมชาติ และการใช้จุลินทรีย์ที่สร้างสารเร่งการเจริญของพืช (Plant growth promoter, PGP) เป็นต้น วิธีการเหล่านี้จะช่วยลด

ผลกระทบจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์ดังกล่าวได้อย่างยั่งยืน งานดังกล่าวได้มีการศึกษาวิจัยมาก่อน โดยเฉพาะการผลิตหัวเชื้อของไรโซเบียมของกรมวิชาการเกษตร แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ส่วนการเติมหัวเชื้อจากเชื้อรามายคอร์ไรซา และกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างสารเร่งการเจริญของพืชนั้น ยังไม่มีการผลิตเพื่อการนำไปใช้อย่างแพร่หลายในกลุ่มเกษตรกรไม่ว่าจะเป็นทางด้านพืชไร่หรือพืชสวน เนื่องจากมีปัจจัยพื้นฐานที่ยังไม่มีการทำความเข้าใจอยู่หลายประการ โดยเฉพาะกลไกของความสัมพันธ์ของพืชและจุลินทรีย์ ซึ่งมีอยู่แล้วในธรรมชาติแต่ถูกทำลายด้วยวิธีการทางการเกษตรที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้การตอบสนองของพืชต่อเชื้อรามายคอร์ไรซาก็มีความแตกต่างกันทั้งชนิดของพืชเองและชนิดของเชื้อรามายคอร์ไรซา จากข้อมูลทางการเกษตรในปัจจุบันพบว่าในต่างประเทศโดยเฉพาะออสเตรเลียซึ่งพื้นดินส่วนใหญ่เป็นดินที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ แต่เกษตรกรสามารถผลิตสินค้าทางการเกษตรที่มีคุณภาพและปลอดสารพิษโดยใช้ระบบเกษตรอินทรีย์ที่มีเชื้อรามายคอร์ไรซาเป็นหลัก เช่น พืชผัก และต้นยูคาลิปตัสที่นำมาใช้ผลิตเยื่อกระดาษ เช่นเดียวกันกับทางตะวันออกของประเทศเยอรมันซึ่งมีพื้นที่การเกษตรกว้างขวางก็มีการใช้เชื้อรามายคอร์ไรซาในกลุ่มเอนโดมายคอร์ไรซากับพืชไร่ในกลุ่มที่เป็นธัญพืช และมีการผลิตเชื้อรามายคอร์ไรซาขายในรูปที่เกษตรกรใช้ได้ง่าย

ประเทศไทยก็มีการนำเชื้อราเอนโดมายคอร์ไรซาเข้ามาจำหน่ายหลายบริษัท แต่ยังมีราคาแพงมาก เช่น Mycostar® กิโลกรัมละ 1,200 บาท (ราคาท้องตลาด) เป็นเอนโดมายคอร์ไรซาที่ใช้ได้ดีกับกล้าส้ม กล้าสนและพืชผัก ซึ่งเกษตรกรมีความต้องการใช้มาก จากการสำรวจ (ติดต่อส่วนตัวที่แปลงสาธิตของบริษัท) พบการตอบสนองในทางบวกกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น กล้าปาล์มน้ำมัน สน สตรอเบอร์รี่ พืชผักเมืองหนาว ดอกกุหลาบของโครงการหลวง เป็นต้น ปัญหาของเกษตรกรก็คือ ราคาที่แพงและยังไม่สามารถตรวจสอบประสิทธิภาพที่แน่นอนของผลิตภัณฑ์เชื้อรามายคอร์ไรซาที่มีขายตามท้องตลาดได้ ดังนั้นผู้วิจัยซึ่งได้ทำวิจัยเกี่ยวกับเชื้อราเอนโดมายคอร์ไรซาของต้นตองแตบ ซึ่งเกษตรกรชาวกะเหรี่ยงในหมู่บ้านกระเหรี่ยงทิชะใช้เป็นพืชที่เพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้กับดิน เพื่อใช้ดินในการปลูกข้าวและพืชพื้นเมืองสำหรับเป็นอาหารและยา จึงมีความสนใจในองค์ความรู้ที่จะใช้พัฒนาการนำเชื้อรามายคอร์ไรซาและจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGR มาใช้ช่วยในการเจริญของพืช โดยเฉพาะในพืชที่ต้องมีการย้ายปลูกเพื่อการเพาะปลูกเพื่อการค้า

องค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของเชื้อรามายคอร์ไรซากับพืชที่เป็นพืชอาศัยในการทดลองจะสามารถประเมินได้ โดยเฉพาะชนิดของเชื้อรามายคอร์ไรซาที่ตอบสนองต่อพืชเป้าหมายได้ดีในดินเลวของประเทศไทยโดยเฉพาะดินในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล (800 เมตร) ซึ่งมีชุมชนชาวเขาอาศัยอยู่จำนวนมาก และพื้นที่ซึ่งเกษตรกรมีการปรับเปลี่ยนพืชที่ปลูกใหม่ เช่น ยางพารา สน กาแฟ และพืชผักเกษตรอินทรีย์ ในภาคเหนือ อีสานและ ยูคาลิปตัสในภาคตะวันตก จึงเป็นสิ่งที่ควรจะมีการวิจัยเพื่อจะใช้เป็นพื้นฐานในการคัดเลือกและตรวจสอบเชื้อรามายคอร์ไรซาและ PGR ที่เหมาะสมสำหรับพืชเป้าหมายที่ใช้ทดลอง เพื่อที่จะสามารถพัฒนาให้สามารถนำไปใช้ได้ในทางปฏิบัติ นอกจากนี้การผลิตหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อพืชอาศัยที่เกษตรกรสามารถนำไปใช้กับพืชเป้าหมายที่มีแนวโน้มที่ดีในทางเศรษฐกิจ มีราคา

สูงและมีความต้องการใช้มาก ในงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นศึกษา พืชที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจและยังมีความต้องการในประเทศไทยคือ พืชที่เป็นพลังงานชีวภาพ อาหาร เครื่องดื่ม และพืชอีกประเภทหนึ่งที่มีความสำคัญในการอนุรักษ์และพัฒนาสิ่งแวดล้อม คือพืชที่ใช้ในการปลูกและฟื้นฟูพื้นที่ป่าไม้ก็เป็นเป้าหมายในการศึกษาเช่นกัน รวมทั้งการใช้วัสดุพื้นบ้านเป็นตัวนำเชื้อรามายคอร์ไรซา ทำให้สามารถเก็บกักมายคอร์ไรซาให้คงประสิทธิภาพได้นานและสะดวกในการใช้งานของเกษตรกร ก็มีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาและพัฒนาไปพร้อม ๆ กัน เพื่อประโยชน์ทางเศรษฐกิจและการอนุรักษ์ดินและพืช

**พืชเป้าหมาย**

1. พืชที่เป็นพลังงานชีวภาพ การวิจัยนี้ทำการศึกษาเชื้อรามายคอร์ไรซาในต้นสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เนื่องจากเป็นพืชที่มีความสำคัญมากในปัจจุบัน เพราะสามารถนำมาผลิตน้ำมันดีเซลชีวภาพ (bio-diesel) ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงชนิดหนึ่ง จึงมีการเพาะปลูกต้นสบู่ดำเพิ่มมากขึ้น โดยทั่วไปเกษตรกรจะทำการไถบริเวณที่ปลูกพืชอื่นมาก่อน เช่น มันสำปะหลัง หรือนำไปปลูกในบริเวณป่าเสื่อมโทรม ใช้วิธีขยายพันธุ์ทั้งการตัดกิ่งปักชำและการเพาะจากเมล็ด

2. พืชเครื่องดื่มเป้าหมายในการศึกษานี้คือ กาแฟพันธุ์อราบิก้า (*Coffea sativa* L.) ซึ่งเป็นพืชส่งเสริมสำคัญสำหรับการทำเกษตรที่สูง แต่เดิมพบว่าพื้นที่ป่าธรรมชาติบนที่สูงของภาคเหนือถูกบุกรุกทำลาย เพื่อนำพื้นที่มาใช้ในการปลูกพืชไร่ เช่น ข้าวโพด และข้าว ซึ่งไม่คุ้มทุนอย่างมาก และมีผลกระทบต่อประชากรบริเวณพื้นราบ เนื่องจากทำให้เกิดการชะหน้าดิน การพังทลายของดิน และน้ำท่วมฉับพลัน ต่อมาจึงพบว่ากาแฟเป็นพืชที่เหมาะสมกับสภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ อีกทั้งยังสามารถแก้ปัญหาที่เกิดจากการปลูกพืชไร่ได้มาก และเกษตรกรชาวเขาก็ยินดีที่จะปลูกกาแฟมากกว่าพืชผลเมืองหนาวชนิดอื่นที่ให้ผลผลิตต่ำกว่า เนื่องจากกาแฟเป็นพืชที่ให้ผลตอบแทนสูง ตัวอย่างเช่น ที่ดอยวาวี จังหวัดเชียงรายยังมีการปลูกและผลิตกาแฟเพิ่มมากขึ้นทุกปี กาแฟทำรายได้ให้เกษตรกรสูงกว่าการปลูกพืชอื่นๆ มาก จึงมีเกษตรกรที่สูงรวมกลุ่มปลูกและแปรรูปเมล็ดกาแฟจำหน่ายเอง ในปัจจุบันราคาเมล็ดกาแฟอราบิก้าดั่วขึ้นอยู่กับคุณภาพ เริ่มต้นประมาณกิโลกรัมละ 300 บาท

3. พืชธัญพืช ชนิดแรกคือข้าว (*Oryza sativa* L.) ซึ่งเป็นพืชอาหารหลักของประชากรในประเทศไทย ข้าวที่ปลูกในนาบริเวณพื้นที่ราบมักเป็นข้าวพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงและส่งเสริมจากกรมข้าว ซึ่งในภาคเหนือจะเป็นข้าวสายพันธุ์ กข และข้าวชัยนาท เป็นต้น ซึ่งทางด้านสายพันธุ์ จะมีความแตกต่างกันน้อย ข้าวที่มีการส่งเสริมให้ปลูกจากทางราชการมักจะต้องมีการดูแลจัดการที่ใช้ปริมาณปุ๋ยและยากำจัดวัชพืชสูง จึงจะทำให้ได้ผลผลิตดี ต่างจากข้าวไร่ที่ปลูกโดยชนกลุ่มน้อยในที่สูง ซึ่งยังมีการเก็บรักษาพันธุ์ข้าวดั้งเดิมไว้ ทำให้มีความหลากหลายของพันธุ์เป็นจำนวนมาก โดยแหล่งพันธุ์ข้าวที่มีความหลากหลายนี้ส่วนใหญ่มีลักษณะเด่นหลายประการ ทั้งการทนต่อสภาพแวดล้อม ไม่ต้องใช้ปุ๋ย สารเร่งการเจริญเติบโต และยากำจัดวัชพืช และยังได้รับการคัดเลือกพันธุ์โดยผู้ปลูกตลอดเวลา ทางกลุ่มวิจัยของศาสตราจารย์

เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม ได้ศึกษารายละเอียดในด้านการรวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทย ข้าวป่าและข้าววัชพืชในปัจจุบัน ทั้งนี้ความสัมพันธ์ของข้าวกับเชื้อรามายคอร์ไรซามีรายงาน โดย Youpensuk *et al.* (2005b)

ธัญพืช กลุ่ม ลูกเดือย (*Coix lachrymal-jobi* L.) งา (*Sesamum indicum* L.) ก็เป็นพืชสำคัญทางภาคเหนือ โดยลูกเดือยมีการปลูกมากในที่สูง ส่วนงาปลูกในทุกจังหวัดทางภาคเหนือโดยเฉพาะแม่ฮ่องสอนและเชียงราย ซึ่งจะมีโรงงานหีบน้ำมันงาหลายแห่งในแต่ละหมู่บ้าน ปัจจุบันมีความต้องการน้ำมันงามากจากประเทศญี่ปุ่น จึงถือว่างาเป็นพืชเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของภาคเหนือ

4. พืชพื้นเมืองที่ใช้ในการปลูกและฟื้นฟูป่า พืชเหล่านี้ได้รับการศึกษาและคัดเลือกมาขยายพันธุ์จนเจริญเป็นกล้าไม้ในโรงเพาะชำของหน่วยวิจัยการเพาะกล้าไม้เพื่อฟื้นฟูป่า อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย สำหรับศึกษาเพื่อการปลูกป่าทดแทนในเขตภาคเหนือ

**ความหลากหลายของเชื้อรามายคอร์ไรซาที่มีผลต่อพืช**

ลักษณะการอยู่ร่วมของสิ่งมีชีวิตแบบเอื้อประโยชน์ต่อกัน (symbiosis) ระหว่างเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาและพืชนั้นมีการค้นพบมาเป็นเวลานานมาก ซึ่งการทำความเข้าใจในความสัมพันธ์ดังกล่าวจะเป็นศูนย์กลางของความเข้าใจสังคมของพืชปัจจุบัน จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่มีการศึกษาและรายงานไว้มีจำนวนชนิดไม่มาก ซึ่งในปัจจุบันนี้เชื่อว่า AMF จะมีความหลากหลายของลักษณะสูงกว่าที่ได้มีการอธิบายไว้ ซึ่งในระบบในธรรมชาติเชื้อราในกลุ่มนี้จะเป็นทั้ง cryptic และมีบทบาทหลากหลาย ซึ่งทำให้การจัดจำแนกความสัมพันธ์ในทางนิเวศวิทยาที่แท้จริงยังคงทำได้ยากมากและถือเป็นความท้าทายสำหรับนักวิจัย

ประมาณ 2 ใน 3 ของพืชในโลกจะมีรามายคอร์ไรซา ซึ่งพืชจะมีความสัมพันธ์แบบเอื้อประโยชน์ต่อกันกับรากลุ่ม glomalean ทำให้เกิดโครงสร้างภายใน (intraradical organ) ที่ใช้แลกเปลี่ยนสารอาหารและโครงสร้างภายนอก (extraradical network) ของเส้นใยเชื้อราที่มีการขยายตัวเพิ่มของระบบราก เส้นใยของเชื้อราจะแผ่กระจายในดิน ซึ่งเส้นใยขนาดเล็กแต่ละเส้นก็จะทำหน้าที่คล้ายราก แต่จะสามารถแทรกไปในดินในปริมาณที่มากกว่าระบบรากของพืชเอง เส้นใยนั้นจะทำหน้าที่แลกเปลี่ยนฟอสฟอรัสและไนโตรเจน (phosphorus- nitrogen pump) ในรูปของไนเตรดและแอมโมเนีย (Marsh and Schultze, 2001)

การเกษตรบนที่สูงในเขตภาคเหนือของไทยได้รับการส่งเสริมจากหลายฝ่าย โดยเฉพาะโครงการหลวง ที่ประสบความสำเร็จมาก มีการนำพืชสายพันธุ์ต่างประเทศกลุ่มไม้ดอกและพืชผัก ไม้ผลมาปลูก เช่น พลับ เชอร์รี่ ท้อ และ แมคคาเมีย เป็นต้น ศูนย์ส่งเสริมการปลูกกาแฟที่สูง ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และกองพืชสวน กระทรวงเกษตร ซึ่งในระยะเริ่มต้นต้องมีการใช้ปุ๋ยและสารเคมีเนื่องจากเป็นพืชการค้า ส่วนเกษตรที่สูงอื่นๆก็มีการปลูกพืชตามที่กรมส่งเสริมแนะนำ ซึ่งพืชเหล่านี้ไม่ใช่พืชหลัก พืชอาหารเช่น ข้าวไร่ ถั่วและงา มักจะเป็นพืชหลักของชุมชน ซึ่งแต่ละชุมชนก็มีการใช้ภูมิปัญญาดั้งเดิมที่ช่วยให้ผลผลิต

ของพืชเหล่านี้มีคุณภาพดีและปริมาณมาก โดยไม่มีการใช้ปุ๋ยเคมี เนื่องจากมีราคาแพงและต้องมีการขนส่งในระยะทางไกล ตัวอย่างที่ได้ทำการศึกษาแล้ว คือชุมชนปากะเยอที่บ้านทิชะ ซึ่งการปลูกข้าวตามระบบหมุนเวียนแปลงปลูกทุก 6-7 ปี โดยแปลงเก่าจะส่งเสริมให้มีการเจริญของต้นตองแตบ (*Macaranga denticulate*) จนกว่าจะกลับมาใช้ที่ดินปลูกข้าวและพืชอาหารอื่นอีกในปีที่ 6-7 จากภูมิปัญญาที่สืบทอดกันมานี้พบว่า ดินที่มีการเจริญของต้นตองแตบแล้ว จะให้ผลผลิตของข้าวเพิ่มขึ้น ทั้งนี้การศึกษาจึงพบว่า พืชตองแตบ มีการเจริญร่วมกับเชื้อราเอนโดมายคอร์ไรซา (AMF) ซึ่งช่วยในการสะสมธาตุอาหาร จากการสำรวจพบว่าบริเวณรากของ ต้นตองแตบในไร่ จะมี AMF หลากหลายถึง 29 ชนิด และเมื่อตรวจรากของต้นตองแตบพบการเข้าไปอยู่ร่วมของ AMF (root colonization) ร้อยละ 63-82 ปริมาณสปอร์ของเชื้อราจะมีความหนาแน่นมากในช่วงฤดูฝน เมื่อทดสอบในกระถางพบว่าตองแตบที่ปลูกด้วยดินที่ปลูกเชื้อราเอนโดมายคอร์ไรซา เป็นระยะเวลา 4 เดือนพบว่าทำให้พืชมีการเจริญและส่วนประกอบของสารอาหารในต้นเพิ่มขึ้นมากเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการปลูกเชื้อราเอนโดมายคอร์ไรซา ในสภาวะที่ดินมีธาตุฟอสฟอรัสต่ำแต่มีการเติมไนโตรเจน ( Youpensuk *et al.*, 2004) พบเชื้อรามายคอร์ไรซาชนิด *Acaulospora morrowiae* มากที่สุดในดินที่ปลูกด้วยเชื้อนี้เดี่ยวๆ หรือที่เป็นเชื้อผสมร่วมกับ *Glomus* spp., และ *G. faciculatum* แต่เชื้อที่ตองแตบจะตอบสนองมากที่สุดต้องมีการตรวจสอบด้วยวิธีอื่นเนื่องจากสปอร์ที่ตรวจได้จากดินบริเวณรากอาจไม่มีผลโดยตรงกับการดูดซับธาตุอาหารของต้นตองแตบเอง (Youpensuk *et al.*, 2005a) ดังนั้นมายคอร์ไรซาก็น่าจะมีบทบาทอย่างมากในการสะสมธาตุอาหารให้กับต้นตองแตบในระบบปลูกพืชเลื่อนลอยแบบหมุนเวียนของหมู่บ้านกะเหรี่ยงทิชะ ซึ่งในการหมุนเวียนสารอาหารนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการรักษาผลผลิตของธัญพืชที่ปลูกและเป็นประโยชน์อย่างยั่งยืนของระบบปลูกพืชเลื่อนลอยแบบหมุนเวียนดังกล่าว

พืชจะสามารถเพิ่มระยะของการอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ไม่ค่อยอุดมสมบูรณ์ได้นานขึ้นเมื่อมีเชื้อราเอนโดมายคอร์ไรซา (AMF) มาอยู่ร่วมกับราก (St. John, 2000; Stutz *et al.*, 2000) เชื้อรามายคอร์ไรซายังมีผลต่อความหลากหลายในสังคมพืชและเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถนำไปประกอบในการจัดการพื้นที่เพื่อการปลูกพืชบนพื้นที่สูง (Rerkasem *et al.*, 2002) เนื่องจากเส้นใยของเชื้อราจะไปเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซับของระบบราก ทำให้เพิ่มปริมาณการนำเข้าสารอาหารและน้ำ (Mathur and Vyas, 2000) ซึ่งสารอาหารที่สำคัญคือฟอสฟอรัส มีการศึกษาในเขตอบอุ่นพบว่า พืชที่มีระบบรากไม่มีการแตกแขนงมากจะได้รับประโยชน์ดังกล่าว แต่พืชที่มีระบบรากแตกแขนงมากจะตอบสนองแบบอื่น เช่น ช่วยป้องกันเชื้อราก่อโรคที่จะเข้าทำลายราก (Newsham *et al.*, 1995)

รายงานจากประเทศอินเดียว่าฝ้าย ถั่วพุ่มและข้าวฟ่างหางกระรอกที่ปลูกในดินที่อบฆ่าเชื้อและมีปริมาณฟอสฟอรัสที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ต่ำ เมื่อใส่เชื้อ AMF ให้พืชจะทำให้พืชเจริญมากกว่าและเมื่อวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสและสังกะสีในพืชก็พบในปริมาณมากกว่าที่พืชไม่ได้รับเชื้อ (Bagyaraj and Manjunath, 1980)

ผลผลิตของ *Foeniculum vulgare* Mill. (fennel) ซึ่งเป็นเครื่องเทศที่สำคัญในอินเดีย และยังปลูกทั่วไปในประเทศรัสเซีย เยอรมัน ฝรั่งเศส อิตาลี ญี่ปุ่น และอเมริกา ดอกและผลมีกลิ่นหอม ผลจะมีต่อมน้ำมันหอมระเหยในในเปลือกชั้นกลาง ใช้ในทางเภสัชกรรมในหลายประเทศ น้ำมัน fennel จะมี anethol มาก นำไปใช้เป็นกลิ่นในการเตรียม culinary, confectionary, cordial เครื่องดื่ม และในสบู่ (Anonymous, 1988) การใช้ AMF ชนิด *Glomus marcrocarpum* และ *G. fasciculatum* จะทำให้ fennel เจริญและเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันขึ้นในเมล็ดและยังมีการดูดซับฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้น (Kapoor *et al.*, 2004)

**ปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายและการเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา**

จำนวนและชนิดของ AMF ที่มาอาศัยอยู่กับรากฝอยของพืชจะมีความแตกต่างขึ้นกับปัจจัยหลายชนิด เช่น

1. <u>ฤดูกาล</u> มีผลการศึกษาในพืชเขตทะเลทราย เช่น *Larrea tridentate* และ *Ambrosia dumosa* ว่าพบเชื้อรามายคอร์ไรซาสูงในฤดูใบไม้ร่วงและต่อเนื่องจนถึงตลอดฤดูใบไม้ผลิ จากนั้นจะลดลงในช่วงที่มีการขาดน้ำในฤดูร้อน (Apple et. al. 2005) ซึ่งรายงานของ Youpensuk *et al.* (2004) ทำการสำรวจจากไร่บนที่สูงบริเวณหมู่บ้านทิชะซึ่งมีต้นตองแตบเจริญ พบโครงสร้างของเชื้อราในรากพืชที่เรียกว่า อาร์บัสคูล (arbuscule) จำนวนมากในช่วงฤดูฝน ทั้งนี้จะเห็นว่าความแตกต่างอาจขึ้นกับลักษณะภูมิประเทศด้วย

2. <u>ชนิดของพืชที่เป็นพืชอาศัย</u> การเข้ามาอาศัยร่วมกับรากของพืชอาศัยจะแตกต่างกันซึ่งมักจะสัมพันธ์กับอัตราการเจริญของรากและความอ่อนแอของพืชอาศัย (Smith and Read, 1997) เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่า เชื้อราอาร์บัสคูลมายคอร์ไรซามีความจำเพาะน้อยหรือไม่มีเลยต่อพืชที่เป็นพืชอาศัย โดย Zhu *et al.* (2000) ได้ตรวจสอบพบการเข้าสู่รากของ AMF ใน peraninal ryegrass และ white cover จำนวนมากจากการปลูกเชื้อ AMF พืชในป่าดิบชื้นจะมีทั้งเอกโตมายคอร์ไรซา (ECM) และ AMF ซึ่งพบว่า พืชตอบสนองต่อ AMF สูงกว่า ECM จากการศึกษาพืช100 ชนิดพบ พืช 5 ชนิดที่มี AMF เข้าอาศัยถึง 75% ซึ่ง 42 ชนิดมีการเข้าไปอยู่ร่วมน้อยกว่า 25% ส่วนอีก 23 ชนิดมีการเข้าอยู่ร่วมเพียง 1-5 % ( Onguen and Kuyper, 2001)

3. <u>สารอาหารที่มีในดิน</u> การอาศัยร่วมกับรากพืชของ AMF มักจะยับยั้งได้ โดยการเติมฟอสฟอรัส ส่วนการเติมไนโตรเจนจะมีผลต่อพืชทั้งการกระตุ้นและการยับยั้งการเจริญ แต่จากการทดลองของ Sylvia and Neal (1990) รายงานว่า การอาศัยร่วมของ *G. etunicatum* ในพืชหอม *Allium cepa* นั้นไม่มีผลกระทบเมื่อเติมฟอสฟอรัสเมื่อพืชขาดไนโตรเจน แต่ถ้ามีปริมาณไนโตรเจนเพียงพอเมื่อเติมฟอสฟอรัสจะยับยั้งการเข้าสู่รากของเชื้อรามายคอร์ไรซา

4. <u>ค่าความเป็นกรดด่างของดิน</u> AMF จะมีประสิทธิภาพดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่กว้าง เช่น การศึกษาเชื้อราชนิด *G. fasciculatum* พบว่าจะเข้าสู่รากพืชที่เจริญในดินที่มีค่า pH ระหว่าง 5.5-9.5 ส่วน *G. mosseae* และ *Glomus* อีกหลายชนิดจะชอบ pH ที่สูงกว่า 5 (Powell and Bagyaraj, 1984) AMF

บางชนิดเร่งการเจริญของพืชในดินกรด เช่น พืชชนิด *Panicum virgatum* (sawitch grass) เมื่อเพาะในดินที่มี pHca 4 จะมีน้ำหนักแห้งมากกว่าพืชที่ปลูกเชื้อที่เจริญในดินที่ pHca 5 (Clark *et al.*, 1999) ทั้งนี้การตอบสนองจะมีความแตกต่างขึ้นกับชนิดของมายคอร์ไรซา เช่น *Gigaspora* margarita และ *G. etunicatum* ที่ปลูกเชื้อในถั่วลันเตา *Gi. margarita* จะเข้าสู่พืชได้สูงสุดเมื่อดินเป็นกรดมีค่า pHwater ที่ 4.6 แต่จะทำให้ความสามารถในการ colonized รากถั่วลันเตาลดลง (Rohyadi *et al.*, 2001)

5. <u>ความชื้นของดิน</u> จะมีผลต่อการงอกของสปอร์ เช่น สปอร์ของเชื้อรา *G. epigaeum* จะงอกได้ดีที่ในช่วงความชื้นระหว่าง field capacity และ soil saturation ถ้าความชื้นต่ำกว่า field capacity การงอกจะลดลง (Danial and Trappe, 1980) ในกรณีที่มีน้ำท่วม การตอบสนองก็จะขึ้นอยู่กับชนิดพืชและชนิดของ AMF ในการทดลองของ Rutto *et al.* (2002) ศึกษาในกล้าต้นท้อที่เจริญในอาหารที่มีฟอสฟอรัสต่ำ พบว่า มีการสะสมเอทานอลในรากแก้วของกล้าท้อที่ไม่มีการปลูกเชื้อ AMF ภายใน 3 วันที่น้ำขัง พืชจะอ่อนแอลงมากกว่า

6. <u>อุณหภูมิของดิน</u> จะมีผลมากเช่นเดียวกับความชื้นในดินต่อการ colonized ของเชื้อ AMF (Braunberger *et al.*, 1994) โดยทั่วไปเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 30°C หรือสูงกว่านั้น (Smith and Read, 1997) ประสิทธิภาพการเข้าสู่รากจะอยู่ในช่วง 18-41°C (Schenck and Smith, 1982)

7. <u>ความหนาแน่นของหัวเชื้อ</u> ผลของความหนาแน่นของหัวเชื้อต่อการเข้าสู่รากของ AMF และการสร้างสปอร์ ได้มีการศึกษากันมาก เพื่อหาวิธีการที่จะเร่งการเจริญของพืชหรือการผลิตหัวเชื้อ AMF โดยจำนวนมาตรฐานของสปอร์สำหรับปลูกเชื้อจะอยู่ที่ 50 สปอร์ สำหรับการปลูกเชื้อในกระถาง แต่ถ้าเป็นสปอร์ขนาดใหญ่ใช้ 5-100 หรือ สปอร์ขนาดเล็กใช้ 50-500 สปอร์ (Brundrett *et al.*, 1996) ความหนาแน่นของสปอร์ในดินบริเวณแปลงปลูกจะมีความสัมพันธ์ทางบวกกับจำนวนการcolonized ของเชื้อ AMF (Clapperton and Reid, 1992) มีการศึกาที่พบว่าเมื่อเพิ่มจำนวนของสปอร์หัวเชื้อจะเพิ่มการเข้าสู่รามากขึ้น แต่การเพิ่มจะต้องไม่เกินขีดจำกัด (Powell and Bagyaraj, 1984)

8. <u>แสง</u> ความเข้มของแสงสูงและช่วงกลางวันที่ยาวจะเพิ่มการเข้าสู่รากหรือการสร้างสปอร์ในพืชหลายชนิด การเพิ่มของการเข้ารากของ AMF มีผลมาจากการเพิ่มกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชทั้งมีการสร้างคาร์บอนในรากและเพิ่มการขับออกของสารอาหารคาร์บอน (Powell and Bgyaraj, 1984) จากการศึกษาโดย NMR พบว่าน้ำตาลที่มีคาร์บอนหกตัวจะถูกนำเข้า AMF ที่อยู่ในราก และมีกระบวนการเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาล trehalose และไขมันที่เก็บสะสม ในส่วนกลุ่มเส้นใยที่อยู่ในรากและส่งมายังกลุ่มเส้นใยที่อยู่นอกราก ซึ่งมีการรับ $NO_3$ และ แอมโมเนียเข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปสังเคราะห์กรดอมิโน Arginine จากนั้นจึงส่งกลับไปยัง AMF ที่อยู่ในเซลล์ราก (Marsh and Schultze, 2001)

9. <u>ยาฆ่ารา</u> ยาฆ่าราในแปลงปลูกมีการใช้กันอย่างมากเพื่อควบคุมราซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืช ซึ่งยาฆ่ารานั้นจำเพาะต่อราทั้งที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค ทั้งนี้ก็จะรวมเชื้อราที่ช่วยในการเจริญของพืช เช่น มาย

คอร์ไรซา (Vyas, 1988) ซึ่งนักวิจัยหลายท่านพบว่า AMF จะได้รับผลกระทบจากการใช้ยาฆ่าราการวิจัยของ Sukarno *et al.* (1993) ทดลองโดยใช้ยาฆ่ารา 3 ชนิด กับ onion plants (*Allium cepa* L.) ซึ่งอาศัยร่วมกับเชื้อ *Glomus* sp. `City Beach' (WUM 16) ที่มีการปลูกเชื้อ ซึ่งมีชื่อทางการค้า คือ aliette®, benlate® และ ridomil® พบว่า benlate® ลดการดูดซึมและส่งผ่านฟอสฟอรัสของเส้นใยเชื้อราในดิน ในขณะที่ aliette® ทำให้การเจริญเติบโตของใบและรากลดลง แต่พบว่ามีการสะสมฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และ ridomil® ลดปริมาณของฟอสฟอรัสที่จะเข้าสู่รากและเส้นใยเชื้อรา ดังนั้นการทำงานของยาฆ่าราทั้ง 3 ชนิด เป็นการลดฟอสฟอรัสซึ่งเป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืช

10. <u>การจัดการที่ดินที่ใช้เพาะปลูก</u> การไถพรวน การเผาทำลายป่าหรือการปลูกพืชหมุนเวียนชนิดที่ไม่ใช่พืชอาศัยของ AMF จะมีผลต่อประชากรของเชื้อ AMF (Gavito and Miller, 1998) การไถและใส่ปุ๋ยจะลดความหนาแน่นของเชื้อมายคอร์ไรซาดั้งเดิมในดินที่ทำการเกษตรนั้น การไถด้วยเครื่องมือที่หนักซึ่งทำให้ดินแน่นจะทำให้มี AMF น้อยลง การศึกษาใน *Cajanus cajan* เป็นตัวอย่างที่ศึกษาในกระถาง พบว่ามีผลในทางลบต่อการเจริญของพืช เช่น รากมีความยาวลดลง การอาศัยของมายคอร์ไรซา *Gi. margarita* น้อยลง น้ำหนักแห้งของรากลดลง การดูดซับฟอสฟอรัสน้อยลง (Yano *et al.*, 1998) เช่นเดียวกันกับการตรวจสอบในข้าวโพดที่ปลูกในแปลง (Entry *et al.*, 1996) ถ้าดินไม่มีการไถจะพบความหนาแน่นของเส้นใย AMF สูงกว่าที่ไถปกติ (Kabir *et al.*, 1998)

Karasawa *et al.* (2002) ศึกษาความแตกต่างในการเจริญของข้าวโพดในการปลูกพืชหมุนเวียนระหว่างพืชที่เป็นพืชอาศัยของมายคอร์ไรซา (ทานตะวัน) กับพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัย (มัสตาด) พบว่าเมื่อใช้หัวเชื้อ AMF จากดินหลังการปลูกทานตะวันจะทำให้ข้าวโพดเจริญดีและมีการ colonized ของ AMF มากกว่าใช้หัวเชื้อหลังการปลูกมัสตาด

**การประเมินการเข้าไปในราก (Root colonization)**

การประเมินว่า AMF เข้า ไปอาศัยอยู่ในรากได้มากหรือน้อยเท่าใด จะใช้วิธีนับว่ามีลักษณะการเกิดโครงสร้างของเชื้อราในรากพืชอาศัย ได้แก่ เส้นใยของเชื้อรา อาร์บัสคูล และเวสสิเคิล ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังการย้อมสีราก ซึ่งเรียกว่าวิธี grid line intersect (Brundrett *et al.*, 1996; McGonigle *et al.* 1990)

**การเก็บและการเพิ่มจำนวน AMF**

เชื้อรา AMF นี้เป็น obligate symbiont ไม่สามารถที่จะนำมาเลี้ยงในอาหารที่ใช้ในห้องปฏิบัติการได้ การเก็บรักษาและการเพิ่มจำนวนของ AMF เป็นเรื่องสำคัญมากในการที่จะเตรียมเพื่อใช้ในการศึกษา โดยทั่วไปจะเพาะในกระถางกับพืชที่เป็นพืชอาศัย โดยปลูกหัวเชื้อในรูปสปอร์จำนวนหนึ่งซึ่งอาจจะมีมายคอร์ไรซามากกว่าหนึ่งชนิด การเพาะจากสปอร์เดี่ยวๆ จะดีกว่า สำหรับการนำไปศึกษา ทั้งผลต่อการเจริญ

การแยกให้ได้สปอร์เดี่ยวๆทำได้หลายเทคนิคใช้ได้ทั้งสปอร์ที่งอกและไม่งอก (Powell and Bagyaraj, 1984; Brundrett and Juniper, 1995)

**อนุกรมวิธานของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา**

การจัดจำแนกเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา ทั้งจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกระบวนการทางอณูชีววิทยา ปัจจุบันนักอนุกรมวิธานเชื้อราจำแนกเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาอยู่ใน Kingdon Fungi, phylum Glomeromycota, Class Glomeromycetes ประกอบด้วย 4 orders (*Archaeosporales, Diversisporales, Glomerales* และ *Paraglomerales*), 9 families (*Acaulosporaceae, Ambisporaceae, Archaeosporaceae, Diversisporaceae, Geosyphonaceae, Gigasporaceae, Glomeraceae, Pacisporaceae* และ *Paraglomeraceae*) และ 14 genera (*Acaulospora, Ambispora, Archaeospora, Diversispora, Entrophospora, Geosyphon, Gigaspora, Glomus, Intraspora, Kuklospora, Paraglomus, Pacispora, Otospora* และ *Scutellospora*) (Palenzuela *et al.*, 2008)

*การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา*

Walker and Trappe (1993) ใช้ลักษณะสปอร์เป็นตัวแยกความแตกต่างของ AMF แต่ละชนิด ประกอบด้วย spore development, การจัดเรียงตัว, รูปร่าง, ขนาด, สี, ornamentation, ชั้นของผนังสปอร์, ปฏิกิริยาจากการย้อมด้วย Melzer's reagent, ลักษณะการงอกของสปอร์ โดยเฉพาะในสกุล *Scutellospora* จะพบลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะกลุ่ม และโครงสร้างที่ติดกับเส้นใยที่แพร่ออกไปในดิน ซึ่งมีการย้อมรากด้วย สี เช่น Trypan blue ซึ่งสีย้อมจะติดผนังเซลล์ของเชื้อรา แล้วจึงตรวจสอบโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Brundrett *et al.*, 1996)

ข้อด้อยของวิธีการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา ก็คือ

1. สามารถใช้ได้เฉพาะเชื้อราที่สร้างสปอร์ในขณะนั้น เนื่องจากการบ่งบอกชนิด AMF โดยใช้ลักษณะของเส้นใยทำได้ยาก แต่ถ้าหากไม่มีสปอร์ ก็จำเป็นต้องใช้โครงสร้างในเซลล์ โดยการย้อมราก และ ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์ซึ่งวิธีนี้ใช้เวลานานและแรงงานสูง (McConigle *et al.*, 1990) และยังพบว่า AMF หลายชนิดไม่ติดสีย้อมในราก หรือติดจางมากเมื่อใช้สีมาตรฐาน (Morton and Redecker, 2001)

2. ในบางฤดูของแต่ละปี AMF จะสร้างสปอร์มากซึ่งทำให้ตรวจพบได้ง่าย (dominant) แต่ถ้าสภาวะแวดล้อมต่างไป อาจไม่มีการสร้างสปอร์เลย ทำให้ตรวจสอบไม่พบเชื้อชนิดนั้นๆ

3. เชื้อรา AM ต่างชนิดกันจะสามารถเข้าอาศัยร่วมกับพืชได้ต่างชนิดกัน (Bever *et al.*, 1996)

4. สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสปอร์จะไม่ถูกตรวจพบ

5. สปอร์ที่เก็บจากดินในแปลงปลูกมักจะเป็นสปอร์ที่ไม่สมบูรณ์ ถูกทำลาย หรือสลาย ทำให้บ่งบอกชนิดได้ยาก จึงมีวิธีการแก้ไข คือมีการใช้วิธีดักจับ AMF (AMF trap culture) โดยการนำดินจากในแปลงมาใช้ปลูกพืชเพื่อหาพืชที่เหมาะสมที่จะเป็นพืชอาศัยในสภาวะที่มีการควบคุม เพื่อเพิ่มจำนวนของสปอร์ชนิดที่จะพบในแปลงปลูกและทำให้ได้สปอร์ใหม่ทุกระยะของการเจริญ (Isuyenkov *et al.*, 2004)

*การใช้วิธีการทางอณูชีววิทยา*

Phylum Glomaromycota ตั้งขึ้นในปี 2001 ซึ่งแยกเป็นกลุ่มใหม่ ก็คือรากลุ่ม AMF ซึ่งอยู่ใน order Glomales ใน Phylum Zygomycota แต่หลักฐานทางอณูชีวภาพ แสดงให้เห็นว่ามีวิวัฒนาการแยกคนละสาย (Schubler *et al.*, 2001a)

วิธีทางอณูชีวภาพสามารถทำได้หลายวิธีการเช่นการวิเคราะห์ izozyme RAPD-PCR, PCR และการทำลายพิมพ์ DNA และการใช้แอนติบอดี้จำเพาะ ซึ่งงานส่วนใหญ่ในปัจจุบันจะมุ่งเน้นที่การใช้เทคนิค PCR กับ primer ที่จำเพาะกับไอโซเลตหรือกลุ่ม บางครั้งจะใช้ร่วมกับ restriction analysis ซึ่งการใช้เทคนิค PCR ใช้ได้ผลสำเร็จในการบ่งบอกชนิดของราที่อยู่ในพืชอาศัยและในดิน ซึ่ง primer ส่วนที่ใช้จะได้มาจากลำดับของเบสที่อยู่ในส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงใน SSU rRNA และวิเคราะห์ด้วย phylogeny (Schubler *et al.*, 2001b; Swofford, 2002) วิธีการสกัด DNA และ PCR ของ AMF จากสปอร์เดี่ยวๆ ซึ่งได้จากการเพาะ pure line (จาก 1 spore) ในกระถางกับพืชที่เป็นพืชอาศัย เพิ่มจำนวน rDNA บริเวณ ITS โดยใช้ primer จำเพาะ ITS1 และ ITS4 (White *et al.*, 1990) ก็นิยมใช้เช่นกัน

การศึกษาหลักๆมุ่งไปยังส่วนของไรโบโซมยีน เช่น การศึกษาของ Lanfranco *et al.* (1999) ได้หาลำดับของเบสบริเวณ ITS ของ *Gi. margarita* ซึ่งประกอบด้วย ยีน 5.8 และบริเวณ ITS1 และ ITS2 การวิเคราะห์จะใช้จากหลายสปอร์ และจากสปอร์เดี่ยว 3 สปอร์ จะได้ 11 slightly different sequence (ในหนึ่งสปอร์มีต่างกัน 3) ชี้ให้เห็นว่า มีการผันแปรทางพันธุกรรมในทั้ง intersporal และ intrasporal

มีการใช้ universal forward primer SS38 หรือ Glomales-specific primer VANS1 กับ reverse *Gigasporaceae*-specific primer VAGIGA ใช้ amplified บางส่วนของ SSU rRNA จาก ราก Hyacinthoides nonscripta และสปอร์ของ *Scutellospora* (Clapp *et al.*, 1999) การใช้ large rDNA ก็มีการศึกษาใน Glomus จากรากของถั่วลันเตารวมทั้ง *G. mosseae*, *G. caledonium* และ *G. geosporum* มีการใช้ single-standed conformation polymorphism (SSCP) .ในการคัดหา nested PCR product (Kjoller and Rosendahl, 2001)

การเพิ่มปริมาณของ DNA โดย PCR มีการเสนอเป็นเทคนิคในการบ่งบอกชนิดของเชื้อรามายคอร์ไรซา (Simon *et al.*, 1993: Wyss and Bonfante, 1993) ส่วนของยีน rRNA ยูนิตขนาดเล็ก (rDNA) จำเพาะต่อ AMF สามารถที่จะเพิ่มจำนวนเมื่อใช้ ใช้ primer ที่จำเพาะสำหรับ taxon (VANS1) ที่เข้าคู่กับ universal

primer (NS21) (Simon *et al.*, 1992) การศึกษาการประยุกต์ใช้ PCR สำหรับ AMF จะใช้กับสปอร์หรือ DNA จากบริเวณรากที่มีการ colonized ของ leek (Simon *et al.*, 1993)

การใช้ primer คู่ VANS1-NS21 ในเทคนิคการทำ PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อราเอนโดมายคอร์ไรซา *G. intraradices* (commercial inoculum source) ในรากของของผักสลัด (zinnia leek) พริก และ (endive) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณและตรวจสอบได้จากรากโดยตรงโดยไม่ต้องสกัด DNA หรือทำให้บริสุทธิ์ (Bonito *et al.*, 1995)

วิธีการที่เรียกว่า real time PCR ได้ถูกนำมาใช้ตรวจการ colonized ของ *G. interadices* ในรากของ *Medicago truncotula* โดยการวัด AM specific phosphate transporter 4 (MtPT4) จาก *M. truncotula* ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว มีประสิทธิภาพและแม่นยำในการตรวจหา AMF การวัดจำนวนของ rDNA หรือ rRNA ของราเป็นปัจจัยบ่งชี้ (parameter) ที่ดีในการประเมิน colonization ของราก นอกจากนี้ยังสามารถใช้ประเมินเกี่ยวกับ symbiotic state ของการ colonized ระบบรากของพืชอาศัย (Isayenkov *et al.*, 2004)

ลักษณะสัณฐานเป็นหลักที่ถูกใช้เพื่อจัดจำแนกชนิดของสปอร์มาเป็นเวลานาน แต่เมื่อไม่นานมานี้เทคนิคอณูชีววิทยามีการปรับปรุงจนกระทั่งประสบความสำเร็จ สามารถบรรยายลักษณะของสปอร์ได้ (Redecker, 2000) ข้อได้เปรียบอย่างหนึ่งในการใช้เทคนิคอณูชีววิทยา คือสามารถวิเคราะห์ชนิดของ AMF ได้โดยตรงจากพืช นั่นแสดงให้เห็นว่ามี AMF หลายชนิด ที่ไม่สามารถจำแนกได้จากตัวอย่างต่างชนิดกัน และเมื่อใช้ลักษณะเพื่อเปรียบเทียบชนิดก็อาจมีความคลาดเคลื่อน (Krüger *et al.*, 2009)

กระบวนการทำ DNA sequence base เป็นวิธีที่มีประโยชน์มากในการบ่งบอกชนิด การจัดลำดับเบสและวิเคราะห์ชิ้นส่วน nuclear rDNA ของ AMF จากหลากหลายลักษณะที่พบทางสัณฐานเพื่อเรียงลำดับตามวิวัฒนาการและสนับสนุนข้อมูลทางสันฐานวิทยา จะออกแบบ primer ผสม 4 ชนิด ซึ่ง primer แต่ละชนิด จะสัมพันธ์กับ rDNA บริเวณเป้าหมายทั้งขนาดเล็ก (small subunit-SSU) และขนาดใหญ่ (large subunit-LSU) (Krüger *et al.*, 2009)ในการตัดสินชนิดของเชื้อที่ได้จากเทคนิคทางอณูชีววิทยาจะใช้บางส่วนของ SSU, ส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) rDNA ทั้งหมด และบางส่วนของ LSU

**การผลิตหัวเชื้อมายคอร์ไรซาเชิงอุตสาหกรรม**

เนื่องจาก AMF ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารในห้องปฏิบัติการได้ จะต้องใช้ พืชที่เป็นพืชอาศัยเพื่อเพิ่มจำนวน และใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป แต่เนื่องจาก AMF อาศัยร่วมกับพืชได้หลายชนิด จึงมีพืชหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้เพาะหัวเชื้อได้ แต่ทั้งนี้ก็ต้องมีการคัดเลือกชนิดของพืชอาศัยที่มี AMF เข้า colonized อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณสปอร์จำนวนมากเพื่อเตรียมหัวเชื้อ โดยหัวเชื้อที่ได้นั้น ก็จะมีทั้งส่วนของรากพืช เส้นใยและสปอร์ปะปนกัน หัวเชื้อที่มีขายในท้องตลาดของประเทศไทยปัจจุบันเป็นหัวเชื้อที่นำเข้าจากต่างประเทศ เช่นหัวเชื้อของ บริษัท Triton ประเทศเยอรมัน ซึ่งก็ต้องทำการทดลองกับพืชเป้าหมายในประเทศก่อนได้รับอนุญาตให้วางจำหน่าย แต่เนื่องจากหัวเชื้อมีราคาสูงถึง 1,200

บาทต่อกิโลกรัม จึงยังไม่มีการใช้แพร่หลาย ในหัวเชื้อนี้จะมีเชื้อ AMF 3 ชนิดรวมกันโดยอยู่ในวัสดุที่สามารถเก็บกักเชื้อรา AM ได้ คือดินเหนียวที่เผาเป็นอนุภาคขนาดเล็กซึ่งทางบริษัทผู้ผลิตได้สั่งซื้อจากประเทศเนเธอร์แลนด์ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ส่วนโรงงานผลิตตั้งอยู่ที่ประเทศสเปนซึ่งมีค่าแรงถูก (Mycosym Company, 2004)

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรามายคอร์ไรซา เพื่อพัฒนาองค์ความรู้และนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรและสิ่งแวดล้อมของประเทศไทยในการวิจัยนี้ การดำเนินงานมีวัตถุประสงค์ทั้งหมด 4 ข้อ คือ

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา อาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซา (AMF) ในพืชเป้าหมาย
2. เพื่อบ่งบอกชนิดของ AMF ที่พบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอณูชีววิทยา
3. เพื่อคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อพืชเป้าหมาย
4. เพื่อคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของ AMF ที่คัดเลือก