

ความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา
ในดินรอบรากในนาข้าว

DIVERSITY OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN
RHIZOSPHERE SOIL IN THE RICE FIELDS



สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ **ปีการศึกษา 2566** ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DIVERSITY OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN
RHIZOSPHERE SOIL IN THE RICE FIELDS



A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOGOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตีแบบลงนิตยสาร และต้องยืมส่งเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ACADEMIC YEAR 2022

หัวข้อสหกิจศึกษา	ความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในดินรอบรากในนาข้าว
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกัลยกร แก้วกัลยา รหัสนักศึกษา 63050445
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

บทคัดย่อ

ข้าวเป็นอาหารหลักของคนในประเทศและเป็นสินค้าเศรษฐกิจส่งออกที่สำคัญของไทย นิยมปลูกมากในภาคกลาง ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมักพบปัญหาต่างๆที่ทำให้ได้ผลผลิตต่ำ อีกทั้งยังเกษตรกรยังมักใช้สารเคมี และยากำจัดศัตรูพืชซึ่งมักพบตกค้างในผลผลิตและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ในการวิจัยนี้จึงได้นำเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (รา AMF) มาใช้ในการส่งเสริมการเจริญของข้าว รา AMF เป็นราที่อยู่ร่วมกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัยกัน โดยเชื้อราจะสร้างโครงสร้างพิเศษเจริญเข้าไปในรากโดยทำหน้าที่ดูดซับน้ำและธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของพืช ในขณะเดียวกันเชื้อราก็ได้รับประโยชน์คือสารอาหารจำพวกน้ำตาล ในการเจริญ เมื่อนำศึกษาจำนวนประชากรของสปอร์เชื้อราในดินที่เก็บตัวอย่างจากสองประเภท ได้แก่ บริเวณรอบรากข้าวและดินคั่นนาโดยเก็บตัวอย่างจาก 2 พื้นที่ คือ ดินบริเวณโรงเรือน (Green House) ของสวทช. และดินจากนาข้าว จ.กาฬสินธุ์ เมื่อนำมาแยกสปอร์รา AMF จากดินนาข้าว โรงเรือนสวทช. ดินคั่นนาโรงเรือนสวทช. ดินนาข้าว จ.กาฬสินธุ์ และดินคั่นนา จ.กาฬสินธุ์ จำนวน 190.9, 261.8, 8.1 และ 290.4 สปอร์/ดิน 100 กรัม ตามลำดับ และเมื่อศึกษาความสามารถของรา AMF ในการเข้าไปเพิ่มจำนวนในราก พบว่าสามารถเข้าอาศัยในรากเท่ากับ 30.47%, 54.83%, 21.57% และ 30.67% ตามลำดับ เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบเชื้อรา 3 สปีชีส์ ซึ่งอยู่ในจีนัสเดียวกันคือ *Acaulospora* เมื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อราโดยวิธี Trap culture เมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 และ 45 วัน ทริตเมนต์ที่พบจำนวนสปอร์มากที่สุดคือ ได้แก่ ดินหัวเชื้อ จ.กาฬสินธุ์ พบ 35.85 สปอร์/ดิน 100 กรัม และ สปอร์สีน้ำตาล พบ 54.17 สปอร์/ดิน 100 กรัม ตามลำดับ พบการเข้าอาศัยในรากมากที่สุดเมื่อเวลา 30 และ 45 วัน คือ ดินหัวเชื้อโรงเรือน สวทช. พบการเข้าราก 16% และ ดินหัวเชื้อ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.กาฬสินธุ์ พบการเข้าราก 21.3% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของข้าวโดยวัดความสูงเมื่อเวลา 45 วัน พบว่าทริตเมนต์ที่มีอัตราการเจริญมากที่สุดคือ สปอร์สีเหลือง มีความสูง 41.17 เซนติเมตร การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงความหลากหลายของเชื้อรา AMF และนำไปใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ปลอดภัย และประหยัดต้นทุนในการทำการเกษตรในครั้งต่อไป

คำสำคัญ : ข้าว, เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (รา AMF), ความหลากหลายทางชีวภาพ, การเข้าอยู่อาศัยภายในราก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere soil in the rice fields.
Students	Miss Kanyakorn Kaewkanya Student ID 63050445
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2022
Advisor	Asst. Prof. Dr. Nattawut Rungindamai

Abstract

Rice is the main food of the people in the country and is an important export product of Thailand. Mostly grown in the Central region, Northern and Northeastern regions frequently encounter a variety of issues that result in low productivity. Moreover, agriculture often uses chemicals and pesticides, which are often found in residues in produce and affect the health of consumers. In this study, rice growth was aided by the application of arbuscular mycorrhizal fungus (AMF). AMF is a fungus that lives symbiotically with plant roots. The fungus creates special structures that grow into the roots to absorb water and nutrients necessary for plant growth. At the same time, the fungus receives benefits from nutrients such as sugars in its growth. When studying the population of fungal spores in soil sampled from two types: the area around rice roots and the rice ridge soil, samples were collected from two areas: soil NSTDA greenhouse area and soil from rice fields, Kalasin province. When used to separate AMF spores from area around rice roots soil in NSTDA greenhouse, rice ridge soil, NSTDA greenhouses, the area around rice roots soil, Kalasin province and rice ridge soil, Kalasin province had 190.9, 261.8, 8.1 and 290.4 spores/100 grams of soil, respectively. And when studying the ability of AMF fungi to multiply in the roots. It was found colonization in roots at 30.47%, 54.83%, 21.57% and 30.67%, respectively. When studying the morphological

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้วยการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

characteristics together with the analysis of phylogenetic relationships, 3 species of fungi were found which belong to the same genus, *Acaulospora*. When studying the increase in the amount of fungi using the trap culture method after 30 and 45 days, the treatment that found the highest number of spores was soil inoculum, Kalasin province, found 35.85 spores/100 grams of soil and brown spores were found at 54.17 spores/100 grams of soil, respectively. The most root colonization were found at 30 and 45 days in NSTDA greenhouse inoculum soil with 16% and inoculum soil Kalasin province with 21.3%, respectively. And when comparing the growth of rice by measuring its height at 45 days, it was found that the treatment with the highest growth rate was the yellow spores have a height of 41.17 centimeters. This study revealed the diversity of AMF and how they can be used to encourage the growth of rice in order to generate safe and reduce farming expenses in the future

Keywords : Rice, Arbuscular Mycorrhiza fungi (AMF), Biodiversity, Root colonization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

สหกิจศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐภูมิ รุ่งจินตามัย อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจฉบับนี้ที่กรุณาให้ ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขให้สหกิจศึกษาเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณคณะอาจารย์ในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ตลอดจนให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะต่างๆ ในระหว่างการศึกษา ผู้เขียนขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.อัมพวา ปินเรือน นักวิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้โอกาสรับเป็นนักศึกษาฝึกงานและเป็นที่ปรึกษาสหกิจศึกษาในครั้งนี้ ขอขอบคุณนางสุชาดา มงคลสัมฤทธิ์ นักวิจัย (สวทช.) ที่ให้เกียรติมาเป็นกรรมการสอบสหกิจศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวสุจินดา สมหมาย นายพงสวัสดิ์ คำสุนทร นายวิทย์อิน ยิงกุลเชา นายสรวิชัย ชัยมงคล และนายนิวัฒน์ พานแก้ว ผู้ช่วยนักวิจัยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (สวทช.) ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก เอื้อเฟื้อสถานที่ในห้องปฏิบัติการ ให้คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนแนะนำการใช้งานอุปกรณ์ สารเคมี และเทคนิคทางจุลชีววิทยาต่างๆ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคุณแม่ ครอบครัว ญาติพี่น้องทุกคน ที่ให้กำลังใจ ให้ความรัก ความเข้าใจมาและให้ความช่วยเหลือโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่าน ที่ได้ให้กำลังใจ และคำแนะนำ คอยช่วยเหลือในด้านการเรียนมาโดยตลอด

กัลยกร แก้วกัลยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ข้าว.....	3
2.1.1 ลักษณะทั่วไปของข้าว.....	3
2.1.2 คุณค่าทางสารอาหารของข้าว.....	3
2.1.3 มูลค่าทางเศรษฐกิจของข้าว.....	3
2.1.4 การจำแนกพันธุ์ข้าวแบ่งตามลักษณะการปลูก.....	4
2.1.5 ปัญหาที่พบในการปลูกข้าว.....	4
2.1.5.1 ดินเสื่อมคุณภาพ.....	4
2.1.5.2 โรคพืช.....	5
2.2 เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา.....	5
2.2.1 ชีวิตวิทยาของรา AMF.....	5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด

2.2.2 ความหลากหลาย และอนุกรมวิธานของรา AMF.....	7
2.2.3 ประโยชน์ของรา AMF ในดิน.....	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	12
3.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน.....	12
3.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดิน.....	12
3.1.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง.....	12
3.2 การศึกษาเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา.....	13
3.2.1 การตรวจนับปริมาณสปอร์ของรา AMF.....	13
3.2.2 การจัดจำแนกชนิดตามลักษณะสัณฐานวิทยาของรา AMF.....	13
3.2.3 การประเมินการเข้าอยู่อาศัยในรากพืชของรา AMF.....	14
3.2.4 การศึกษารา AMF ด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุล.....	15
3.2.4.1 การสกัดสารพันธุกรรม.....	15
3.2.4.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR.....	16
3.2.4.3 การวิเคราะห์ลำดับเบส.....	17
3.2.4.4 การวิเคราะห์สัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ.....	17
3.3 การเพิ่มปริมาณสปอร์รา AMF โดยวิธี Trap culture.....	18
3.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืชทดลอง.....	18
3.3.2 การเตรียมวัสดุปลูก.....	18
3.3.3 การตรวจนับปริมาณสปอร์ของรา AMF.....	19
3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของของรา AMF ในการส่งเสริมการเจริญของพืชทดลองในโรงเรือน.....	19
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	19
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	20
4.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน.....	20
4.2 การศึกษาเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา.....	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหากมีเหตุแบบสงวนเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มาแก้ไข

4.3 การเพิ่มปริมาณสปอร์รา AMF โดยวิธี Trap culture.....	36
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของของรา AMF ในการส่งเสริมการเจริญของพืชทดลองในโรงเรือน.....	38
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	43
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	43
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	44
เอกสารอ้างอิง.....	45
ภาคผนวก.....	49
ภาคผนวก ก.....	50
ภาคผนวก ข.....	51
ภาคผนวก ค.....	52
ภาคผนวก ง.....	55



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ประเภทและลักษณะของไมคอร์ไรซาแต่ละชนิด.....	8
3.1 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินเพื่อคัดเลือกสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (AMF).....	12
3.2 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้านอนุชีวโมเลกุล.....	16
3.3 PCR condition ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย.....	17
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์รา AMF.....	22
4.2 ชนิดของรา AMF ที่พบในดินตัวอย่างแต่ละแหล่ง.....	29
4.3 ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR.....	33
4.4 ค่าเฉลี่ยของปริมาณสปอร์รา AMF โดยวิธี Trap culture ระยะเวลา 30 วัน.....	37
4.5 ค่าเฉลี่ยของปริมาณสปอร์รา AMF โดยวิธี Trap culture ระยะเวลา 45 วัน.....	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างส่วนต่างๆของรา AMF ภายในรากพืช.....	6
2.2 โครงสร้างของรา AMF ภายนอกและภายในรากพืช.....	7
2.3 ลักษณะโครงสร้างการเจริญของไมคอร์ไรซาชนิดต่างๆ.....	7
3.1 วิธีการประเมินการเข้าอยู่อาศัยภายในราก.....	14
3.2 การเพิ่มปริมาณรา AMF โดยวิธี Trap culture ภายในโรงเรือน (Green House) ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.).....	18
4.1 ลักษณะพื้นที่บริเวณนาข้าวโรงเรือน (Green House) ของ สวทช.....	20
4.2 ลักษณะพื้นที่บริเวณนาข้าว จ.กาฬสินธุ์.....	21
4.3 แสดงความหนาแน่นของจำนวนสปอร์ของรา AMF ในดินแต่ละแหล่ง (สปอร์/ดิน 100กรัม).....	23
4.4 เปอร์เซนต์การเข้าอยู่อาศัยภายในรากพืชแต่ละแหล่ง.....	25
4.5 การเข้าอยู่อาศัยของสปอร์รา AMF ในรากข้าวโรงเรือน (Green House).....	25
4.6 การเข้าอยู่อาศัยของสปอร์รา AMF ในรากหญ้าค่านาโรงเรือน (Green House).....	26
4.7 การเข้าอยู่อาศัยของสปอร์รา AMF ในรากข้าว จ.กาฬสินธุ์.....	27
4.8 การเข้าอยู่อาศัยของสปอร์รา AMF ในรากหญ้าค่านา จ.กาฬสินธุ์.....	28
4.9 ลักษณะสปอร์ของ <i>Acaulospora</i> sp.1.....	30
4.10 ลักษณะสปอร์ของ <i>Acaulospora</i> sp.2.....	31
4.11 ลักษณะสปอร์ของ <i>Acaulospora</i> sp.3.....	32
4.12 แสดงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของราในจีนัส <i>Acaulospora</i> ที่ได้มาจากลำดับยีน ITS, SSU และ LSU (1000 บุทสแตป) โดยมีตัวเลขซึ่งมีนัยสำคัญแสดงถึงค่าบูทสแตป ML และ MP ≥ 50 เปอร์เซนต์ และมีความเชื่อมั่น (BI) ≥ 0.95 ตามลำดับ.....	35
4.13 เปอร์เซนต์การเข้าอาศัยภายในรากพืช หลังจากระยะเวลาผ่านไป 30 วัน.....	39
4.14 เปอร์เซนต์การเข้าอาศัยภายในรากพืช หลังจากระยะเวลาผ่านไป 45 วัน.....	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.15 ลักษณะการเข้าอยู่อาศัยของรา AMF ในพืชทรีตเมนต์ต่างๆเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน.....40

4.16 ลักษณะการเข้าอยู่อาศัยของรา AMF ในพืชทรีตเมนต์ต่างๆเมื่อเวลาผ่านไป 45 วัน.....41

4.17 อัตราการเจริญของต้นข้าวในแต่ละทรีตเมนต์.....42



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีภูมิปัญญาที่สืบทอดกันมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันคือการปลูกข้าว ข้าวจึงเป็นอาหารหลักของคนในประเทศและยังเป็นสินค้าเศรษฐกิจส่งออกที่สำคัญของไทย โดยข้าวเป็นธัญพืชที่ให้คุณค่าทางอาหารสูง เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญที่ให้พลังงานแก่ร่างกาย คนไทยนิยมปลูกข้าวทั่วประเทศ โดยพื้นที่ที่นิยมปลูกพบได้ในทุกภาคของประเทศไทย ลักษณะการปลูกจะขึ้นอยู่กับแต่ละพื้นที่ เช่น ในภาคกลางพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นที่ราบลุ่มจึงนิยมปลูกข้าวนาดำหรือข้าวนาหว่าน ส่วนภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นพื้นที่สูงมักปลูกเป็นข้าวนาไร่ สำหรับพื้นที่ภาคตะวันออกเป็นพื้นที่ดินร่วนปนทรายธาตุอาหารอินทรีย์วัตถุต่ำ บางพื้นที่มีปัญหาดินเค็มทำให้เมื่อปลูกข้าวมักได้ผลผลิตต่ำ อีกทั้งเกษตรกรมักใช้ปุ๋ยเคมี และยาฆ่าแมลงในการกำจัดศัตรูพืชจึงทำให้เกิดการสะสมและตกค้างของสารเคมีส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค และสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม

ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) หรือเรียกย่อได้ว่ารา AMF เป็นเชื้อราที่อยู่ในดินอาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัยกันโดยไม่ก่อโรคในพืชที่อยู่อาศัยต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ร่วมกัน รา AMF มีโครงสร้างของเส้นใยเมื่อเข้าไปอยู่ในรากพืชจะช่วยให้พืชสามารถดูดซับน้ำ และธาตุอาหารได้ดียิ่งขึ้นโดยเฉพาะฟอสฟอรัสที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช อีกทั้งเชื้อรายังช่วยปรับปรุงคุณภาพของดินให้ดียิ่งขึ้น ทำให้ดินร่วนซุย ในขณะเดียวกันเชื้อราที่ได้รับผลประโยชน์คือเมื่อพืชสังเคราะห์แสงเชื้อราจะได้รับสารอาหารและน้ำตาลจากพืชไปด้วย

ในการศึกษารังนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาความหลากหลายและจัดจำแนกรา AMF โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลด้านอนุชีวโมเลกุลโดยศึกษาจากยีนต่างๆ และศึกษาการนำไปใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว เพื่อให้เกษตรกรมีผลผลิตที่ดี ปลอดภัย และประหยัดต้นทุนในการทำการเกษตรในครั้งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาจำนวนประชากร ความหลากหลายและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา AMF ที่เก็บจากดินบริเวณรอบรากต้นข้าว และดินบริเวณคันนา
- 2) เพื่อศึกษาการจัดจำแนกรา AMF โดยใช้ข้อมูลอณูชีวโมเลกุลจากยีนจำนวน 3 ยีน ได้แก่ ยีน ITS, SSU และ LSU
- 3) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของรา AMF ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโดยทดสอบในโรงเรือน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) เก็บตัวอย่างรา AMF ในดิน 2 พื้นที่ ได้แก่ ดินจากบริเวณโรงเรือน (Green House) ของ สวทช. และดินจาก ต.หนองห้าง อ.กุฉินารายณ์ จ.กาฬสินธุ์
- 2) ศึกษาจำนวนประชากร ความหลากหลายและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา AMF ในดินบริเวณรอบรากต้นข้าว และคันนา จำนวน 4 ชนิด
- 3) จัดจำแนกรา AMF ได้ถึงระดับโมเลกุล และ/หรือ ชนิด จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยใช้ข้อมูลทางอณูชีวโมเลกุล
- 4) ศึกษาการเพิ่มปริมาณของรา AMF โดยวิธี Trap culture

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบถึงจำนวนประชากรและความหลากหลายของรา AMF ในดิน
- 2) สามารถจำแนกชนิดของรา AMF โดยใช้ข้อมูลทางด้านอณูชีวโมเลกุล
- 3) สามารถใช้ประโยชน์ของรา AMF ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

เอกสารและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของข้าว

ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจัดอยู่ในวงศ์หญ้า (Gramineae) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* L. เป็นพืชอายุสั้นและเป็นอาหารหลักของประชากรในหลายประเทศทั่วโลกโดยมีสารอาหารหลักได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ซึ่งให้พลังงานแก่ร่างกาย ในทวีปเอเชียที่คนนิยมปลูกข้าว 3 สายพันธุ์หลัก ได้แก่ 1) สายพันธุ์ซินิกา (Sinica) หรือ จาปอนิกา (Japonica) ลักษณะเมล็ดสั้น กลม นิยมปลูกในประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี และสหรัฐอเมริกา 2) สายพันธุ์อินดิกา (Indica) ลักษณะเมล็ดยาว ค่อนข้างแบน นิยมปลูกในประเทศไทย ฟิลิปปินส์ เวียดนาม ลาว กัมพูชา พม่า มาเลเซีย และอินโดนีเซีย 3) สายพันธุ์จาวานิกา (Javanica) ลักษณะเมล็ดกว้างหนา นิยมปลูกไม่มากในประเทศอินโดนีเซีย ไต้หวัน ญี่ปุ่น และฟิลิปปินส์ (ธีระรัตน์ และคณะ, 2561)

2.1.2 คุณค่าทางสารอาหารของข้าว

ข้าวเป็นธัญพืชที่มีคุณค่าทางสารอาหารสูงและเป็นอาหารหลักของประชากรโลก ประชากรทั่วโลกมากกว่าร้อยละ 50 บริโภคข้าวเป็นหลัก ซึ่งในแต่ละประเทศประชากรจะบริโภคข้าวต่างชนิดกันไป เช่น ข้าวเหนียว ข้าวเจ้า ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี เป็นต้น โดยองค์ประกอบหลักได้แก่ คาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้ข้าวยังมีวิตามินและแร่ธาตุอื่นๆ ตามแต่ละชนิดของข้าว เช่น วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ฟลาโวนอยด์ สารต้านอนุมูลอิสระ สารแกมมาออโรซานอล เป็นต้น (ศิวาพร, 2561) คุณค่าทางโภชนาการของข้าวที่สำคัญ ได้แก่ ช่วยป้องกันการเกิดโรคเบาหวาน ช่วยในการทำงานของระบบประสาทและสมอง ช่วยในการควบคุมระดับคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด และช่วยในการเจริญเติบโตของทารกในครรภ์ (เชาวนีพร และคณะ, 2560)

2.1.3 มูลค่าทางเศรษฐกิจของข้าว

การปลูกข้าวเป็นภูมิปัญญาที่สืบทอดกันมาตั้งแต่โบราณของไทยเป็นทั้งอาหารบริโภคในประเทศและเป็นสินค้าส่งออกหลักไปยังต่างประเทศ ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีอุตสาหกรรมการผลิต ส่งออก และแปรรูปข้าวใหญ่เป็นอันดับ 6 ของโลกรองจากจีน อินเดีย อินโดนีเซีย บังกลาเทศ และเวียดนาม โดยประเทศไทยผลิตข้าวได้เฉลี่ยปีละ 30-31 ล้านตันข้าวเปลือกหรือประมาณ 20 ล้านตันข้าวสาร (มรกต และ ศิริพร, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอดีตประเทศไทยได้รับอิทธิพลทางด้านเกษตรกรรมมาจากจีน ในสมัยสุโขทัยนิยมปลูกข้าวเมล็ดที่มีลักษณะป้อมและยาว ต่อมาในช่วงกรุงศรีอยุธยาตอนต้นประเทศไทยในสมัยนั้นเป็นอู่ข้าวอู่น้ำได้รับการสนับสนุนให้มีการทำนาเป็นหลักเพื่อใช้เป็นเสบียงในช่วงสงคราม จนถึงช่วงสมัยกรุงศรีอยุธยาตอนปลายไปจนถึงรัตนโกสินทร์ได้เปิดการค้าเสรีกับต่างประเทศผ่านสนธิสัญญาเบาว์ริง เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างทางเศรษฐกิจทำให้ผลิตข้าวเพื่อบริโภคภายในประเทศและส่งออกในต่างประเทศ (กองสารสนเทศและดัชนีเศรษฐกิจการค้า, 2560) จนต่อมาการส่งออกข้าวถือเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญและสร้างรายได้ให้กับประเทศมาอย่างยาวนาน

2.1.4 การจำแนกพันธุ์ข้าวแบ่งตามลักษณะการปลูก

การจำแนกพันธุ์ข้าวตามลักษณะของพื้นที่ในการปลูกในประเทศไทย สามารถแบ่งได้ดังนี้

- 1) ข้าวไร่ (upland rice) เป็นข้าวที่ปลูกได้โดยไม่มีคันนา ไม่ต้องเก็บกักน้ำ ปลูกได้ทั้งที่ราบและที่ชัน การเตรียมดินปลูกทำได้โดยใช้ดินแห้งพอประมาณ ปลูกโดยการหว่าน การหยอด หรือโรยเป็นแถว นิยมปลูกกันมากในบริเวณที่ราบสูงตามภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
- 2) ข้าวนาสวนหรือข้าวนาดำ (lowland rice) เป็นข้าวที่ปลูกบริเวณที่ราบลุ่มทั่วไป มีคันนาเพื่อกักเก็บน้ำไว้หล่อเลี้ยงต้นข้าวตั้งแต่ปลูกจนถึงเก็บเกี่ยว ระดับน้ำสูงไม่เกิน 1 เมตร โดยน้ำในคันนามาจากน้ำฝนหรือน้ำจากชลประทานก็ได้ นิยมปลูกในทุกภาคของประเทศไทย
- 3) ข้าวน้ำขึ้นหรือข้าวนาเมือง (floating rice) เป็นข้าวที่ปลูกโดยที่ไม่สามารถรักษาระดับน้ำได้ บางครั้งระดับน้ำที่ปลูกสูงกว่า 1 เมตร ต้องปลูกข้าวพันธุ์พิเศษที่เรียกว่า ข้าวขึ้นน้ำ ข้าวลอย หรือข้าวฟางลอย โดยมีลักษณะพิเศษที่สามารถยืดอกขึ้นน้ำได้ ส่วนมากปลูกในแถบภาคกลางตอนบน (กิตติศักดิ์, 2552)

2.1.5 ปัญหาที่พบในการปลูกข้าว

2.1.5.1 ดินเสื่อมคุณภาพ

ปัญหาดินเสื่อม หมายถึง การเสื่อมคุณภาพของสารอาหารและแร่ธาตุส่งผลกระทบต่อการผลิตพืช ทำให้ได้ผลผลิตพืชน้อยลง ปัญหาการเสื่อมโทรมของดินเกิดจากการใช้พื้นที่ดินเป็นเวลานานทำให้มีปริมาณอินทรีย์วัตถุและธาตุอาหารในดินลดลง หรือเกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ซึ่งปัญหาดังกล่าวมีสาเหตุ ดังนี้ 1) ขาดสิ่งปกคลุมหน้าดินทำให้เกิดการชะล้างดินและการสลายตัวของอินทรีย์วัตถุ 2) ขาดแหล่งอินทรีย์วัตถุเพราะไม่มีการใส่เพิ่มเติม 3) เมื่อไม่มีวัตถุคลุมดินเม็ด ดินจะแตกออกเมื่อมีน้ำฝนปะทะหน้าดิน ทำให้เกิดการชะล้างของดินอย่างรุนแรง (ประภาศรี และคณะ, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5.2 โรคพืช

โรคพืช หมายถึง ลักษณะอาการที่ผิดปกติที่พืชแสดงออก อาจเกิดที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นพืชหรือเกิดทั้งลำต้น โดยสาเหตุของโรคพืชอาจเกิดได้ทั้งจากสิ่งมีชีวิตหรือสิ่งไม่มีชีวิต สิ่งมีชีวิตที่ทำให้เกิดโรคในพืช ได้แก่ ไวรัส ไมโครพลาสมา แบคทีเรีย รา และไส้เดือนฝอย ซึ่งสิ่งเหล่านี้ทำให้พืชแสดงอาการที่ต่างไปจากเดิมได้ เช่น ใบมีสีผิดปกติ เช่น เหลือง หรือ ต่างซีด ลำต้นแคระแกรน เกิดแผลเป็นจุด ตายแห้ง ใบไหม้ เป็นปุ่มปม เป็นต้น สาเหตุโรคพืชจากสิ่งไม่มีชีวิตอาจเกิดขึ้นสภาพแวดล้อมผิดปกติ หรือสารเคมีบางอย่างทำให้พืชแสดงลักษณะอาการที่ผิดไปจากเดิมซึ่งก่อโรคได้เช่นเดียวกับจุลินทรีย์ที่มีชีวิต โดยจะต่างกันว่าโรคที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิตจะไม่แพร่ระบาดและพบในบางพื้นที่เท่านั้น (กรมวิชาการเกษตร, 2563)

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ 1) พืชอาศัย (Host) จะต้องอ่อนแอเป็นโรคร่าง 2) เชื้อก่อโรค (Pathogen) จะต้องเป็นเชื้อก่อโรครุนแรง และ 3) สภาพแวดล้อม (Environment) จะต้องเหมาะสมต่อการเกิดโรค ปัญหาโรคในข้าวที่สำคัญในประเทศไทย คือ โรคใบไหม้ (Rice Blast Disease) เกิดจากเชื้อ *Pyricularia grisea* โรคใบจุดสีน้ำตาล (Brown Spot Disease) เกิดจากเชื้อ *Helminthosporium oryzae* โรคกาบใบแห้ง (Sheath blight Disease) เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* โรคยอดฝักดาบ (Bakanae Disease) เกิดจากเชื้อ *Fusarium fujikuroi* โรคใบหงิก (Ragged Stunt Disease) เกิดจากเชื้อ *Rice Ragged Stunt Virus* (RRSV) เป็นต้น (ดารา และคณะ, 2550) ซึ่งโรคเหล่านี้สามารถพบได้ทั่วไปในข้าวและเป็นปัญหาหลักของเกษตรกรไทยมาจนถึงปัจจุบัน

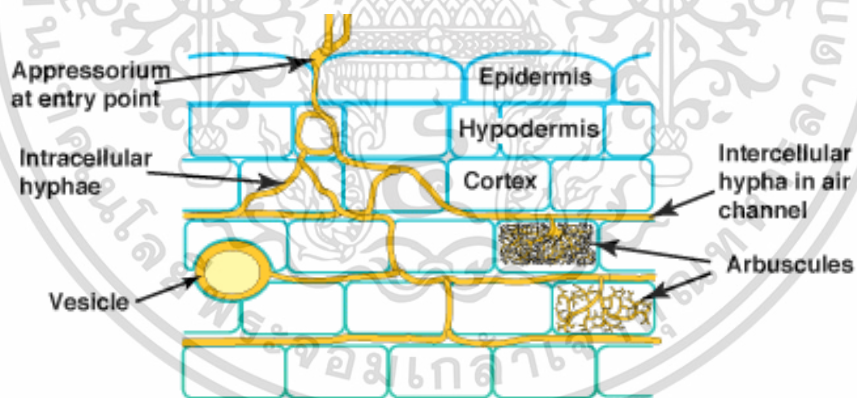
2.2. เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

2.2.1 ชีวิตวิทยาของเชื้อรา AMF

เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhizal fungi : AMF) เป็นเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่ม Endomycorrhiza มีความสัมพันธ์กับรากพืชที่อาศัยอยู่แบบพึ่งพาอาศัยกัน (obligate mutualistic symbiosis) ไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญภายในห้องปฏิบัติการได้ เป็นราที่ไม่มีผนังกัน (non-septate hypha) เชื้อราชนิดนี้สามารถอาศัยอยู่ร่วมกับพืชได้หลายชนิดโดยไม่ก่อโรคแก่พืชที่อยู่อาศัยโดยต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ร่วมกัน เชื้อราจะได้รับน้ำตาลจากการสังเคราะห์แสงของพืช และมีบทบาทหน้าที่ในการช่วยให้พืชดูดซึมธาตุอาหารต่างๆได้ดียิ่งขึ้นโดยเฉพาะฟอสฟอรัสซึ่งเป็นธาตุอาหารที่สำคัญในการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ยังช่วยให้พืชต้านทานโรคได้ดียิ่งขึ้น สามารถเจริญได้แม้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อีกทั้งยังช่วยปรับสมดุลฮอร์โมนพืช (Gadkar et al., 2001) เชื้อราที่มีโครงสร้างพิเศษที่อาศัยอยู่ในราก ได้แก่ เวสิเคิล (vesicle) อาร์บัสคูล (arbuscule) และเส้นใย (hyphae) โดยจะอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ (cortex) ของเซลล์รากพืช โดยจะพบว่าโครงสร้างอาร์บัสคูลเจริญเข้าไปอยู่ในเซลล์ของรากพืช (intracellular) ลักษณะของเส้นใยจะแตกไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แขนงเกือบเต็มเซลล์รากพืชคล้ายต้นไม้ขนาดเล็ก (little tree-like) (สมจิตร, 2549) ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวมีหน้าที่แลกเปลี่ยนอาหารระหว่างเชื้อรากับรากพืช อาร์บัสคูลมีอายุประมาณ 1-2 สัปดาห์ หากไม่ได้ใช้งานหรือหยุดการใช้งานแล้วจะถูกย่อยสลายโดยเซลล์ต่อไป (Requena et al., 2007) ในขณะที่โครงสร้างเวสิเคิลและเส้นใยจะเจริญอยู่ระหว่างเซลล์รากพืช (intercellular) โดยลักษณะของเวสิเคิลจะมีรูปร่างเป็นทรงกลมหรือรี ลักษณะคล้ายถุงโป่งพองออกมาที่ปลายเส้นใยหรือระหว่างเส้นใย ภายในมีหยดไขมันสะสมอยู่ใช้ในการสะสมอาหาร บางชนิดไม่มีการสร้างเวสิเคิลและสร้างในจำนวนที่แตกต่างกัน เป็นโครงสร้างที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี เมื่อเซลล์รากพืชชั้นคอร์เท็กซ์หลุดออกไปเวสิเคิลอาจโผล่ออกมาในดินและอาจพัฒนาไปเป็นสปอร์ทำหน้าที่เป็นส่วนสืบพันธุ์ต่อไปได้ (แสงดาว, 2552) (รูปที่ 2.1)

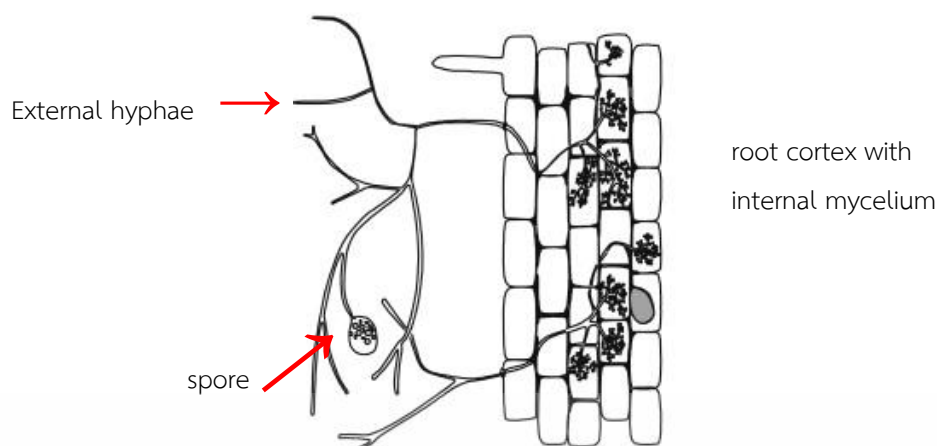
เส้นใยที่เจริญออกไปภายนอกเซลล์ (external hyphae) จะยังสามารถเจริญต่อไปได้แต่ไม่สามารถรวมกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไรโซมอบ (rhizomorph) ได้ ในการเจริญเข้าสู่ภายในรากพืชอาจมีเส้นใยบางส่วนเจริญอยู่ตามผิวรากโดยจะมีลักษณะหนาและใหญ่ขึ้น เรียกว่า Appressorium จากนั้นจะแทงเจริญเข้าไปในเซลล์ผิวรากพืชช่วยยึดเกาะ (เล็ควิริยะกุล, 2556) AMF เป็นเชื้อราที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction) แต่สร้างสปอร์ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่จำเป็นต้องอาศัยอยู่ร่วมกับพืชทำหน้าที่สะสมอาหารและสืบพันธุ์ ภายในสปอร์สะสมลิปิด คาร์โบไฮเดรต และสารพันธุกรรมจำนวนมาก อาจมีจำนวนมากถึง 2500 นิวเคลียส/สปอร์



รูปที่ 2.1 โครงสร้างส่วนต่างๆของรา AMF ภายในรากพืช

(ที่มา: Mycorrhizal Associations: The web resource, 2012)

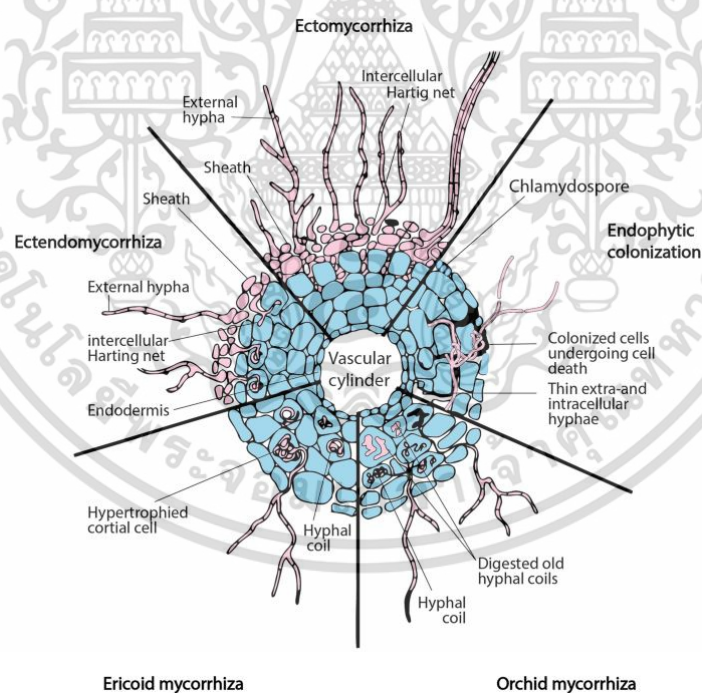
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของรา AMF ภายนอกและภายในรากพืช (Adholeya, 2012)

2.2.2 ความหลากหลาย และอนุกรมวิธานของรา AMF

ไมคอร์ไรซา (Mycorrhiza) หมายถึง การอาศัยอยู่ร่วมกันระหว่างราและรากพืช (Smith & Read, 2008) แบ่งได้ทั้งหมด 7 ชนิด ตามชนิดของพืชอาศัยและลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา (รูปที่ 2.3) โดยมีรายละเอียดดังนี้ (Brundrett et al., 1996)



รูปที่ 2.3 ลักษณะโครงสร้างการเจริญของไมคอร์ไรซาชนิดต่างๆ (Dhanker et al., 2020)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ประเภทและลักษณะของไมคอร์ไรซาแต่ละชนิด

ชนิดของไมคอร์ไรซา	ลักษณะโครงสร้างและหน้าที่ของเชื้อราที่พบภายในรากพืช	บริเวณพบในรากพืช	ประเภทของพืชอาศัย	Reference
1. เอกโตไมคอร์ไรซา (Ectomycorrhiza)	สร้างเส้นใยผสมกันห่อหุ้มบริเวณรากแขนงของพืชลักษณะเป็นแผ่นเรียกว่า แผ่นเมเทิล (mantle sheath) ทำหน้าที่ดูดซับน้ำและสารประกอบต่างๆให้แก่พืช เช่น กลูโคส ฟรุกโตส ลิปิด โปรตีน เป็นต้น เส้นใยมีผนังกันตามขวาง เป็นราชชั้นสูง	เส้นใยจะเจริญแทงเข้าไปผ่านชั้น เซลล์ผิว (epidermis) ไปยังชั้นคอร์เท็กซ์ (cortex)	พืชส่วนใหญ่เป็นพวกไม้ป่า ไตแก วงศ์ Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, Jglandaccaeae, Caesalpinaceae, Dipterocarpaceae, Myrtaceae และ Tiliaceae	(Zak, 1973) (Brundrett et al., 1996)
2. อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Arbuscular mycorrhiza) หรือ เอนโดไมคอร์ไรซา (Endomycorrhiza)	เป็นการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อราและรากพืช โดยจะอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ มีโครงสร้างพิเศษ ได้แก่ เวสิเคิล (vesicle), อาร์บัสคูล (arbuscule), และเส้นใย โดยเวสิเคิลจะมีลักษณะเป็นทรงกลมหรือรี โป่งพองออกมาจากปลายของเส้นใย มีผนังหนา ภายในมีหยดไขมันสีเหลืองทำหน้าที่ในการสะสมอาหาร ส่วนอาร์บัสคูลมีลักษณะแตกแขนงภายในเซลล์พืชคล้ายต้นไม้ ทำหน้าที่ดูดซับธาตุอาหารสำคัญให้แก่พืช	เชื้อราจะเจริญเข้าไปอยู่ในชั้น เซลล์ผิว (epidermis) และชั้นคอร์เท็กซ์ (cortex) ของรากพืช	พบในรากพืชเกือบทุกชนิดและพบในระบบนิเวศที่หลากหลาย เช่น ไม้ป่า โกงกาง ป่าเขตร้อน และทุ่งหญ้า ทะเลทราย นอกจากนี้ยังพบในพืชไร่ เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวโพด มะเขือเทศ ถั่วเหลือง ฝ้าย องุ่น เป็นต้น และพบในพืชสวน เช่น ทุเรียน ลำไย ส้ม กุหลาบ คาร์เนชั่น ลิลลี่ เป็นต้น	(Peterson et al., 2004) (สมจิตร, 2549)

	โดยเฉพาะฟอสฟอรัสที่เป็นธาตุอาหารหลักที่ให้ในการเจริญ			
3. ออร์คิดไมคอร์ไรซา (Orchid mycorrhiza)	อาจจัดได้ว่าเป็นราเอนโดไมคอร์ไรซาชนิดหนึ่ง โดยจะสร้างเส้นใยที่มีลักษณะขดเป็นวง (coil of hyphae หรือ peloton) สามารถย่อยลิกนินและเซลลูโลสได้ อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดและให้สารอาหารแก่ต้นกล้าในระยะแรกของการเจริญได้		อาศัยอยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้บางชนิดได้ เช่น <i>Paphiopedilum</i> sp., <i>Cephalanthera longibracteata</i>	(Peterson et al., 2004) (เลิศวิริยะกุล, 2556)
4. อีริคอยด์ไมคอร์ไรซา (Ericoid mycorrhiza)	รากที่มีอีริคอยด์ไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่จะเป็นรากที่มีรากแขนง (lateral root) ลักษณะเป็นรากเส้นเล็กแคบๆ เรียกว่า Hair root เส้นใยสามารถเจริญเข้าไปในเซลล์รากแล้วขดเป็นวงคล้ายขดลวด (coil) มีบทบาทสำคัญในการช่วยส่งเสริมการเจริญในพืชที่มีการปลูกในพื้นที่ที่มีความเป็นกรดสูง	เจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ (cortex)	พบในพืชวงศ์ Ericaceae, Epacridaceae และ Empetraceae	(Harley & Smith, 1983) (Peterson et al., 2004)
5. เอกเทนโดไมคอร์ไรซา (Ectendomycorrhiza)	เป็นไมคอร์ไรซาที่อยู่ระหว่างเอกโตไมคอร์ไรซา (Ectomycorrhiza) และ เอนโดไมคอร์ไรซา (Endomycorrhiza) บางครั้งอาจพบเส้นใยเกาะกันไว้อย่างหลวมๆรอบๆบริเวณรากพืชหรือไม่พบเส้นใยเลยและมีเส้นใยบางส่วนที่เจริญเข้าไปในเซลล์รากพืชแล้วขดเป็นวง	พบเส้นใยเจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ (cortex)	พืชอาศัย ได้แก่ Pine, Spruce, Beech เป็นต้น	(Mikola P., 1965)

	(Coil) อยู่ภายในเซลล์พืช เส้นใยมีหนึ่งก้าน ย่อมติดสีเข้ม บางครั้งพบการสร้าง Chalmydospore ภายในเส้นใยแต่ไม่พบ Conidai และโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นๆ			
6. โมโนโทรพอยด์ไมคอร์ไรซา (Monotropoid mycorrhiza)	เชื้อราจะสร้างแผ่นเมเทิลที่มีความหนามาก บริเวณรอบราก	พบเส้นใยเจริญเข้าไปในชั้นเซลล์ผิวของรากพืช (epidermis) และต่อมาจะเปลี่ยนแปลงเป็น Haustoria ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นสั้นๆไม่มีการแตกแขนง (fungal page)	พบอยู่ในไม้ป่าหลายชนิด เช่น Beech Pine และ Conifer ชนิดอื่นๆ	(Harley & Smith, 1983)
7. อาร์บุดอยด์ไมคอร์ไรซา (Arbutoid mycorrhiza)	เชื้อราจะสร้างแผ่นเมเทิล (mantle sheath) บางครั้งอาจสร้างเส้นใยเป็นลักษณะขดเป็นวง (Coil)	เจริญอยู่ในชั้นเซลล์ผิว (epidermis)	มีความสัมพันธ์กับพืชสกุล Arbutus และ Arctostaphylos อยู่ในวงศ์ Ericaceae	(Peterson et al., 2004)

2.2.3 ประโยชน์ของรา AMF ในดิน

1. ช่วยดูดซึมน้ำและธาตุอาหารภายในดินให้แก่พืช

รา AMF ความสัมพันธ์แบบพึ่งพาระหว่างรากพืชกับรากพืชนั้นนอกจากจะมีเส้นใยภายในรากพืชแล้วยังมีเส้นใยภายนอกรากพืชโดยเส้นใยของเชื้อรามีขนาดเล็กกว่ารากพืชทำให้เจริญแทรกไปยังดินไปได้กว่ารากพืชเพียงอย่างเดียว โดยเชื้อราจะช่วยเพิ่มพื้นที่ในการดูดซึมธาตุอาหารต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญของพืชโดยเฉพาะฟอสฟอรัส (P) อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายธาตุอาหารภายในดินที่ย่อยสลายยาก เช่น สังกะสี (Zn) เป็นต้น ทำให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ง่ายขึ้น (Habte et al., 1999) ในขณะเดียวกันเชื้อราก็กได้รับสารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่พืชสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการเจริญ (Jakobsen et al., 2002) มีรายงานว่ารา AMF สามารถส่งเสริมการดูดซึมฟอสฟอรัสให้แก่พืชที่อาศัยได้ดีกว่าพืชที่ไม่มีรา AMF อีกทั้งยังมีความสามารถในการช่วยดูดซึมน้ำให้แก่พืชโดยพบว่ารา AMF จะช่วยดูดซึมน้ำจากดินและลำเลียงส่งให้พืชโดยตรง มีส่วนช่วยในการปรับแรงดันออสโมซิส และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผนังเซลล์พืชให้ยืดหยุ่นมากขึ้น (Quilambo, 2003)

2. ช่วยเพิ่มความต้านทานต่อโรคพืช

รา AMF มีความสามารถในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคในพืชให้แก่พืชอาศัย เช่น *Fusarium* sp. และ *Phytophthora parasitica* โดยการเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะไปทำให้เกิดการแสดงออกของยีนต้านทาน แสดงออกคล้ายกับพืชตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค เมื่อเชื้อราเจริญเข้าไปอยู่ในรากพืชมากขึ้นจะเหนี่ยวนำให้พืชมีความต้านทานต่อโรคพืชเพิ่มขึ้น (García-Garrido & Ocumpo, 2002) อีกทั้งยังมีรายงานว่ามีการใช้รา AMF ในการควบคุมโรคพืชได้อีกด้วย

3. ช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดินให้ดีขึ้น

เนื่องจากรา AMF มีโครงสร้างพิเศษคือเส้นใย (hyphae) โดยมีเส้นใยที่เจริญเข้าไปในรากพืชแล้วยังมีเส้นใยที่เจริญออกมาข้างนอกรากออกสู่ดินโดยเส้นใยบริเวณนี้จะอยู่ผสานกันเป็นร่างแหภายในดินและปล่อยสารประกอบจำพวก glycoprotein ซึ่งจะทำให้เกิดการรวมตัวกันของเม็ดดิน ช่วยปรับปรุงให้ดินมีความร่วนซุย โปร่ง ระบายน้ำและอากาศได้ดี นอกจากนี้ยังช่วยหมุนเวียนธาตุอาหารในดิน ลดการสูญเสียธาตุอาหารที่จำเป็นและเหมาะสมต่อการเจริญต่อการเจริญเติบโตของพืช (Rillig & Mummey, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน

3.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดิน

สำรวจและเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากข้าวและดินคันนา 2 แหล่ง ได้แก่ ดินจากบริเวณโรงเรือน (Green House) ของ สวทช. และ ดินจากนาข้าว ตำบลหนองห้าง อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดกาฬสินธุ์ ข้อมูลสถานที่เก็บแสดงดังตารางที่ 3.1 โดยเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูฝนในเดือนมิถุนายน และกรกฎาคม พ.ศ.2566 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินเพื่อคัดเลือกสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (AMF)

วันที่	site	ตัวอย่าง		หมายเหตุ
		ดินนาข้าว	ดินหญ้า บนคันนา	
29 มิ.ย. 66	โรงเรือน (Green House) ของ สวทช.	✓	✓	1. เก็บดินแปลงละ 10 จุด นำมาผสมรวมกัน 2. พื้นที่ทำการเกี่ยวข้าวแล้ว ดินแห้ง รอไถ กลบ
11 ก.ค. 66	ต.หนองห้าง อ.กุฉินารายณ์ จ.กาฬสินธุ์	✓	✓	1. เก็บดินแปลงละ 10 จุด นำมา ผสมรวมกัน 2. แปลงสมบูรณ์ ใส่ปุ๋ยเคมี และสารเคมี กำจัดศัตรูพืช

3.1.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินจำนวนดินละ 10 ตัวอย่าง สุ่มตัวอย่างให้กระจายพื้นที่ห่างกันตัวอย่างละ 10 เมตร ที่ระดับความลึก 15-30 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างดินประมาณ 1-2 กิโลกรัม ตัวอย่างรากต้นข้าวล้างให้สะอาด และซับให้แห้งเก็บใส่ถุงกระดาษขาวที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเตรียมศึกษาโครงสร้างพิเศษของรา AMF เช่น เวสิเคิล (vesicle) อาร์บัสคูล (arbuscule) หรือเส้นใย (hypha) ที่อยู่ในรากพืชต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การศึกษาเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

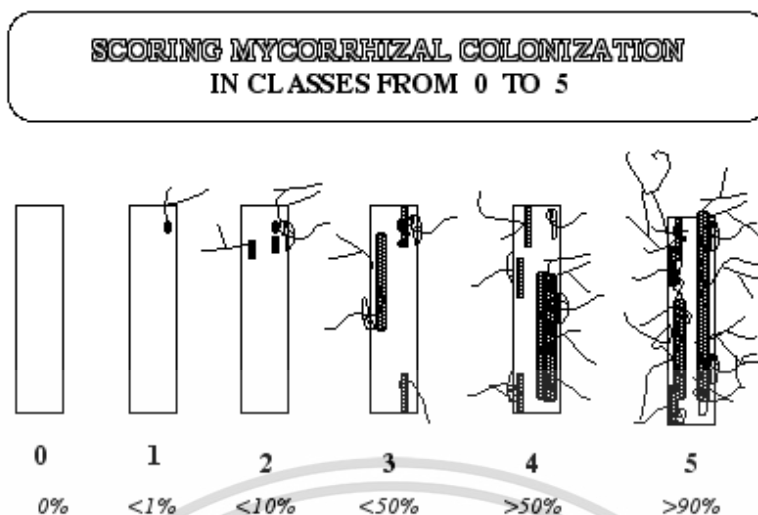
3.2.1 การตรวจนับปริมาณสปอร์ของรา AMF จากดินหัวเชื้อ

ทำการตรวจนับปริมาณสปอร์ของรา AMF ในรากพืชด้วยวิธีการร่อนเปียก (wet sieve method) (Brundrett, 1996) และวิธีปั่นเหวี่ยงด้วยน้ำตาลซูโครส (sucrose centrifugation) (Smith, 1979) โดยชั่งดิน 100 กรัม ใส่บีกเกอร์เติมน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแช่ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นเทน้ำลงบนตะแกรงร่อนขนาด 500, 250, 125 และ 32 ไมโครเมตร ตามลำดับ นำตะกอนที่กรองได้บนตะแกรงขนาด 125 และ 32 ไมโครเมตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทของเหลวทิ้งแล้วเติมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 50% กวนตะกอนให้เข้ากับสารละลายแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นแล้วกรองผ่านกรวยกรองโดยใช้เครื่องซัคชั่น (suction) จากนั้นถ่ายสปอร์ลงบนกระดาษกรอง นำไปนับจำนวนสปอร์ของรา AMF ได้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ นำสปอร์ที่จำแนกได้วางบนสไลด์แล้วหยด Polyvinyl-Lacto-Glycerol (PVLG) ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์เพื่อเก็บไว้จำแนกชนิดของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อไป

3.2.2 การประเมินการเข้าอยู่อาศัยในรากพืชของรา AMF จากดินหัวเชื้อ

นำตัวอย่างรากขาวจากในดินมาล้างด้วยน้ำเปล่าให้สะอาด ใส่ลงในขวดแก้วจากนั้นเติม 10% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) นำไปบ่มอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างรากด้วยน้ำเปล่าแล้วเติม 2% กรดแลคติก (Lactic acid) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทของเหลวทิ้ง เติมสีย้อม 0.05% ทริปแฟนบลู (Trypan Blue) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่ทิ้งไว้ข้ามคืนให้รากย้อมติดสี นำรากไปตรวจสอบโครงสร้างของรา AMF ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยตัดรากให้มีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตรเรียงกัน 30 เส้น หยดน้ำเปล่าแล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นตรวจประเมินการเข้าอาศัยภายในราก (%Colonization) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า จากการนับโครงสร้างพิเศษของรา AMF ที่ปรากฏ เช่น เวสิเคิล (vesicle) อาร์บัสคูล (arbuscule) หรือเส้นใย (hyphae) โดยโครงสร้างพิเศษนี้จะติดสีฟ้าเข้มส่วนเนื้อเยื่อรากขาวจะไม่ติดสี (รูปที่ 3.1) (Trouvelot et al., 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 วิธีการประเมินการเข้าอยู่อาศัยภายในราก

วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยในรากพืชของเชื้อรา AMF

$$\% \text{ การเข้ารากพืช} = (90n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1)/N$$

n_5 = number of fragments rated 5

n_4 = number of fragments rated 4

n_3 = number of fragments rated 3

n_2 = number of fragments rated 2

n_1 = number of fragments rated 1

N = Total root fragments

3.2.3 การจัดจำแนกชนิดตามลักษณะสัณฐานวิทยาของรา AMF

หดยีสรา Polyvinyl-Lacto-Glycerol (PVLG) ลงบนสไลด์ ใช้ forcep คีบสปอร์ของเชื้อราลงในสารที่หยดไว้ประมาณ 10 สปอร์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ใช้ปลายเข็มกดกระจกปิดสไลด์ตำแหน่งที่มีสปอร์ให้สปอร์แตกออกเพื่อดูลักษณะภายในของสปอร์ เช่น สารภายในสปอร์ที่มีลักษณะเป็นหยดไขมัน และจำนวนชั้นผนังสปอร์ เป็นต้น ตรวจสอบลักษณะภายนอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตลักษณะของสปอร์ เช่น สี พื้นผิว และวัดขนาดสปอร์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การศึกษาราคา AMF ด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุล

3.2.4.1 การสกัดสารพันธุกรรม

วิธีที่ 1 CTAB method

ทำการสกัดจากพันธุกรรมจากสปอร์รา AMF โดยใช้ตัวอย่างสปอร์ 100 สปอร์ เลือกลักษณะสปอร์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน สกัด DNA ด้วยวิธี CTAB method โดยเติม CTAB ปริมาตร 600 ไมโครลิตร จากนั้นบดสปอร์ให้แตกด้วย micro pestle นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำมาเติม CIAA (chloroform : isoamyl alcohol) อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับตัวอย่างโดยกลับลอดไปมา 50 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใส (supernatant) ใส่ในหลอดใหม่ ปริมาตร 450 ไมโครลิตร จากนั้นเติม cold isopropanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร กลับลอดไปมาอีก 30 ครั้ง นำตัวอย่างไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งล้างตะกอน DNA ด้วย cold 70% ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เทน้ำทิ้งแล้วปล่อยให้ตะกอน DNA แห้งโดยปล่อยให้แห้งข้ามคืน (overnight) ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ละลาย DNA และเก็บรักษา DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 2 ชุด Kit

ทำการสกัดจากพันธุกรรมจากสปอร์รา AMF โดยใช้ตัวอย่างสปอร์ 100 สปอร์ เลือกลักษณะสปอร์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน ด้วยชุด Kit (DNeasy® Plant Mini Kit) โดยการบดสปอร์ให้แตกด้วย micro pestle กับทราย จากนั้นเติม Buffer AP1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำไป vortex แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที กลับลอด 2-3 ครั้ง ขณะบ่ม เมื่อครบเวลาเติม Buffer P3 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำแข็ง นาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เมื่อครบเวลาดูดส่วนใสใส่หลอด QIAshredder ที่มีหลอดข้างในขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เมื่อครบเวลาดูดส่วนใสในหลอดใหม่ เติม Buffer AW1 ปริมาตร 1.5 v/v ของสารผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน ดูดสารผสมลงในหลอด DNeasy Mini ปริมาตร 650 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Buffer AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Buffer AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร อีกครั้งนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้ายหลอดข้างในขนาด 2 มิลลิลิตรไปเป็นหลอด micro centrifuge อันใหม่ขนาด 1.5 หรือ 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Buffer AE1 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณ 100 ไมโครลิตรเพื่อชะล้าง DNA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที และเก็บรักษา DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.4.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มจำนวน DNA ของรา AMF โดยใช้ยีนจำนวน 3 ยีน ได้แก่ ITS (Internal transcribed spacer region) , SSU (Small subunit) และ LSU (Large subunit) ดังตารางที่ 3.2 จากตัวอย่างสปอร์ที่แยกได้จากการสกัดสารพันธุกรรม นำมาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ในสารละลาย 1X TAE ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที เปรียบเทียบกับ DNA ladder marker จากนั้นตรวจดูแถบ Genomic DNA ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Doc

ตารางที่ 3.2 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้านอนุชีวโมเลกุล

Gene	Primers		Sequence (5'→3')	Reference
ITS	ITS1	Forward	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	(White et al., 1990)
	ITS4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	(White et al., 1990)
	ITS1F	Forward	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	(Gardes & Bruns, 1993)
	ITS4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	(White et al., 1990)
SSU	NS31	Forward	TTG GAG GGC AAG TCT GGT GCC	(Simon et al., 1992)
	AM1	Reverse	GTT TCC CGT AAG GCG CCG AA	(Helgason et al., 1998)
	NS31	Forward	TTG GAG GGC AAG TCT GGT GCC	(Simon et al., 1992)
	AML2	Reverse	GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C	(Lee et al., 2008)
LUS	FLR3	Forward	TTG AAA GGG AAA CGA TTG AAG T	(Gollotte et al., 2004)
	FLR4	Reverse	TAC GTC AAC ATC CTT AAC GAA	(Gollotte et al., 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 PCR condition ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย

Step	ITS	SSU (Öpik et al., 2009)	LSU
Preheat	96 °C (2 min)	94 °C (2 min)	94 °C (2 min)
Denature	96 °C (1 min)	94 °C (45 sec)	93 °C (1 min)
Annealing	56 °C (1 min)	65 °C (45 sec)	58 °C (1 min)
Extension	72 °C (1:30 min)	72 °C (45 sec)	72 °C (1 min)
Cycle	34	35	39
Final extension	72 °C (7min)	72 °C (10 min)	72 °C (10 min)
Final hold	15 °C	15 °C	12°C

3.2.4.3 การวิเคราะห์ลำดับเบส

เมื่อได้ข้อมูลลำดับเบส DNA เรียบร้อยแล้ว นำมาประกบคู่สาย DNA ทำ consensus sequence ในโปรแกรม BioEdit v.7.0.5.3 จากนั้นตรวจดูคุณภาพลำดับเบสที่ได้ ตัดแต่งต้นสายและปลายสาย DNA ทั้งเส้น forward และ reverse จากนั้นกลับเส้น reverse แล้วรวมสาย forward และ reverse แก้ไขข้อมูลลำดับเบสให้ตรงกันทั้งหมดแล้วบันทึกข้อมูลของสายที่แก้ไขแล้วให้เรียบร้อย

เมื่อได้ลำดับเบสที่เป็นสายประกบคู่ consensus sequence มาแล้วนำข้อมูลที่ได้ไปค้นหาข้อมูลในโปรแกรม BLASTn จากฐานข้อมูลของ GenBank ในเว็บไซต์ของ NCBI โดยเลือกข้อมูลที่มี sequence ที่เหมือนกันมากที่สุด นำมาสร้างข้อมูล dataset โดยนำ consensus sequence ที่ได้เทียบกับ sequence ของ GenBank แล้วใช้โปรแกรม MAFFT online (<http://maff.cbrc.jp/alignment/server>) เรียงลำดับเบสทำการตัดส่วนเกินของสาย sequence ต้นสายและปลายสายปรับให้ลำดับเบสใกล้เคียงกันมากที่สุดโดยใช้โปรแกรม BioEdit v.7.0.5.3 (Hall, 1999)

3.2.4.4 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

โดยใช้โปรแกรม Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) และ Bayesian Inference (BI) ทำการแปลงข้อมูล (export dataset) ของ sequence alignment โดยเปลี่ยนข้อมูลจากสกุล .fasta ให้เป็นสกุล .phy เพื่อวิเคราะห์ Maximum Likelihood (ML) ใน CIPRES โดยใช้ RAXML-HPC2 v.8.2.12 บน XSEDE ที่มีการรันการสร้างตัวอย่างบูทสตรป (bootstrap) 1,000 ครั้ง และเปลี่ยนข้อมูลจากสกุล .fasta ให้เป็นสกุล .nexus เพื่อวิเคราะห์ Maximum Parsimony (MP) ในโปรแกรม PAUP v.4.0b10

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และวิเคราะห์ Bayesian inference (BI) โดยใช้ MrBayes v.3.0b4 เพื่อสร้างแผนภูมิแสดงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

3.3 การเพิ่มปริมาณสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา โดยวิธี Trap culture

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืชทดลอง

การเพาะเลี้ยงต้นข้าว โดยนำเมล็ดข้าวมาแช่น้ำทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นเพาะเลี้ยงในกล่องเก็บความชื้น (moist chamber) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จนกระทั่งได้ต้นอ่อนเพื่อเตรียมปลูกลงในกระถาง

3.3.2 การเตรียมวัสดุปลูก

เตรียมดินสำหรับเพาะปลูกและทรายมาอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยนึ่งฆ่าเชื้อทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง ผสมดิน:ทราย ในอัตราส่วน 2:1 ใส่ในกระถาง เช็ดฆ่าเชื้อกระถางปลูกด้วย 70% เอทิลแอลกอฮอล์ จากนั้นปลูกลงต้นอ่อนข้าวในข้อ 3.5.1 จำนวน 1 ต้นลงในกระถาง นำสปอร์ที่แยกได้ในข้อ 3.3.1 เติมนลงในกระถางบริเวณรอบรากข้าว กระถางละประมาณ 100 สปอร์ รดน้ำให้ชุ่ม (รูปที่ 3.2) ทริตเมนต์ที่ใช้เพาะปลูก ได้แก่ ดินฆ่าเชื้อ (control), ดินฆ่าเชื้อ+AMFสปอร์สีเหลือง, ดินฆ่าเชื้อ+AMFสปอร์สีน้ำตาล, ดินฆ่าเชื้อ+AMFสปอร์สีใส, ดินฆ่าเชื้อ+ดินหั่วเชื้อโรงเรือน (Green House) ของสวทช., ดินฆ่าเชื้อ+ดินหั่วเชื้อจังหวัดกาฬสินธุ์ และดินฆ่าเชื้อ+ดินการค้า (MYCORTECH™) โดยแต่ละทริตเมนต์มีจำนวน 6 ขั้ว ใส่ปุ๋ยเคมีตรากระติงลูกโลก สูตร 16-16-16 (Nitrogen, Phosphorus และ Potassium; N-P-K) เมื่อต้นข้าวอายุ 30 วัน วางในโรงเรือนที่มีแสงส่องถึง อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส รดน้ำวันเว้นวัน



รูปที่ 3.2 การเพิ่มปริมาณรา AMF โดยวิธี Trap culture ภายในโรงเรือน (Green House)

ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การตรวจนับปริมาณสปอร์รา AMF ของพืชทดลองในโรงเรือน

ทำการตรวจนับปริมาณสปอร์ของรา AMF ในดินเมื่อข้าวมีอายุ 30 และ 45 วัน โดยเก็บตัวอย่างดินมาผสมให้เข้ากัน สุ่มตัวอย่างดินเพื่อตรวจนับจำนวนสปอร์ตามวิธีในข้อ 3.2.1 โดยใช้ดิน ปริมาณ 20 กรัม ตรวจสอบลักษณะและจัดจำแนกสปอร์ของรา AMF สังเกตลักษณะสี ขนาด พื้นผิว และขนาดชั้นผนังของสปอร์รา AMF

3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของของรา AMF ในการส่งเสริมการเจริญของพืชทดลองในโรงเรือน

บันทึกและเก็บข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของข้าวในข้อ 3.3 ที่มีการเติมทริตเมนต์ลงไป โดยบันทึกข้อมูลทั้งหมด 3 ด้าน ได้แก่ (1) ปริมาณสปอร์ของรา AMF ที่เพิ่มขึ้นในดิน ตามวิธีในข้อที่ 3.2.1 โดยใช้ดินปริมาณ 20 กรัม ตรวจสอบลักษณะและจัดจำแนกสปอร์ของรา AMF สังเกตลักษณะสี ขนาด พื้นผิว และขนาดผนังของสปอร์รา AMF (2) วัดประเมินการเข้าอยู่อาศัยในราก (root colonization) ตามวิธีในข้อ 3.2.3 และ (3) ความสูงของต้นข้าว

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS windows เวอร์ชัน 22 โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน

พื้นที่ที่ศึกษาสำหรับการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบบรอกข้าวและดินคั่นนาประกอบด้วย 2 แหล่ง ได้แก่ พื้นที่บริเวณที่ 1 คือ ดินนาข้าวบริเวณโรงเรือน (Green House) ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) เป็นดินแปลงนาข้าวที่เก็บเกี่ยวแล้ว ดินมีลักษณะแห้ง รอโลกบ เป็นแปลงนาข้าวที่ปลูกข้าวเพียงอย่างเดียว แต่มีการหมุนเวียนสายพันธุ์ข้าวที่ใช้ปลูก (รูปที่ 4.1) โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 26 มิถุนายน พ.ศ.2566 จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 10 จุด และ พื้นที่บริเวณที่ 2 คือ ดินจากนาข้าว ตำบลหนองห้าง อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดกาฬสินธุ์ พื้นที่เป็นแปลงนาข้าวที่มีการปลูกข้าวอุดมสมบูรณ์ มีการใส่ปุ๋ยเคมีในนาข้าว (รูปที่ 4.2) โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 11 กรกฎาคม พ.ศ.2566 จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 10 จุด เช่นเดียวกัน



รูปที่ 4.1 ลักษณะพื้นที่บริเวณนาข้าวโรงเรือน (Green House) ของ สวทช.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ลักษณะพื้นที่บริเวณนาข้าว จ.กาฬสินธุ์

4.2 การศึกษาเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การตรวจนับปริมาณสปอร์ของรา AMF

การศึกษาคความหลากหลายของรา AMF โดยตรวจนับจำนวนสปอร์ในตัวอย่างดินบริเวณรอบรากข้าว และดินคั่นนา 2 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณโรงเรือน (Green House) ของสวทช. และ ดินจากนาข้าว ตำบลหนองห้าง อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดกาฬสินธุ์ สามารถจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์เชื้อราได้ 4 ลักษณะ ได้แก่ (1) สปอร์สีเหลือง ขนาด 115x147.5 – 137.5x160 ไมครอน รูปร่างรี ผิวเรียบ, (2) สปอร์สีน้ำตาล ขนาด \varnothing 92.5 – 190 ไมครอน รูปร่างกลม ผิวเรียบ, (3) สปอร์สีใส \varnothing 97.5 – 197.5 ไมครอน รูปร่างกลม ผิวเรียบ และ (4) สปอร์สีเทา ขนาด \varnothing 92.5 – 112.5 ไมครอน รูปร่างกลม ผิวเรียบ จากตัวอย่างดินทั้งหมดที่เก็บมาศึกษา พบว่าในแต่ละพื้นที่มีจำนวนความหนาแน่นของประชากรเชื้อรา AMF แตกต่างกัน

พื้นที่ที่พบจำนวนสปอร์มากที่สุดคือ ดินคั่นนา จ.กาฬสินธุ์ ปริมาณสปอร์ที่พบคือ 290.4 สปอร์/ดิน 100 กรัม โดยพบลักษณะของสปอร์ 3 ลักษณะ ได้แก่ สปอร์สีเหลืองรี จำนวน 91.6 สปอร์/ดิน 100 กรัม สปอร์สีน้ำตาลกลม จำนวน 193.4 สปอร์/ดิน 100 กรัม และสปอร์สีใสกลม จำนวน 6.4 สปอร์/ดิน 100 กรัม จำนวนสปอร์สีน้ำตาลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนสปอร์สีใส ส่วนจำนวนสปอร์สีเหลืองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนสปอร์สีน้ำตาลและสีเหลือง

รองลงมาคือดินคั่นนา จากโรงเรือน (Green House) ของ สวทช. ปริมาณสปอร์ที่พบคือ 261.8 สปอร์/ดิน 100 กรัม โดยพบลักษณะของสปอร์ 4 ลักษณะ ได้แก่ สปอร์สีเหลืองรี จำนวน 124 สปอร์/ดิน 100 กรัม สปอร์สีน้ำตาลกลม จำนวน 108.2 4 สปอร์/ดิน 100 กรัม สปอร์สีใสกลม จำนวน 16.4 4 สปอร์/ดิน 100 กรัม และ สปอร์สีเทากลม จำนวน 13.2 4 สปอร์/ดิน 100 กรัม จำนวนสปอร์สีเหลืองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนสปอร์สีน้ำตาลและสีเทา ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนสปอร์สีไสและสีเทาส่วนจำนวนสปอร์สีน้ำตาลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนสปอร์สีเหลือง สีไส และสีเทา

ตัวอย่างซึ่งมีความหลากหลายรองลงมา ได้แก่ ดินจากนาข้าว โรงเรือน (Green House) ของ สวทช. ปริมาณสปอร์ที่พบคือ 190.9 สปอร์/ดิน 100 กรัม พบลักษณะของสปอร์ 4 ลักษณะ ได้แก่ สปอร์สีเหลืองรี จำนวน 171 สปอร์/ดิน 100 กรัม สปอร์สีน้ำตาลกลม จำนวน 6.3 สปอร์/ดิน 100 กรัม สปอร์สีไสกลม จำนวน 9.7 สปอร์/ดิน 100 กรัม และสปอร์สีเทากลม จำนวน 3.9 สปอร์/ดิน 100 กรัม จำนวนสปอร์สีเหลืองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนสปอร์สีน้ำตาล สีไส และสีเทา

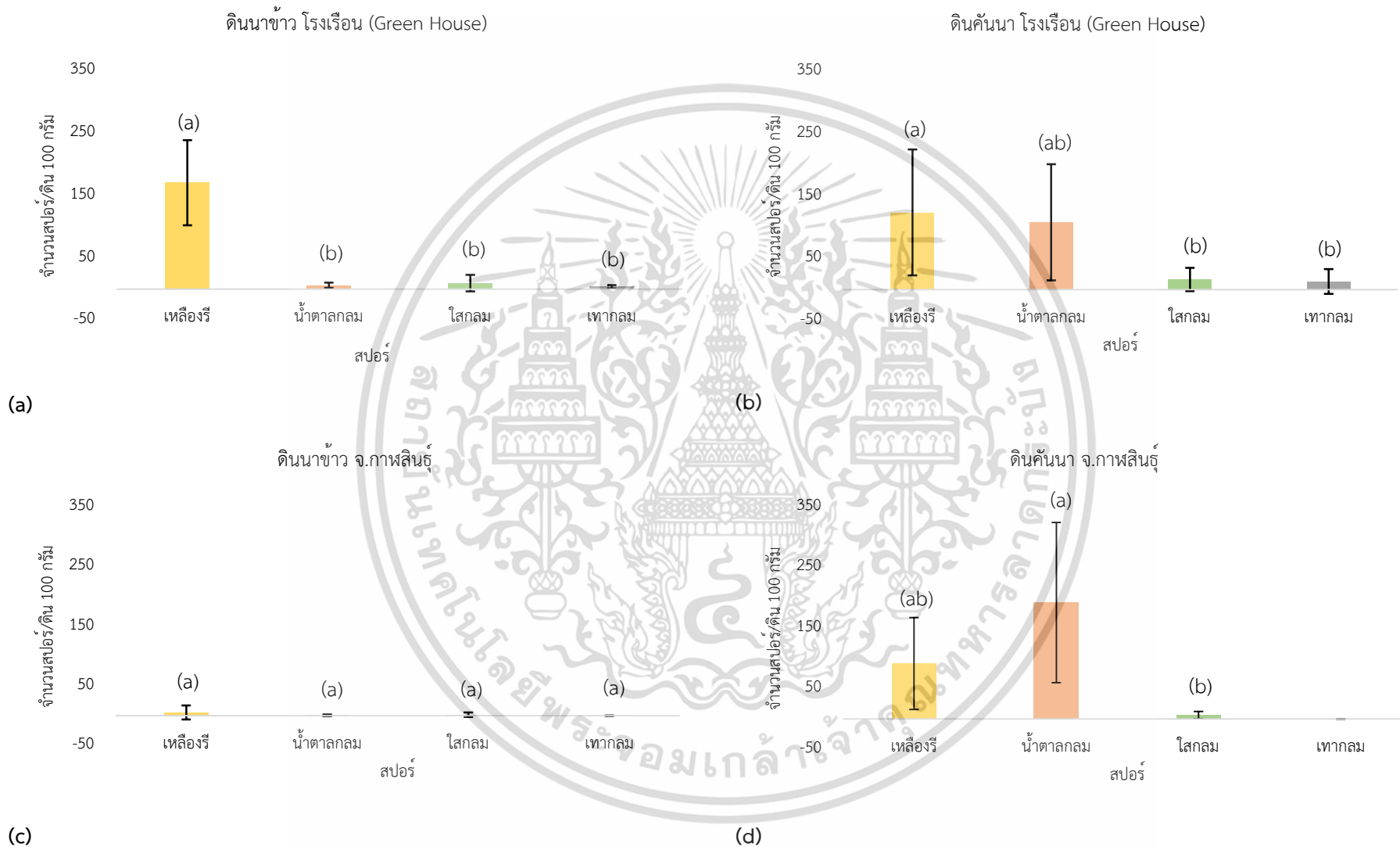
พื้นที่ที่พบจำนวนสปอร์น้อยที่สุดคือ ดินนาข้าว จ.กาฬสินธุ์ ปริมาณสปอร์ที่พบคือ 8.1 สปอร์/ดิน 100 กรัม พบลักษณะของสปอร์ 4 ลักษณะ ได้แก่ สปอร์สีเหลืองรี จำนวน 5.4 สปอร์/ดิน 100 กรัม สปอร์สีน้ำตาลกลม จำนวน 0.8 สปอร์/ดิน 100 กรัม สปอร์สีไสกลม จำนวน 1.8 สปอร์/ดิน 100 กรัม ปริมาณสปอร์ที่พบคือ 8.1 สปอร์/ดิน 100 กรัม และสปอร์สีเทากลม จำนวน 0.1 สปอร์/ดิน 100 กรัม จำนวนสปอร์แต่ละลักษณะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4.3)

จากการทดลองศึกษาความหลากหลายและปริมาณของรา AMF รอบรากข้าวและดินคั่นนาจากดินหัวเขื่อนนาข้าวโรงเรือน (green House) และนาข้าว จ.กาฬสินธุ์ พบว่าปริมาณสปอร์เชื้อราอาจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ลักษณะของสถานที่เก็บดินตัวอย่าง จากการทดลองพบว่าดินนาข้าว จ.กาฬสินธุ์มีปริมาณสปอร์น้อยกว่านาข้าวโรงเรือน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kabir et al. (1998) กล่าวว่าดินที่ไม่มีการไถที่จะพบความหนาแน่นของเส้นใยเชื้อรามากกว่าดินที่มีการไถอยู่เสมอซึ่งส่งผลให้เส้นใยมีความเสียหาย โดยจะเห็นว่านาข้าว จ.กาฬสินธุ์เป็นนาที่มีการไถพรวนอยู่เสมอตามฤดูกาลในการปลูกข้าว ไม่มีการปลูกพืชหมุนเวียนอีกทั้งยังมีการใช้สารเคมีในนาข้าวส่งผลให้พบปริมาณของสปอร์เชื้อราน้อยกว่านาข้าวโรงเรือน หรือจุลินทรีย์ ธาตุอาหารและค่า pH ในดินที่ไม่เหมาะสมในการเจริญ สอดคล้องกับการทดลองของ Raju et al. (1990) ได้รายงานว่าจำนวนสปอร์ของเชื้อราจะแปรผันกับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ภายในดินดังนั้นการออกของสปอร์รา AMF ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยจึงทำให้พบปริมาณสปอร์และสปิซิสของเชื้อรามากน้อยแตกต่างกันไป

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์รา AMF

Morphotype	สี	ขนาด (ไมครอน)	รูปร่าง	พื้นผิว
1	เหลือง	115x147.5 – 137.5x160	รี	เรียบ
2	น้ำตาล	∅ 92.5 - 190	กลม	เรียบ
3	ไส	∅ 97.5 – 197.5	กลม	เรียบ
4	เทา	∅ 92.5 – 112.5	กลม	เรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในงานเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงความหนาแน่นของจำนวนสปอร์ของรา AMF ในดินแต่ละแหล่ง (สปอร์/ดิน 100 กรัม)

(a) ดินนาข้าว โรงเรือน (Green House)

(c) ดินนาข้าว จ.กาฬสินธุ์

(b) ดินคันทนา โรงเรือน (Green House)

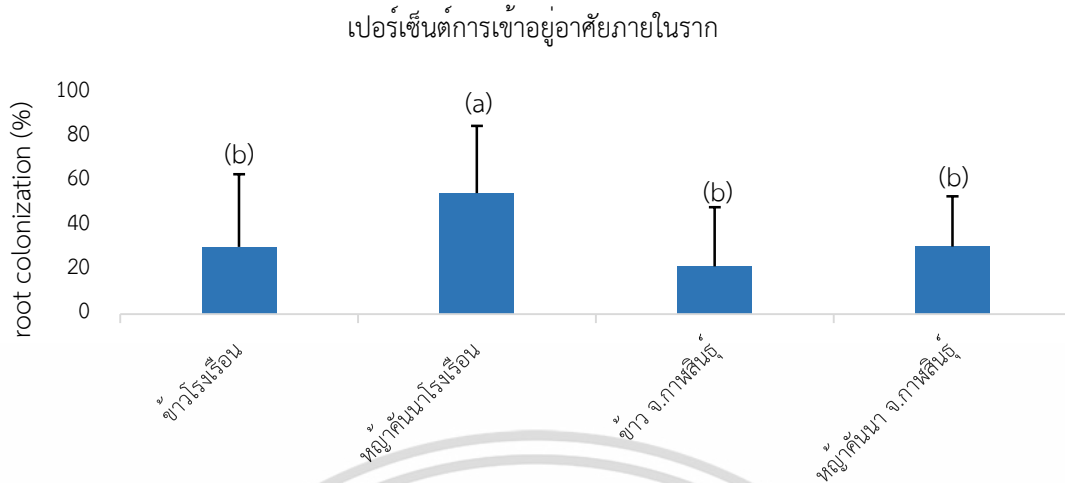
(d) คันทนา จ.กาฬสินธุ์

การประเมินการเข้าอยู่อาศัยในรากพืชของรา AMF

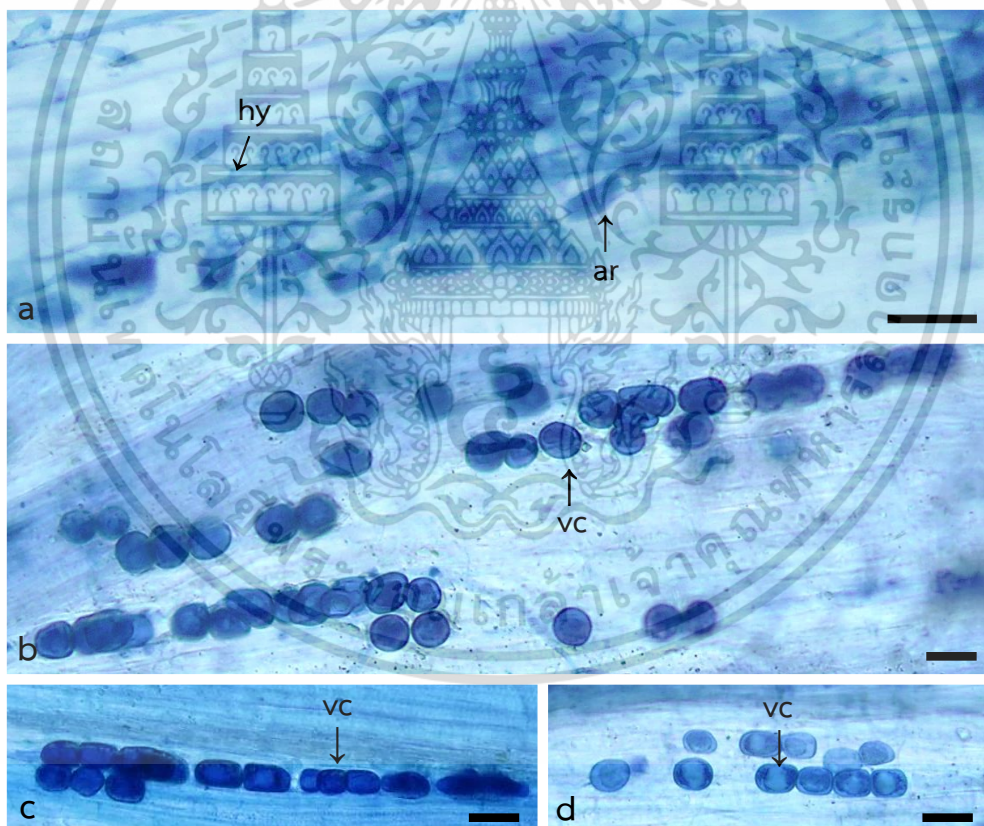
จากการนำดินบริเวณรอบรากข้าวและดินคันทนา 2 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณโรงเรือน (Green House) ของสวทช. และ ดินจากนาข้าว ตำบลหนองห้าง อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดกาฬสินธุ์ มาประเมินการเข้าอยู่อาศัยภายในรากของรา AMF โดยใช้วิธีการย้อมรากด้วย Trypan blue จากการประเมินโครงสร้างของเชื้อราในรากพืชที่ปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถพบได้ 3 ลักษณะ ได้แก่ เวสิเคิล (vesicle), อาร์บัสคูล (arbuscule), และเส้นใย (hyphae) โดยพบว่าการเข้าอยู่อาศัยภายในรากของรา AMF ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4.4) โดยพื้นที่ที่มีการเข้าอยู่อาศัยภายในรากมากที่สุดคือ หน้าคันทนาโรงเรือน (Green House) มีการเข้าราก 54.83% พบโครงสร้างภายในราก 3 ลักษณะ คือ เวสิเคิล, อาร์บัสคูล, และเส้นใย (รูปที่ 4.6) รองลงมาคือ หน้าคันทนา จ.กาฬสินธุ์ มีการเข้าราก 30.67% พบโครงสร้างภายในราก 3 ลักษณะ คือ เวสิเคิล, อาร์บัสคูล และเส้นใย (รูปที่ 4.8) ต่อมาคือ ข้าวโรงเรือน (Green House) มีการเข้าราก 30.47% พบโครงสร้างภายในราก 3 ลักษณะ คือ เวสิเคิล, อาร์บัสคูล, และเส้นใย (รูปที่ 4.5) และสุดท้ายพบการเข้ารากน้อยที่สุดคือ ข้าว จ.กาฬสินธุ์ มีการเข้าราก 21.57% พบโครงสร้างภายในราก 3 ลักษณะ คือ เวสิเคิล, อาร์บัสคูล และเส้นใย (รูปที่ 4.7)

งานวิจัยหลายฉบับได้เปรียบเทียบชนิดของพืชอาศัยโดยพบว่าชนิดของพืชอาศัยมีอิทธิพลต่อการเข้าอยู่อาศัยภายในรากโดยให้ข้อมูลว่าพืชในกลุ่มธัญพืชสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อราได้มากที่สุด (Simpson & Daft, 1990) จากการทดลองนี้คัดเลือกข้าวซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มธัญพืชที่มีระบบรากที่ดี จะเห็นว่าปริมาณสปอร์ของเชื้อราในพื้นที่ทั้ง 2 แหล่ง พบว่าการเข้าอยู่อาศัยภายในรากไม่สัมพันธ์กับปริมาณสปอร์ภายในดิน สอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่าเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยภายในรากไม่สัมพันธ์กับการสร้างสปอร์ของรา AMF (Daniell et al., 2001) แต่ก็มีรายงานของ Eom et al. (2000) ที่กล่าวว่ารา AMF ไม่จำเพาะต่อการเข้าอยู่อาศัยภายในรากของพืชอาศัยด้วยเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



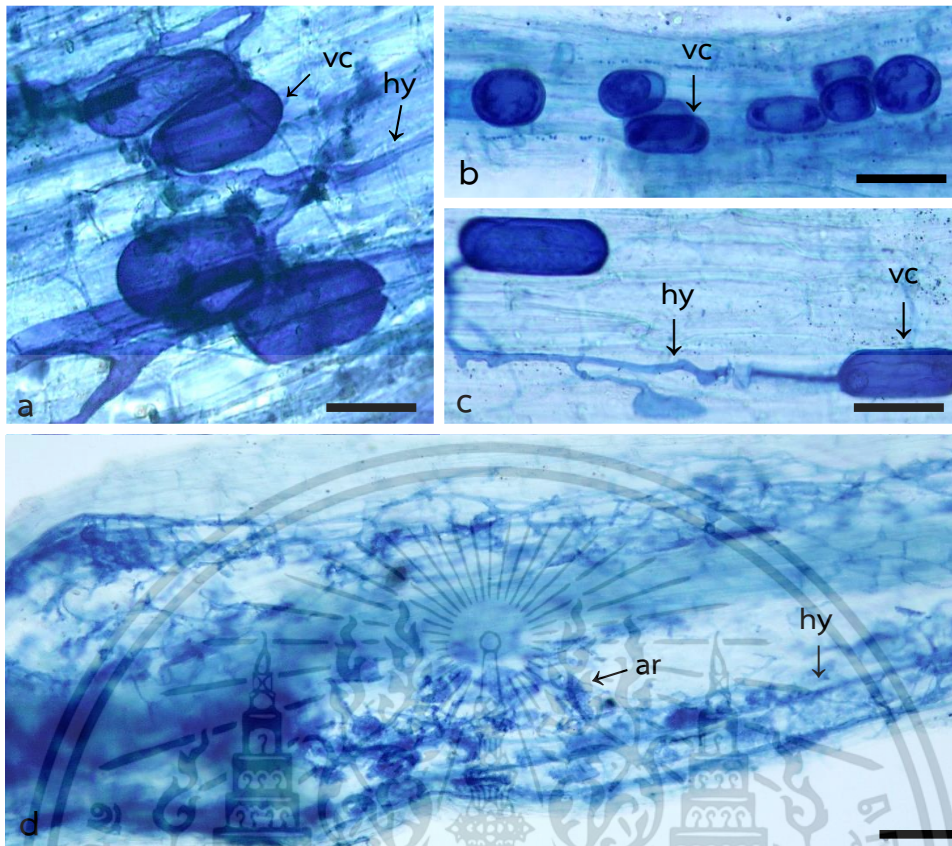
ดินตัวอย่าง
รูปที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยภายในรากพืชแต่ละแหล่ง



รูปที่ 4.5 การเข้าอยู่อาศัยของสปอร์รา AMF ในรากข้าวโรงเรือน (Green House)

(a) เส้นใย (hy, hyphae) และอาร์บัสคูล (ar, arbuscule), (b)-(d) เวสิเคิล (vc, vesicle),

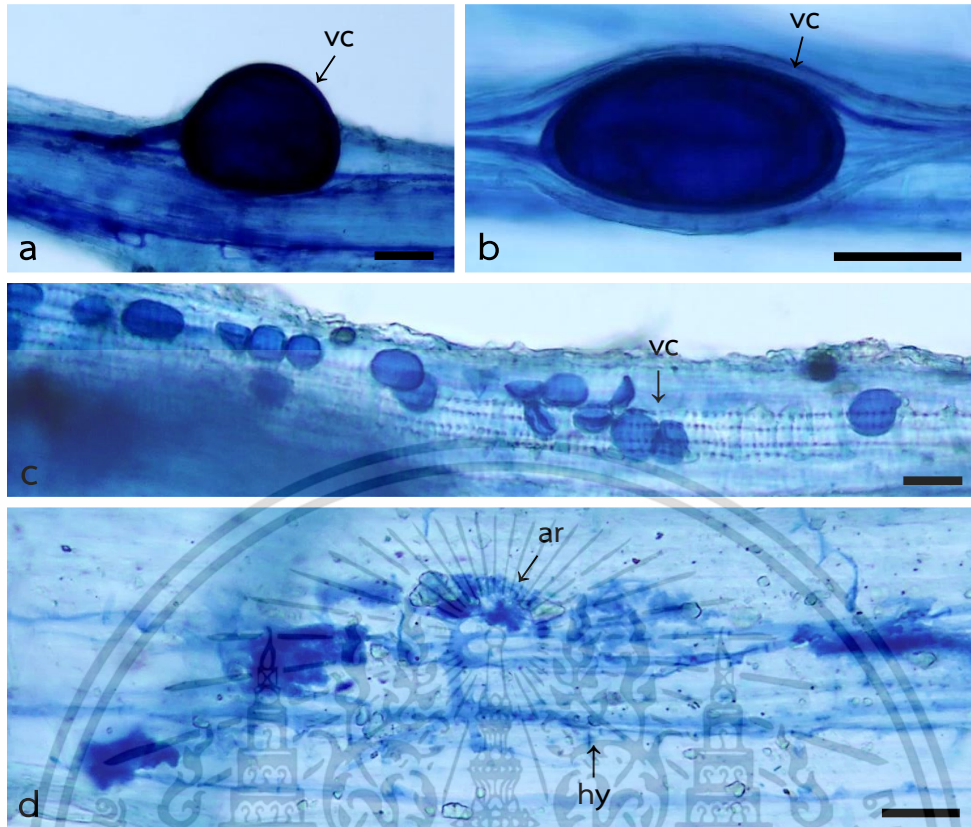
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
bars: a = 40 μ m, b-d = 20 μ m
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การเข้าอยู่อาศัยของสปอร์รา AMF ในรากหนุ่้าคั้่นนาโรงเรีอ (Green House)

(a),(c) เวสิเคิล (vc, vesicle) และเส้นใย (hy, hyphae), (b) เวสิเคิล (vc, vesicle), (d) อาร์บัสคูล (ar, arbuscule) และเส้นใย (hy, hyphae, bars: a-c = 20 μ m, d = 30 μ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

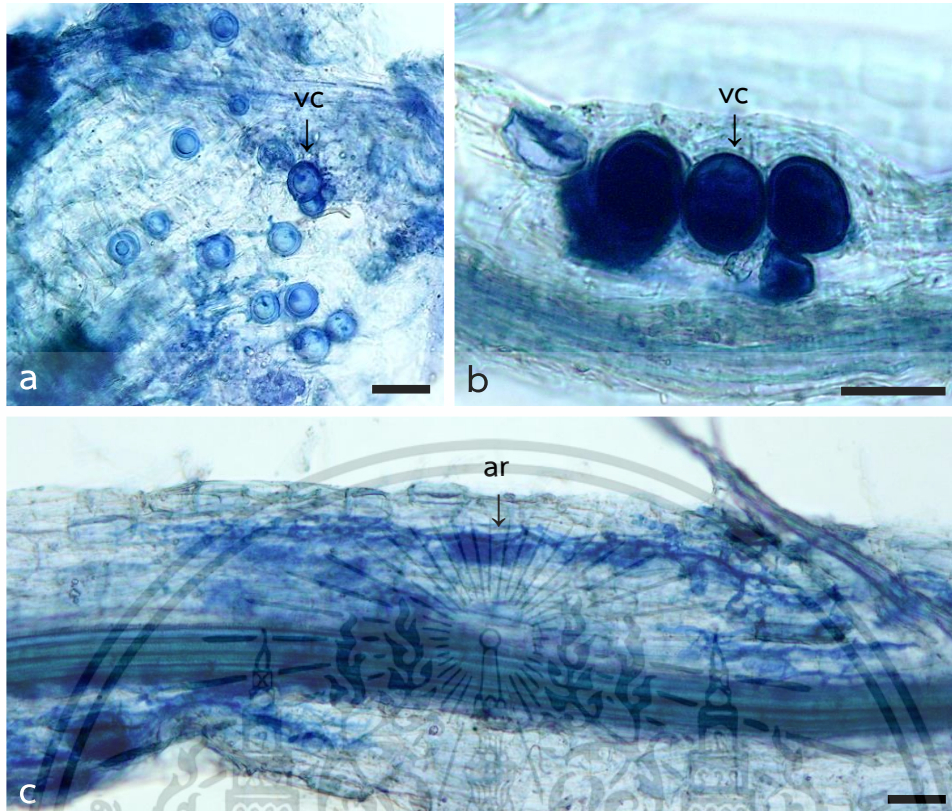


รูปที่ 4.7 การเข้าอยู่อาศัยของสปอร์รา AMF ในรากข้าว จ.ภาพลีนธ์

(a)-(c) เวสิเคิล (vc, vesicle), (d) อาร์บัสคูล (ar, arbuscule) และเส้นใย (hy, hyphae),

bars: a,c = 5 μ m, b,d = 20 μ m

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 การเข้าอยู่อาศัยของสปอร์รา AMF ในรากหมู้าคันทนา จ.ภาพสินธุ์

(a),(b) เวสิเคิล (vc, vesicle), (c) อาร์บัสคูล (ar, arbuscule), bars: a = 40 μm, b-c = 30 μm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

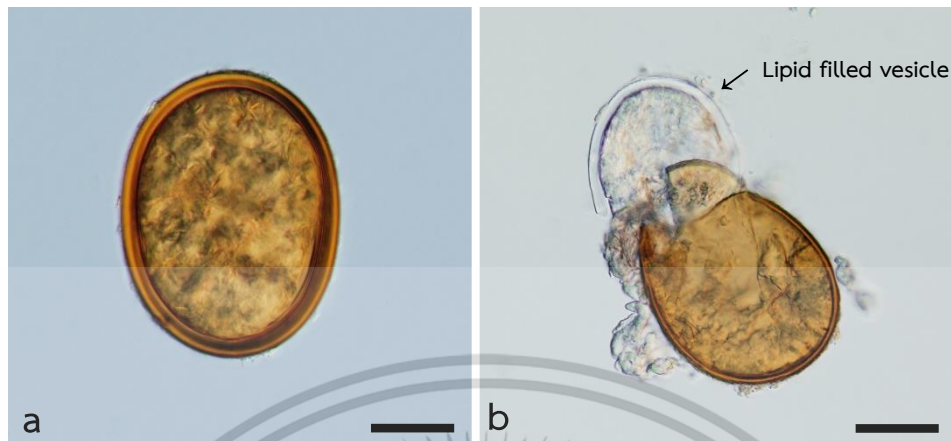
การจัดจำแนกชนิดตามลักษณะสัณฐานวิทยาของรา AMF

จากการจัดจำแนกชนิดตามลักษณะสัณฐานวิทยาของรา AMF พบว่าทั้งหมดเป็นราจัดอยู่ในสกุลเดียวกัน ได้แก่ *Acaulospora* แต่พบว่าจัดเป็นคนละชนิดกัน เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ที่แตกต่างกัน สามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด (species) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ชนิดของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบในดินตัวอย่างแต่ละแหล่ง

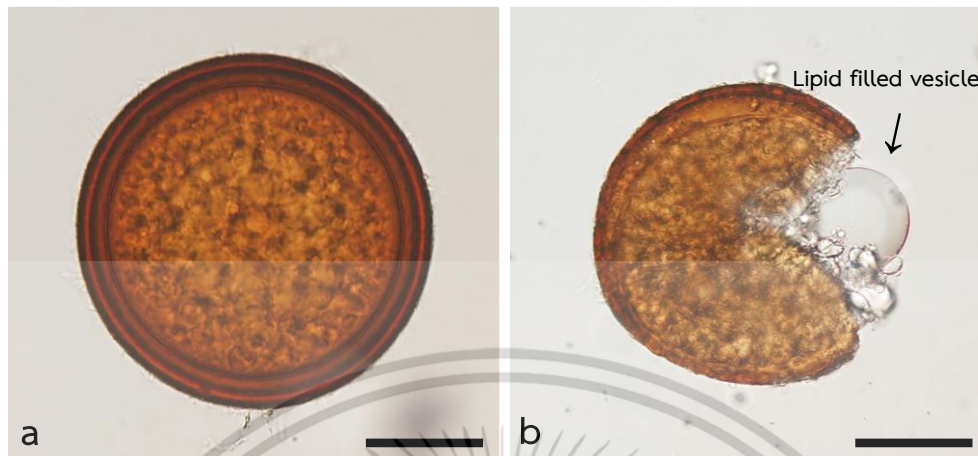
Genus	Species	Characteristics
<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora</i> sp.1	สีเหลืองรี
	<i>Acaulospora</i> sp.2	สีน้ำตาลกลม
	<i>Acaulospora</i> sp.3	ใสไม่มีสีกลม

จากการศึกษาของ วรพจน์ (2557) ที่ได้ศึกษาผลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและพืชตระกูลถั่ว ต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง พบว่าเชื้อราในสกุล *Acaulospora* มีความถี่ในการพบมากที่สุด สอดคล้องกับการทดลองที่ได้ศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า *Acaulospora* เป็นจีนัสที่พบได้บ่อยและมากที่สุด

Acaulospora sp.1รูปที่ 4.9 ลักษณะสปอร์ของ *Acaulospora* sp.1(a) สปอร์สภาพสมบูรณ์, (b) สปอร์ผนังเซลล์แตก, bars: a,b = 50 μ mลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สปอร์มีลักษณะรี (ellipsoidal) หรือเป็นรูปไข่ (ovoid) สปอร์มีสีเหลืองส้ม (brilliant orange yellow) ผนังผิวเรียบ พบเป็นสปอร์เดี่ยว มีผนังสปอร์ 2 ชั้น ลักษณะซ้อนกันบางๆหลายชั้น (laminated) ผนังหนา 3.75-6.25 μ m สปอร์มีขนาด 115x147.5 – 137.5x160 μ m

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acaulospora sp.2

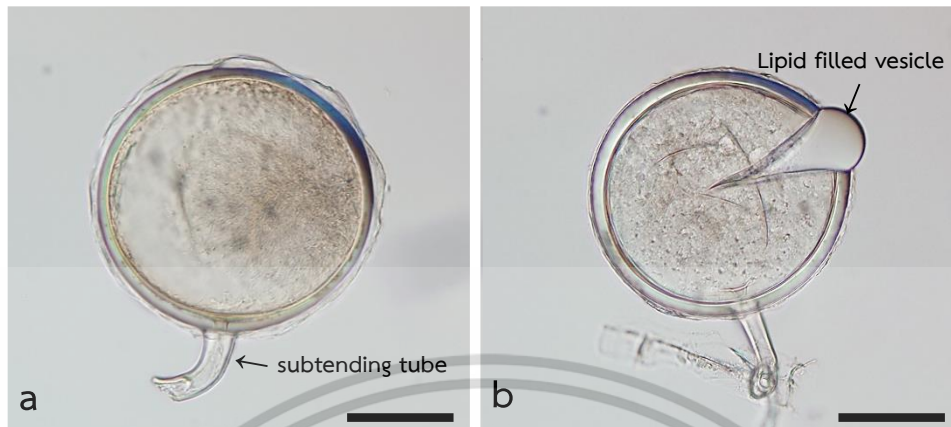
รูปที่ 4.10 ลักษณะสปอร์ของ *Acaulospora* sp.2

(a) สปอร์สภาพสมบูรณ์, (b) สปอร์ผนังเซลล์แตก, bars: a,b = 50 µm

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สปอร์ส่วนใหญ่มีลักษณะกลม (globose) ไปจนถึงค่อนข้างกลม (subglobose) สปอร์สีน้ำตาลอ่อน (light brown) ไปจนถึงสีส้มแดง (dark reddish orange) พื้นผิวเรียบ พบเป็นสปอร์เดี่ยว ผนังสปอร์มี 2 ชั้น ผนังซ้อนกันเป็นชั้น (lamine) ผนังสปอร์หนา 5-9.5 µm มีขนาดประมาณ 92.5 – 190 µm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acaulospora sp.3รูปที่ 4.11 ลักษณะสปอร์ของ *Acaulospora* sp.3(a) สปอร์สภาพสมบูรณ์, (b) สปอร์ผนังเซลล์แตก, bars: a,b = 50 μ mลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สปอร์มีลักษณะกลม (globose) สปอร์ไม่มีสี (hyaline) บางครั้งอาจพบเป็นสปอร์ค่อนข้างใส (subhyaline) หรือมีสีเหลืองอ่อน (pale yellow) พบเป็นสปอร์เดี่ยวติดกับก้านของสปอร์ (subventing tube) พื้นผิวเรียบ ผนังสปอร์มี 2 ชั้น ชั้นแรกเป็นผิวหน้าของสปอร์มีลักษณะบางเป็นผนังที่สลายหรือหลุดออกไปได้ง่าย ผนังชั้นที่ 2 มีความหนา 5-8.75 μ m มีขนาดประมาณ 97.5 – 197.5 μ m

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษารา AMF ด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุล

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR

จากการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา AMF จำนวน 3 ตัวอย่าง เมื่อทำการสกัด DNA แล้วนำมาเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยมียีนเป้าหมายจำนวน 3 ยีน คือยีน ITS, SSU และ LSU (ตารางที่ 4.3) โดยที่ยีน ITS และ SSU ใช้ primer จำนวนอย่างละ 2 คู่ในการศึกษา ซึ่ง primer ITS1-ITS4 และ NS31-AM1 ทำงานได้ไม่ดีนัก เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนยีนได้เพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น แต่ primer ITS1F-ITS4 และ NS31-AML2 สามารถเพิ่มยีนเป้าหมายได้ในทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษา ส่วนยีน LSU ซึ่งใช้ primer เพียง 1 คู่ในการศึกษา พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายได้ในทุกตัวอย่างโดยภาพรวมพบที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ครบทั้ง 3 ยีน ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำข้อมูลในส่วนนี้มาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

ตารางที่ 4.3 ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR

ตัวอย่าง	Morphology	ยีน ITS *		ยีน SSU		ยีน LSU
		ITS1-ITS4	ITS1F-ITS4	NS31- AM1	NS31- AML2	FRL3-FRL4
สปอร์สีเหลือง	<i>Acaulospora</i> sp.1	-	+	-	+	+
สปอร์สีน้ำตาล	<i>Acaulospora</i> sp.2	+	+	+	+	+
สปอร์ใสไม่มีสี	<i>Acaulospora</i> sp.3	-	+	-	+	+
รวม		1	3	1	3	3

หมายเหตุ + ; สามารถเพิ่มปริมาณได้ - ; ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้

* ; ยีน ITS พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้แต่เมื่อข้อมูลลำดับเบสมา blast พบว่า sequence ที่ได้ไม่ตรงกับตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

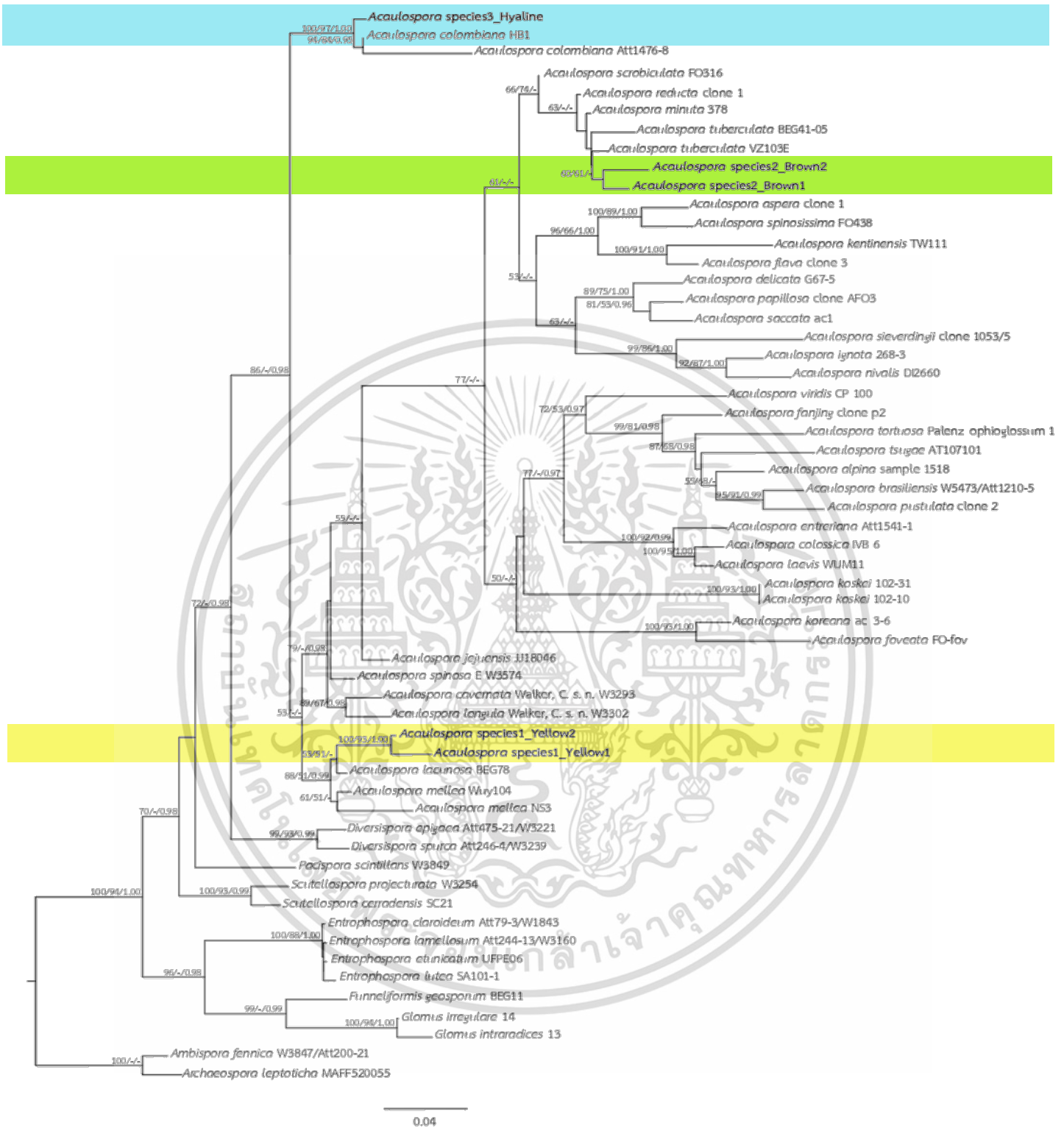
เมื่อปฏิกิริยา PCR สิ้นสุดลงจึงนำเอา PCR product ไปหาลำดับเบสโดยการส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ เมื่อได้ลำดับเบสแล้วจึงนำลำดับเบสของยีน ITS, SSU และ LSU มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบนเว็บไซต์ CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2/logininput.action>) ด้วยโปรแกรม RAxML-HPC2 on XSEDE v.8.2.12 โดยใช้ *Ambispora fennica* W3847/Att200-21 และ *Archaeospora laptotica* MAFF520055 เป็น out groupe นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PAUP v.4.0 และโปรแกรม MrBayes v.3.0b4 จากผลการวิเคราะห์ทั้ง 3 โปรแกรม พบว่ารา AMF ทั้ง 3 ชนิด ที่เก็บได้จากพื้นที่ 2 แหล่ง ได้แก่ ดินจากนาข้าว โรงเรือน (Green House) และดินจาก จ.กาฬสินธุ์ สามารถแบ่งได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างสปอร์ใสไม่มีสี (hyaline) แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุล *Acaulospora colombiana* โดยมีความความเชื่อมั่นของ ML-BS และ MP-BS เป็น 91 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (รูปที่ 4.12) จึงกำหนดให้เป็น *Acaulospora* sp.3

กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างสปอร์สีน้ำตาล (Brown) แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุล *Acaulospora* โดยมีความความเชื่อมั่นของ ML-BS และ MP-BS เป็น 60 และ 61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (รูปที่ 4.12) จึงกำหนดให้เป็น *Acaulospora* sp.2

กลุ่มที่ 3 ตัวอย่างสปอร์สีเหลือง (Yellow) แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุล *Acaulospora* โดยมีความความเชื่อมั่นของ ML-BS และ MP-BS เป็น 53 และ 11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (รูปที่ 4.12) จึงกำหนดให้เป็น *Acaulospora* sp.1

ทั้งนี้อาจจะต้องมีการเพิ่มยีนในการศึกษาสายวิวัฒนาการเพิ่มเติม และอาจต้องเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มีจำนวนมากกว่านี้เพื่อการทำซ้ำและให้มีความเชื่อมั่นที่สูงขึ้นเพื่อให้มั่นใจว่าตัวอย่างที่ศึกษานั้นเป็นสปีชีส์ใหม่จริงๆ ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของรา AMF ซึ่งจากการทดลองพบปัญหาคือ ยีน ITS เป็นยีนที่เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสมา blast แล้วลำดับเบสที่ได้ไม่ตรงกับตัวอย่าง ปัญหานี้ตรงกับงานวิจัยของ Likar et al. (2013) ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จากยีน ITS ได้และเนื่องจากการใช้ลำดับ 18S rDNA โดยทั่วไปมักจำกัดให้เฉพาะในระดับสกุลหรือวงศ์อีกทั้งยีนนี้ยังเป็นตำแหน่งยีนทั่วไปที่เชื้อราทุกตัวมีและไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับรา AMF โดยในการศึกษาลำดับเบสของรา AMF จากยีน SSU ใช้คู่ไพรเมอร์ NS31 ร่วมกับ AM1 และ AML2 (Lee et al., 2008) และยีน LSU ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ FLR3-FLR4 ประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณของยีนเป้าหมายซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับรา AMF โดยตรง (Mummey & Rillig, 2007) นี่เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของราในจีนัส *Acaulospora* ที่ได้มาจากลำดับยีน ITS, SSU และ LSU (1000 บุทสแตป) โดยมีตัวเลขซึ่งมีนัยสำคัญแสดงถึงค่าบูทสแตป ML และ MP ≥ 50 เลอส์เซินเห็นเอกสารที่สมบูรณ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า เปรอร์เซ็นต์ และความเชื่อมั่น (BI) ≥ 0.95 ตามลำดับ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การเพิ่มปริมาณสปอร์รา AMF โดยวิธี Trap culture

การตรวจนับปริมาณสปอร์ของรา AMF ของดินโรงเรือน

จากการทดลองการเพิ่มปริมาณสปอร์ของรา AMF โดยวิธี Trap culture หลังจากปลูกข้าวเป็นระยะเวลา 30 และ 45 วัน เมื่อนับปริมาณสปอร์รา AMF จากการเก็บตัวอย่างดินในแต่ละทริตเมนต์ โดยแยกสปอร์ด้วยวิธีวิธีการร่อนเปียก (wet sieve method) และวิธีปั่นเหวี่ยงด้วย 50% น้ำตาลซูโครส (sucrose centrifugation) จากการทดลองเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที มีปัญหา คือไม่สามารถทำลายสปอร์ของรา AMF ในดินฆ่าเชื้อได้ จากการทดลองจึงนับปริมาณสปอร์เฉพาะสปอร์เป้าหมายเท่านั้น เมื่อระยะเวลา 30 วัน พบการเพิ่มจำนวนของสปอร์มากที่สุดคือดินหัวเชื้อ จ.กาฬสินธุ์ พบ 35.85 สปอร์/ดิน 100 กรัม รองลงมาคือสปอร์สีน้ำตาล พบ 20 สปอร์/ดิน 100 กรัม ต่อมาคือดินหัวเชื้อโรงเรือน (Green House) พบ 13.35 สปอร์/ดิน 100 กรัม ดินการค้า พบ 4.15 สปอร์/ดิน 100 กรัม สปอร์สีใส พบ 2.5 สปอร์/ดิน 100 กรัม และสปอร์สีเหลืองไม่พบการเพิ่มจำนวนสปอร์ในดินเมื่อระยะเวลา 30 วัน (ตารางที่ 4.4)

ระยะเวลา 45 วัน พบการเพิ่มจำนวนของสปอร์มากที่สุดคือสปอร์สีน้ำตาล พบ 54.17 สปอร์/ดิน 100 กรัม รองลงมาคือดินหัวเชื้อ จ.กาฬสินธุ์ พบ 39 สปอร์/ดิน 100 กรัม ต่อมาคือดินหัวเชื้อโรงเรือน (Green House) พบ 38 สปอร์/ดิน 100 กรัม ดินการค้า พบ 31.50 สปอร์/ดิน 100 กรัม สปอร์สีเหลือง พบ 6.67 สปอร์/ดิน 100 กรัม และดินที่พบการเพิ่มจำนวนสปอร์ในดินน้อยที่สุดคือสปอร์สีใส พบ 0.83 สปอร์/ดิน 100 กรัม (ตารางที่ 4.5)

จากการทดลองการเพิ่มปริมาณสปอร์รา AMF โดยวิธี Trap culture จะเห็นว่าในขั้นตอนของการฆ่าเชื้อดินปลูกที่ใช้อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที พบปัญหา คือไม่สามารถฆ่าเชื้อดินปลูกให้ปลอดสปอร์รา AMF ในดินได้ ซึ่งจากการทดลองของ Vallejos-Torres et al. (2022) ได้ทำการศึกษาผลของรา AMF และปุ๋ยหมักในการเพิ่มการเจริญและการดูดซึมแคลเซียมในต้นโกโก้ ได้ใช้อุณหภูมิในการนึ่งฆ่าเชื้อดินปลูกคือ 131 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งสามารถทำลายสปอร์ของเชื้อราในดินปลูกได้ จากการทดลองจึงนับปริมาณสปอร์เชื้อราเฉพาะสปอร์เป้าหมายของการทดลองเท่านั้น ซึ่งเมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 และ 45 วัน พบว่าปริมาณสปอร์น้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณสปอร์ที่ใส่ลงไปในช่วงที่เริ่มปลูกพืชทดลอง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Requena et al. (2007) ที่กล่าวว่าสปอร์ของรา AMF ส่วนใหญ่จะเริ่มงอกเส้นใยเมื่อมีระยะเวลาผ่านไป 2-3 สัปดาห์ ในสภาวะที่มีปริมาณน้ำ ธาตุอาหารและอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญ หรืออาจเกิดจากสารอาหารภายในสปอร์ลดลงจนไม่เพียงพอต่อการเจริญ เช่นเดียวกับการเข้าอยู่อาศัยภายในรากที่ควรตรวจสอบการเข้าอยู่อาศัยเมื่อปลูกพืชแล้วเป็นระยะเวลา 50 วัน (Tahat et al., 2008)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยของปริมาณสปอร์รา AMF โดยวิธี Trap culture ระยะเวลา 30 วัน

Treatments	Total (mix spore)	Spore Target
control	34	-
สปอร์สีเหลือง	5	0
สปอร์สีน้ำตาล	22.5	20
สปอร์สี	20	2.5
ดินหัวเชื้อโรงเรือน (Green House)	13.35	13.35
ดินหัวเชื้อ จ.ภาพสินธุ์	35.85	35.85
ดินการค้า	4.15	4.15

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยของปริมาณสปอร์รา AMF โดยวิธี Trap culture ระยะเวลา 45 วัน

Treatments	Total (mix spore)	Spore Target
control	36.5	-
สปอร์สีเหลือง	42.5	6.67
สปอร์สีน้ำตาล	66.5	54.17
สปอร์สี	60.8	0.83
ดินหัวเชื้อโรงเรือน (Green House)	38	38
ดินหัวเชื้อ จ.ภาพสินธุ์	39	39
ดินการค้า	31.50	31.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของของรา AMF ในการส่งเสริมการเจริญของพืชทดลองในโรงเรือน

จากการศึกษาประสิทธิภาพของของรา AMF ในการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยบันทึกและเปรียบเทียบข้อมูล 3 ด้าน ดังนี้

(1) ปริมาณสปอร์ของรา AMF

จากการทดลองนับปริมาณสปอร์ของรา AMF หลังจากระยะเวลาผ่านไป 30 และ 45 วัน แสดงผลดังตารางที่ 4.4 และ 4.5

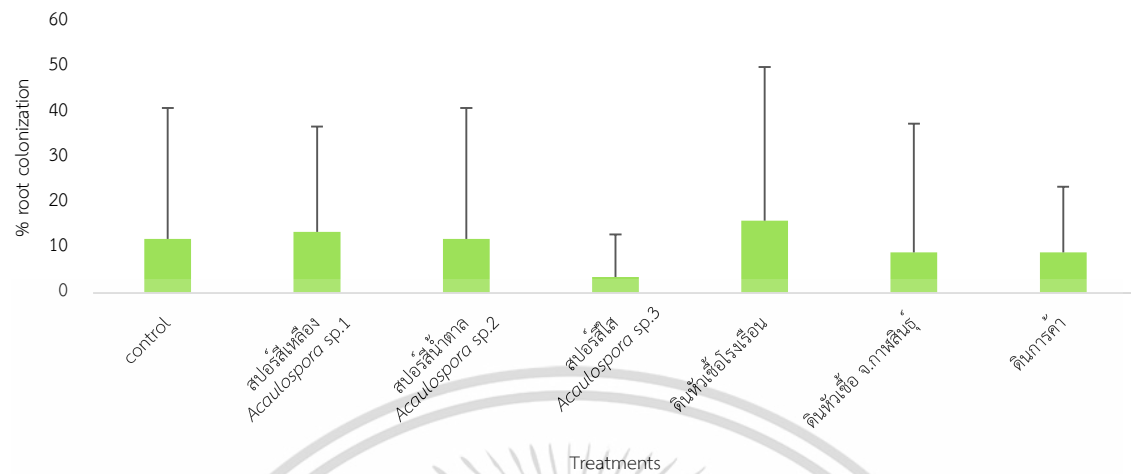
(2) ประเมินการเข้าอยู่อาศัยในราก (root colonization)

จากการประเมินการเข้าอยู่อาศัยภายในรากของรา AMF หลังจากปลูกข้าวเป็นระยะเวลา 30 และ 45 วัน พบว่าในระยะเวลา 30 วัน ทรिटเมนต์ที่มีการเข้าอยู่อาศัยภายในรากมากที่สุดคือดินหัวเชื้อโรงเรือน (Green House) พบการเข้าราก 16% รองลงมาคือ สปอร์สีเหลือง พบการเข้าราก 13.5% ต่อมาคือ control และสปอร์สีน้ำตาล พบการเข้าราก 12% ดินหัวเชื้อ จ.กาฬสินธุ์ และดินการค้า พบการเข้าราก 9% สุดท้ายทรिटเมนต์ที่พบการเข้าอยู่อาศัยภายในรากน้อยที่สุดคือสปอร์สีใส พบการเข้าราก 3.5% (รูปที่ 4.13) และในระยะเวลา 45 วัน ทรिटเมนต์ที่มีการเข้าอยู่อาศัยภายในรากมากที่สุดคือดินหัวเชื้อ จ.กาฬสินธุ์ พบการเข้าราก 21.3% รองลงมาคือสปอร์สีน้ำตาล พบการเข้าราก 8.4% ต่อมาคือดินการค้า พบการเข้าราก 6.35% control พบการเข้าราก 1.9% สปอร์สีเหลือง พบการเข้าราก 1.85% สปอร์สีใส พบการเข้าราก 0.55% และทรिटเมนต์ที่พบการเข้าอยู่อาศัยภายในรากน้อยที่สุดคือดินหัวเชื้อโรงเรือน (Green House) พบการเข้าราก 0.35% (รูปที่ 4.14)

จากการประเมินเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยภายในรากเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Trap culture พบว่าสอดคล้องกัน จะเห็นว่าทรिटเมนต์ที่มีเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยภายในรากมากที่สุด คือ ดินหัวเชื้อ (mix spore) เมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 วัน ดินโรงเรือน (Green House) มีการเข้ารากอยู่ที่ 13.5% และเมื่อเวลาผ่านไป 45 วัน ดินหัวเชื้อ จ.กาฬสินธุ์ (mix spore) มีการเข้ารากอยู่ที่ 21.3% มีรายงานว่าเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่างสปีชีส์กัน มีความสามารถในการเข้ารากต่างกัน อีกทั้งจะพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 45 วัน จะพบการเข้าอยู่อาศัยภายในรากของรา AMF มากกว่า 30 วัน สอดคล้องกับรายงานของ Tahat et al. (2008) ที่กล่าวว่าควรตรวจสอบการเข้าอยู่อาศัยเมื่อปลูกพืชแล้วเป็นระยะเวลา 50 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์การเข้ารากของข้าว เมื่อเวลา 30 วัน



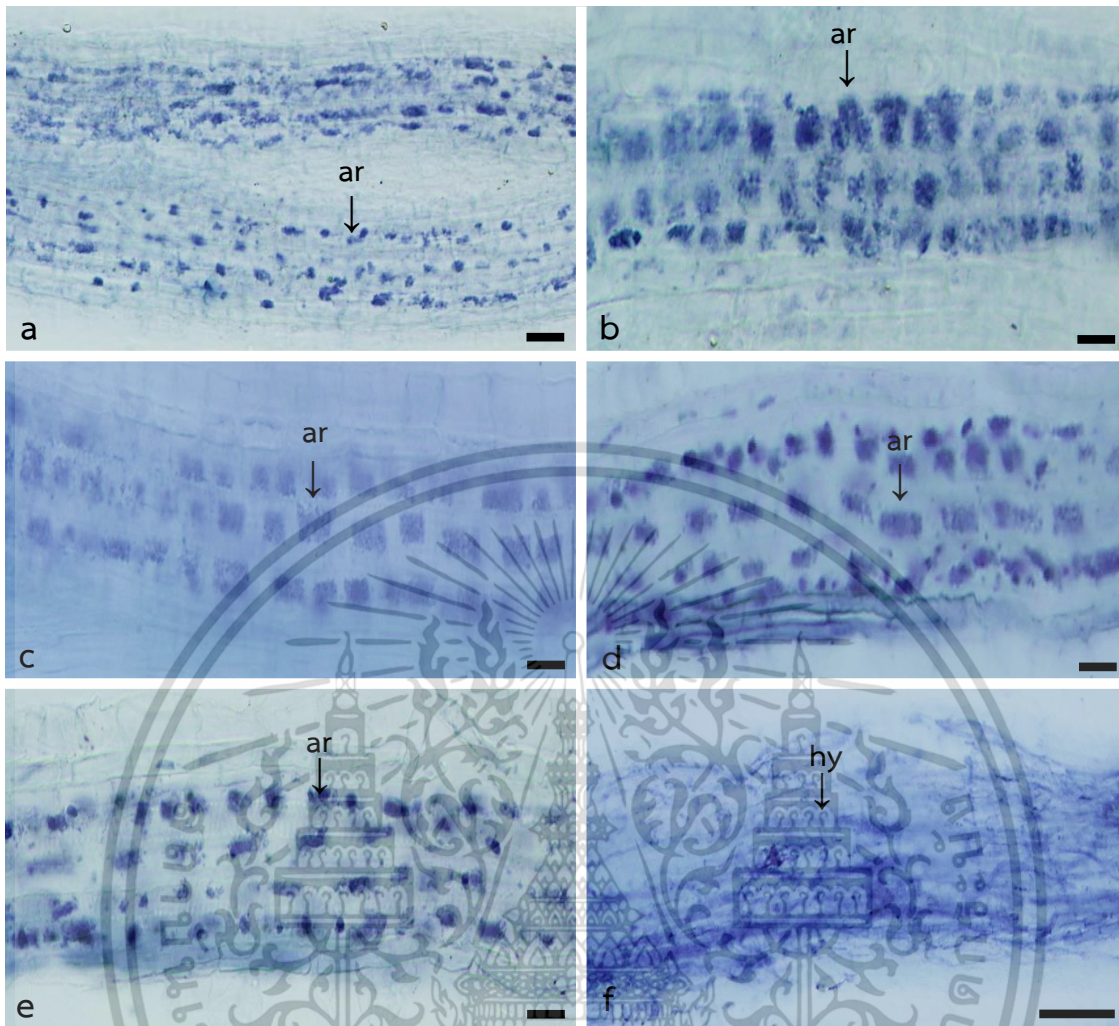
รูปที่ 4.13 เปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยภายในรากพืช หลังจากระยะเวลาผ่านไป 30 วัน

เปอร์เซ็นต์การเข้ารากของข้าว เมื่อเวลา 45 วัน



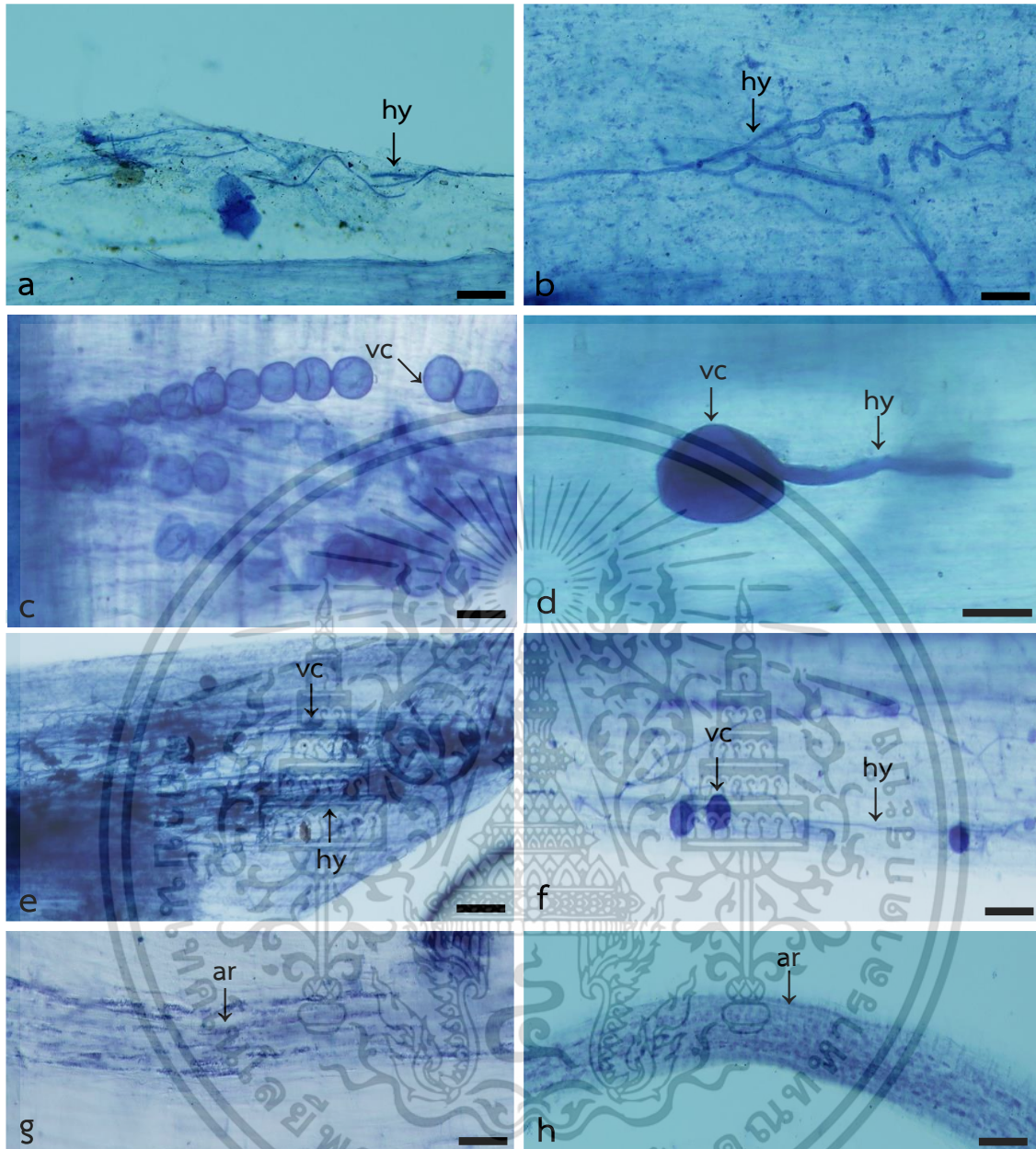
รูปที่ 4.14 เปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยภายในรากพืช หลังจากระยะเวลาผ่านไป 45 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 ลักษณะการเข้าอยู่อาศัยของรา AMF ในพืชที่รติเมนต์ต่างๆ เมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน
 (a)-(e) อาร์บัสคูล (ar, arbuscule), (f) เส้นใย (hyphae), bars: a-e = 10 μm , f = 100 μm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 ลักษณะการเข้าอยู่อาศัยของรา AMF ในพืชชนิดที่ต่างกัน เมื่อเวลาผ่านไป 45 วัน

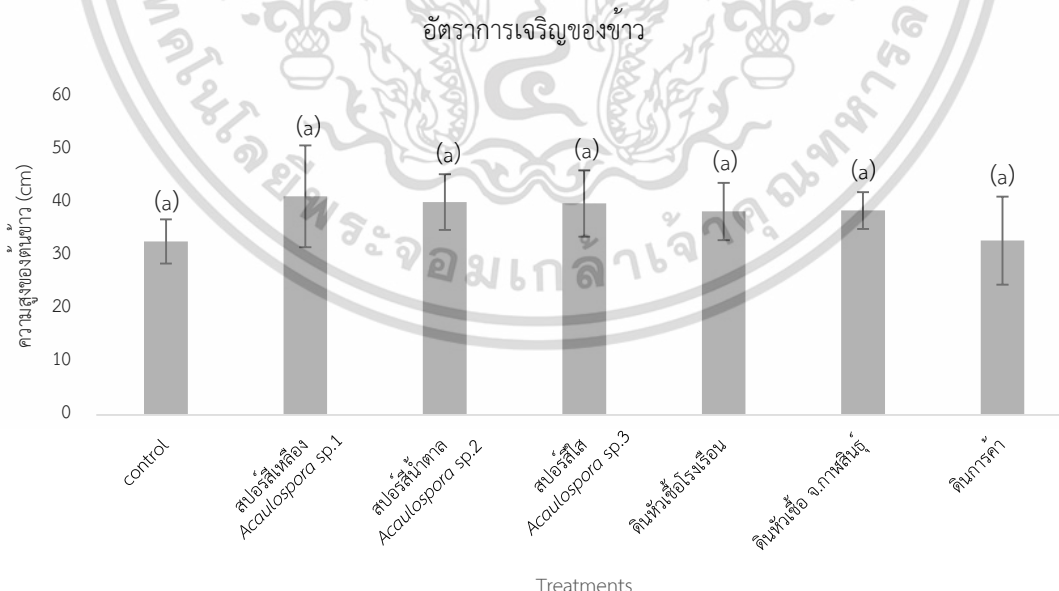
(a),(b) เส้นใย (hy, hyphae), (c)-(f) เวสิเคิล (vc, vesicle) และเส้นใย (hy, hyphae), (g),(h) อาร์บัสคูล (ar, arbuscule), bars: a,b = 100 μ m, c-f = 20 μ m, g,h = 10 μ m

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) ความสูงของต้นข้าว

จากการทดลองเปรียบเทียบการเจริญของพืชอาศัยโดยวัดความสูงของต้นข้าวโดยมีทริตเมนต์ในการทดลอง ได้แก่ control, สปอร์สีเหลือง, สปอร์สีน้ำตาล, สปอร์สีใส, ดินหัวเชื้อโรงเรือน (Green House), ดินหัวเชื้อ.กาฬสินธุ์ และดินการค้า เมื่อระยะเวลาผ่านไป 45 วัน จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าทริตเมนต์แต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการส่งเสริมการเจริญ โดยทริตเมนต์ที่มีอัตราส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวมากที่สุดโดยวัดจากความสูงของข้าว ได้แก่ สปอร์สีเหลือง มีความสูง 41.17 เซนติเมตร รองลงมาคือ สปอร์สีน้ำตาล มีความสูง 40.08 เซนติเมตร ทริตเมนต์ต่อมาคือ สปอร์สีใส มีความสูง 39.83 เซนติเมตร ทริตเมนต์ที่ส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวใกล้เคียงกันคือดินหัวเชื้อจังหวัดกาฬสินธุ์ และดินหัวเชื้อโรงเรือน (Green House) มีความสูง 38.50 และ 38.33 เซนติเมตร และสุดท้ายทริตเมนต์ที่ส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวน้อยที่สุด คือ ดินการค้า และ control มีความสูง 32.83 และ 32.67 เซนติเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.15)

จากการศึกษาการประสิทธิภาพของเชื้อราที่ส่งเสริมการเจริญของพืชทดลองโดย เมธาวิการณ์ และ โสภณ (2554) กล่าวว่าอ้อยที่ปลูกร่วมกับรา AMF มีความสูง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งมากกว่าอ้อยที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับรา AMF สอดคล้องกับผลการทดลองเมื่อในการฆ่าเชื้อไม่สามารถทำลายสปอร์เชื้อราได้ทำให้ในดิน control ยังมีสปอร์เชื้อราที่ช่วยส่งเสริมการเจริญอยู่โดยจะเห็นว่าความสูงของต้นข้าวเมื่อระยะเวลาผ่านไป 45 วัน การเจริญไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
รูปที่ 4.17 อัตราการเจริญของต้นข้าวในแต่ละทริตเมนต์
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

(1) การสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างบริเวณรอบรากข้าวและดินคันทนา 2 แหล่ง จำนวน 10 ซ้ำ ตรวจนับปริมาณสปอร์ของเชื้อราด้วยวิธีการร่อนเปียก (wet sieve method) และวิธีปั่นเหวี่ยงด้วยน้ำตาลซูโครส (sucrose centrifugation) พบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์เชื้อราได้ 4 ลักษณะ ได้แก่ สปอร์สีเหลืองรี สปอร์สีน้ำตาลกลม สปอร์สีใสกลม และสปอร์สีเทากลม โดยพบความหนาแน่นของจำนวนสปอร์ในดินข้าว โรงเรือน (Green House) ดินคันทนาโรงเรือน (Green House) ดินข้าว จ.กาฬสินธุ์ และ ดินคันทนา จ.กาฬสินธุ์ จำนวน 190.9, 261.8, 8.1 และ 290.4 สปอร์/ดิน 100 กรัม ตามลำดับ และคัดเลือกสปอร์ที่มีปริมาณมากที่สุด 3 อันดับมาศึกษาในขั้นต่อไป พบเปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยภายในรากเท่ากับ 30.47%, 54.83%, 21.57% และ 30.67% ตามลำดับ

(2) การศึกษาเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุล

เมื่อทำการสกัดสารพันธุกรรมและเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยมียีนเป้าหมายจำนวน 3 ยีน คือ ยีน ITS, SSU และ LSU แล้วย่นำมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่าสปอร์ของเชื้อรา 3 ลักษณะ คือ *Acaulospora* sp.1, *Acaulospora* sp.2 และ *Acaulospora* sp.3

(3) การเพิ่มปริมาณสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา โดยวิธี Trap culture

(ก) จากการทดลองการเพิ่มปริมาณสปอร์ของรา AMF โดยวิธี Trap culture หลังจากปลูกข้าวเป็นระยะเวลา 30 และ 45 วัน ไม่ประสบผลสำเร็จเนื่องจากในวิธีการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อราในดิน control ได้ จากการทดลองจึงนับปริมาณสปอร์เฉพาะสปอร์เป้าหมายเท่านั้น โดยพบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 วัน ทริทเมนต์ที่มีจำนวนสปอร์มากที่สุด ได้แก่ ดินหัวเชื้อ จ.กาฬสินธุ์ พบ 35.85 สปอร์/ดิน 100 กรัม และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 45 วัน ทริทเมนต์ที่มีจำนวนสปอร์มากที่สุด ได้แก่ สปอร์สีน้ำตาล พบ 54.17 สปอร์/ดิน 100 กรัม และเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยภายในรากมากที่สุดเมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 วัน คือ ดินหัวเชื้อโรงเรือน (Green House) พบการเข้าราก 16% และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 45 วันเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยภายในรากมากที่สุด คือ ดินหัวเชื้อ จ.กาฬสินธุ์ พบการเข้าราก 21.3%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ข) จากการทดลองเปรียบเทียบการเจริญของพืชอาศัยโดยวัดความสูงของต้นข้าวเมื่อระยะเวลาผ่านไป 45 วัน จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าทรีตเมนต์แต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการส่งเสริมการเจริญ โดยทรีตเมนต์ที่มีอัตราส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวมากที่สุด คือ สปอร์สีเหลือง มีความสูง 41.17 เซนติเมตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

(1) สำรวจและเก็บตัวอย่างดินบริเวณนาข้าวและคันทนาในพื้นที่อื่นๆ เช่น เก็บตัวอย่างดินแต่ละภาคในประเทศไทย เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบความหลากหลายของสปอร์รา AMF

(2) ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ด้วยยีนเป้าหมายอื่น ๆ เพื่อเป็นข้อมูลเปรียบเทียบในการศึกษาสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

(3) ในการนึ่งฆ่าเชื้อดินก่อนการปลูกควรเพิ่มเวลาให้นานกว่าเดิมและไม่ควรวางถุงดินซ้อนทับกันหลายชั้นมากเกินไปเพื่อให้ความร้อนในการฆ่าเชื้อทั่วถึงและเพื่อฆ่าเชื้อสปอร์รา AMF

(4) ทำการทดลองการเพิ่มปริมาณสปอร์รา AMF โดยวิธี Trap culture ในพืชทดลองชนิดต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณดูว่าพืชชนิดไหนที่สปอร์ของเชื้อราสามารถเพิ่มปริมาณได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. (2563). โรคศัตรูสำคัญของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามและการป้องกันกำจัด
- กองสารสนเทศและดัชนีเศรษฐกิจการค้า. (2560). ข้าว...ทรัพย์สินในดินมรดกภูมิปัญญา...สู่การค้าโลก. *Trade Policy and Strategy Office*, 7(73), 12.
- กิตติศักดิ์ ศรีทุมมา. (2552). การศึกษาพันธุ์ข้าวไร่พื้นเมืองที่มีศักยภาพ เพื่อใช้ในระบบเกษตรยั่งยืนของอำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดน่าน ศรีนครินทร์วิโรฒ].
- เขาวนิพร ชีพประสพ, หาสันต์ สาเหล็ม, ฤทัยทิพ โอนมูณ. (2560). องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณอะไมเลสในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีราชชมงคลธัญบุรี*, 7(2), 84-97.
- ดารา เจตนะจิตร, นงรัตน์ นิลพานิชย์, พากเพียร อรัญนารณ, วิชิต ศิริสันธนะ, วิชชุดา รัตนากาญจน์, รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์, วันชัย โรจนหัสติน, ธัญลักษณ์ อารยาพันธ์. (2550). โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว.
- ธีระรัตน์ ชินแสน, สำราญ พิมราช, นภาพร เวชกามา. (2561). การศึกษาคุณภาพและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่พบในเขตพื้นที่จังหวัดมหาสารคามและจังหวัดใกล้เคียงที่ผ่านการกระตุ้นความงอกด้วยวิธี *Hydropriming*.
- ประภาศรี จงประดิษฐ์นันท์, พัชรินทร์ นามวงษ์, สมพร เจริญรุ่งเรือง, สมภาพ จงรวยทรัพย์. (2549). การสูญเสียธาตุอาหารจากการพังทลายของดินในพื้นที่ปลูกสับปะรด. *วารสารอนุรักษ์ดินและน้ำ*, 21(3), 72.
- มรกต ตันติเจริญ, ศิริพร วัฒนศรีรุ่งกุล. (2555). ยุทธศาสตร์วิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมข้าว (พ.ศ. 2554-2559).
- เมธาวิกรม พรหมลา และ โสภณ บุญลือ. (2554). ชนิดและผลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของอ้อย. *การพัฒนาอนาคตชนบทไทย: ฐานรากที่มั่นคงเพื่อการพัฒนาประเทศไทยอย่างยั่งยืน*, 16-22.
- เลิศวิริยะกุล ชัยยา. (2556). [การเพิ่มปริมาณสปอร์ของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่].
- ศิวาพร แดงโชติ. (2561). [การบริโภคข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงของแต่ละกลุ่มวัยกรณีศึกษาผู้บริโภคในเขตกรุงเทพมหานคร มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช].
- สมจิตร อยู่เป็นสุข. (2549). ไมคอร์ไรซา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- แสงดาว กิตติวัฒน์. (2552). [ความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในไมยราบเลื้อยและการประยุกต์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่].

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Adholeya, A. (2012). *Rhizosphere Biology*.

Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. and Malajczuk, N. (1996). *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. ACIAR Monograph.

Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, A. H., & Young, J. P. W. (2001). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops [Article]. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(2-3), 203-209. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00134-9)

Dhanker Rinku, Chaudhary Suman, Kumari Anju, and Goyal Sneha. (2020). *Plant Microbe Symbiosis*.

Eom, A. H., Hartnett, D. C., & Wilson, G. W. T. (2000). Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie [Article]. *Oecologia*, 122(3), 435-444. <https://doi.org/10.1007/s004420050050>

Gadkar, V., David-schwartz, R., Kunik, T., & Kapulnik, Y. (2001). Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition [Article]. *Plant Physiology*, 127(4), 1493-1499. <https://doi.org/10.1104/pp.010783>

García-Garrido, J. M., and Ocampo, J.A. (2002). Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 53(373), 1377-1386.

Gardes, M. a. B., T. D. (1993). *ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts* (Vol. 2).

Gollotte, A., Tuinen, V. D. and Atkinson, D. (2004). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza*, 14, 111-117. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0244-7>

Habte, M., Zhang, Y. C., & Schmitt, D. P. (1999). Effectiveness of *Glomus* species in protecting white clover against nematode damage [Article]. *Canadian Journal of Botany*, 77(1), 135-139. <https://doi.org/10.1139/b98-188>

Hall, T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 95-98.

Harley, J. L. a. S., S.E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.

Helgason, T., , Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A.H., Young, J. P. (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394-431.

Jakobsen, I., Smith, S.E. and Smith, F.A. (2002). *Function and diversity of arbuscular mycorrhizae in carbon and mineral nutrition* (Vol. 157). Springer-Verlag Heidelberg.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kabir, Z., O'Halloran, I. P., Fyles, J. W., & Hamel, C. (1998). Dynamics of the mycorrhizal symbiosis of corn (*Zea mays* L.): effects of host physiology, tillage practice and fertilization on spatial distribution of extra-radical mycorrhizal hyphae in the field. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 68(1), 151-163.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(97\)00155-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-8809(97)00155-2)
- Lee, J., Lee, S., & Young, J. P. W. (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*,
- Likar, M., Hančević, K., Radić, T., & Regvar, M. (2013). Distribution and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grapevines from production vineyards along the eastern Adriatic coast [Article]. *Mycorrhiza*, 23(3), 209-219. <https://doi.org/10.1007/s00572-012-0463-x>
- Mikola P. (1965). Studies on the ectendotrophic mycorrhiza of Scots pine in Finland. *Acta Forestalia Fennica* 79.
- Mummey, D. L., & Rillig, M. C. (2007). Evaluation of LSU rRNA-gene PCR primers for analysis of arbuscular mycorrhizal fungal communities via terminal restriction fragment length polymorphism analysis [Article]. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 200-204.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.002>
- Õpik, M., Metsis, M., Daniell, T. J., Zobel, M., & Moora, M. (2009). Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest [Article]. *New Phytologist*, 184(2), 424-437.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02920.x>
- Peterson R. L., M. H. B., and Melville L. H. Cavers P. B. (2004). *Arbuscular mycorrhizas Mycorrhizas: Anatomy and cell biology*. National Research Council.
- Quilambo, O. A. (2003). *The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis* (Vol. 2(12)). African Journal of Biotechnology.
- Raju, P. S., Clark, R. B., Ellis, J. R., & Maranville, J. W. (1990). Effects of species of VA-mycorrhizal fungi on growth and mineral uptake of sorghum at different temperatures. *Plant and Soil*, 121(2), 165-170. <https://doi.org/10.1007/BF00012308>
- Requena, N., Serrano, E., Ocón, A., & Breuninger, M. (2007). Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment [Review]. *Phytochemistry*, 68(1), 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.09.036>
- Rillig, M. C., & Mummey, D. L. (2006). Mycorrhizas and soil structure [Review]. *New Phytologist*, 171(1), 41-53. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01750.x>
- เอกสารนี้ *Phytologist*, 171(1), 41-53. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01750.x> ซึ่งด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Simon, L., Lalonde, M., & Bruns, T. D. (1992). Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular- arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots [Article]. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1), 291-295.
<https://doi.org/10.1128/aem.58.1.291-295.1992>
- Simpson, D., & Daft, M. J. (1990). Spore production and mycorrhizal development in various tropical crop hosts infected with *Glomus clarum*. *Plant and Soil*, 121(2), 171-178.
<https://doi.org/10.1007/BF00012309>
- Smith, S. E., and Read, D.J., (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press.
- Smith, W. G., and Skipper, D.H.,. (1979). Comparison of Methods to Extract Spores of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Soil Microbiology and Biochemistry*, 43(4), 722-725.
- Tahat M.M., K. S., Radziah O., Kadir J. and Masdek H.N. (2008). Plant Host Selectivity for Multiplication of *Glomus mosseae* Spore. *International Journal of Botany*, 4, 466-470.
- Trouvelot, A., Kough, J.L. and Gianinazzi-Pearson, V. (1986). *Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthode d'estimation ayant une signification fonctionnelle* European symposium on mycorrhizae (1 ; Dijon 1985-07-01) = Symposium européen sur les mycorhizes (1 ; Dijon 1985-07-01),
- Vallejos-Torres, G., Torres, S. C., Gaona-Jimenez, N., Saavedra, J., Tuesta, J. C., Tuesta, O. A., Becerra, A. G., Marín, C., & del Mar Alguacil, M. (2022). The Combined Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Compost Improves Growth and Soil Parameters and Decreases Cadmium Absorption in Cacao (*Theobroma cacao* L.) Plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22(4), 5174-5182. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00992-9>
- White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics*. Academic Press.
- Zak, B. (1973). *Classification of ectomycorrhizae* (G. C. a. K. Marks, T.T., Ed.). Academic Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

Polyvinyl-Lacto-Glycerol (PVLG) mountant

Polyvinyl alcohol (PVL)	16.6 g
Lactic acid	100 ml
Glycerol	10 ml
Distilled water	100 ml

ผสม PVL กับน้ำกลั่น จากนั้นนำไป auto clave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว จากนั้นเติมกรดแลคติกและกลีเซอรอล เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้งาน

0.05% w/v trypan blue in lactoglycerol

ละลาย trypan blue 0.05 g ใน lactoglycerol (lactic acid : glycerol : น้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1:1) ปริมาตร 100 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเพิ่มปริมาณ DNA

ตารางที่ 1 ส่วนผสม PCR Master Mix

Mixture	Concentration	Volume (μ l)
Nano pure water	-	38.3
Taq buffer (10X)	500 mM KCl 100 M Tris-HCl 0.1% Triton TM X-100	5
MgCl ₂	50 mM	2.5
dNTP mix	10 mM	1
Forward primer	10 μ M	1
Reverse primer	10 μ M	1
Taq DNA polymerase	5 U/ μ l	0.2
DNA template	-	1
Total		50

ตารางที่ 2 ปริมาณสารพันธุกรรมหลังจากเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR

ตัวอย่าง	ng/ μ l	A260/A280
สปอร์สีน้ำตาล	2.13	3.22
สปอร์สีเหลือง	1.04	2.47
สปอร์สีใส	0.74	3.26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

เปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยภายในรากพืช

ตารางที่ 3 การประเมินการเข้าอยู่อาศัยภายในรากพืชของดินตัวอย่าง

Sample	Site	ดินโรงเรือน (Green House) สวทช.				ดิน จ.ภาพลีนธุ์			
		รากข้าว		รากหญ้า		รากข้าว		รากหญ้า	
1		4	>50%	5	>90%	0	0%	3	<50%
2		1	<1%	5	>90%	1	<1%	2	<10%
3		3	<50%	4	>50%	1	<1%	3	<50%
4		1	<1%	0	0%	4	>50%	2	<10%
5		4	>50%	5	>90%	3	<50%	3	<50%
6		3	<50%	4	>50%	1	<1%	2	<10%
7		4	>50%	3	<50%	1	<1%	4	>50%
8		2	<10%	2	<10%	1	<1%	4	>50%
9		5	>90%	5	>90%	2	<10%	3	<50%
10		2	<10%	5	>90%	1	<1%	2	<10%
11		2	<10%	5	>90%	0	0%	3	<50%
12		2	<10%	3	<50%	4	>50%	3	<50%
13		3	<50%	3	<50%	3	<50%	4	>50%
14		1	<1%	5	>90%	3	<50%	2	<10%
15		3	<50%	3	<50%	0	0%	3	<50%
16		3	<50%	5	>90%	2	<10%	3	<50%
17		2	<10%	3	<50%	2	<10%	3	<50%
18		3	<50%	5	>90%	2	<10%	3	<50%
19		5	>90%	4	>50%	2	<10%	3	<50%
20		4	>50%	3	<50%	3	<50%	2	<10%
21		2	<10%	4	>50%	4	>50%	3	<50%
22		5	>90%	3	<50%	2	<10%	3	<50%
23		0	0%	3	<50%	4	>50%	3	<50%
24		0	0%	3	<50%	3	<50%	3	<50%
25		0	0%	5	>90%	4	>50%	2	<10%

Sample	Site		ดินโรงเรือน (Green House) สวทช.				ดิน จ.ภาพสินธุ์			
	รากข้าว		รากหญ้า		รากข้าว		รากหญ้า			
26	1	<1%	3	<50%	3	<50%	3	<50%		
27	2	<10%	3	<50%	4	>50%	2	<10%		
28	4	>50%	5	>90%	1	<1%	3	<50%		
29	4	>50%	3	<50%	2	<10%	5	>90%		
30	2	<10%	3	<50%	2	<10%	4	>50%		
% การเข้าราก		30.47%		50.83%		21.57%		30.67%		

ตารางที่ 4 การประเมินการเข้าอยู่อาศัยภายในรากข้าว เมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 วัน

Sample	Treatment		สปอร์สีเหลือง Acaulospora sp.1		สปอร์สีน้ำตาล Acaulospora sp.2		สปอร์สีใส Acaulospora sp.3		ดินหัวเชื้อโรงเรือน (Green House)		ดินหัวเชื้อ จ.ภาพสินธุ์		ดินการค้า		
	control														
1	5	>90%	4	>50%	3	<50%	0	0%	0	0%	0	0%	3	<50%	
2	3	<50%	0	0%	5	>90%	0	0%	0	0%	5	>90%	3	<50%	
3	0	0%	3	<50%	0	0%	2	<10%	4	>50%	0	0%	0	0%	
4	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	
5	0	0%	2	<10%	0	0%	3	<50%	0	0%	0	0%	0	0%	
6	0	0%	2	<10%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	
7	0	0%	1	<1%	0	0%	0	0%	5	>90%	0	0%	0	0%	
8	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	3	<50%	
9	0	0%	3	<50%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	
10	0	0%	4	>50%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	
% การเข้าราก		12%		21.1%		12%		3.5%		16%		9%		9%	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 การประเมินการเข้าอยู่อาศัยภายในรากข้าว เมื่อระยะเวลาผ่านไป 45 วัน

Sample	Treatment		control		สปอร์สีเหลือง <i>Acaulospora</i> sp.1		สปอร์สีน้ำตาล <i>Acaulospora</i> sp.2		สปอร์สีโต <i>Acaulospora</i> sp.3		ดินหัวเชื้อโรงเรือน (Green House)		ดินหัวเชื้อ จ.ภาพสินธุ์		ดินการค้า	
1	1	<1%	0	0%	2	<10%	0	0%	0	0%	2	<10%	3	<50%		
2	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	5	>90%	0	0%		
3	0	0%	3	<50%	0	0%	2	<10%	0	0%	0	0%	0	0%		
4	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%		
5	0	0%	2	<10%	0	0%	3	<50%	0	0%	4	>50%	0	0%		
6	3	<50%	0	0%	1	<1%	0	0%	0	0%	0	0%	5	>90%		
7	0	0%	1	<1%	0	0%	0	0%	1	<1%	5	>90%	0	0%		
8	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	2	<10%		
9	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	3	<50%	0	0%		
10	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	2	<10%	0	0%		
11	1	<1%	1	<1%	1	<1%	0	0%	2	<10%	0	0%	0	0%		
12	1	<1%	0	0%	4	>50%	1	<1%	0	0%	3	<50%	0	0%		
13	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%		
14	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	<1%	2	<10%	1	<1%		
15	0	0%	0	0%	0	0%	1	<1%	0	0%	5	>90%	0	0%		
16	0	0%	0	0%	5	>90%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%		
17	2	<10%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	2	<10%	1	<1%		
18	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	2	<10%	0	0%		
19	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	<1%	0	0%		
20	0	0%	0	0%	1	<1%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%		
% การ เข้าราก	1.9%		1.85%		8.4%		0.55%		0.35%		21.3%		6.35%			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การเจริญของต้นข้าวในแต่ละทรีตเมนต์

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยความสูงของพืชทดลองในแต่ละทรีตเมนต์ (cm)

Sample Treatment	control	สปอร์สีเหลือง <i>Acaulospora</i> sp.1	สปอร์สีน้ำตาล <i>Acaulospora</i> sp.2	สปอร์สีใส <i>Acaulospora</i> sp.3	ดินห้วยเชื้อโรเรียน (Green House)	ดินห้วยเชื้อ จ.ภาพสินธุ์	ดินการค้า
1	28	35	33.5	35	33	36	35
2	30	35	40	30	40	34	31
3	34	40	43	43	45	38	39
4	40	45	51	40	44	43	17
5	31	46	25	45	34	42	36
6	33	46	28	46	34	38	39
รวม	32.67	41.17	40.08	39.83	38.33	38.5	32.83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



control



สปอร์สีเหลือง
Acaulospora sp.1



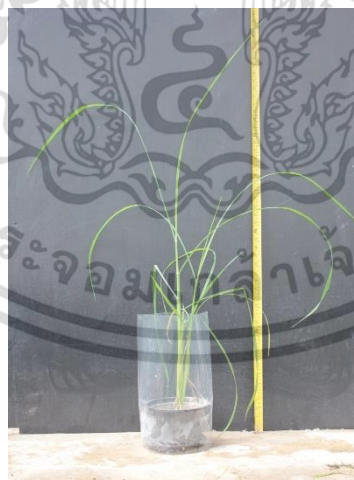
สปอร์สีน้ำตาล
Acaulospora sp.2



สปอร์สีใส
Acaulospora sp.3



ดินหัวเชื้อโรงเรือน
(Green House)



ดินหัวเชื้อ จ.กาฬสินธุ์



ดินการค้า



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงการงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 8 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาวกัลยกร แก้วกัลยา รหัสประจำตัว 63050445

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา

ขอรับรองว่าสหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย ความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในดินรอบรากในนาข้าว

ชื่อภาษาอังกฤษ Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere soil in the rice fields.

ปีการศึกษา 2566

เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการคัดลอกเลียนแบบงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์แล้ว โปรแกรมอักขรวิธี 2.00 %

ลงชื่อ **กัลยกร แก้วกัลยา**

(นางสาวกัลยกร แก้วกัลยา)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษาได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงได้ลงชื่อไว้

ลงชื่อ **ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย**

(ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานที่ระบุชื่อเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงอาจารย์ที่ปรึกษาอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนังสือแสดงเจตจำนงว่าด้วยการเผยแพร่ผลงาน

ข้าพเจ้า ดร.อัมพวา ปินเรือน ตำแหน่ง นักวิจัย บริษัท ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ตั้งอยู่ที่ 113 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ได้รับนักศึกษา ชื่อ นางสาวกัลยา แก้วกัลยา รหัสนักศึกษา 63050445 ของสาขาวิชาจุลชีววิทยา อุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เข้าร่วมโครงการสหกิจศึกษา ณ สถานที่ข้างต้น ระหว่าง วันที่ 3 กรกฎาคม พ.ศ.2566 ถึงวันที่ 29 ตุลาคม พ.ศ.2566 ข้าพเจ้าขอแสดงเจตจำนงว่าด้วยการเผยแพร่ผลงาน ดังนี้

ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นความลับทางการค้าและเป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ในกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น

ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท อนุญาตให้เผยแพร่ได้ ภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เพื่อประโยชน์ทางการศึกษาเท่านั้น

ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท อนุญาตให้เผยแพร่ออกสู่สาธารณะได้

ในกรณีที่มีการพิจารณาโครงการ/ผลงาน ดังกล่าวเข้าร่วมประกวด/แข่งขัน โครงการ/ผลงาน สหกิจศึกษาในทุกระดับ ข้าพเจ้าขอแสดงเจตจำนงดังนี้

อนุญาตให้นำโครงการ/ผลงาน เข้าร่วมประกวดสหกิจศึกษาในทุกระดับ

ไม่อนุญาตให้นำโครงการ/ผลงาน เข้าร่วมประกวดสหกิจศึกษาในทุกระดับ

ลงชื่อ อัมพวา ปินเรือน ผู้แสดงเจตจำนง

(ดร.อัมพวา ปินเรือน)

ลงชื่อ กัญจวิ รุ่งจิตตมัย ผู้แทนภาควิชา/คณะ

(ผศ.ดร.กัญจวิ รุ่งจิตตมัย)

ลงชื่อ กัลยา เลียงศิริ พยาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า (นางสาวกัลยา เลียงศิริ) ไม่ว่าจะกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้