ประชากรราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในพื้นที่ปลูกสับปะรด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดเพชรบุรี

Community of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Pineapple Planting Areas at Prachuap Khiri Khan and Phetchaburi Provinces

บุณฑริก ฉิมชาติ[1] กนกอร บุญพา[1] สนธยา ขำติ๊บ[1] และธวัชชัย อินทร์บุญช่วย[2*]

Boontarik Chimchart[1], Kanokon Bunpha[1], Sontaya Khamtib[1] and Tawatchai Inboonchuay[2*]

Received: January 19, 2023

Revised: February13, 2023

Accepted: February 21, 2023

Abstract: This research focuses on the variety of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) at pineapple field in Prachuap Khiri Khan and Phetchaburi province to increase soil nutrient availability and reduce chemical fertilizer rate. Composite soil samples from 5 pineapple field were analyzed for soil chemical properties and classified for AMF. The result showed that soil texture was different in all fields such as clay, sandy loam, sandy clay loam and loamy sand. The quantity of spore at site 3 was highest (2.48 spores/gram soil) and site 4 and 5, the least number of spores were found (0.11 and 0.13 spores/gram soil). The 5 AMF species were classified in pineapple planting area, more varieties were found in site 1 than other sites such as *Paraglomus brasillianum*, *Septoglomus constrictum* and *Acaulospora spinosa*, respectively. In the other sites only *Acaulospora mellea* and *Paraglomus occultum* were found. Organic matter affected the quantity of AMF. Meanwhile, soil texture and nutrient content affected to variety of AMF.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza, Classification, Pineapple

บทคัดย่อ: การวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาความหลากหลายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ในพื้นที่ปลูกสับปะรด จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ จ.เพชรบุรี เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชและลดการใช้ปุ๋ยเคมี โดยเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกสับปะรด จำนวน 5 แปลง นำมาวิเคราะห์ทางเคมีและจำแนกชนิดรา พบว่าเนื้อดินแตกต่างกัน เป็นดินเหนียว ดินร่วนทราย ดินร่วนเหนียวปนทราย และดินทรายปนร่วน นับจำนวนสปอร์ พบว่าในแปลงที่ 3 มีจำนวนประชากรของราสูงที่สุด (2.48 สปอร์ต่อดินแห้ง 1 กรัม) ในแปลงที่ 4 และ 5 พบสปอร์จำนวนน้อยที่สุด (0.11 และ 0.13 สปอร์ต่อดินแห้ง 1 กรัม) ในการจำแนกชนิดราสามารถจำแนกได้ 5 ชนิด แปลงที่ 1 มีความหลากหลายมากกว่าแปลงอื่น พบราทั้งหมด 3 ชนิดๆ ที่พบมากที่สุด ได้แก่ รา *Paraglomus brasillianum* รองลงมา คือ *Septoglomus constrictum* และ *Acaulospora spinosa* ในขณะที่แปลงที่เหลือพบคล้ายกัน ได้แก่ *Acaulospora mellea* และ *Paraglomus occultum* สรุปได้ว่าจำนวนประชากรจะขึ้นอยู่กับปริมาณอินทรียวัตถุ ส่วนความหลากหลายขึ้นอยู่กับเนื้อดินและปริมาณธาตุอาหาร

คำสำคัญ: ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา, การจัดจำแนก, สับปะรด

[1] กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

[1] Soil Science Research Group, Agricultural Production Science Research and Development Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900, Thailand

[2] ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม 73140

[2] Department of Soil Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom, 73140.

* Corresponding authorl: fagrtci@ku.ac.th

คำนำ

ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Arbuscular Mycorrhizal Fungi: AMF) เป็นราที่พบทั่วไปในดิน อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ได้ประโยชน์ร่วมกันโดยไม่ทำอันตรายต่อพืชอาศัย (พักตร์เพ็ญ, 2556) สามารถช่วยเพิ่มการดูดซับธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน และจุลธาตุ รวมไปถึงช่วยทำให้พืชมีชีวิตรอดภายใต้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพิ่มความทนทานของพืชในสภาวะแห้งแล้ง ตลอดจนช่วยเพิ่มความต้านทานโรคพืชบางชนิด ในขณะที่ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้รับสารอาหารจากการสังเคราะห์แสงของพืชผ่านทางระบบราก เช่น แป้ง น้ำตาล โปรตีน วิตามินต่างๆ (Schenck, 1981)

ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซานั้น สามารจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์เป็นหลัก ซึ่งลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก เช่น การพัฒนาของสปอร์ รูปร่าง ขนาด ลักษณะลวดลายชั้นผนังของสปอร์ เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) มาใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนก ทำให้มีการจำแนกใหม่อยู่ใน Phylum Glomeromycota, Class Glomeromycetes (Redecker *et al*., 2013) Lee *et al*. (2013) สามารถจำแนกราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาใน genera ต่างๆ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 240 species ซึ่งถ้านำเทคนิค PCR เข้ามาช่วยจะสามารถจำแนกราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้เพิ่มมากขึ้นและทำให้เกิดความเข้าใจที่ชัดเจนยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซานั้นจะสัมพันธ์กับชนิดของพืช คุณสมบัติต่างๆ ของดิน เช่น ความเป็นกรด-ด่างของดิน (soil pH) ความพรุนของดิน (soil porosity) ธาตุอาหารในดิน (soil nutrients) อุณหภูมิของดิน ปริมาณน้ำฝน ความชื้นในดิน และจุลินทรีย์ในดิน เป็นต้น

ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซานั้นจะอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยกันโดยสร้างเส้นใยภายในรากและรอบๆ รากแขนงเพื่อเพิ่มพื้นที่ของรากในการดูดซับธาตุอาหาร โดยเฉพาะธาตุฟอสฟอรัส ทำให้พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Marx, 1973) ในประเทศไทยนั้นได้เริ่มมีการสำรวจความหลากหลายและการจำแนกชนิดราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา นภาพร และจรัสลักษณ์ (2560) ได้ทำการคัดแยกราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในแปลงพริกไทย เมื่อนำมาจัดจำแนกสปอร์ออกเป็นกลุ่ม โดยอาศัยขนาด รูปร่าง และสีของสปอร์ได้ทั้งหมด 5 สกุล คือ *Glomus, Acaulospora, Septoglomus, Racocetra* และ *Gigaspora* สุภาพร และคณะ (2549) ได้ใช้ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา สายพันธุ์ *Glomus mosseae* และ *Glomus manihotis* ในการปลูกสับปะรด พบว่าสามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและผลผลิตสับปะรด นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยเคมีได้มากกว่าสับปะรดที่ไม่ใส่ไมคอร์ไรซาร่วมด้วย Rodríguez-Romero *et al*. (2011) ได้ทำการทดลองในเรือนกระจกโดยใช้ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ *Glomus mosseae* ให้แก่มะละกอและสับปะรดในระยะต้นอ่อนร่วมกับการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส พบว่าราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของสับปะรดเมื่อระดับของฟอสฟอรัสที่ใส่ต่ำที่สุดคือ 18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าการใส่ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสามารถทดแทนการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในระยะต้นอ่อนได้ เช่นเดียวกับ Naher *et al*. (2013) ได้รายงานว่า ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา สายพันธุ์ *Glomus mosseae* สามารถใช้ได้กับพืชหลายชนิด ไม่ว่าจะพืชผัก ผลไม้ พืชไร่ หรือพืชอุตสาหกรรม จากรายงานนี้จะเน้นการใช้ AMF ร่วมกับพืชหลายชนิด หนึ่งในนั้นคือ สับปะรด พบว่า AMF ช่วยเพิ่มการดูดยึดธาตุอาหาร เพิ่มความชื้นในดิน อีกทั้งยังช่วยเพิ่มความต้านทานต่อโรคและสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่า การสำรวจความหลากหลายในพื้นที่ปลูกสับปะรดนั้นยังมีคนศึกษาน้อย ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาความหลากหลายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในพื้นที่ปลูกสับปะรด จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ จ.เพชรบุรี เพื่อนำไปเป็นแนวทางในการทดสอบประสิทธิภาพของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เพื่อเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชและลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีในแปลงสับปะรดต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่ปลูกสับปะรด จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ จ.เพชรบุรี จำนวน 5 แปลง สภาพภูมิประเทศโดยรวมเป็นพื้นที่ลูกคลื่นลอนลาด (undulating) มีความลาดเทเฉลี่ย 4.02 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างดินแบบ composite sample ที่ระดับความลึก 0-20 เซนติเมตร นำตัวอย่างดินที่เก็บได้มาวิเคราะห์สมบัติดินพื้นฐาน ได้แก่ การกระจายขนาดของอนุภาคดินโดยวิธี Pipette (Gee and Bauder, 1986) ค่าพีเอช (National Soil Survey Center, 1996) อินทรียวัตถุโดยวิธี Walkley-Black (Nelson and Sommers, 1996) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์โดยวิธี Bray II (Bray and Kurtz, 1945) และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Thomas, 1982)

การตรวจนับสปอร์และเตรียมตัวอย่าง

ตรวจหาและนับจำนวนสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินบริเวณรอบรากสับปะรดโดยวิธีร่อนเปียก (wet sieving) จากนั้นแยกสปอร์เดี่ยวออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำมาเตรียมตัวอย่างลงบนสไลด์ตามวิธีการของ Trappe and Schenck (1982) เพื่อดูปฏิกิริยาต่อผนังของสปอร์ จากนั้นนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ส่วนที่สองจะนำไปศึกษาโดยเทคนิคอณูชีววิทยา

การจัดจำแนกราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยเทคนิคอณูชีววิทยา

นำสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะเหมือนกันฆ่าเชื้อบริเวณผิวสปอร์ (Danesh *et al*., 2016) เมื่อฆ่าเชื้อแล้วดูดสปอร์จำนวน 1 สปอร์ใส่ลงในหลอด PCR ที่มีน้ำปราศจากไอออนผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใช้ปลายทิปกดสปอร์ให้แตกโดยสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ ดูดน้ำที่ได้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) จากนั้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ต้องการโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) รอบที่ 1 ร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') และ NS4 (5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3') จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่อง PCR โดยมีลำดับของปฏิกิริยา (PCR reaction condition) ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ
ขั้นตอนที่ 2 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
55 องศาเซลเซียส 40 วินาที } 40 รอบ
72 องศาเซลเซียส 1 นาที
ขั้นตอนที่ 3 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจสอบ PCR product ด้วยเครื่องแยกดีเอ็นเอ (gel electrophoresis) ใน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นำ PCR product ไปใช้เป็น template DNA เพื่อทำ PCR รอบที่ 2 ร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ AM1 (5'-GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA-3') และ NS31 (5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3') จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่อง PCR โดยมีลำดับของปฏิกิริยา ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ
ขั้นตอนที่ 2 94 องศาเซลเซียส 1 นาที
58 องศาเซลเซียส 45 วินาที } 30 รอบ
72 องศาเซลเซียส 45 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สภาพทั่วไปของพื้นที่เก็บตัวอย่าง

สภาพภูมิประเทศของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์แบ่งเป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ พื้นที่ภูเขาและพื้นที่ราบชายฝั่งทะเล ส่วนสภาพภูมิประเทศของจังหวัดเพชรบุรีแบ่งเป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ ทางด้านทิศตะวันตกมีลักษณะเป็นที่ราบสูงและภูเขาสูงชัน แล้วค่อยๆ ลาดต่ำมาทางทิศตะวันออกเกิดเป็นสันปันน้ำ พื้นที่เก็บตัวอย่างดินแปลงที่ 1-4 ตั้งอยู่ที่ ต.สามกระทาย อ.กุยบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์ ลักษณะพื้นที่โดยทั่วไปมีสภาพสูงต่ำ มีพื้นที่เป็นที่ราบจนถึงลูกคลื่นลอนลาด พื้นที่ส่วนใหญ่ปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย แปลงที่ 5 ตั้งอยู่ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี เกือบถึงรอยต่อ อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีสภาพพื้นที่ค่อนข้างราบเรียบถึงลูกคลื่นลอนลาด แปลงที่เก็บตัวอย่างดินเป็นแปลงทดลองปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (Table 1)

Table 1 Locations and altitude of sampling sites

Sampling sites	Coordinates	Locations	Altitude above mean sea level (m)
1	994623E, 121059^{N}	Sam Krathai, Kui Buri District, Prachuap Khiri Khan	101
2	994625E, 121101^{N}	Sam Krathai, Kui Buri District, Prachuap Khiri Khan	93
3	994619E, 121060^{N}	Sam Krathai, Kui Buri District, Prachuap Khiri Khan	107
4	994805E, 121147^{N}	Sam Krathai, Kui Buri District, Prachuap Khiri Khan	40
5	995133E, 123740^{N}	Phetchaburi Agricultural Research and Development Center; Sam Phraya, Cha Am District, Phetchaburi	65

2. สมบัติดินพื้นฐาน

เมื่อนำตัวอย่างดินในแต่ละแปลง มาวิเคราะห์การกระจายของอนุภาคขนาดต่างๆ เปรียบเทียบกับเกณฑ์ชั้นเนื้อดิน (เอิบ, 2547) พบว่าดินมีเนื้อดินตั้งแต่ดินทรายจนถึงดินเหนียว ค่าพีเอชดินโดยใช้ดินต่อน้ำเท่ากับ 1:1 พบว่า ดินชั้นบนและดินชั้นล่างของแต่ละแปลงมีค่าพีเอชไม่ต่างกัน ค่าพีเอชอยู่ในพิสัย 3.1-8.5 เป็นดินกรดจัดมากในแปลงที่ 1 ถึงด่างจัดในแปลงที่ 4 ปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับต่ำมากถึงต่ำ (2.9-5.8 กรัมต่อกิโลกรัม) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับต่ำมากถึงสูง (0.77-44.95 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับต่ำมากถึงปานกลาง (43–157 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของเนื้อดินที่ผันแปรอยู่ในพิสัย อย่างไรก็ตาม พบว่าในแปลงที่ 5 ปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมมีค่าสูงมาก ซึ่งไม่สอดคล้องกับลักษณะดิน อาจเป็นผลเนื่องมาจาก พื้นที่บริเวณนั้นเป็นแปลงการทดลอง อาจมีปุ๋ยตกค้างอยู่สูง (Table 2)

Table 2 Physical and chemical properties of soil samples

Sampling sites	Depth (cm)	Texture class	pH (1:1)	OM (g kg^{-1})	Available P	Exchangeable. K
					(----------mg kg^{-1}----------)	
1	0-20	Clay	8.4	4.8	6	157
2	0-20	Sandy loam	3.9	4.8	12	52
3	0-20	Sandy clay loam	3.7	5.8	3	62
4	0-20	Sandy loam	3.1	4.1	7	43
5	0-20	Loamy sand	4.6	4.5	45	132

3. จำนวนประชากรและความหลากหลายทางชีวภาพของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบริเวณรากสับปะรด

จำนวนประชากรของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบริเวณรากสับปะรด

จำนวนประชากรของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบริเวณรากสับปะรด (Figure 1) พบว่า แปลงที่ 3 มีจำนวนสปอร์สูงที่สุด เท่ากับ 2.48 สปอร์ต่อดินแห้ง 1 กรัม แปลงที่ 1 และ 2 มีจำนวนสปอร์ลดลงมา เท่ากับ 1.42 และ 1.68 สปอร์ต่อดินแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่ แปลงที่ 4 และ 5 มีจำนวนสปอร์น้อยที่สุด เท่ากับ 0.11 และ 0.13 สปอร์ต่อดินแห้ง 1 กรัม อาจเนื่องมาจากมีปุ๋ยตกค้างอยู่สูง จึงทำให้สปอร์มีจำนวนน้อย สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา

Gravito and Miller (1998) รายงานว่า ในดินที่ถูกรบกวนอยู่ตลอดเวลาจะมีปริมาณของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่ำเมื่อเทียบกับดินที่ไม่ถูกรบกวน และในดินที่มีฟอสฟอรัสต่ำหรือสูงเกินไปมีผลทำให้การเข้าสู่รากพืชของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาลดน้อยลง

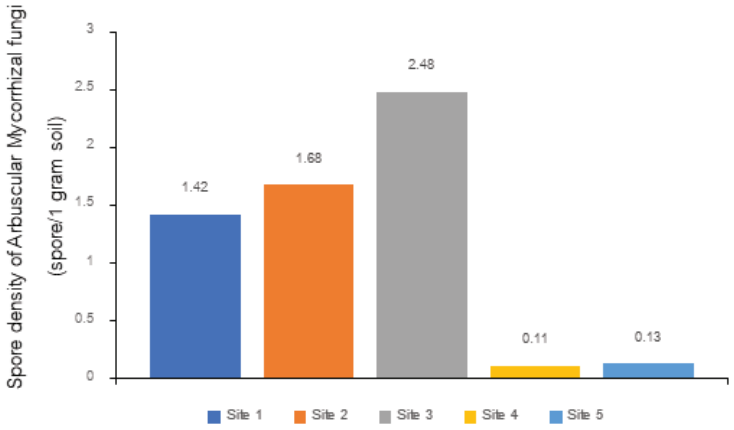

Figure 1 Spore density of arbuscular mycorrhizal fungi at sampling sites

จำนวนชนิดและความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณรากสับปะรด

จำนวนชนิดและความหลากหลายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีความแตกต่างกันตามพื้นที่ ซึ่งในแปลงที่ 1 นั้นจะมีความหลากหลายแตกต่างจากพื้นที่อื่นๆ การจำแนกชนิดของราจากดินบริเวณรอบรากสับปะรด จะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ขนาด สี รูปร่าง ร่วมกับอณูชีววิทยา เริ่มแรกนำสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากวิธีร่อนเปียกไปศึกษาด้วยเทคนิคทางอณูวิทยา พบว่า แปลงที่ 1 ดินเป็นดินเหนียวจะพบราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอยู่ 3 ชนิดๆ ที่พบมากที่สุด ได้แก่ รา *Paraglomus brasillianum* รองลงมา คือ *Septoglomus constrictum* และ *Acaulospora spinosa* ในขณะที่ 4 แปลงที่เหลือมีความหลากหลายคล้ายกันซึ่งราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซ ที่พบ ได้แก่ *Acaulospora mellea* และ *Paraglomus occultum* (Table 3) ความหลากหลายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง ปริมาณอินทรียวัตุ ดินเหนียว และฟอสฟอรัส และชนิดของพืช เป็นต้น Lekberg *et al.* (2007) พบว่า ปริมาณดินเหนียว อินทรียวัตถุ ความชื้น และความเป็นกรดด่างที่เพิ่มขึ้นของดินมีผลต่อความหลากหลายของชนิดราที่อยู่ในวงศ์ Glomeraceae สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขึ้นอยู่กับระยะทางวิวัฒนาการ การวิเคราะห์จากค่าเปอร์เซ็นต์อัตลักษณ์จะให้ค่าประมาณที่เป็นประโยชน์ ซึ่งโดยปกติจะพิจารณาว่าสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มีวิวัฒนาการใกล้ชิดกันหรือเป็นชนิดเดียวกัน เมื่อเปอร์เซ็นต์อัตลักษณ์มีค่าแตกต่างกันไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ (Pearson, 2013) ดังนั้นจึงสามารถใช้ไพรเมอร์ AM1 และ NS31 ในการจัดจำแนกสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจนถึงระดับชนิด (species) ได้

Table 3 Physical and chemical properties of soil samples

Sampling sites	Ordinal number	Species of arbuscular mycorrhiza	Identity (%)	Accession number
1	1	*Paraglomus brasillianum*	99%	KP1442306.1
	2	*Septoglomus constrictum*	98%	KU136431.1
	3	*Acaulospora spinosa*	99%	MF196929.1
2	1	*Acaulospora mellea*	99%	KP144299.1
	2	*Paraglomus occultum*	99%	JN687477.1
3	1	*Acaulospora mellea*	99%	KP144299.1
	2	*Paraglomus occultum*	99%	JN687477.1
4	1	*Acaulospora mellea*	99%	KP144299.1
5	1	*Acaulospora mellea*	100%	MF196923.1

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นอีกวิธีที่ใช้ร่วมกับเทคนิคทางอณูชีววิทยาในการจำแนกชนิดรา โดยจะนำสปอร์ที่แยกได้จากวิธีร่อนเปียกมาทำสไลด์แล้วย้อมด้วย PVLG และ Melzer's reagent จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงใน Figure 2 และ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Paraglomus brasillianum* จะเห็นได้ว่ารูปร่างสปอร์จะมีลักษณะกลม มีผนังสปอร์ (spore wall) 3 ชั้น เมื่อย้อมด้วย Melzer's reagent จะเห็นได้ว่าผนังชั้นที่ 2 จะมีสีเหลืองเข้ม (Figure 2a and 3a) ซึ่งลักษณะและรูปร่างจะคล้ายคลึงกับรา *Paraglomus occultum* แต่จะต่างกันตรงที่เมื่อย้อมด้วย Melzer's reagent ผนังชั้นที่ 2 ของสปอร์รา *P. occultum* จะมีสีเหลืองอ่อน เป็นริ้วๆ นอกจากนี้จะสังเกตเห็นผนังด้านใน (germinal spore) จะมี 2 ชั้น ซึ่งต่อกับผนังชั้นที่ 2 และ 3 จะเห็นได้ว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานอย่างเดียวอาจไม่ชัดเจน จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาร่วมด้วย (Figure 3e and 3g) รา *Septoglomus constrictum* สปอร์จะมีสีตั้งแต่น้ำตาลแดงไปจนถึงดำ รูปร่างค่อนข้างกลมถึงกลม มีผนัง 2 ชั้น ผนังชั้นที่ 1 ไม่ทำปฏิกิริยากับ Melzer's reagent ผนังชั้นที่ 2 จะติดสีน้ำตาลอมส้มไปจนถึงดำอมแดง (Figure 2b and 3b) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบของรา *Acaulospora spinosa* จะสังเกตได้ว่า สปอร์จะมีได้หลายสีตั้งแต่ครีม น้ำตาลออกเหลือง เป็นต้น รูปร่างจะกลมหรือค่อนข้างกลม มีผนังสปอร์ 3 ชั้น ผนังชั้นที่ 2 จะมีสีเหลืองอ่อน ผนังชั้นที่ 3 จะสังเกตได้ง่ายเมื่อย้อมด้วย Melzer's reagent เนื่องจากจะแยกออกจากผนังสปอร์อย่างชัดเจน (Figure 2c and 3c) ราชนิดสุดท้ายที่พบคือ *Acaulospora mellea* สีสปอร์ในธรรมชาติจะมีสีน้ำตาลอมส้มอ่อนจนถึงน้ำตาลอมส้มเข้ม รูปร่างสปอร์ส่วนใหญ่จะกลมถึงค่อนข้างกลม บางครั้งมีรูปร่างไม่แน่นอน ผนังสปอร์มี 3 ชั้น ผนังชั้นที่ 1 จะย่นเป็นริ้วเมื่ออยู่ใน PVLG ส่วนผนังชั้นที่ 2 จะเรียบกว่า มีสีเหลืองส้มอ่อน ผนังชั้นที่ 3 จะมีสีเหลืองอ่อน ส่วนผนังด้านในจะมี 2 ชั้น จะสังเกตได้ชัดเจนตรงผนังชั้นที่ 2 จะติดสีแดงเข้มหรือม่วงเข้มเมื่อย้อมด้วย Melzer's reagent (Figures 2 and 3 (d, f, h, i))

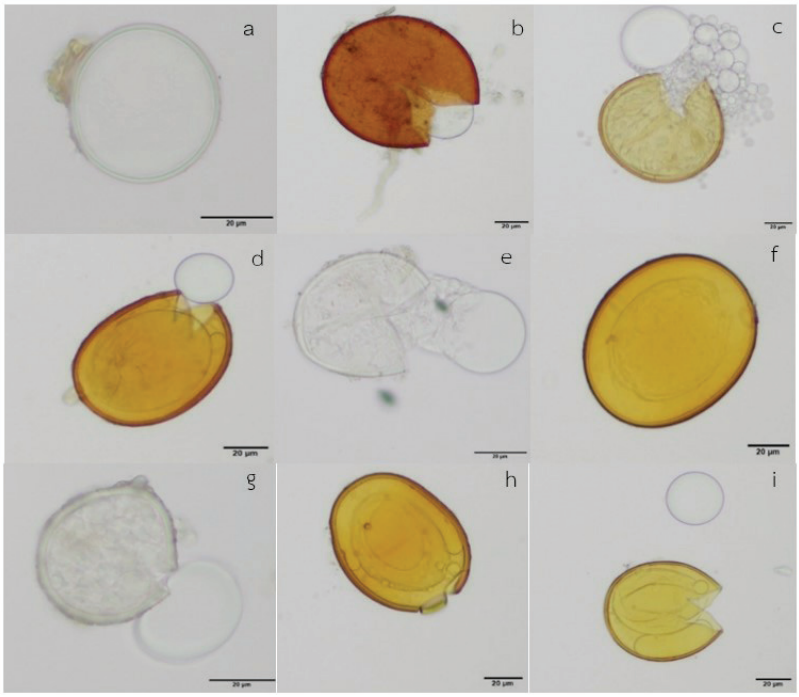

Figure 2 Morphology of arbuscular mycorrhiza after reaction with PVLG site 1 (a) *Paraglomus brasillianum,* (b) *Septoglomus constrictum,* (c) *Acaulospora spinosa*, site 2 (d) *Acaulospora mellea*, (e) *Paraglomus occultum*, site 3 (f) *Acaulospora mellea,* (g) *Paraglomus occultum,* site 4 (h) *Acaulospora mellea and site* 5 (i) *Acaulospora mellea*.

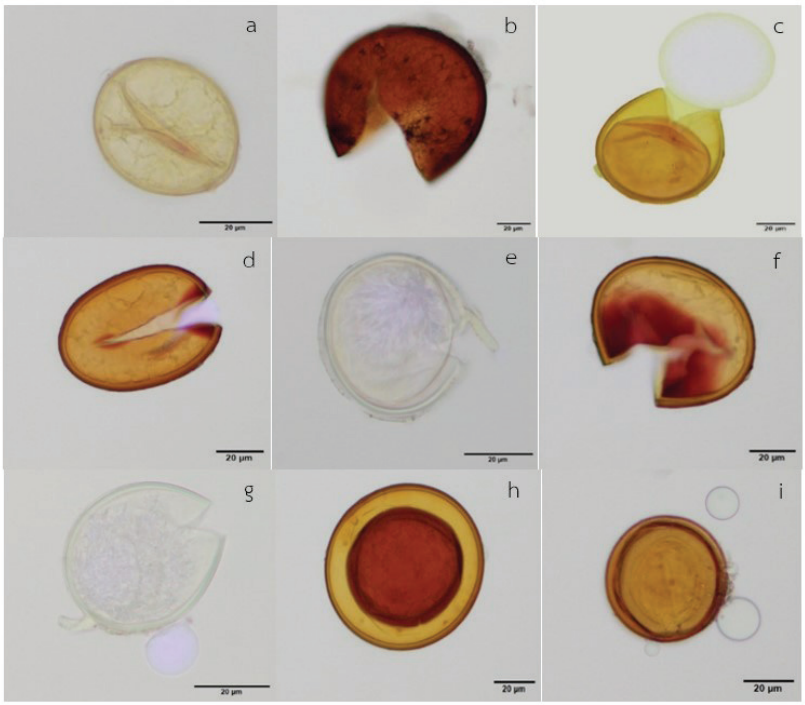

Figure 3 Morphology of arbuscular mycorrhiza after reaction with Melzer's reagent site 1 (a) *Paraglomus brasillianum,* (b) *Septoglomus constrictum,* (c) *Acaulospora spinosa,* site 2 (d) *Acaulospora mellea,* (e) *Paraglomus occultum,* site 3 (f) *Acaulospora mellea,* (g) *Paraglomus occultum*, site 4 (h) *Acaulospora mellea and* site 5 (i) *Acaulospora mellea.*

4. ปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนประชากรราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

จาก Table 4 แสดงถึงปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนประชากรของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ซึ่งพบว่าปริมาณอินทรียวัตถุมีอิทธิพลต่อจำนวนประชากรอย่างมีนัยสำคัญ (r = 0.91) และอนุภาคดินเหนียวส่งผลต่อจำนวนประชากรมากกว่าอนุภาคขนาดอื่นๆ จาก (Figure 4) ใช้หลักการวิเคราะห์ส่วนประกอบสำคัญ จะเห็นได้ชัดเจนว่า ในแปลงที่ 3 ปริมาณอินทรียวัตถุมีความสัมพันธ์กับจำนวนประชากร ถ้าปริมาณอินทรียวัตถุเพิ่มขึ้น จำนวนประชากรมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Silvana *et al*. (2020) รายงานว่าปริมาณอินทรียวัตถุและไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน โดยพบว่า ความหนาแน่นของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH ดินและคาร์บอนเพิ่มขึ้น และมีความหนาแน่นลดลงเมื่อปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้น (Johnson *et al*., 1991) Johnson *et al*. (1992) รายงานว่า ความหนาแน่นของสปอร์ในดินทรายจะมีความสัมพันธ์กับคาร์บอนในเชิงลบ ขณะที่ในดินดำความหนาแน่นของสปอร์มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับคาร์บอนในดิน ในทำนองเดียวกับ นาฏยา และคณะ (2556) รายงานว่าจำนวนประชากร จำนวนชนิด และจำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันระหว่างพื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่ป่าธรรมชาติ โดยพบว่าพื้นที่เกษตรกรรมมีจำนวนประชากรเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีมากในพื้นที่ปลูกไผ่ที่เคยเป็นป่ามาก่อน ในทางตรงกันข้าม Carrenho *et al*. (2007) รายงานว่า เนื้อดินและความต้องการปูนมีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในพืช ซึ่งในเนื้อดินที่หยาบกว่าจะมีเปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสูงกว่าดินเนื้อละเอียด เนื่องจากในดินเนื้อละเอียดมีปริมาณธาตุอาหารสูง จึงเป็นการจำกัดการเข้าอาศัยของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในราก นั่นคือเมื่อสภาพแวดล้อมมีความอุดมสมบูรณ์ มีธาตุอาหารเพียงพอต่อพืช ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจึงมีส่วนช่วยน้อยในการดูดซับธาตุอาหารพืช ดังนั้นจึงมีการเข้าอยู่อาศัยในรากได้น้อยกว่าดินที่มีธาตุอาหารต่ำ และในดินเนื้อละเอียดมีช่องว่างระหว่างเม็ดดินน้อย รากพืชกระจายได้น้อย จึงทำให้พื้นที่การสร้างสปอร์และการเข้าอาศัยในรากลดลง นอกจากนี้ ผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการกระจายตัวของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีความสัมพันธ์กับความเป็นกรด-ด่างของดิน โดยราสามารถเข้าอาศัยในรากพืชอาศัยได้ดีที่สุดที่ pH 6.5 (Wang *et al*., 1993) ความชื้นของดินทั้งแห้งและชุ่มชื้นมีผลต่อการกระจายตัวของรา (Anderson *et al*., 1984) Liu *et al*. (2016); Kim *et al*. (2017) ได้รายงานว่าความหนาแน่นของสปอร์หรือการกระจายตัวของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะสูงเมื่อในดินมีปริมาณฟอสฟอรัสดินต่ำ เปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยก็จะสูงตามไปด้วย

Table 4 Correlation matrix (r) between soils properties and spore density

	Sand	Silt	Clay	Spore density	OM	Total N	Avail. P	Exch. K
Sand	1	-	-	-	-	-	-	-
Silt	-0.762	1	-	-	-	-	-	-
Clay	-0.907*	0.419	1	-	-	-	-	-
Spore density	0.019	-0.568	0.342	1	-	-	-	-
OM	0.197	-0.772	0.225	0.914 *	1	-	-	-
Total N	-0.679	0.918*	0.356	-0.696	-0.806	1	-	-
Avail. P	0.438	-0.151	-0.517	-0.600	-0.357	0.212	1	-
Exch. K	-0.515	0.246	0.562	-0.161	-0.051	0.537	0.415	1

Remarks: *P <0.05 (n = 5)

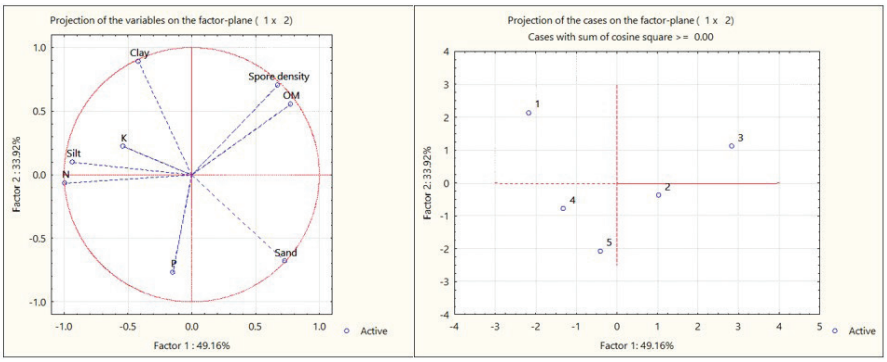

Figure 4 Correlation of principal component analysis of spore density with soils properties

สรุป

ดินในพื้นที่ปลูกสับปะรดที่มีเนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย (แปลงที่ 3) บริเวณ ต.สามกระทาย อ.กุยบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีจำนวนประชากรของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสูงที่สุดเท่ากับ 2.48 สปอร์ต่อดินแห้ง 1 กรัม มีความสัมพันธ์กับปริมาณอินทรียวัตถุอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ เมื่อปริมาณอินทรียวัตถุเพิ่ม จำนวนประชากรราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะเพิ่มขึ้น ในขณะที่ขนาดอนุภาคของดิน ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ไม่มีผลต่อจำนวนประชากรของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การจำแนกชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาด้วยการใช้ไพรเมอร์ AM1 และ NS31 สามารถจำแนกได้ 3 สกุล 5 ชนิด ได้แก่ *Paraglomus brasillianum, Septoglomus constrictum, Acaulospora spinosa, Acaulospora mellea* และ *Paraglomus occultum* โดยสมบัติของดิน เช่น เนื้อดิน ความเป็นกรดด่าง ปริมาณไนโตรเจน เป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อความหลากหลายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ยิ่งดินมีค่าความเป็นกรดด่างสูง จำนวนสปอร์และความหลากหลายก็จะสูงตามไปด้วย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าจำนวนประชากรจะขึ้นอยู่กับปริมาณอินทรียวัตถุในดิน ส่วนความหลากหลายทางชีวภาพของราจะขึ้นอยู่กับเนื้อดินและปริมาณธาตุอาหาร และไพรเมอร์ AM1 และ NS31 สามารถใช้ในการจัดจำแนกราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในระดับชนิด (species) ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ในการสนับสนุนเงินทุนสำหรับการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

พักตร์เพ็ญ ภูมิพันธ์. 2556. บทบาทของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อพืช ดิน และสิ่งแวดล้อม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2(2): 91-101, doi: 10.14456/tjst.2013.16.

นภาพร คงตุก และจรัสลักษณ์ เพชรวัง. 2560. การคัดแยกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากสวนพริกไทยในจังหวัดนครศรีธรรมราชและสุราษฎร์ธานี. แก่นเกษตร 45 ฉบับพิเศษ 1: 481-486.

นาฏยา แพทย์พิทักษ์ ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก และพักตร์เพ็ญ ภูมิพันธ์. 2556. การสำรวจประชากรเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบริเวณเขตรากไผ่ในพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ป่าธรรมชาติ.หน้า 2302-2310. *ใน* การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.นครปฐม.

สุภาพร ธรรมสุระกุล สมเพชร เจริญสุข และออมทรัพย์ นพอมรบดี. 2549. การเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยเคมีกับสับปะรดโดยใช้ราไมคอไรซ่าสายพันธุ์ต่างๆ, หน้า 18-35. *ใน* ผลงานฉบับเต็มขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรง

ตำแหน่งนักวิชาการเกษตร 7ว. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. กรุงเทพฯ

เอิบ เขียวรื่นรมณ์. 2547. คู่มือปฏิบัติการการสำรวจดิน. พิมพ์ครั้งที่ 5 ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 182 หน้า.

Anderson, R.C., A.E. Liberta and L.A. Dickman. 1984. Interaction of vascular plants and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi across a soil moisture-nutrient gradient. Oecologia 64(1): 111-117.

Bray, R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. Soil Science 59: 39-45.

Carrenho, R., S.F.B. Trufem, V.L.R. Bononi and E.S. Silva. 2007. The effect of different soil properties on arbuscular mycorrhizal colonization of peanuts, sorghum and maize. Acta Botanica Brasilica 21(3): 723-730, doi: 10.1590/S0102-33062007000300018.

Danesh, Y.R., S. Najafi and S. Demir. 2016. Using *in vitro* culturing technique for studying life cycle of arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Glomus intraradices.* Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences 26(2): 161-167.

Gee, G.W. and J.W. Bauder. 1986. Particle-size analysis, pp. 961-1010. *In* A. Klute, (ed.) Methods of Soil Analysis, Part I. Physical and Mineralogical Methods. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, USA.

Gravito, M.E., and M.H. Miller. 1998. Changes in mycorrhizal development in maize induced by crop management practices. Plant and Soil 198: 185-192.

Johnson, N.C., D.R. Zak, D. Tilman and F.L. Pfleger. 1991. Dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizae during old field succession. Oecologia 86: 349-358.

Johnson, N.C., D. Tilman and D. Wedin. 1992. Plant and soil controls on mycorrhizal fungal communities. Ecology 73: 2034-2042, doi: 10.2307/1941453.

Kim, S.J., J.K. Eo, E.H. Lee, H. Park and A.H. Eom. 2017. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and soil conditions on crop plant growth. Mycobiology 45(1): 20-24, doi: 10.5941/MYCO.2017.45.1.20.

Lee, E.H., J.K. Eo , K.H. Ka and A.H. Eom. 2013. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their roles in ecosystems. Mycobiology 41(3): 121-125, doi: 10.5941/MYCO.2013.41.3.121.

Liu, W., Y. Zhang, S. Jiang, Y. Deng, P. Christie, P.J. Murray, X. Li and J. Zhang. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi in soil and roots respond differently to phosphorus inputs in an intensively managed calcareous agricultural soil. Scientific Reports 6:24902, doi: 10.1038/srep24902.

Lekberg, Y., R.T. Koide, J.R. Rohr, L. Aldrich-Wolfe and J.B. Morton. 2007. Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. Journal of Ecology 95: 95–105, doi: 10.1111/j.1365-2745.2006.01193.x.

Marx, D.H. 1973. Mycorrhizae and feeder root diseases, pp. 351-382. *In*: G.C. Marks, T.T. Kozlowski (eds.). Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology. . Academic Press. New York.

Naher, U.A., R. Othman and Q.A. Panhwar. 2013. Beneficial effects of mycorrhizal

association for crop production in the tropics - a review. International Journal of Agriculture and Biology 15(5): 1021-1028.

National Soil Survey Center. 1996. Soil Survey Laboratory Methods Manual. United States Department of Agriculture, Natl. Soil Surv. Cent., Soil Surv. Lab., Soil Survey Investigation No. 42, Version 3.

Nelson, D.W. and L.E. Sommers. 1996. Total carbon, and organic matter, pp. 961-1010. *In* D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke and R.H. Loeppert, (eds.). Methods of Soil Analysis. Part III. Chemical Method. Amer. Soc. Agron. Inc., Madison, Wisconsin, USA.

Pearson W.R. 2013. An introduction to sequence similarity ("Homology") searching. Current Protocols in Bioinformatics 3:3.1.1-3.1.8, doi: 10.1002/047125 0953. bi0301s42.

Redecker D., A. Schüßler, H. Stockinger, S.L. Stürmer, J.B. Morton and C. Walker. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). Mycorrhiza 23: 515-531, doi: 10.1007/ s00572-013-0486-y.

Rodríguez-Romero, A.S., R. Azcón and M.D.C. Jaizme-Vega. 2011. Early mycorrhization of two tropical crops, papaya (*Carica papaya* L.) and pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.], reduces the necessity of P fertilization during the nursery stage. Fruits 66(1): 3-10, doi: 10.1051/fruits/2010036.

Schenck, N.C. 1981. Can mycorrhizae control root diseases. Plant Disease 65: 230-234.

Silvana, V.M., F.J. Carlos, A.C. Luĉia, A. Natalia and C. Marta. 2020. Colonization dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Ilex paraguariensis* crops: Seasonality and influence of management practices. Journal of King Saud University – Science, doi: 10.1016/j.jksus.2018.03.017.

Thomas, G.W. 1982. Exchangeable cations, pp. 159-165. *In* C.A. Black, (ed.) Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd. Agronomy No. 9. ASA and SSSA. Inc., Madison, Wisconsin, USA.

Trappe, J.M. and N.C. Schenck. 1982. Taxonomy of the fungi forming endomycorrhizae, pp. 1-9. *In* N.C. Schenck, (ed.). Methods and Principles of Mycorrhizal Research. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, USA.

Wang, G.M., D.P. Stribley, P.B. Tinker and C. Walker. 1993. Effects of pH on arbuscular mycorrhiza, I. Field observations on the long-term liming experiments at Rothamsted and Woburn. New Phytologist 124: 465-472, doi: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03837.