บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

Mycorrhiza เป็นการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อรากับรากพืช มีความสัมพันธ์แบบต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ (mutualism) โดยพบว่า พืชที่มีเชื้อรากลุ่มนี้เจริญอยู่ตามราก มีการเจริญเติบโตรวดเร็วและมากกว่าพืชที่ไม่มีราอยู่ (Bagyaraj,1991;Bonfante Fasolo,1984)

Bonfante Fasolo, 1984 (อ้าง Frank, 1885) และHarley, 1972 แบ่งราไมโคไรซ่าเป็น 3 พวกใหญ่ๆ ตามลักษณะสัณฐานภายนอก คือ

1. เอคโตไมโคไรซ่า (Ectomycorrhiza) ซึ่งจะสร้างเส้นใยสานกันเป็นแผ่นแบบ (compact sheat) หรือเป็นเยื่อหุ้มหนา (mantle)รอบรากแขนงแล้วแทงเส้นใยเข้าไปในราก เจริญอยู่ระหว่างเซลและประสานติดต่อกันเป็น hartig network รอบๆ cortical cell

2. เอคเทนโดไมโคไรซ่า (Ectendomycorrhiza) มีลักษณะอยู่ระหว่างเอคโตไมโคไรซ่าและเอนโดไมโคไรซ่า ทั่วไปพบเกาะตามรากไม้เป็นเยื่อบางๆ เส้นใยจะแทงเข้าไปเจริญในช่องว่างระหว่างเซลในชั้นคอร์เท็กซ์ อาจมีบางส่วนแทงเข้าภายในเซลของชั้นคอร์เท็กซ์ โดยเส้นใยสานกันเป็นร่างแหแบบหยาบๆ

3. เอนโดไมโคไรซ่า (Endomycorrhiza) จะสร้างเส้นใยสานกันแบบหลวมๆ ในดินหรือที่ผิวรากพืชและแทงผ่านผนังเซลชั้นนอกเข้าไปเติบโตระหว่างเซลและภายในเซลของชั้นคอร์เท็กซ์และชั้นเอพิเดอร์มิสของรากพืชอาศัย Hacskaylo (1971) แบ่งราเอนโดไมโคไรซ่าเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เส้นใยมีผนังกั้น พบเฉพาะกับพืชพวก Ericales และพวกกล้วยไม้บางครั้งอาจเรียกเป็น " orchid mycorrhiza " และกลุ่มที่เส้นใยไม่มีผนังกั้น ได้แก่ ราเอนโดไมโคไรซ่ากลุ่มที่เรียกว่า vesicular-arbuscular mycorrhiza(VAM) หรือวีเอไมโคไรซ่า (V-A mycorrhiza)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ราวีเอไมโคไรซ่าประกอบด้วยโครงสร้างหลายแบบ (Bonfante Fasolo, 1984) ได้แก่

1. External mycelium เส้นใยจะสานกันเป็นร่างแหหลวมๆ ภายนอกรากช่วยเพิ่มพื้นที่ในการดูดธาตุอาหารและลดระยะทางในการดูดธาตุอาหารจากแหล่งในดิน ช่วยให้พืชดูดซึมธาตุอาหารกลุ่มที่ถูกตรึงด้วยอนุภาคดินจึงทำให้ดูดซึมฟอสฟอรัสได้ดีขึ้น เส้นใยในดิน มี 2 ลักษณะ (Brown and King, 1982) เป็นเส้นใยขนาดใหญ่ ผนังหนา ไม่มีผนังกั้น (septum) แตกแขนงแบบ dichotomous ภายในมักพบเม็ดน้ำมัน ปกติเส้นใยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8-12 ไมครอน บางครั้งขนาดใหญ่ถึง 20 ไมครอน ปลายเส้นใยมักโป่งออกสร้างเป็นเวสิเคิลหรือคลามิโดสปอร์ และกลุ่มเส้นใยขนาดเล็ก ผนังบาง ผิวเรียบ แตกแขนงมากและมีอายุสั้น เส้นใยกลุ่มนี้ทำหน้าที่ดูดอาหารโดยเส้นใยเล็กๆจะแทรกเข้าไปในอนุภาคของอินทรียวัตถุ เมื่อใช้อาหารหมด ไซโตพลาสซึมจะเคลื่อนที่ไปยังเส้นใยหลักที่แตกกิ่งแขนงออกด้านข้างคล้ายราก แล้วสร้างผนังกั้น จากนั้นเส้นใยแขนงเล็กๆที่ดูดอาหารจะเหี่ยวไป (Bonfante Fasolo, 1984) Sanders และ Tinker (1973) รายงานว่า ความยาวของเส้นใยภายนอกมีประมาณ 80 เซนติเมตรต่อความยาวของรากหอมใหญ่ 1 เซนติเมตร และในแอปเปิล พบว่ามีการสร้าง external mycelium 1% ของน้ำหนักรากฝอย (Mosse,1981) External mycelium ที่แตกแขนงแผ่กระจายนี้ ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมทำให้การดูดซึมฟอสฟอรัสเพิ่มสูงถึง 477% (O'Keefe and Sylvia, 1991)

2. เส้นใยที่อยู่ภายในรากพืช มีการพัฒนาเป็นโครงสร้างพิเศษอยู่ระหว่างเซลและภายในเซลของเนื้อเยื่อชั้นเอพิเดอร์มิสและคอร์เท็กซ์ เส้นใยที่อยู่ในเซลชั้นเอพิเดอร์มิสมักขดเป็นวง (coil formation) หรือเป็น loop ไม่แตกแขนง ส่วนเส้นใยภายในเซลรากพืชชั้นคอร์เท็กซ์มีการพัฒนาเป็นโครงสร้างพิเศษ 2 รูปแบบ คือ

2.1 อาร์บัสคูล (Arbuscule) เกิดจากปลายเส้นใยแตกแขนงแบบ dichotomous branching จนเป็นกิ่งก้านเล็กๆจำนวนมาก มีลักษณะคล้ายพุ่มไม้ ปลายสุดของแขนงจะแคบและแหลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.0 ไมครอน ถูกหุ้มล้อมโดยรอบด้วย plasmalemma ของเซลพืช เป็นลักษณะที่ใช้บ่งชี้ได้ว่ามีการติดเชื้อราวีเอไมโคไรซ่าแล้ว (Bagyaraj and Manjunath, 1980) ภายในอาร์บัสคูลเมื่อศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิสชั่น (TEM) พบว่าประกอบด้วยนิวเคลียสขนาดใหญ่จำนวนมาก มีไมโตคอนเดรีย ไกลโคเจน หยดน้ำมันและแวคิวโอ (vacuole) ซึ่งภายในแวคิวโอมีแกรนูล

(granules) ของฟอสฟอรัสและแคลเซี่ยมจำนวนมาก อาร์บัสคูลมีอายุสั้นประมาณ 4-15 วัน หลังจากนั้นจะสลายไป พบว่าการสร้างและสลายตัวของอาร์บัสคูลเกิดขึ้นรอบๆ plasmalemma ของเซลพืชอาศัย เมื่อใกล้สลายตัว บางครั้งพบว่าส่วนปลายแขนงจะพองออกเป็นกระเปาะกลมๆ และเมื่อสลายตัวจะปลดปล่อยสารต่างๆ ให้สะสมในเซลพืชอาศัยผ่านทาง invaginated plasmalemmaที่อยู่แบบชิดกับผนังของอาร์บัสคูล บางส่วนจะไหลย้อนกลับไปยังเส้นใยและประกอบกันเป็นไซโตพลาสซึมของเชื้อรา (Bonfante Fasolo, 1984)

อาร์บัสคูลมีลักษณะโครงสร้างคล้าย haustoria ซึ่งมีผิวหยักโค้ง จึงทำให้พื้นที่ผิวของ plasmalemma ของพืชอาศัยสัมผัสกับอาร์บัสคูลเพิ่มขึ้น 2-3 เท่า Cox และ Tinker (1977) พบว่าพื้นที่ของ plasmalemma เพิ่มถึง 20% ในเนื้อเยื่อชั้นคอร์เท็กซ์ของรากหอมเมื่อมีการเข้าอยู่อาศัยของราชนิดนี้ปานกลาง

2.2 เวสิเคิล (Vesicle) รูปร่างคล้ายถุงที่โป่งพอง ภายในประกอบด้วยนิวเคลียสจำนวนมาก ไกลโคเจน หยดน้ำมันขนาดใหญ่และแกรนูลของฟอสฟอรัสและแคลเซี่ยมใน vacuole เวสิเคิลส่วนมากมีลักษณะรูปไข่หรือกลม ขนาดรูปร่างรวมทั้งองค์ประกอบภายในต่างกันไปขึ้นกับชนิดของราและพืชอาศัย (Mosse,1981) เป็นโครงสร้างที่เก็บสะสมอาหารของราโดยเก็บไขมันซึ่งจะถ่ายทอดให้แก่เซลพืชอาศัยเมื่อเวสิเคิลสลายตัว นอกจากนี้อาจทำหน้าที่เป็นส่วนขยายพันธุ์ได้ เมื่อผิวนอกของเนื้อเยื่อชั้นคอร์เท็กซ์หลุดออกไป เวสิเคิลจะโผล่ออกจากเนื้อเยื่อรากสู่ดิน ซึ่งอาจงอกเป็นเส้นใยในเวลาต่อมา

มีสมมติฐาน กล่าวถึงการแลกเปลี่ยนแร่ธาตุและอาหารระหว่างราวีเอไมโคไรซ่ากับเซลพืชว่ามี 2 วิธี (Jeffries and Dodd, 1991) ได้แก่ เซลพืชสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยอาร์บัสคูลซึ่งสะสมแร่ธาตุและอาหารอยู่ ทำให้สารดังกล่าวออกมาสะสมอยู่ภายในเซล และถูกดูดซึมไปใช้ในที่สุด อีกประการหนึ่งคือ เกิดการถ่ายทอดผ่าน plasmalemma ของเซลพืชที่แนบอยู่กับผนังอาร์บัสคูลตลอดเวลา

จากโครงสร้างพิเศษของราชนิดนี้ที่มีเวสิเคิลและอาร์บัสคูล จึงสามารถจำแนกและเรียกรากสมุนไพรว่าเป็น vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi หรือ VA mycorrhizal fungi

การจำแนกชนิดของราวีเอไมโคไรซ่า

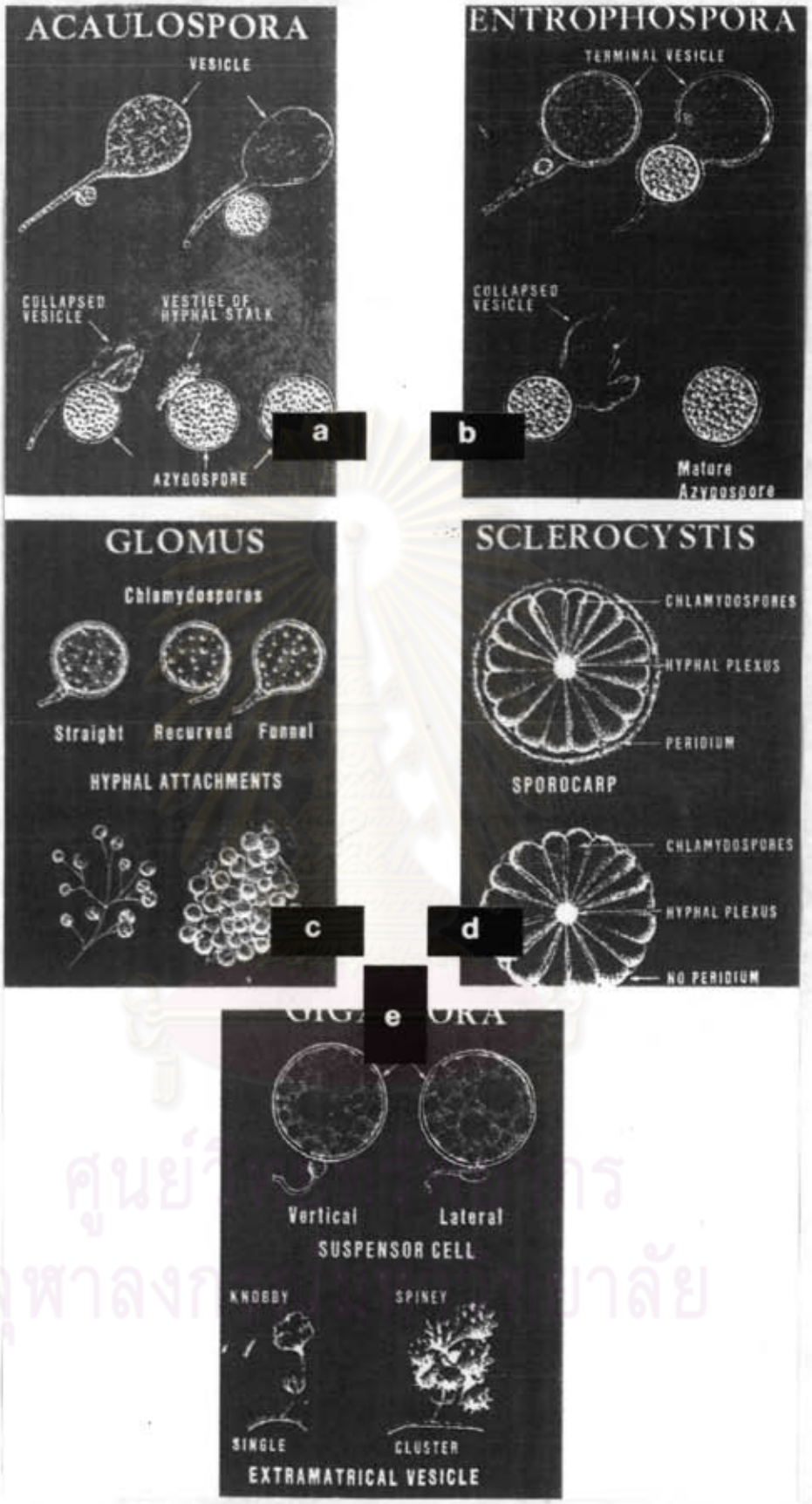
รากสมุนี้เป็น obligate biotroph เจริญเพิ่มปริมาณได้เฉพาะภายในเซลรากพืช ไม่สามารถเจริญบนอาหารสังเคราะห์ ในการจำแนกชนิดจึงอาศัยลักษณะที่ต่างกันทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ที่รวบรวมได้จากดินบริเวณรากพืช ราวีเอไมโคไรซ่าจัดอยู่ใน Subdivision Zygomycotina Class Zygomycetes Order Endogonales Family Endogonaceae แบ่งเป็น 7 genera (Schenck, 1987 ; Hall, 1984) ได้แก่ Acaulospora, Entrophospora, Gigaspora, Glaziella, Glomus, Sclerocystis และ Scutellospora ส่วน genera Endogone สร้างเพียง zygospore และไม่มีความสัมพันธ์กับรากพืชแบบวีเอไมโคไรซ่า genera Medicella และ Complexipes พบอยู่ร่วมกับ Pinus resinosa แบบเอคเทนโดไมโคไรซ่า รูปร่างสปอร์ของราวีเอไมโคไรซ่าชนิดต่างๆ แสดงไว้ในภาพที่ 1 และแต่ละ genus มีลักษณะและรายละเอียดดังนี้

Acaulospora Gerdemann และ Trappe (1974) รายงานว่าราบี้สร้าง azygospore ติดกับด้านข้างของเส้นใยและสร้างถุงโป่งพองขนาดใหญ่ ซึ่งมีผนังบางและมีสารอยู่ภายในหนาแปนที่ปลายเส้นใย เมื่อสปอร์แก่ถุงโป่งพองที่ปลายเส้นใยจะสลายไป เหลือเพียง azygospore เดี่ยวๆในดินหรือในรากพืชอาศัย ซึ่งจะสร้างเวสิเคิลและอาร์บัสคูลกับรากพืชในเวลาต่อมา (Schenck and Smith,1982)

Entrophospora azygospore เกิดภายในเส้นใยซึ่งโป่งบวมคล้ายห่อสวมปลายพองออกขนาดใหญ่และมีผนังบาง เมื่อสปอร์มีขนาดใหญ่ขึ้น เส้นใยจะขยายออกตามสปอร์ ทำให้เส้นใยส่วนนี้มีรูปร่างเป็น dumb bell-shaped cell ส่วนปลายที่โป่งพองจะสลายไปในที่สุด เหลือเพียงสปอร์อยู่เดี่ยว ๆ ภายในดิน ไม่พบว่าราชนิดนี้สร้างสปอโรคาร์ป

Gigaspora สร้าง azygospore รูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม ขนาดใหญ่ เกิดบนปลายเส้นใยซึ่งโป่งเป็นกระเปาะคล้าย suspensor เมื่อสปอร์แก่จะมี septum เกิดขึ้นใต้บริเวณส่วนที่เป็นกระเปาะกั้นระหว่างสปอร์กับเส้นใยที่เชื่อมติดกับสปอร์ (subtending hyphae) มีการพบเส้นใยผอมเรียวขนาดเล็กยื่นจาก suspensor ไปยังสปอร์ ซึ่งมักหลุดหายไปได้ง่ายเมื่อสปอร์แก่ (Gerdemann and Trappe, 1974)

Glaziella ราบี้สร้างสปอโรคาร์ปสีส้มถึงแดง ขนาดใหญ่ประมาณ 1.5 - 5 เซนติเมตร ภายในกลวง มีคลามิโดสปอร์กระจายในผนังของสปอโรคาร์ป มีรายงานว่าพบ



ภาพที่ 1 แพทเทอร์นของสปอร์ในสกุล (a) Acaulospora (b) Entrophospora (c) Glomus (d) Sclerocystis (e) Gigaspora ซึ่งมีแพทเทอร์นของสปอร์เช่นเดียวกับสกุล Scutellospora (ออมทรัพย์ นพอมรบดี, 2533)

เพียงชนิดเดียว โดยพบสปอโรคาร์ปอยู่บนผิวดิน และลอยไปมาอย่างอิสระบริเวณผิวทะเล (Trappe and Schenck,1982)

Glomus สร้างคลามิโดสปอร์ที่ปลายเส้นใยและมักพบ 1 สปอร์ที่ปลายเส้นใยแต่ละเส้น มีผนัง 1 หรือ 2 ชั้น เมื่อสปอร์แก่จะมีหยดน้ำมันขนาดต่างๆ กันภายใน มีผนัง (septum) กั้นระหว่างสปอร์กับเส้นใยที่เชื่อมติดกับสปอร์ ทำให้สารประกอบภายในสปอร์และในเส้นใยที่ติดกับสปอร์ถูกแยกออกจากกัน หรือผนังสปอร์อาจหนาขึ้นจนปิดกั้นช่องเปิดระหว่างสปอร์กับเส้นใย สปอร์ของราชนี้อาจเกิดเดี่ยวๆในดิน ในรากพืช หรือสร้างเป็นสปอโรคาร์ป ซึ่งมักรวมกันเป็นกลุ่มไม่เป็นระเบียบ ยกเว้นเพียง Glomus radiatum ซึ่งสปอร์จะเรียงเป็นรัศมีออกจากฐานสปอโรคาร์ป (Trappe and Schenck, 1982)

Sclerocystis ราชนิดนี้จะสร้างคลามิโดสปอร์ที่ปลายเส้นใยและเรียงกันเป็นชั้นเดียวรอบๆ เส้นใยที่สานพันกันตรงกลาง (central plexus) อาจมีหรือไม่มี peridium หุ้มสปอร์ หรือกลุ่มคลามิโดสปอร์กระจายกันอยู่ในสปอโรคาร์ป โดยสปอร์เกาะตัวกันหลวมๆ สปอโรคาร์ปอาจเกิดเดี่ยวๆบนดินหรือรวมตัวเกาะติดกับเศษอินทรียวัตถุหรือมอสบนผิวดินได้(Hall, 1984)

Scutellospora สร้าง azygospore คล้าย Gigaspora คือมี suspensor พองคล้ายกระเปาะเหมือนกัน แต่ผนังสปอร์มี 2 ชั้นหรือมากกว่า โดยผนังชั้นในยืดหยุ่นได้ซึ่งต่างจาก Gigaspora และมักพบ auxillary cell เป็นปมหรือเป็นก้อน ต่างจาก Gigaspora ที่เป็นหนามหรือเป็นปุ่มยื่นออกมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ลักษณะสำคัญในการจำแนกชนิดของราวี เอไมโคไรซ่า</u>

ลักษณะสำคัญในการจำแนกชนิดของราวี เอไมโคไรซ่านั้น ได้มีผู้สรุปว่า โครงสร้างสำคัญต่อไปนี้ของราวี เอไมโคไรซ่าซึ่งใช้จำแนกชนิดราวี เอไมโคไรซ่า ได้แก่ (Trappe, 1982; ออมทรัพย์ นพอมรบดี, สุภาพร ธรรมสุระกุล และ สมเพชร เจริญสุข, 2533)

1. สปอโรคาร์ป (sporocarp) เป็นโครงสร้างของราวี เอไมโคไรซ่าซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของสปอร์จำนวนมากและไม่แตกออกจากกัน อาจเกิดจากการรวมตัวกันของสปอร์

ที่ติดกันและอยู่ภายในเส้นใยที่พันกันหลวมๆ มักไม่มี peridium หรือเกิดการรวมตัวกันของเส้นใยที่พันกันอยู่อย่างไม่เป็นระเบียบและสปอร์เกิดอยู่ในกลุ่มเส้นใย(glebal hyphae) นั้น หรือสปอร์รวมตัวกันและถูกล้อมรอบด้วยเส้นใยเป็นสปอโรคาร์ปแบบมี peridium อาจพบรวมตัวกันอยู่ตามซากพืชซากสัตว์ สปอร์ของราชนิดอื่นๆที่ตายแล้ว เมล็ดพืชหรือในรากพืช (ออมทรัพย์ นพอมรบดี และคณะ, 2533)

สปอโรคาร์ป อาจมีขนาดค่อนข้างใหญ่ถึง 5.0 เซนติเมตร เช่น สปอโรคาร์ปของราวีเอไมโคไรซ่าสกุล Glaziella หรือ Glomus แต่มีบางชนิดที่มีขนาดเล็กกว่า 0.5 - 1 มิลลิเมตร เช่น สปอโรคาร์ปของราวีเอไมโคไรซ่าสกุล Sclerocystis หรือ Glomus บางชนิด เช่น Glomus fasciculatum, Glomus microcarpum เนื่องจากขนาดของสปอโรคาร์ปมีความแปรปรวนค่อนข้างสูงในบางชนิด ลักษณะที่สำคัญที่ควรพิจารณานอกเหนือไปจากขนาด คือ สีของสปอโรคาร์ป ผนังหรือ peridium ซึ่งอาจเกิดจากเส้นใยที่พันกันอยู่อย่างหลวมๆ เช่น G. microcarpum, G. radiatum หรือคลุมอยู่อย่างหนาแน่น เช่น Sclerocystis sinuosa, Glomus segmentatum เป็นต้น แต่บางชนิดอาจไม่มี peridium ก็ได้ การจะสังเกตสีและรูปร่างของสปอโรคาร์ป โครงสร้างภายในและการเรียงตัวของสปอร์ ต้องตัดสปอโรคาร์ปตามความยาวผ่านแกนในตำแหน่งที่เส้นใยเชื่อมติดกับสปอร์ (attachment)

2. สปอร์ (spores)

ลักษณะสำคัญของสปอร์ที่ใช้ศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของราบี้ได้แก่

2.1 ขนาดสปอร์ การวัดขนาดของสปอร์วัดด้วยไมโครมิเตอร์ ความยาวของสปอร์วัดตามแกนผ่านจุดที่เส้นใยเชื่อมติดกับสปอร์ และวัดความกว้างของสปอร์โดยวัดส่วนที่กว้างที่สุดซึ่งตั้งฉากกับ attachment ขนาดของสปอร์ส่วนใหญ่มักใช้ค่าที่อยู่ระหว่างกลางของขนาดเล็กสุดกับขนาดใหญ่สุด เช่น Acaulospora laevis มีขนาดเท่ากับ 320 ไมครอน ซึ่งเป็นค่าที่ได้มาจากการวัดขนาดสปอร์ที่วัดได้ขนาดเล็กสุดเป็น 119 ไมครอน และขนาดใหญ่สุดเท่ากับ 520 ไมครอน แต่เนื่องจากในการวัดขนาดสปอร์ของราแต่ละชนิดอาจมีขนาดเล็กสุดและขนาดใหญ่สุดเท่ากับทั้งๆที่สปอร์ส่วนใหญ่มีขนาดโดยเฉลี่ยต่างกันในแต่ละชนิด ซึ่งจะทำให้ได้ค่าขนาดสปอร์ซึ่งเป็นค่าระหว่างกลางเท่ากัน จึงไม่ควรนำค่าขนาดสปอร์มาใช้เป็นข้อพิจารณาที่สำคัญในการจำแนกชนิด การวัดขนาดสปอร์กรณีที่ผนังมีลวดลาย (ornamentation) ให้วัดความสูงของลวดลายนั้นแยกต่างหากจากขนาดสปอร์จริง

2.2 สีของสปอร์ สามารถเห็นได้ง่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แต่สีของสปอร์อาจเปลี่ยนไปได้ เนื่องจากแสงสะท้อนที่เกิดจาก dissecting microscope หรือแสงที่ผ่านตัวอย่างก่อนมาถึงตา เมื่อดูตัวอย่างโดยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound ชนิด bright field หรือ phase contrast เพื่อแสดงความแตกต่างกันของสี ซึ่งอาจเกิดจากเม็ดสีในผนังสปอร์หรือเม็ดสีใน cytoplasmic content ภายในสปอร์ พบว่า สีของสปอร์ที่เกิดจากสารภายในสปอร์พบในราวี เอไมโคไรซ่าเพียงไม่กี่ชนิด ได้แก่ Gigaspora gigantea และ Glomus convolutum สารภายในสปอร์ของ G.gigantea จะมีสีเหลืองอมเขียวหรือเขียวอมเหลืองขณะที่ผนังสปอร์ใสไม่มีสี ส่วนสปอร์ของ G. convolutum จะมีสีเหลืองเข้ม เนื่องจากจุดสีในหยดน้ำมันที่สะสมอยู่ภายในสปอร์ (Gerdemann and Trappe, 1974) องค์ประกอบภายในสปอร์ของราวี เอไมโคไรซ่าที่ยังอ่อนอยู่ส่วนใหญ่ไม่มีสี แต่ในสปอร์ที่เจริญเต็มที่ (mature spores) จะมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่สร้างคลามิโดสปอร์กับกลุ่มที่สร้าง azygospore กลุ่มที่สร้าง azygospore ตรวจพบเม็ดน้ำมันขนาดเล็กสม่ำเสมอภายในสปอร์ ส่วนพวกที่สร้างคลามิโดสปอร์บางชนิดมีเม็ดน้ำมันขนาดเล็กหรืออาจรวมกันเป็นเม็ดน้ำมันขนาดใหญ่เม็ดเดียว ถ้าแห้งหรือเย็นเม็ดน้ำมันอาจเปลี่ยนเป็นผลึกหรือมีรูปร่างไม่แน่นอนหรือมีเส้นใยอยู่ภายใน ลักษณะความผันแปรเหล่านี้สามารถใช้จำแนกชนิดของราวี เอไมโคไรซ่าได้

2.3 ผนังสปอร์ เป็นลักษณะที่สำคัญที่สุดในการจำแนกชนิดของรากลุ่มนี้ เป็นแนวทางให้รู้ถึงการเจริญ วิธีการขยายพันธุ์และกลไกการดำรงชีวิต สปอร์ทั่วไป เมื่อยังอ่อนจะมีผนังบางและหนาขึ้นเมื่อสปอร์แก่ อาจหนาเพียง 1 ไมครอนหรือมากกว่า 20 ไมครอนในบางชนิด ยิ่งกว่านั้นราวี เอไมโคไรซ่าบางชนิดผนังเปลี่ยนแปลงไปเป็น 2 ชั้นหรือมากกว่า ผนังชั้นนอกอาจแตกหลุดได้ในขณะที่ผนังชั้นในมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม บางชนิดผนังสปอร์เชื่อมติดกันเรียก laminated wall

Berch (1986) ได้ศึกษาโครงสร้างผนังสปอร์ของราวี เอไมโคไรซ่าในสกุล Gigaspora และ Scutellospora และพบว่าแม้จะมีลักษณะอื่นๆใกล้เคียงกันแต่สามารถแยกกันได้ชัดเจนโดยอาศัยจำนวนผนังสปอร์ พบว่า 100% ของ Gigaspora มีผนังเพียง 1–2 ชั้น ส่วน Scutellospora ที่พบว่ามีผนังมากกว่า 3 ชั้นขึ้นไปนั้นมีถึง 90% บางครั้งผนังหลายชั้นของสปอร์จะเชื่อมติดกันเป็น laminated wall ซึ่งจะสะท้อนแสงเมื่ออยู่ในน้ำ หรือกลีเซอรีน ดังนั้นจึงเสนอว่าในการจำแนกรากลุ่มนี้ควรต้องดูลักษณะและชั้นของผนังสปอร์เพื่อช่วยในการตัดสินโดยให้พิจารณาจำนวนชั้นและแบบของผนังสปอร์ประกอบกัน เป็นต้น

2.4 ลวดลายของผนังสปอร์(Spore ornamentation) ลวดลายที่ผนังสปอร์มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป เช่น เป็นปุ่มกลม เป็นเส้น หนาม หลุมเล็กๆ หลุมกลมมีขอบ เป็นรอยย่นหรือมองดูเหมือนตาข่าย หรือเป็นหลอด เป็นต้น บางชนิดอาจมี 2 ลักษณะรวมกัน รูปแบบขนาดหรือความสูงของลวดลายผนังสปอร์ มีประโยชน์ในการจัดลำจำแนกชนิดได้

2.5 ปฏิกิริยาของผนังหรือเยื่อเยื่อสปอร์ต่อ Melzer's reagent เช่น เกิดสีม่วงแดงกับผนังชั้นในของ Acaulospora longula, Acaulospora mellea และ Acaulospora rehmii เป็นต้น (Schenck, Spain, Steverding and Howeler 1984)

3. เส้นใยที่เชื่อมติดกับสปอร์ (Subtending hyphae) เส้นใยที่เชื่อมติดกับสปอร์นอกจากสามารถใช้ในการจำแนก genus ของราวี เอไมโคไรซ่าแล้วยังมีประโยชน์ในการจำแนก species ด้วย ลักษณะที่ควรศึกษา ได้แก่

3.1 จำนวนเส้นใยต่อสปอร์ ราวี เอไมโคไรซ่าส่วนใหญ่จะสร้างสปอร์บนเส้นใยหรือในเส้นใย ถ้ามีหลายเส้นใยมักอยู่ในสกุล Glomus เช่น Glomus heterosporum, Glomus lacteum สามารถสร้างสปอร์บน 1-3 subtending hyphae หรือ Glomus multicaulis มี 1-4 เส้นใยใน 1 สปอร์ โดยแต่ละเส้นใยจะอยู่ตรงกันข้ามกัน

3.2 สีของเส้นใย โดยทั่วไปสีของเส้นใยที่เชื่อมติดกับสปอร์จะเป็นสีเดียวกับผนังสปอร์ ยกเว้นใน Glomus invermaium ที่ผนังเส้นใยไม่มีสีแต่เชื่อมติดอยู่กับผนังสปอร์ที่มีสีน้ำตาลเข้ม

3.3 รูปร่างของเส้นใย รูปร่างเส้นใยที่เชื่อมต่อกับสปอร์มีความแปรปรวนมากในสกุล Glomus มีตั้งแต่เป็นรูปทรงกระบอก รูปกรวย เป็นเส้นตรงหรือโค้งหักมุมตรงจุดเชื่อมระหว่างเส้นใยกับสปอร์ ใน G. mosseae พบว่ามีส่วนฐานของเส้นใยที่ติดกับสปอร์ยื่นออกมาจากสปอร์เป็นรูปกรวยหรือทรงกระบอก จุดที่ติดกับสปอร์ไม่คอดซึ่งต่างจากราในสกุล Gigaspora หรือ Scutellospora ที่สปอร์เกิดอยู่บน bulbous suspensor like cell ทำให้จุดที่สัมผัสกันของสปอร์กับเส้นใยมีลักษณะคอดอย่างเด่นชัด เป็นต้น

3.4 ผนังกั้นระหว่างสปอร์กับเส้นใย เมื่อสปอร์ของราวี เอไมโคไรซ่ายังอ่อนอยู่จะพบว่ามีทางเชื่อมต่อถึงกัน ต่อเมื่อสปอร์เริ่มแก่อาจมีผนังกั้น (septum) เกิดขึ้นระหว่างเส้นใยกับสปอร์ จากลักษณะนี้ช่วยให้จำแนกราวี เอไมโคไรซ่าในสกุล Glomus ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีผนังกั้น(septum) ระหว่างเส้นใยกับสปอร์ กับพวกที่ไม่มีผนังกั้น ในกลุ่มที่ไม่มีผนังกั้น มัก

พบว่าผนังสปอร์หนาจนดูเหมือนปิดกั้นทางเชื่อมต่อระหว่างเส้นใยกับสปอร์ ดังนั้นการแยกชนิดของ Glomus โดยอาศัยลักษณะของเส้นใยที่เชื่อมติดกับสปอร์จึงง่ายกว่าอาศัยลักษณะสปอร์ เช่น สปอร์ของ Glomus etunicatum บางครั้งมีลักษณะคล้ายสปอร์ของ G. fasciculatum หรือ G. macrocarpum แต่เส้นใยที่เชื่อมติดกับสปอร์ของ G. etunicatum มีผนังกั้นและเส้นใยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กเพียง 5-8 ไมครอน ผนังหนาเล็กน้อยต่างกับ Glomus อีก 2 ชนิดข้างต้น ซึ่งมีผนังสปอร์หนาจนปิดกั้นเส้นใยส่วนที่ติดกับสปอร์ และเส้นใยมีขนาด 10-20 ไมครอน มีสีและผนังหนากว่า

นอกจากนี้ยังมีการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับ จำนวนชั้นของผนังเส้นใย ความกว้างของเส้นใย สัดส่วนของความกว้างของสปอร์กับความกว้างของเส้นใย ตลอดจนผนังกั้นภายในของสปอร์และสารต่างๆ ที่อยู่ภายในสปอร์กับเส้นใยเพื่อประกอบการจำแนกชนิดของราวี เอไมโคไรซา

4. Soil-born auxillary cell ราวี เอไมโคไรซาในสกุล Glomus และ Gigaspora บางชนิดจะสร้างเซลพิเศษ หรือกลุ่มของเซลที่ปลายเส้นใยซึ่งเรียกว่า soil-born auxillary cell ซึ่งมีลักษณะต่างกันในแต่ละชนิด อาจเป็นเซลเดี่ยวๆหรือเป็นกลุ่มขนาดต่างกัน เซลดังกล่าวมักผิวไม่เรียบอาจเป็น knobs,warts,spines หรือมี coralloid projection ที่ผิว แม้ว่าจะสามารถจำแนกชนิดได้โดยใช้ลักษณะสปอร์เพียงอย่างเดียว แต่การตรวจพบ auxillary cell จะช่วยยืนยันการจำแนกชนิดได้ดีขึ้น

5. คุณสมบัติอื่น ๆ

5.1 คุณสมบัติทางชีวเคมี Rosendahl และ Sen (1992) รายงานว่า ได้มีการศึกษา pattern ของ acid phosphatase และ alkaline phosphatase isozymes ในรากที่มีการติดเชื้อราวี เอไมโคไรซาในปี 1979 ต่อมามีการใช้เทคนิค isozyme ศึกษาและจำแนกราวี เอไมโคไรซาโดยศึกษา pattern ของ isozymes ที่สกัดจากสปอร์ของ Glomus 5 ชนิด พบว่า malate dehydrogenase เป็นสารบ่งชี้ที่ดีที่สุดในการแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อรา (Sen and Hepper,1986 ; อ้างถึงใน Rosendahl and Sen, 1992) แต่ยังเห็นความแตกต่างไม่ชัดเจน วิธีการสกัดเอ็นไซม์ยังต้องปรับปรุง เนื่องจากมีผนังสปอร์ปนเนื้อในเอ็นไซม์ที่สกัดได้ หรือวิธีสกัดบางวิธีทำให้สปอร์ไม่แตกจึงไม่ได้เอ็นไซม์ และในกรณีที่สปอร์ราวี เอไมโคไรซามีขนาดเล็กและอยู่เป็นกลุ่ม จะมีปัญหาในการสกัดเอ็นไซม์เพิ่มขึ้นทำให้ได้เอ็นไซม์ที่

ไม่บริสุทธิ์มีการปนเปื้อนโดยราอื่นๆได้ ในระยะหลังมีการพัฒนาวิธีการสกัดโดยสกัดเอ็นไซม์จากเส้นใยและรากที่ติดเชื้อราวี เอไมโคไรซ่า แต่วิธีการยังไม่แพร่หลายนัก เนื่องจากเอ็นไซม์ที่สกัดได้มีความเข้มข้นต่ำ และกรรมวิธีในการสกัดทำให้เกิดเกลือไปทำให้การเคลื่อนที่ของเอ็นไซม์ระหว่างทำ electrophoresis ผิดไปจากเป็นจริงอีกทั้งวิธีสกัดก็ลำบากและใช้เวลามาก (Rosendahl and Sen, 1992)

5.2 ลักษณะทางภูมิต้านทาน ปัจจุบันนิยมใช้ 2 วิธีการเพื่อจำแนกราวี เอไมโคไรซ่า คือ The fluorescent antibody และ Enzymelinked immunosorbent assay(ELISA) โดยสกัด antigen จากสปอร์หรือเส้นใยราวี เอไมโคไรซ่าและฉีดเข้าเส้นเลือดบริเวณหูกระต่าย แล้วเก็บ serum ในวันที่ 28 หลังจากให้ antigen ครั้งแรก หลังจากนั้น นำ antigen ที่ได้มาตกตะกอนกับสารสกัดจากสปอร์หรือเส้นใยของราวี เอไมโคไรซ่าในวิธี ELISA serum ส่วนหนึ่ง กรองด้วย membrane filter และ label ด้วย fluorescein-labelled goat anti-rabbit serum และตรวจผลโดยใช้กล้อง UV illumination microscope แต่จากผลการตรวจ พบว่า ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะเชื้อเป้าหมาย แต่ยังเกิดปฏิกริยากับ species อื่นได้ด้วย (Kough, Malajezuk and Linderman, 1983 ; อ้างใน ออมทรัพย์ นพอมรบดี และคณะ, 2533 ; Aldwell and Hall, 1986 ; อ้างใน Peroto, Malavasi and Butcher, 1992) ดังนั้นจึงมีความพยายามใช้ antibodies ของ clone เดี่ยว เพื่อจำแนกราวี เอไมโคไรซ่าที่มีลักษณะเหมือนกันโดย Wright, Morton และ Sworobuk, 1987 ได้ isolate monoclonal 2 ชนิด ซึ่งทำปฏิกริยาโดยตรงกับสปอร์ของ Glomus occultum ทำให้สามารถจำแนกราวี เอไมโคไรซ่าที่มีใบดินต่างชนิดกันซึ่งไม่สามารถจำแนกได้โดยวิธี ELISA (Peroto, Malavasi and Butcher 1992)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเข้าสู่รากพืชของราวี เอไมโคไรซ่า และความสัมพันธ์กับรากพืช

การเข้าสู่รากของราวี เอไมโคไรซ่า เกิดจากการที่สปอร์ถูกกระตุ้นด้วยสารที่พืชปล่อยออกมาจากรากให้งอก germ tube และสร้างเส้นใยยืดยาวเข้าหารากพืชและเจริญรอบๆราก เมื่อสัมผัสกับผิวรากพืชปลายเส้นใยจะบวมพองและสร้างโครงสร้างคล้าย appressorium ย่อยผนังเซลของรากและแทงผ่านชั้นเอพิเดอร์มิส หรือผ่านเข้าทางผนังรากขนอ่อนหรือทาง

เอพิเดอร์มิสที่เริ่มเปื่อย จากนั้นจะแตกแขนงเจริญไปตามช่องว่างระหว่างเซลและ/หรือแทงทะลุเข้าไปเจริญภายในเซลของเนื้อเยื่อในชั้นเอพิเดอร์มิสและคอร์เท็กซ์ บางครั้งเส้นใยขดเป็นวงต่อมาจึงพัฒนาเป็นอาร์บัสคูลและเวสิเคิล โดยไม่เจริญในเนื้อเยื่อชั้นเอนโดเดอร์มิสชั้นเนื้อเยื่อเจริญและท่อลำเลียงน้ำและอาหาร (Bakshi, 1974 ; Bonfante Fasolo,1984) การเข้าอยู่อาศัยของราวี เอไมโคไรซ่าไม่ทำให้สัณฐานวิทยาภายนอกของรากพืชอาศัยเปลี่ยนแปลง ส่วนลักษณะสัณฐานวิทยาภายในสามารถตรวจสอบได้ วิธีที่นิยมมาก คือย้อมสีรากที่มีเชื้อราบี้เจริญอยู่ตามวิธีของ Phillips และ Hayman (1970)

ความสัมพันธ์ของราวี เอไมโคไรซ่ากับรากพืช

ในการอยู่ร่วมกับรากพืช ราวี เอไมโคไรซ่าจะช่วยดูดแร่ธาตุจากดินโดยเฉพาะอย่างยิ่งฟอสฟอรัสซึ่งมักถูกตรึงโดยอนุภาคดินทำให้โอกาสที่ฟอสฟอรัสจะแพร่มาถึงบริเวณรากและถูกดูดซึมโดยรากเป็นไปได้ยาก เส้นใยของราวี เอไมโคไรซ่า ซึ่งแตกแขนงเจริญแผ่กระจายรอบรากพืชเป็นบริเวณกว้างจะช่วยเพิ่มอาณาบริเวณระบบรากให้กว้างขึ้น เป็นการเพิ่มพื้นที่ในการดูดซึมแร่ธาตุ เนื่องจากเส้นใยของราวี เอไมโคไรซ่าทำหน้าที่แทนรากขนอ่อน นอกจากนี้ราวี เอไมโคไรซ่ายังช่วยสลายธาตุอาหารต่างๆที่ปกติไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้และช่วยลำเลียงธาตุอาหารไปตามเส้นใยจนถึงอาร์บัสคูลและสลายตัวปลดปล่อยให้กับพืชในที่สุด ขณะเดียวกันราวี เอไมโคไรซ่าก็ได้รับสารอาหารเช่น น้ำตาลต่างๆจากเซลพืชผ่านเข้าอาร์บัสคูลหรือสะสมไว้ที่เวสิเคิลและเคลื่อนไปตามเส้นใยราในเวลาต่อมา (Abbott and Robson, 1984)

เมื่อในดินมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชต่ำทำให้พืชขาดฟอสฟอรัส ภายใต้ภาวะที่มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชต่ำ จะช่วยทำให้ราวี เอไมโคไรซ่ากับพืชมีความสัมพันธ์กันมากขึ้นโดยการติดเชื้อในรากมากขึ้น เนื่องจาก membrane ของรากมี phospholipid น้อยลงทำให้น้ำตาลและกรดอะมิโนต่างๆถูกปล่อยออกมาจากรากมากขึ้น เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของราวี เอไมโคไรซ่า นอกจากนี้ยังพบว่า เซลรากพืชที่ติดเชื้อราวี เอไมโคไรซ่า ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาในพืช ได้แก่ มีการสลายตัวของแป้งที่เก็บสะสมไว้และเคลื่อนไปยังเซลของราทำให้ตรวจไม่พบเม็ดแป้งในเซลพืช ขณะเดียวกันพบว่ามี arbuscule มากขึ้น เซลพืชมีการสร้างออร์กาเนลต่างๆเพิ่มขึ้น เช่น ไมโตคอนเดรีย เอนโดพลาสมิคเรติคูลัม เป็นต้น และยังพบว่ามี lignification ของผนังเซลมากขึ้น โดยเฉพาะเซลในชั้นเอนโดเดอร์มิส(Cooper, 1984)

การแพร่กระจายของราวี เอไมโคไรซ่า

ราวี เอไมโคไรซ่าอาศัยอยู่ร่วมกับพืชได้เกือบทุกชนิดและกระจายอยู่ทั่วทุกภูมิภาคของโลก ทั้งเขตร้อน อบอุ่น แม้แต่เขตหนาว สามารถพบในป่าร้อนชื้น ทุ่งหญ้า ทะเลทรายและในพืชน้ำ เป็นต้น Bagyaraj (1991) ได้รวบรวมรายงานเกี่ยวกับพืชอาศัยของราบี้ พบว่าพืชในกลุ่มที่มีท่อลำเลียงน้ำและอาหารประมาณ 90% หรือประมาณ 3 แสนชนิด ทั้ง Angiosperm และ Gymnosperm รวมทั้งพืชน้ำต่างๆ เป็นพืชอาศัยของราวี เอไมโคไรซ่าได้และพบในพืชพวก Bryophyte และ Pteridophyte ซึ่งไม่มีท่อลำเลียงน้ำและอาหารด้วย พืชที่ยังไม่เคยมีรายงานว่าพบการสร้างวี เอไมโคไรซ่าได้แก่พืชในตระกูล Pinaceae Betulaceae Orchidaceae Fumanaceae Commelinaceae Urticaceae และ Ericaceae และพบมีการสร้างราวี เอไมโคไรซ่าปริมาณน้อยมากในพืชพวก Brassicaceae Chenopodiaceae Polygonaceae และ Cyperaceae จนไม่ถือว่าพืชดังกล่าวเป็นพืชอาศัยของราวี เอไมโคไรซ่า พืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่มีราวี เอไมโคไรซ่า เช่น พืชไร่ ได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวฟ่างทุกชนิด มันฝรั่ง ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง มะเขือเทศ กาแฟ ยาสูบ นอกจากนี้ยังพบในพืชสวนต่างๆได้แก่ ลำไย ลิ้นจี่ ส้ม กล้วย อินทผลัม และพบในไม้ป่าในเขตร้อน เช่น สัก ยางพารา เป็นต้น ระยะหลังพบในรากพืชลอยน้ำและพบในเฟิร์นพวก Salvinia cucullata ด้วย นอกจากนี้พืชบางชนิดสร้างทั้งเอคโตไมโคไรซ่าและวี เอไมโคไรซ่า เช่น แอปเปิล โอ๊ค เป็นต้น (Trappe, 1977)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการติดเชื้อในรากพืชของราวี เอไมโคไรซ่า

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเจริญและการติดเชื้อในรากพืชของราวี เอไมโคไรซ่าได้แก่

อุณหภูมิ

Schenck และ Schroder, 1974 พบว่า อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญในระยะต่างๆ และการสร้างสปอร์ของราวี เอไมโคไรซ่าในแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน เช่นมีการสร้างอาร์บัสคูล ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส มีการเจริญของเส้นใยรอบๆรากดีที่สุด ที่อุณหภูมิระหว่าง 28-34 องศาเซลเซียส An, Shan และ Wang (1993) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการงอกและ

ประสิทธิภาพของ Glomus spp. 2 ชนิด พบว่า ที่อุณหภูมิต่ำ G. macrocarpum มีประสิทธิภาพในการติดเชื้อของรากน้อยลง ตลอดจนถึงไม่สามารถช่วยเร่งการเจริญของกล้าแอปเปิล

pH

ราวีเอไมโคไรซ่าหลายสายพันธุ์สามารถทนทานและเจริญได้ในช่วง pH ค่อนข้างกว้าง G. fasciculatum สามารถเจริญเข้าสู่รากพืชได้ดีในช่วง 5.3-7.5 และสามารถอยู่รอดได้แม้ pH จะสูงถึง 9.5 ขณะที่ G. mosseae ชอบ pH ประมาณ 5.2 Glomus tenue สร้างวีเอไมโคไรซ่าได้ดีที่ pH ต่ำ Acaulospora หลายชนิด เช่น A.laevis เจริญได้ดีเมื่อ pH เป็น 5.0 และเปอร์เซนต์การติดเชื้อในรากลดลงเมื่อ pH สูงกว่า 6.2 (Abbott et al, 1992 ; Lambert, Cole and Baker, 1980)

ฟอสฟอรัส

มีรายงานหลายฉบับ กล่าวถึง การเติมธาตุอาหารฟอสฟอรัสในดิน ทำให้การเจริญและการติดเชื้อในรากของราวีเอไมโคไรซ่าน้อยลง การให้ปุ๋ย rock phosphate 100 ppmP ทำให้การติดเชื้อของ G. fasciculatum มากกว่าการให้ปุ๋ยซูเปอร์ฟอสเฟตซึ่งรากพืชสามารถดูดไปใช้ได้โดยตรง และการให้ปุ๋ยซูเปอร์ฟอสเฟตติดต่อกันเป็นเวลานานทำให้จำนวนสปอร์และเส้นใยของราวีเอไมโคไรซ่าในดิน รวมทั้งการติดเชื้อในรากพืชลดลงตามลำดับ (Sreenivaga and Bagyaraj, 1989 ; อ้างใน Bagyaraj, 1991) แต่การให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในรูป rock phosphate ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของราวีเอไมโคไรซ่า (Menge, 1984)

ไนโตรเจน

Hayman (1970) พบว่า การเติมปุ๋ยไนโตรเจนลงในดิน ทำให้ราวีเอไมโคไรซ่าสร้างสปอร์น้อยลง Abbott และคณะ (1984) ได้รายงานยืนยันว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณมาก มีผลยับยั้งการเจริญของราวีเอไมโคไรซ่ารวมทั้งการติดเชื้อในราก และเพิ่มเติมว่าปุ๋ยไนโตรเจนในรูปเกลือไนเตรทยับยั้งการเจริญได้มากกว่าเกลือแอมโมเนีย แต่การให้ปุ๋ยไนโตรเจนและธาตุอาหารบางชนิด เช่น สังกะสี แมงกานีส มากเกินไปจะยับยั้งการเจริญและการติดเชื้อในรากของราวีเอไมโคไรซ่า (Menge, 1984)

สารเคมีทางการเกษตร

ยาฆ่าราา ยาฆ่าแมลงและยากำจัดวัชพืชล้วนมีผลยับยั้งการเจริญของราวี่เอไมโคไรซ่า Mellocen และ Cole(1979);อ้างถึงใน Nopamornbodi and Vasuvat,1989 รายงานว่า สารเคมีพวก captasol,carlondazin หรือ trifurafin ยับยั้งการงอกของสปอร์ A. laevis และ Glomus caledonins แต่มียากำจัดวัชพืชบางชนิด เช่น paraquat, simazime, atrazine และ malic hydrazide ทำให้มีการติดเชื้อในรากเพิ่มมากขึ้นซึ่งอาจเนื่องมาจากยากำจัดวัชพืชดังกล่าวทำให้รากพืชปลอยสารต่างๆออกจากรากเพิ่มขึ้น (Menge, 1984)

Pathogen

การสร้างสปอร์ของ G. macrocarpum ลดลงถ้ารากพืชมีการติดเชื้ออยู่ก่อนแล้วด้วย Pythium sp.และ Phytophthora sp. และยังทำให้เปอร์เซนต์การติดเชื้อในรากลดลงด้วยถึง 30-35% (Kruckelman, 1975)

ปริมาณน้ำในดิน

ปริมาณน้ำที่มากหรือน้อยเกินไปในดินทำให้การงอกของสปอร์และการสร้างสปอร์น้อยลง ปริมาณน้ำที่เหมาะสมคือ ต่ำกว่าระดับ field capacity เล็กน้อย (Mange, 1984)

ความเข้มแสงและระยะเวลาการให้แสง

Ferguson และ Woodland(1982) ได้รายงานถึงอิทธิพลความเข้มแสงและระยะเวลาที่ได้รับแสงที่มีต่อการสร้างสปอร์และการเจริญของราวี่เอไมโคไรซ่าว่ายิ่งได้รับแสงมากและนานยิ่งทำให้ราวี่เอไมโคไรซ่าเจริญและสร้างสปอร์มากขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการสังเคราะห์แสงที่เพิ่มขึ้น พบว่า G. fasciculatum ในรากหญ้าซูดานสร้างสปอร์เพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า

Host

Singh และ Tilak (1992) รายงานว่า G. versiforme มีการสร้างสปอร์และมีการติดเชื้อในรากมากเมื่อใส่เชื้อบนข้าวสาลีและข้าวนก เช่นเดียวกับ Brown, Luis, Sabiniano และ Castro (1993) ได้ทดลองใส่เชื้อราวี่เอไมโคไรซ่าบนหอมพบว่าสร้างสปอร์ดีที่สุด แต่ราวี่เอไมโคไรซ่ากลับยับยั้งการเจริญของรากหอมและพบว่าเส้นใยราวี่เอไมโคไรซ่าแผ่กระจายไม่ดีนักยับเป็น low potential inoculum

Substrate

Brown และคณะ (1993) ได้ศึกษาเกี่ยวกับ substrate สำหรับผลิต inoculum ของราวี เอไมโคไรซา พบว่า ดินเหนียวเป็น substrate ที่ดีที่สุดในการผลิตสปอร์เป็นจำนวนมากแต่กลับยับยั้งการเจริญของรากพืชอาศัย และขัดขวางการแผ่กระจายของเส้นใย ทำให้ inoculum potential ต่ำลง perlite ใช้ทำ inoculum ได้ดีที่สุด

ผลของราวี เอไมโคไรซาต่อการเจริญของพืช

ราวี เอไมโคไรซา มีบทบาทช่วยเพิ่มการเจริญของลำต้น ผลผลิต และเพิ่มเปอร์เซนต์การมีธาตุอาหาร Ross และ Harper(1970) พบว่า ราวี เอไมโคไรซาช่วยเพิ่มการเจริญและผลผลิตของถั่วเหลืองที่ปลูกในดินที่อบฆ่าเชื้อถึง 30-40% และมีการสะสมธาตุฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แคลเซียม ทองแดงและแมงกานีสในใบเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นที่ไม่มีราวี เอไมโคไรซา ในอินเดียข้าวฟ่างที่ปลูกในดินที่อบฆ่าเชื้อและมีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่ำ เมื่อใส่ราวี เอไมโคไรซาทำให้น้ำหนักแห้งของรากและต้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ มีปริมาณฟอสฟอรัสสูงกว่าต้นที่ไม่ใส่เชื้อ (Bagyaraj และคณะ, 1980) ช่วยเพิ่มน้ำหนักแห้งของต้น 39% และมีปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้น 54% ในแปลงเพาะปลูกข้าวฟ่าง (Singh และคณะ, 1992) เช่นเดียวกับการทดลองในมันฝรั่งเมื่อปลูกในดินที่มีปริมาณฟอสฟอรัสต่ำ พบว่า ราวี เอไมโคไรซาช่วยให้พืชสามารถดูดซึมฟอสฟอรัสจากดินได้มากขึ้นถึง 42% เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่มีราบี้ (McArthur and Knowles,1993) Wang Parent, Gosselin และ Desfardins (1993) พบว่า Glomus intraradices และ Glomus vesiculiferum ช่วยให้เยอบีราออกดอกเร็วขึ้น และลดอัตราการตายในสัปดาห์ที่ 8 ของต้นเยอบีราซึ่งเป็นปัญหาในการขยายพันธุ์ เย็นใจ วสุวัต, ออมทรัพย์ นพอมรบดี และ ภูษิต วิวัฒนวงศ์วนา (2521) ได้ทดลองใส่ราวี เอไมโคไรซาในข้าวโพด พบว่า มีการเจริญมากกว่าต้นที่ไม่ใส่ราบี้โดยต้นข้าวโพดที่ใส่ทั้งสปอร์และรากที่มีไมโคไรซามีการเจริญดีที่สุดและการใส่ราวี เอไมโคไรซาร่วมกัน 4 ชนิด ทำให้ข้าวโพดมีความสูง และให้ผลผลิตดีกว่าเมื่อใส่ราแต่ละชนิดและเมื่อไม่ใส่ราบี้ (ระพีพรรณ ชีวะธนรักษ์, 2528)

McGraw และ Schenck (1980) ได้ศึกษาผลของราวี เอไมโคไรซาต่อพืชหลายชนิดในเรือนทดลอง พบว่าเมื่อใส่ราวี เอไมโคไรซา ส้มชนิด sour orange มีการเจริญของต้น

และได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น เบญจมาศออกดอกเร็วขึ้นและมีปริมาณดอกเพิ่มถึง 100% มะเขือเทศสายพันธุ์ walker ให้ผลผลิตมากขึ้น 200 - 300% โดยชนิดของราวี เอไมโคไรซ่าที่ช่วยให้พืชสวนใหญ่ข้างต้นเจริญดี คือ G. etunicatum, G. fasciculatum และ G. mosseae แต่ G. microcarpum และ G. macrocarpum ช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเฉพาะในพืชบางชนิดเท่านั้น ในประเทศไทยมีการทดลองในถั่วลิสง พบว่า ราวี เอไมโคไรซ่าทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นจากดินที่ไม่ใส่เชื้อถึง 10-23% (ออมทรัพย์ นพอมรบดี, 2528) นอกจากนี้พบว่าราว G. etunicatum ช่วยเปลี่ยนแปลงและดูดซึมธาตุฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปอินทรียสารต่างๆ รูปต่างๆ ได้แก่ Phytic acid, RNA, ATP หรือ CMP ทำให้พืชที่มีราบี้สามารถใช้ฟอสฟอรัสได้ดีกว่าที่พืชไม่มีราบี้ ถึง 500-6000 เท่า (Jayachandran, Schwab and Hetrick, 1992)

นอกจากช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชแล้ว ราวี เอไมโคไรซ่ายังช่วยควบคุมความรุนแรงและการเกิดโรคในพืชได้ด้วย เช่น Glomus sp. ช่วยลดการเกิดโรค sheath blight ในข้าวได้ถึง 30% เมื่อเติมราวี เอไมโคไรซ่าดังกล่าวในดินปลูก (Ilag, Rosales and Mew, 1987) ในยาสูบ เมื่อใส่เชื้อ Glomus monosporum ทำให้ทนต่อเชื้อ Thielaviopsis basicola สาเหตุโรครากเน่าได้ และยังทำให้ผลผลิตน้ำหนักรากและใบมากกว่าดินที่ไม่ใส่ราวี เอไมโคไรซ่า (Giovannetti, Tosi, Torre and Zazzerini, 1991) ช่วยลดการเป็นโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ Fusarium solani และเพิ่มผลผลิตของมันฝรั่งได้ เมื่อมีรา G. etunicatum, G. macrocarpum และ Gigaspora margarita อยู่ร่วมด้วย (Pascua and Milagrosa, 1989)

การผลิต inoculum ของราวี เอไมโคไรซ่า

เนื่องจากราวี เอไมโคไรซ่าต่างจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ รวมทั้งเอคโตไมโคไรซ่า คือไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ การเพิ่มปริมาณจำเป็นต้องให้เจริญไปพร้อมๆกับเซลรากพืชที่เป็น host ดังนั้นการผลิต inoculum ที่มีคุณภาพปริมาณมากที่ใช้ในแปลงเพาะปลูกจึงค่อนข้างยุ่งยากและมีลำดับขั้นตอนดูแลการผลิต ทั้งการเตรียม เก็บรักษาและขนส่ง เนื่องจากมีปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่างๆ เกี่ยวข้องและมีอิทธิพลต่อความมีชีวิตและคุณภาพของ inoculum

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

inoculum ที่ดีควรมีลักษณะให้ประโยชน์ได้สูงสุด ได้แก่ ให้ผลตอบสนองที่ดีต่อพืช ใช้กับพืชได้หลายอย่าง สามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ในดินได้ดี ใช้ได้ในหลายภูมิอากาศ และหลายสภาพภูมิประเทศ และสามารถเจริญรอบรากและเจริญภายในรากได้รวดเร็ว เป็นต้น

inoculum ที่คุณภาพดีควรสามารถเจริญรอบรากและเจริญเข้าไปเติบโตในราก พืชได้อย่างรวดเร็ว เป็น inoculum ที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์อื่นปนเปื้อน อย่างน้อยที่สุดไม่ควรมีเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช (Bagyaraj, 1992)

ขั้นตอนในการผลิต VA mycorrhiza inoculum

1. การเตรียม starter culture ที่ดี เป็นเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อราวีเอไมโคไรซ่า ซึ่งมีองค์กรต่างๆทั้งภาครัฐและเอกชนทำหน้าที่รวบรวมและพร้อมให้บริการเพื่อการวิจัย เช่น International Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhiza Fungi (INVAM) และเนื่องจากเชื้อราชนิดนี้พบได้ทั่วไปในดินหลายลักษณะ หลายภูมิอากาศ ดังนั้นการแยกสปอร์จากดินจึงใช้เป็น starter culture ที่ดี

การใส่เชื้อลงบนรากพืชโดยเฉพาะการเตรียม starter culture ควรวางสปอร์ของเชื้อราวีเอไมโคไรซ่าให้สัมผัสหรือใกล้รากพืชมากที่สุด (Ferguson and Woodland,1982) หรือวางลงบนรากของต้นอ่อนโดยตรง เมื่อเพาะเมล็ดในกระถาง inoculum ควรอยู่ต่ำกว่าเมล็ดพืชประมาณ 2-3 เซนติเมตร

2. การเตรียม inoculum มีการค้นคว้าเทคนิควิธีการผลิตหลายวิธี เพื่อให้ได้ inoculum คุณภาพดี มีประสิทธิภาพในการติดเชื้อสูง ไม่มีการปนเปื้อนหรือมีน้อยมาก มีความมีชีวิตสูงและคงสภาพนั้นได้นาน และต้องขนส่งได้สะดวกด้วย

เทคนิคการเตรียม inoculum แบบต่างๆ (Jeffries and Dodd, 1991 ; Bagyaraj, 1992)

Nutrient Film Technique (NFT) เป็นเทคนิคที่จดสิทธิบัตรตั้งแต่ ค.ศ.1980 โดย Rothamsted Experimental Station ในประเทศอังกฤษ ผลิต inoculum โดยใส่เชื้อราวีเอไมโคไรซ่าซึ่งเฉพาะเจาะจงกับพืช แล้ววางพืชบนแผ่นพลาสติกคู่ที่วางเอนอยู่ใน container ให้รากอยู่ระหว่างแผ่นพลาสติกคู่นั้น ปั๊ม nutrient solution ให้ไหลผ่านช่อง

ว่างระหว่างแผ่นพลาสติกจากด้านบนและสัมผัสกับรากพืชตลอดเวลา ด้วยวิธีนี้จะได้ inoculum ของราวี เอไมโคไรซ่าประกอบด้วยรากพืชและเส้นใยของเชื้อราวี เอไมโคไรซ่าเป็นจำนวนมาก หลังจากทำให้รากแห้ง โดยวิธี air drying แล้ว วิธีนี้ผลิต inoculum ได้มากในเวลารวดเร็ว มีการปนเปื้อนน้อย แต่เชื้อราวี เอไมโคไรซ่าสร้างสปอร์น้อยมากทำให้สูญเสีย viability ได้ง่ายในระหว่างการทำให้แห้ง การเก็บและการขนส่ง

Circulating Hydroponic Culture Systems สามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ วางพืชให้รากจุ่มใน nutrient solution ตลอดเวลา มีการปั๊มอากาศเข้าไปใน solution และอีกวิธีหนึ่งคือ ปลูกพืชโดยใช้ทรายเป็นวัสดุเพาะ เติม nutrient solution วันละ 3-4 ครั้ง ให้ทรายอิ่มตัวด้วยสารละลายแล้วระบายออก รวมเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมงต่อวัน การผลิตด้วยวิธีนี้ต้องตรวจวัด pH และความเข้มข้นของสารละลายเป็นระยะๆ ควรใช้ container ขนาดใหญ่เพื่อไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงของ pH และความเข้มข้นมากเกินไป โดยวิธีนี้มักได้ inoculum ที่ประกอบด้วย เส้นใยภายในและภายนอกรากพืช รากพืชและสปอร์กรดีปลูกในทราย

มีผู้ใช้เทคนิคเพื่อเพิ่มปริมาณให้ได้รวดเร็วขึ้นและใช้เป็นเทคนิคเพื่อการศึกษากายวิภาคและสรีรวิทยาของความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับราวี เอไมโคไรซ่า ได้แก่ การทำ root transformation of host plant โดยวิธี Ri-T-DNA ของ Agrobacterium rhizogenes ทำให้เกิดรากจำนวนมากและมีการติดเชื้อในรากเร็วกว่าปกติ รวมทั้งมีการสร้างสปอร์ในหลอดทดลองด้วย ในอนาคตมีความหวังว่าอาจใช้วิธีนี้เพื่อผลิต inoculum ที่ปราศจากเชื้ออื่นในปริมาณมากได้ (Becard and Fortin, 1988)

Soil Culture หรือ Pot Culture ประกอบด้วยพืชอาศัย ราวี เอไมโคไรซ่า เชื้อจุลินทรีย์ ดินต่างๆและ supporting soil นิยมใช้วิธีนี้เพื่อผลิต inoculum ปริมาณมาก เพราะค่อนข้างสะดวก ผลิตได้ inoculum มีประสิทธิภาพสูงพอควร เก็บได้นานและเหมาะสำหรับใช้โรย หยอดหรือทำเป็น pellet ปลูกในแปลงเพาะขนาดใหญ่ (Bagyaraj, 1992)

ขั้นตอนการผลิต inoculum โดยวิธี Pot Culture Technique อย่างง่ายๆ โดยนำดินและ/หรือรากพืชที่ติดเชื้อราวี เอไมโคไรซ่า inoculate ลงในพืชที่เรียกว่า "trap plant" ที่ปลูกในดินหรือวัสดุปลูกที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้ราวี เอไมโคไรซ่าเจริญระยะหนึ่ง หลังจากนั้นแยกเฉพาะ

สปอร์ที่แข็งแรง ไม่มีเชื้ออื่นปนและไม่ถูกทำลายโดยศัตรู เช่น ไส้เดือนฝอย นำมาแช่ใน 0.05% โซเดียมไฮโปคลอไรด์นาน 2-3 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว ล้างด้วยน้ำสะอาดที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง จากนั้น inoculate ลงบนรากของต้นอ่อน การผลิตโดยวิธีนี้อาจมีผลเสีย กลายเป็นแหล่งกระจายของโรคพืชได้ในกรณีเกิดการปนเปื้อนโดย root pathogens ในระหว่างการเตรียม

ไม่ว่าจะผลิต inoculum ของราวี เอไมโคไรซ่าโดยวิธีใดล้วนมีข้อดี เหมาะสมกับพืชและวิธี inoculate ที่ต่างกัน พืชพวกย้ายปลูก (transplanted crops) ในประเทศที่พัฒนาแล้วนิยมใช้ inoculum ที่เตรียมด้วยวิธี Nutrient Film Technique เนื่องจากสอดคล้องกับวิธีการปลูกและการดูแลในเรือนเพาะชำที่ค่อนข้างสะอาด แต่สำหรับในประเทศที่กำลังพัฒนาซึ่งยังคงใช้วัสดุปลูกที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อ soil inoculum จะเหมาะสมกว่า

สำหรับพืชที่เพาะด้วยเมล็ดในแปลงขนาดใหญ่ ควรใช้ inoculum ที่ทำโดยวิธี Pot Culture ในรูป multiseed pellets คลุกเมล็ดด้วย inoculum ที่บดเป็นชิ้นเล็กๆ หรือหยอดสปอร์เข้มข้นใกล้ๆ เมล็ดเวลาปลูก หรือใส่ร่องระหว่างแถว ซึ่ง inoculum ในรูป multiseed pellets เป็นที่นิยมเพราะสะดวกและมีเปอร์เซนต์การติดเชื้อค่อนข้างสูง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย