

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

เอื้องแซะ

เอื้องแซะ เอื้องแซะหอม หรือ เอื้องแซะหลวง (*Dendrobium scabrilingue* Lindl.) เป็นพืชที่จัดอยู่ในตระกูล Orchidaceae สกุล *Dendrobium* section : *Nigrohirsutae* มีลักษณะประจำคือ มีขนสีน้ำตาลหรือสีดำขึ้นอยู่ตามกาบใบ (ระพี, 2516)

เอื้องแซะเป็นกล้วยไม้ที่มีลำลูกกล้วยตั้งตรง สูงประมาณ 10-20 เซนติเมตร ส่วนโคนลูกกล้วยเรียว ส่วนกลางจะอ้วน สีเหลืองทอง มีร่องตามความยาวของลูกกล้วย ใบยาวประมาณ 8 เซนติเมตร กว้างประมาณ 1.5 เซนติเมตร สีเขียวอมเหลืองเล็กน้อย หรือ สีเขียวอ่อน ปลายใบเว้าเฉียง กาบใบมีขนสีดำ รวมทั้งใต้แผ่นใบก็มีขนอย่างบางๆ ลูกกล้วยแก่จะทิ้งใบ (ระพี, 2516) โดยปกติจะมีลำลูกกล้วยเกิดใหม่ปีละ 2 อัน ซึ่งเป็นที่ให้ดอก ออกดอกช่อละ 2 ดอก ส่วนมากออกดอกถ้าละ 3-4 ช่อ ยิ่งถ้าสูงและสมบูรณ์มากยิ่งมีดอกมาก (จิตราพรรณ, 2539) ที่โคนของช่อดอกจะมีปลอกยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ปลอกมีขนสีดำ ดอกมีกลิ่นหอม กลีบดอกสีขาวเป็นมันปากมีสามแฉกเห็นได้ชัดเจน หูปากทั้งสองข้างตั้ง ปลายแหลม พื้นสีขาว มีเส้นสีเขียวขนานกันถี่ๆ เฝียงขึ้นหาปลายแหลม (ระพี, 2516) แผ่นปากจะมีสีเขียวอ่อนแล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อบานได้ 3-4 วัน และเป็นสีเหลืองอมส้มเมื่อดอกใกล้โรย แต่บางต้นที่แผ่นปากมีสีส้มอมแดงเมื่อดอกบาน (จิตราพรรณ, 2539) ดอกมีขนาด 2-3 เซนติเมตร กลีบดอกกว้าง 0.50-0.60 เซนติเมตร ยาว 1.40-1.50 เซนติเมตร กลีบด้านข้างค่อนข้างโค้ง ยาว 2.00-2.20 เซนติเมตร ความกว้างพอๆ กับกลีบอื่นๆ ดอกคล้ายบานคว่ำลง ดอกเริ่มบานตั้งแต่ราวเดือน พฤศจิกายน แต่มีไม่มากนัก จากนั้นจะผลิดอกเรื่อยๆ ไปจนถึงราวเดือนเมษายน บางช่อดอกอาจบานเป็นเวลากว่า 2 เดือน (ระพี, 2536)

การเจริญเติบโต การกระจายพันธุ์และถิ่นกำเนิด

เอื้องแซะเป็นกล้วยไม้ประเภทที่มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบซิมโพเดียล (sympodial) คือเป็นกล้วยไม้ที่มีลำลูกกล้วยเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะแตกหน่อเป็นลำต้นใหม่และเป็นกอ (บรรณ, 2534) ในสภาพธรรมชาติจะพบเอื้องแซะตามกิ่งไม้ค้ำๆ กันไปเป็นทางยาว ร่วมกับมอสหรือไลเคน สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญของเอื้องแซะต้องมีความชื้นสูง และอากาศเย็น (ระพี, 2536) มีถิ่นกำเนิดในประเทศพม่า (หญิงลักษณะเลิศ, 2498) และกระจายพันธุ์มายังประเทศไทย ซึ่งพบเอื้องแซะแถบป่าอำเภอมะละเรียง อำเภอมะเข่ อำเภอมอทองที่บริเวณคอยอินทนนท์ และ อำเภอมืองบริเวณคอยสุเทพ ซึ่งมักมีความสูงมากกว่า 1,300 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล นอกจากนั้นยังพบทางตอนเหนือของขุนแม่สุรินทร์ อัมพาง แม่ฮ่องสอน ภูเมือง เขาเขียว เขาใหญ่ และตราด (Seidenfaden, 1985)

การใช้ประโยชน์เชื้อราไมคอร์ไรซาเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืช

ในปี 1982 Chiariello *et al.* ได้ศึกษาผลของเชื้อรา *Glomus tenuis* และ *G. fasciculatus* ที่มีต่อการขนย้ายธาตุฟอสฟอรัสในบริเวณทุ่งหญ้า รัฐ California โดยปลูกพืช *Plantago electa* และ *Clarkia rubicunda* ในอาหารวัน และเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวร่วมกับพืช พบว่าเชื้อราทั้ง 2 สามารถอยู่อาศัยในรากพืชได้ และทำให้พืชมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น จากนั้นได้ศึกษาความสามารถในการเคลื่อนย้ายธาตุฟอสฟอรัส โดยทดลองในพื้นที่ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัสในแปลงขนาด 0.02 ha ปลูกต้น *P. electa* ร่วมกับเชื้อ *G. tenuis* และ *G. fasciculatus* โดยให้พืชดังกล่าวเป็น donor ซึ่งรอบรัศมี 35-55 มิลลิเมตรมีพืชอื่นๆ ขึ้นอยู่โดยรอบ ตรวจหาคัมมันตภาพรังสี ^{32}P หลังจากนั้น 6-7 วัน พบว่า donor มีปริมาณกัมมันตภาพรังสี $3.1 \times 10^6 \pm 9.7 \times 10^4$ count/min และต้นพืชรอบๆ มีปริมาณกัมมันตภาพรังสีแตกต่างกันโดยปริมาณที่พบไม่ได้ขึ้นกับระยะห่างระหว่างต้นพืช หรืออายุของพืช อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่า เชื้อราดังกล่าวมีผลต่อการเคลื่อนย้ายแร่ฟอสฟอรัสไปยังพืชข้างเคียง โดยอาศัยการเคลื่อนผ่านเส้นใยของเชื้อราไมคอร์ไรซาที่เชื่อมโยงกันระหว่างรากพืช และเคลื่อนย้ายธาตุฟอสฟอรัสจากที่มีปริมาณมากไปที่มีปริมาณน้อยกว่า

Collins *et al.* (1992) ทดลองปลูกข้าวโพด และถั่วเหลืองร่วมกับเชื้อราไมคอร์ไรซา *Glomus* sp. โดยปลูกข้าวโพด และถั่วเหลืองต่อเนื่อง 5 ปีต่อกัน จากนั้นในปีที่ 5 ปลูกข้าวโพดในแปลงที่ปลูกถั่วเหลืองต่อเนื่อง และปลูกถั่วเหลืองในแปลงที่ปลูกข้าวโพดต่อเนื่อง แล้ววิเคราะห์ธาตุ ฟอสฟอรัส(P), สังกะสี(Zn), ทองแดง(Cu) พบว่าถั่วเหลืองที่ปลูกในแปลงข้าวโพดที่ปลูกต่อเนื่อง จะมีปริมาณธาตุทั้งสาม และจำนวนฝักมากกว่าถั่วเหลืองที่ปลูกในแปลงถั่วเหลืองที่ปลูกต่อ

เนื่อง ในทางเดียวกัน ข้าวโพดที่ปลูกในแปลงที่ปลูกถั่วเหลืองต่อเนื่องมีปริมาณรากทั้งสาม มากกว่าที่ปลูกในแปลงที่ปลูกข้าวโพดต่อเนื่อง เมื่อแยกเชื้อราจากข้าวโพด และถั่วเหลืองที่ปลูกในแปลงที่ปลูกข้าวโพดต่อเนื่องพบเชื้อ *Glomus aggregatum*, *G. leptotichum*, *G. mossae*, และ *G. occatum* และพบเชื้อ *G. claroideu* และ *G. microcarpum* ในข้าวโพดและถั่วเหลืองที่ปลูกในแปลงที่ปลูกถั่วเหลืองต่อเนื่อง สรุปผลการทดลองว่าการปลูกพืชชนิดเดียวกันอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน จะมีผลไปลดชนิด และปริมาณเชื้อไมคอร์ไรซา

Newsham *et al.* (1995) ได้ศึกษาความสามารถของเชื้อไมคอร์ไรซาในการควบคุมโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในต้นหญ้า *Vulpia ciliata* ซึ่งเป็นหญ้าอาหารสัตว์ที่ปลูกมากในประเทศอังกฤษ โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด คือ ปลูกหญ้าร่วมกับเชื้อรา *F. oxysporum*, *Glomus*, *F. oxysporum* + *Glomus* และ ชุดเปรียบเทียบ พบว่าเชื้อราไมคอร์ไรซาสามารถเข้าไปอยู่ในราก 6% ของความยาวราก ในชุดที่ปลูกร่วมกับไมคอร์ไรซาพืชจะมีความยาวรากเพิ่มมากขึ้น 2 เท่า และเมื่อปลูกเชื้อราไมคอร์ไรซาหลังจากเชื้อราสาเหตุโรคแล้ว พบว่าเชื้อราไมคอร์ไรซาจะไปลดปริมาณของเชื้อราสาเหตุโรคให้ลดลง จนไม่พบ สันนิษฐานว่าเชื้อราไมคอร์ไรซาเข้าไปกระตุ้นให้กระบวนการ lignification ในพืชเพิ่มขึ้น

Ouimet *et al.* (1995) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราไมคอร์ไรซากับต้น sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) ในรัฐ Quebec ประเทศแคนาดา ที่เป็นโรค dieback ที่เกิดอาการ declining ซึ่งมีสาเหตุมาจากการขาดธาตุโปแตสเซียม ฟอสฟอรัสและ แคลเซียม พบว่าต้น sugar maple ที่เป็นโรคจะมีปริมาณใบร่วงมากกว่าต้นปกติถึง 10% และสีใบมีสีเหลือง ซึ่งเกิดจากการขาดธาตุโปแตสเซียม และเมื่อสำรวจรากในดินพบว่าดินรอบโคนต้นพืชปกติมีปริมาณเชื้อราไมคอร์ไรซามากกว่าต้นที่เป็นโรค พบว่าการเข้าไปอาศัยร่วมกับพืชของเชื้อราไมคอร์ไรซาจะลดน้อยลงเมื่อดินเป็นกรด สรุปได้ว่าเชื้อราไมคอร์ไรซาช่วยเพิ่มความเป็นด่างให้กับดิน อีกทั้งยังช่วยรักษาสมดุลแร่ธาตุภายในดิน

Schellenbaum *et al.* (1991) ทดลองปลูกต้นองุ่น (*Vitis vinifera* L.) ร่วมกับเชื้อ *Glomus fasciculatum* จากนั้นบันทึกการเจริญเติบโต และลักษณะรากที่ตัดปีที่ 2, 4, 6 และ 8 พบว่าต้นพืชจะสูงมากในตัดปีที่ 4 และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะราก โดยพบว่าจะมีตุ่มปมขึ้นรอบๆราก McArthur and Richard (1992) ได้แยกเชื้อ *Glomus fasciculatum* จากรากของ *Trifolium repens* แล้วนำไปปลูกกับมะเขือเทศ แล้วจึงเก็บรากตรวจดู พบว่ามะเขือเทศมีเชื้อราจะมีอัตราการเจริญที่มากกว่าต้นที่ไม่มีรา และเซลล์ที่มีเชื้อราไมคอร์ไรซาจะมีลักษณะบวม ใหญ่กว่าเซลล์ปกติ และพบว่าเชื้อราไมคอร์ไรซาสามารถเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่งโดยผ่านทาง cortical cell

Fester *et al.* (1999) ทำการปลูกเชื้อราไมคอร์ไรซา *Glomus intraradices* ในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) ในกระบะ และวัดปริมาณสาร bluenin และ 4-coumarylpatescine ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้าง พบว่าในรากที่มีอายุน้อยจะมีการสะสมสารดังกล่าว ที่บริเวณปลายรากมาก ในขณะที่รากจากต้นที่อายุหน่อยอาจไม่พบว่ามีสารดังกล่าว จากนั้นศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรากับเชื้อแบคทีเรีย โดยปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas fluorescence* และ *Rhizobium leguminosarum* ร่วมกับเชื้อรา พบว่าต้นบาร์เลย์ที่ปลูกด้วยแบคทีเรียก่อนเชื้อราจะมีปริมาณของเชื้อราในรากมากกว่าการปลูกพร้อมกัน หรือต้นที่ปลูกเชื้อราอย่างเดียว และต้นที่มีปริมาณเชื้อรามากยังมีการเจริญเติบโตที่สูงที่สุดอีกด้วย สรุปได้ว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ช่วยทำให้เชื้อราเข้าอาศัยในพืชได้ดียิ่งขึ้น อาจเนื่องมาจากความสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ทำให้เชื้อราที่เข้ามาที่หลังเข้าได้ง่ายขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Kaldorf และ Mullet (2000) ที่ปลูกเชื้อ *Glomus intraradices* ลงในข้าวโพด พบว่าต้นข้าวโพดที่มีไมคอร์ไรซาในรากฝอยมากกว่าต้นที่ไม่ได้ inoculate ด้วยราไมคอร์ไรซา และยังพบอีกว่าต้นที่ปลูกร่วมกับไมคอร์ไรซามีปริมาณของ indole-3-butyric acid (IBA) มากกว่า

Rincon *et al.* (2001) ทดลองปลูกเชื้อราไมคอร์ไรซา 7 ชนิดในต้น *Pinus pinea* L. ได้แก่ *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata*, *Melanogaster ambiguus*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon luteolus*, *R. roseolus* และ *Scleroderma verrucosum* คลุกเส้นใยของเชื้อ *H. crustuliniforme*, *L. laccata* และ *P. tinctorius* กับวัสดุปลูก (vermiculite : peat, 1:1) ในอัตราส่วน 1:4 1:8 1:32 และ 1:64 แล้วย้ายต้นกล้าอายุ 1 เดือนมาปลูก พบว่าเชื้อราทั้งสามสามารถอาศัยร่วมกับพืชได้มากกว่า 80% แต่ไม่ได้มีผลต่อลักษณะทางกายภาพ ทำ spore suspension ของเชื้อ *M. ambiguus*, *P. tinctorius*, *R. luteolus*, *R. roseolus* และ *S. verrucosum* ที่ความเข้มข้น 10^3 10^4 10^5 10^6 10^7 และ 10^8 spores / 175 ml พบว่า *Pinus pinea* L. ที่ปลูกร่วมกับ spore suspension ของเชื้อ *R. luteolus* และ *S. verrucosum* ที่ความเข้มข้น 10^3 และ 10^6 spores / 175 ml ตามลำดับ มีความสูงเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น และต้นที่ปลูกกับเชื้อทุกชนิดมีน้ำหนักแห้งน้อยกว่าชุดเปรียบเทียบ สรุปได้ว่าการที่เชื้อราไม่มีผลต่อ *Pinus pinea* L. เพราะวัสดุปลูกไม่เหมาะสมมีผลยับยั้งการทำงานของเชื้อราดังกล่าว

เชื้อราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ และการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis)

เมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็ก และไม่มีเอนโดสเปิร์มเพื่อสะสมอาหาร พบว่าเมล็ดกล้วยไม้ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดหนักแค่ 14 μg การงอกของเมล็ดเริ่มจากการดูดน้ำเข้าเมล็ด กระตุ้นให้เซลล์ที่ undifferentiated พัฒนาเป็น cotyledon และเมล็ดบวมจนแตกออก embryo จะเกิดการพัฒนามื่อได้

รับคาร์โบไฮเดรตจากภายนอก หรือถูกเข้าทำลายจากเชื้อราที่เหมาะสม บางชนิดยังต้องการวิตามิน หรือ growth factor อื่นๆในการงอก คาร์โบไฮเดรตดังกล่าวอาจอยู่ในรูป D-glucose, D-fructose และ sucrose พบว่า disaccharide trihalose ที่พบในเชื้อราและแมลงอาจมีความสำคัญต่อการงอก เชื้อราไมคอร์ไรซาสามารถสร้างเอนไซม์ cellulase และ pectinase ซึ่งสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลง คาร์โบไฮเดรตเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับพืชและเชื้อรา (Baber, 1968) ราไมคอร์ไรซาเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อชั้น cortex โดยเมื่อเข้าไปในเนื้อเยื่อจะสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า peloton ปกติเส้นใยจะเข้าไปในเซลล์รากโดยจะแทรกเข้าไปในเยื่อหุ้ม cytoplasm แต่ไม่ได้แทรก (penetrate) ผ่านเข้าไปโดยตรง เมื่อเชื้อราเข้าไปเจริญอยู่ (colonize) ในเซลล์จะมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์หนามากขึ้น และยังไปกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มของกระบวนการ metabolism ในเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเพิ่มการสร้างโปรตีน และจำนวนไรโบโซม เป็นผลให้ nucleus บวมใหญ่ขึ้น (Brock, 1984)

เชื้อไมคอร์ไรซาจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ metabolism โดยเมื่อเชื้อราเข้าสู่เซลล์ราก กล้วยไม้ จะกระตุ้นให้เซลล์รากสร้าง mitochondria และ endoplasmic reticulum มากขึ้น ใน nuclei ของเซลล์ที่มีเชื้อราจะมีปริมาณ DNA มาก Williamson และ Hadley 1969 (อ้างโดย Harley และ Smith, 1993) ได้ปลูกกล้วยไม้ *Dactylorhiza purpurella* และ *Spathoglottis plicata* ร่วมกับเชื้อรา *Tulasnella calospora* และตรวจดู nuclei ด้วยการย้อมสี Feulgen พบว่า nuclei ของเซลล์รากที่ถูก infect จะมีปริมาณ DNA มากกว่าเซลล์ปกติ 2-4 เท่า แต่ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดเมื่อ Alvarez 1968 (อ้างโดย Harley และ Smith 1993) พบว่าการที่เซลล์ที่ถูก infect มีปริมาณ DNA มากกว่าเพราะเกิด somatic doubling DNA ของแวนด้า

Mollison 1943 (อ้างโดย Harley และ Smith, 1993) ทำการทดลองใน *Goodyera repens* และ *Dactylorhiza purpurella* พบว่าไมคอร์ไรซาในเซลล์รากจะมีระยะเวลาการมีชีวิต และจะสลายไปเมื่อช่วงเวลาหนึ่ง ซึ่งมีวัฏจักรดังนี้

1. เส้นใยเชื้อราอาศัยอยู่ในเซลล์
2. เส้นใยเริ่มสืบแบบ แต่มันจะหนา
3. เส้นใยเริ่มสลายไปพร้อมกับไซโตพลาสซึมของเซลล์ราก การสลายของเส้นใยเกิดจาก defence reaction ของเซลล์รากเมื่อถูก infect โดยเชื้อรา หรือเพื่อตอบสนองบางอย่างที่ราผลิต เพราะพบว่าระหว่างที่เส้นใยสลาย จะมีการเพิ่มของ เอนไซม์ poly phenol oxidase
4. เชื้อราเกิด re-infection เข้ามาแทนที่

เมื่อเมล็ดกล้วยไม้งอกจะพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม จากนั้นกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ differentiation ได้ยอด และรากที่สมบูรณ์ เกิดเป็นต้นกล้วยไม้สมบูรณ์ในที่สุด

การศึกษาเชื้อไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้เริ่มจาก Reissek ในปี 1847 (อ้างโดย Hadley, 1982) ซึ่งสามารถแยกเชื้อราจากกล้วยไม้ไม่ได้สำเร็จ แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อราได้ ต่อมาปี 1909 Wachtlich (อ้างโดย Hadley, 1982) พบเซลล์รากที่มีเชื้อราอยู่ในเซลล์ และเรียกเซลล์ดังกล่าวว่า digestion cell การค้นพบที่สำคัญคือการค้นพบของ Bernard ในปี 1909 (อ้างโดย Hadley, 1982) ศึกษาในกล้วยไม้ดิน (terrestrial orchid) พบว่าเชื้อไมคอร์ไรซาเป็นราสกุล *Rhizoctonia* หลายชนิด เช่น *R. mocoroides*, *R. repens* และ *R. lanuginosa* นอกจากนี้ยังมีเชื้อราอื่นๆ เช่น *Corticium catonin* และพบว่าเมล็ดกล้วยไม้จะสามารถงอกได้โดยอาศัยเชื้อราที่เหมาะสม โดยเชื้อราดังกล่าวจะช่วยส่งเสริมธาตุอาหารกับกล้วยไม้ ในปี 1909 Bergeff (อ้างโดย Hadley, 1982) สามารถแยก และตั้งชื่อเชื้อราหลายชนิดที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ อาทิ *Armillaria*, *Gastrodia*, *Galeola*, *Hymenochaeta* และได้ทดลองความสัมพันธ์ของเชื้อรากับกล้วยไม้อีกหลายชนิด พบว่าเชื้อไมคอร์ไรซาไม่ได้จำเพาะเจาะจงกับกล้วยไม้ พบว่าในกล้วยไม้หนึ่งชนิด อาจมีไมคอร์ไรซามากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Hadley (1970) ที่ทดลอง cross-inoculation พบว่าเชื้อราหลายชนิด สามารถเข้าทำลายการเจริญ และกระตุ้นอัตราการเจริญของกล้วยไม้ *Dactylorhiza purpurella* ได้

ในการทดลองของ Purves และ Hadley (1975) ที่ปลูกกล้วยไม้ *Dactylorhiza purpurella* และ *Goodyera repens* ในสภาพที่ขาดธาตุอาหาร อุณหภูมิต่ำ และปลูกร่วมกับไมคอร์ไรซา พบว่ากล้วยไม้สามารถเจริญได้ดีเมื่อปลูกร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซา แม้ว่าจะอยู่ในสภาพอุณหภูมิต่ำ และขาดธาตุอาหารก็ตาม นอกจากนี้พบว่าต้นกล้วยไม้ที่ไม่มีไมคอร์ไรซา มีการเจริญเติบโตช้า Hadley และ Willaim (1972) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อไมคอร์ไรซากับ *Spathoglottis plicata* พบว่าหลังถูกเชื้อเข้าอาศัยในราก nucleus จะมีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากการที่ไมคอร์ไรซาไปเร่งกระบวนการ metabolism ให้เกิดการเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนจึงมีการเพิ่มจำนวนของจำนวน ribosome และ endoplasmic reticulum

Stoutamire (1974) พบว่าโดยทั่วไปการพัฒนาจากโปรโตคอร์ัมไปเป็นยอด ราก สร้างคลอโรฟิลล์จนเป็นต้นกล้วยไม้ที่สมบูรณ์ จะใช้เวลาหลายเดือนหรือหลายปีเมื่อเลี้ยงแบบ asymbiotic culture ในขณะที่การเลี้ยงแบบ symbiotic culture จะใช้เวลาแค่ 2-3 สัปดาห์เท่านั้น เพราะการที่ไมคอร์ไรซาเข้าอาศัยในพืชช่วยเร่งการเจริญเติบโต การเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ ในขณะที่กล้วยไม้ที่ไม่มีไมคอร์ไรซาจะมีกระบวนการดังกล่าวไม่สมบูรณ์

เชื้อไมคอร์ไรซาอยู่ได้โดยอาศัยธาตุอาหาร เช่น จากสารอินทรีย์ในกลุ่มสารประกอบไนโตรเจน เช่น Asparagine, Glycine และ Urea ไมคอร์ไรซาบางชนิดเป็นเชื้อราที่พบในดิน เช่น

Rhizoctonia goodyarae, *Tulasnella colospora* ใหม่ๆ ที่กล้วยไม้บางชนิดที่มีราเหล่านี้เป็นกล้วยไม้
อากาศ (epiphytic orchid) ซึ่งไม่ได้ปลูกในดิน (Hadley, 1982)

การเข้าสู่พืชของเชื้อรา (infection) ไม่ใช่กระบวนการที่ก่อให้เกิดการงอกของเมล็ดโดยตรง
กระบวนการเจริญบางอย่างของ embryo cell เกิดขึ้นก่อนการแทรกของเชื้อรา กระบวน
การ infection จะถูกควบคุมโดยพืชให้เชื้อราเข้าสู่พืชที่ตำแหน่งที่เหมาะสม สำหรับกล้วยไม้เขต
ร้อนส่วนมาก เชื้อไมคอร์ไรซาเข้าผ่านทาง รากขน (root hair) Williamson และ Hadley (1970)
ทดลองปลูกเชื้อ *Rhizoctonia* หลายสปีชีส์ร่วมกับกล้วยไม้ *Dactylorhiza purpurella* พบว่าเชื้อรา
ทุกไอโซเลทจะเข้าสู่กล้วยไม้ผ่านทางรากขน เริ่มจากการเกิดเส้นใยเข้าไปสัมผัสรากอยู่ 15 ชั่วโมง
จากนั้นปลายเส้นใยจะเกิดโครงสร้างที่เรียกว่า peg แทะผ่านผนัง ซึ่งการผ่านผนังอาจทำได้ง่ายขึ้น
เพราะเชื้อราสร้างเอนไซม์ย่อยผนัง หรืออาจเป็นจากเอนไซม์ที่กล้วยไม้สร้างขึ้นเองเพื่อตอบสนอง
ต่อการเข้าของเชื้อรา จากนั้นเชื้อราจะเข้าไปยังช่อง lumen ของเซลล์ โดยเซลล์จะยังคงความมี
ชีวิตอยู่ใน 30-40 ชั่วโมงต่อมาจึงจะพบ peloton ภายในเซลล์ ผ่านไป 2-3 วันเซลล์จะขยายขนาด
ใหญ่ขึ้น ซึ่งเป็นผลแรงจากกระบวนการ metabolism เมล็ดพัฒนาออกเป็นโปรโตคอร์ม นอกจากนี้
เชื้อรายังกระตุ้นให้เกิดการ hydrolysis แป้งที่สะสมในโปรโตคอร์ม ทำให้ปริมาณแป้งลดลงไป

ในปี 1911 Bernard (อ้างโดย Hadley, 1982) พบว่าในหัว *Loraglossum* มีการสร้างสารบาง
ชนิด ซึ่งเป็นสาร phytoalexin เรียกสารดังกล่าวว่า orchinol ในปี 1959 Gattmann และ Kern (อ้าง
โดย Hadley, 1982) พบว่าการสร้างสาร orchinol เป็นการตอบสนองการเข้าของเชื้อรา ราก
กล้วยไม้สามารถผลิตสารฆ่าเชื้อราได้เช่นกัน แต่อยู่ในปริมาณน้อย สำหรับสารดังกล่าวสามารถ
ต่อต้านเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น *Rhizoctonia solani*, *Tusarum solani* ในกรณีของเชื้อรา *R. solani*
เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด แต่สามารถอาศัยอยู่ร่วมกับกล้วยไม้แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและ
กันได้

ความสัมพันธ์ของเชื้อรากับกล้วยไม้สามารถสรุปได้ดังนี้

1. การเคลื่อนที่ธาตุอาหารจากเชื้อราสู่ภายนอกเพื่อกล้วยไม้ เชื้อไมคอร์ไรซา
สามารถช่วยเคลื่อนย้ายสารประกอบที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้นมาสู่ภายนอก ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อต้น
กล้วยไม้ Hijner และ Arditti (1973) พบว่าเชื้อรา *Rhizoctonia* สร้าง niacin ซึ่งเป็นวิตามินที่
กระตุ้นให้เกิดการงอก และการเจริญของเมล็ดกล้วยไม้ จากการศึกษาของ Harvais และ Raitsakas
(1975) ทำการปลูกกล้วยไม้ร่วมกับเชื้อ *Rhizoctonia solani* ในอาหารที่มีปริมาณธาตุอาหารจำกัด
พบว่าเชื้อราดังกล่าวสร้าง glutamine, glutamic acid, aspartic acid สร้างและสะสมในเส้นใย โดย
ไม่ได้ปล่อยลงในอาหารใน 2 สัปดาห์แรกและเมล็ดกล้วยไม้ไม่มีการงอก หลังจากนั้นมีการของ

เมล็ด และเมื่อตรวจสอบอาหารพบ thiamine และ nicotinic acid ซึ่งสรุปว่าเชื้อราดังกล่าวปลดปล่อยในอาหาร

2. การเคลื่อนย้ายธาตุอาหารสู่กล้วยไม้ด้วยเชื้อไมคอร์ไรซา เชื้อไมคอร์ไรซาสามารถย่อยสลาย complex carbohydrates และในขณะเดียวกันยังดูดซึม hydrosates ร่วมกับธาตุอาหาร อื่นๆ แล้วส่งไปยังเนื้อเยื่อพืช ซึ่งได้จากการทดลองของ Smith ในปี 1966 (อ้างโดย Hadley, 1982) ซึ่งปลูกกล้วยไม้ *Dactylorhiza purpurella* ร่วมกับเชื้อ *Rhizoctonia repens* ในอาหารที่มีคาร์บอน และ ฟอสฟอรัส จากนั้นตรวจสอบปริมาณของ ^{14}C และ ^{32}P ในต้นกล้วยไม้ พบว่าเชื้อ *Rhizoctonia repens* สามารถเคลื่อนย้ายสารประกอบทั้งคู่สู่โปรโตคอร์มกล้วยไม้ได้

3. เชื้อราได้รับธาตุอาหารจากกล้วยไม้ ขณะที่กล้วยไม้มีการงอก มีการปลดปล่อยธาตุอาหารและวิตามินบางชนิด ซึ่งอาจมีผลช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อรา เช่นในเส้นใยของเชื้อไมคอร์ไรซาได้รับคาร์โบไฮเดรตจากกล้วยไม้ Hadley และ Purves (1974) ซึ่งปลูกกล้วยไม้ *Goodyera repens* ร่วมกับเชื้อรา *Ceratobasidium cornigerum* ในอาหารวุ้นที่ไม่มีธาตุอาหาร (water agar :WA) พบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ในอาหารเพราะได้รับธาตุอาหารที่ปลดปล่อยจากกล้วยไม้

Dearnaley and McGee (1996) ได้ศึกษาเชื้อไมคอร์ไรซาในกล้วยไม้ พบว่าเชื้อราดังกล่าวเป็น endomycorrhiza อาจพบได้ทั้งในราก ลำต้น เมล็ดที่งอกใหม่ โดยเชื้อไมคอร์ไรซาจะสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า coil หรือ peloton ในเนื้อเยื่อกล้วยไม้ชั้น cortex และในขณะที่เชื้อเข้าสู่กล้วยไม้ ชั้น plasma membrane จะเกิด invagination สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และยังทำให้ microtubule เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเนื่องจากการเกิด depolymerisation ซึ่งมีผลทำให้ความหนืดของ cytoplasm ในเซลล์ลดลง และทำให้การเคลื่อนที่ของ organelle และของเหลวในเซลล์ลดลงด้วย

Umata (1997) เก็บฝักกล้วยไม้ *Erythrorchis ochobiensis* จากเกาะ Kogashima ประเทศญี่ปุ่น นำฝักมาทำให้แห้ง แยกเมล็ดมาเลี้ยงในอาหารร่วมกับเชื้อราที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ *E. ochobiensis*, *Loweporus tophroporus*, *Microporus affinis*, *Eeythromyces crociareas*, *Ganoderms australe* และ *Phellinus* sp. เปรียบเทียบกับเมล็ดที่เพาะโดยไม่มีเชื้อรา พบว่าเมล็ดที่เพาะร่วมกับเชื้อรามีเปอร์เซ็นต์การงอกที่สูงกว่า และในเดือนที่ 4 ต้นกล้าที่ปลูกร่วมกับเชื้อราจะมีการเจริญเติบโตที่มากกว่า และพบว่ารากกล้วยไม้แต่ละชนิดอาจแยกเชื้อราได้มากกว่า 1 ชนิด

การจำแนกเชื้อราโดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์DNA

การจำแนกและพิสูจน์ชนิดของเชื้อราโดยวิธีการทางด้านลายพิมพ์ของอนุโมเลกุล (molecular fingerprinting) เป็นสิ่งจำเป็น (Bounou *et al.*, 1999) เนื่องจากการใช้ลักษณะสัณฐานของโคโลนี และเส้นใยของเชื้อรายังมีปัญหาในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อรา โดยเฉพาะเชื้อราที่เป็น *Mycelia sterilia* เช่น ราในจีนัส *Rhizoctonia* ได้มีการพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมโดยใช้DNA ได้แก่ restriction fragment length polymorphisms (RFLP) และ random amplified polymorphic DNAs (RAPD) การใช้ RFLP markers ประสบผลสำเร็จในการตรวจพิสูจน์เชื้อราหลายชนิด แต่ยังเป็นวิธีการที่เสียค่าใช้จ่ายสูง เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการปฏิบัติงานต้องมีเพียงพอ (พรพันธ์, 2538) สำหรับ RAPD markers มีรายงานครั้งแรกว่าเป็นลายพิมพ์DNA โดย Williams *et al.* (1990) และ Welsh and McClelland (1990) เทคนิคนี้มีชื่อเรียกแบบอื่นได้อีก คือ AP – PCR หรือ arbitrariness primer polymerase chain reaction (Welsh and McClelland, 1990) DAF หรือ DNA amplification fingerprinting (Caetano-Anolles *et al.*, 1991) และ Mapp หรือ multiple arbitrariness amplicon profiling แต่ละเทคนิคที่เรียกนี้มีชื่อแตกต่างกันบ้างในด้านขนาด primer ที่ใช้ แต่โดยหลักการไม่แตกต่างกันคือ ใช้ primer ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวใน polymerase chain reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณDNAแบบสุ่ม (สุรินทร์, 2540) จึงมีการนำ RAPD markers มาใช้ในการพิสูจน์จุลินทรีย์ และพันธุ์พืชมากมาย การจำแนกกลุ่มของเชื้อราไมคอร์ไรซาขึ้นกับ ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ ชนิดของพืชอาศัย วงจรชีวิต ซึ่งทำให้มีการจำแนกที่ค่อนข้างสับสน เนื่องจากเชื้อราไมคอร์ไรซามีสมาชิกมากถึงกว่า 6,000 สปีชีส์ ซึ่งเป็นราใน zygomycete, ascomycete และ basidiomycete จึงมีการนำวิธีการวิเคราะห์ลายพิมพ์DNAมาใช้ในการจำแนก โดยเฉพาะเทคนิค Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) โดยอาศัยการสุ่มลำดับ nucleotide สั้นๆ เพื่อหาลำดับเบส ซึ่งช่วยให้สามารถจำแนกถึงมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอย่างใกล้ชิดออกจากกันได้ การจำแนกความเหมือน และต่างของเชื้อราโดยวิธี RAPD เป็นวิธีการที่ใช้ค่าใช้จ่ายน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี RFLP

พิศสุวรรณ, 2540 ได้สรุปปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำ PCR-RAPD ไว้ดังนี้

1. DNA ต้นแบบ (template DNA) ใช้ความเข้มข้นของ DNA น้อยมาก ประมาณ 10-20 นาโนกรัม
2. primer ซึ่งเป็นDNAสายสั้นๆ สายเดี่ยวที่สังเคราะห์ขึ้น มีขนาดสั้นยาว ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของงานวิจัย ในกรณีของเทคนิค RAPD จะมีเบสเพียง 10 mers โดยลำดับเบสของ primer ควรสอดคล้องกับDNAต้นแบบมากที่สุด เพื่อให้เกิดให้

การจับคู่กันเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ ใช้ในความเข้มข้น 10-100 พิโคโมล บนสาย primer ควรมีเบส G และ C รวมกัน 50% ขึ้นไป

3. enzyme DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Escherichia coli* เช่น DNA polymerase I และ Klenow fragment และมักเสื่อมคุณภาพเนื่องจากต้องผ่านอุณหภูมิสูงถึง 95°C ในขั้นตอน denaturation ของการทำ PCR จึงมีการค้นคว้าหาเอนไซม์ชนิดทนความร้อนสูงได้นาน และยังคงเร่งปฏิกิริยาได้ เอนไซม์ดังกล่าวคือ Taq DNA Polymerase ที่ได้จากแบคทีเรียน้ำพุร้อน *Thermus aquaticus* และเอนไซม์ตัวอื่นๆ ที่ใช้คือ *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Thermococcus litoralis*

Simon *et al.* (1992) ได้จำแนกเชื้อ arbuscular mycorrhizas โดยอาศัย small subunit ของ rRNA ซึ่งทำให้ได้ complete sequence ของ 18S ของเชื้อรา *Glomus intraradices* และ *G. margarita* ต่อมาสามารถได้ลำดับเบสของเชื้อ AM อื่นๆ อีก 12 isolate และทำ phylogenetic relationship ด้วย ต่อมา Sanders *et al.* (1995) ได้พัฒนาวิธีการโดยใช้ primer ITS1 และ ITS4 ใช้เทคนิค RFLP จำแนกเชื้อรา AM โดยอาศัย ความต่างของลำดับเบสใน ITS region พบว่าสามารถสร้าง pattern ของ *Glomus* group ที่แตกต่างกันถึง 10 แบบ Haudek *et al.* (1996) ทำการรวบรวมเชื้อราในประเทศไทย 10 ชนิด และจัดกลุ่มตามลักษณะลักษณะสัณฐานวิทยาได้ ดังนี้ *Amanita muscaria*, *A. porphyria*, *A. rubescens*, *Boletus edulis*, *B. aerens*, *B. erythropus*, *B. calopus*, *Lactarius deterrimus*, *L. deliciosus*, *L. porninsis* และ *L. scrobiculatus* จากนั้นทำการแยก DNA และวิเคราะห์ด้วยวิธี RAPD โดยใช้ M13 primer (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), (GTG)₅, (GACA)₄, V1 primer (5'-ACGGTCTTGG-3') และ V5 primer (5'-TGCCGAGCTG-3') พบว่าเชื้อราทั้ง 17 isolate สามารถแยกเชื้อราเป็น 3 จินัส คือ *Scraphila*, *Boletus* และ *Lactarius* ซึ่งสอดคล้องกับการแยกด้วยลักษณะลักษณะสัณฐานวิทยา แต่พบว่ามีเชื้อราบางไอโซเลทที่ไม่สามารถจัดรวมกลุ่มกับเชื้อราอื่นๆ ได้

Schilling *et al.* (1996) ตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* และ *F. avenaceum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค foot rot และ head blight ของเมล็ดธัญพืชและพืชตระกูลหญ้า จำนวน 15 ไอโซเลท และพืชอื่นๆ จำนวน 9 ไอโซเลท โดยนำเส้นใยของเชื้อรามาสกัด DNA ตามวิธีการของ moller และคณะ (อ้างโดย Schilling *et al.*, 1996) จากนั้นนำ DNA ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ primer OPT 18 และ UBC 85 ตามวิธี RAPD ของ Williams และคณะ (อ้างโดย Schilling *et al.*, 1996) และทำการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ตำแหน่ง ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ของเชื้อรา *F. culmorum*, *F. graminearum* และ *F. avenaceum* อย่างละ 2 ไอโซเลท ใช้

primer 2 primers ได้แก่ I5 และ I4 พบว่าเชื้อราแต่ละไอโซเลทมีความแตกต่างกัน โดยเชื้อรา *F. culmorum* จะให้ผลของ PCR เป็นแถบ DNA ประมาณ 470 bp ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย primer OPT 18 และ *F. graminearum* ให้แถบ DNA ขนาด 410 bp ได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย primer UBC 85 ส่วนเชื้อรา *F. avenaceum* ไม่พบแถบ DNA เมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA ตรงตำแหน่ง ITS regions เพื่อหาความแตกต่างกันของ *Fusarium* spp. พบว่าแต่ละไอโซเลทของเชื้อรา *F. culmorum* (CB5251.52), *F. graminearum* (CB5389.62) และ *F. avenaceum* จะได้แถบ DNA ขนาดประมาณ 570, 570 และ 600 bp ตามลำดับ ดังนั้นเทคนิค RAPD-PCR สามารถจำแนกเชื้อราดังกล่าวได้ ในปีเดียวกัน Fraissinet *et al.* (1996) ได้ตรวจสอบเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิดจำนวน 6 ไอโซเลท โดยนำเส้นใยมาสกัด DNA จากนั้นนำ DNA ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ primer A 5' ACGGTACACT 3', primer B 5' TTGTCCCTGC 3', primer C 5' CTGATGCTAC 3' และ primer D 5' TGGTCACTGA 3' พบว่า primer B สามารถปรากฏแถบ band ที่แตกต่างกันสำหรับเชื้อราแต่ละไอโซเลท ซึ่งทำให้แยกเชื้อราได้เป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 คือไอโซเลทที่ S5, S17 และ S34 กลุ่มที่ 2 คือไอโซเลทที่ S6 กลุ่มที่ 3 คือไอโซเลทที่ S16 และกลุ่มที่ 4 คือไอโซเลทที่ S30 ซึ่งกลุ่มของไอโซเลทที่แยกได้สอดคล้องกับแหล่งที่มาของเชื้อ จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเทคนิค RAPD-PCR สามารถจำแนกความต่าง และเหมือนของเชื้อรา *S. sclerotiorum* ไอโซเลทต่างๆ ได้

Overmayer *et al.* (1996) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *Cylindrocladium scoparium* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรค damping-off, root rot, stem lesion, stem canker, stem dieback, stunting และ leaf spot กับพืช *Eucalyptus* และ *Rhododendron* spp. ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความหลากหลายทางลักษณะพื้นฐาน ลักษณะโคโลนี การสร้างโคนิเดีย การสร้างรงควัตถุ อัตราการเจริญ และความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบทางชีวโมเลกุลโดยเทคนิค RAPD-PCR ทำการรวบรวมเชื้อราทั้งหมด 20 ไอโซเลท โดยแยกได้จากพืชอาศัยคือ *Calluna vulgaris*, *Erica gracilis*, *Leucothea catesbaei*, *Monania baetzi*, *Rhododendron simsii* และ *Rosa spec* ทำการสกัด DNA แยกและวิเคราะห์ DNA ใช้ primer OPE02 5' GGTGCGGGAA 3' primer OPE03 5' CCAGATGCAC 3' primer OPE04 5' GTGACATGCC 3' primer OPE07 5' AGATGCAGCC 3' primer OPE14 5' TGCGGCTGAG 3' พบว่า primer OPE03 และ OPE04 สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราแต่ละไอโซเลทต่างๆ ได้ดี พบว่าไอโซเลท CS4 และ CS22 ซึ่งแยกได้จาก *Rhododendron simsii* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับไอโซเลท CS17 และ CS16 ที่แยกได้จาก *Erica gracilis* จากนั้นนำไปสร้าง phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราดังกล่าวออกได้ 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่แยกจาก *Calluna vulgaris* กลุ่มที่แยกจาก *Rhododendron*

และ *Erica* กลุ่มที่แยกจากพืชอื่นๆ โดยในกลุ่มที่แยกจาก *Rhododendron* และ *Erica* พบว่าเชื้อรา มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แม้ว่าแยกได้จากพืชอาศัยต่างชนิดกัน ซึ่งการทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจะเป็นประโยชน์พื้นฐานในการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อรานี้ได้ต่อไป

Udapa *et al.* (1998) ได้เก็บเชื้อรา *Ascochyta rabiei* สาเหตุโรค ascochyta blight จากพืช chickpea 53 isolate ในประเทศเลบานอน สกัด DNA โดยใช้ CTAB method ใช้ primer 14 ชนิด พบว่าสามารถแยกเชื้อราทั้ง 53 isolate ได้เป็น 22 กลุ่ม ซึ่งกลุ่มเชื้อราที่แยกได้สอดคล้องกับระดับอาการของโรคที่แสดงออกมากคือ susceptible moderately และ highly resistant ซึ่งการทดลองนี้สามารถใช้เป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือkdต้นต้านทานต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่า RAPD เป็นวิธีที่เหมาะสมในการจำแนกความหลากหลายของตัวอย่างที่มีจำนวนมากๆ ในปีเดียวกัน Junghans *et al.* (1998) ทำการตรวจสอบความหลากหลายของเชื้อรา *Pisolithus tinctorius* ซึ่งเป็นเชื้อรา ectomycorrhiza ที่พบมากในพืช *Rhododendron* และ *Erica* ซึ่งเชื้อรา มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก ลักษณะโคโลนี, อัตราการเจริญ, กิจกรรมการผลิต phytohormone, ระดับของอุณหภูมิที่ต้องการเพื่อการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ, ความสามารถในการเกิด mycorrhiza จากการจำแนกเชื้อราดังกล่าวโดยอาศัยเทคนิค RAPD-PCR ทำการแยกเชื้อราจากพืชทั้งสองชนิดทั้งหมด 20 ไอโซเลต และตรวจสอบโดยใช้ primer OPAG03, 04, 06, 07, 08, 09, 11, 13, 14, 15, 17, 18 และ 20 พบว่า primer OPAG03 สามารถ amplified ได้ดีที่สุด โดยจะได้แถบ DNA ขนาดประมาณ 320-2900 bp และสามารถแยกเชื้อราทั้งหมดเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่แยกได้จาก *Rhododendron* และกลุ่มที่แยกได้จาก *Erica*

Bounou *et al.* (1999) รายงานว่าการศึกษาเชื้อรา *Rhizoctonia solani* AG-3 และ Ags ที่เข้าทำลายมันฝรั่งในประเทศสหรัฐอเมริกา และแคนาดา โดยใช้เทคนิค PCR ทำการแยกเชื้อรา *R. solani* จำนวน 62 ไอโซเลต โดยนำเส้นใยของเชื้อราจากหัวมันฝรั่งที่เป็นโรค 20-60 มิลลิกรัม มาสกัด DNA ตามวิธีการของ Tai and Tanksley (อ้างโดย Bounou *et al.*, 1999) และดินที่ปลูกมันฝรั่ง 5 กรัม มาสกัด DNA ตามวิธีการของ Volossiuk (อ้างโดย Bounou *et al.*, 1999) จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ primer แบบสุ่มที่มีความยาว 10 mers จะได้ชิ้นส่วน DNA ที่มีความยาว 2-5 kbp และจะเกิดเฉพาะกับ AG-3 isolate และเมื่อนำ DNA ของเชื้อราดังกล่าวมาเพิ่มปริมาณโดยใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจงคือ SBU-177 และ SBL-336 แล้วนำผลผลิต DNA ที่สังเคราะห์ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะคือ XhoI พบว่า AG-3 จะให้ผลแตกต่างจาก Ags การวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเจาะจง และแม่นยำ ในปีเดียวกัน Schena *et al.* (1999) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และการควบคุมโรคของเชื้อรา *Aureobasidium pullulans* ซึ่งเป็นเชื้อรา endophyte ที่พบในผัก และผลไม้หลายชนิด และมีผลควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ

Penicillium digitatum, *Botrytis cinera*, *Aspergillus niger* และ *Rhizopus stolonifer* โดยแยกเชื้อ *A. pullulans* จากผิวผลไม้ และผักหลายชนิด จำนวนทั้งหมด 41 ไอโซเลท ทำ RAPD-PCR โดยใช้ primer OPD20 5' ACCCGGTCAC 3' พบว่าเชื้อราดังกล่าวมีความหลากหลายทางชีวภาพ มีแค่ 3 ไอโซเลทที่มีลักษณะแถบปรากฏที่เหมือนกัน คือ L47, L198 และ LS236 และอีกกลุ่มคือ LS379 และ LS380 ซึ่งพบว่าไอโซเลทที่มีลักษณะแถบเหมือนกันจะมี biocontrol activity ที่เหมือนกัน แม้ว่าเทคนิค RAPD-PCR สามารถจำแนกความเหมือน หรือต่างของเชื้อราในสปีชีส์ที่ต่างกันได้ แต่ไม่สามารถจำแนกความต่างภายในสปีชีส์ได้

จากรายงานของ Yamato (2001) ซึ่งแยก DNA จากส่วนยอด และราก ของพืช *Scraphila tosaensis* โดยใช้ cetyltrimethylammonium bromide, phenol/chloroform extraction และ isopropanol precipitation ทำ PCR โดยใช้ SS38 และ NS 21 primer จากนั้นนำ product ที่ได้มา re-amplified ด้วย VANS1 primer ซึ่งเป็น primer ที่จำเพาะกับเชื้อรา *Glomus*, VAACAU จำเพาะกับเชื้อรา *Acaulospora* และ *Enterophosphora*, VAGIGA จำเพาะกับเชื้อรา *Gigaspora*, *Scutellospora* พบว่า DNA จะ amplified ใน VANS1 primer ซึ่งสรุปได้ว่าเชื้อราที่มีในราก *Scraphila tosaensis* เป็นราในจีนัส *Glomus* และเป็นเชื้อราที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัย ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเชื้อราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ที่เป็น intracellular hyphae coil จากการศึกษารูปร่างของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* AG-3 isolates ที่เข้าทำลายมันฝรั่งในประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา Bounou *et al.* (1999) ใช้เทคนิค PCR ทำการแยกเชื้อรา *R. solani* จำนวน 62 ไอโซเลท โดยนำเส้นใยจากหัวมันฝรั่งที่เป็นโรค 20-60 มิลลิกรัม มาสกัด DNA ตามวิธีการของ Tai & Tanksley (อ้างโดย Bounou *et al.*, 1999) และใช้ดินที่ปลูกมันฝรั่ง 5 กรัม มาสกัด DNA ตามวิธีการของ Volossiouk (อ้างโดย Bounou *et al.*, 1999) จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี RAPD โดยใช้ primer แบบสุ่มที่มีความยาว 10 mers ซึ่งได้ชิ้นส่วนของ DNA ที่มีความยาว 2-5 kbp และเกิดเฉพาะกับ AG-3 isolate ซึ่งชิ้นส่วน DNA ที่ได้นี้สามารถใช้เป็น DNA คัดตาม โดยนำมา hybridization กับ DNA ของเชื้อราได้ และเมื่อ DNA ของเชื้อราดังกล่าวมาเพิ่มปริมาณด้วยวิธีการ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจงคือ SBU-177 และ SBL-336 แล้วนำผลผลิต DNA ที่สังเคราะห์ได้นี้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะคือ *XhoI* พบว่า AG-3 isolate จะได้ผลแตกต่างกับ Ags ของเชื้อรา *R. solani*