



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพัฒนามายคอร์ไรซาเพื่อเกษตรอินทรีย์

Development of Mycorrhizal for Sustainable Land Use

โดย ศาสตราจารย์ ดร.สายสมร ลำยอง และคณะ

ตุลาคม 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนามายคอร์ริซาเพื่อเกษตรอินทรีย์

Development of Mycorrhizal for Sustainable Land Use

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| 1. ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ลำยอง | มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 2. อาจารย์ พิภพ ลำยอง | มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 3. รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี |
| 4. ศาสตราจารย์ ดร. เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม | มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

พืชที่ใช้ผลิต biofuel – สบู่ดำ

จากการสำรวจความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (AMF) ที่เกี่ยวข้องกับสบู่ดำ โดยวิธีตรวจสอบสปอร์ในดินบริเวณราก 10 แหล่ง ใน 6 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ เชียงราย, เชียงใหม่, ลำพูน, เลย, ขอนแก่น และหนองคาย ระหว่างเดือนตุลาคม 2006-ธันวาคม 2007 พบ AMF 34 ชนิด คือ *Acaulospora* (17 ชนิด), *Gigaspora* (2 ชนิด), *Glomus* (10 ชนิด) และ *Scutellospora* (5 ชนิด) ซึ่งค่าดัชนีความหลากหลาย (DI) อยู่ในช่วง 0.18-0.95 (ค่าเฉลี่ย 0.49) และ ความอุดมสมบูรณ์ของชนิด AMF มีจำนวนตั้งแต่ 3-11 ชนิด (จำนวนเฉลี่ย 6.1 ชนิด) การเข้าอาศัยของ AMF ในรากสบู่ดำ พบตั้งแต่ 38-94% ของพื้นที่ราก

การวิเคราะห์ยีน Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) ในหน่วยช่องใหญ่ของ rRNA ในรากและดินบริเวณราก จากตัวอย่างที่เก็บแบบสุ่ม จำนวน 40 ตัวอย่าง จาก 6 แหล่งของจังหวัดเชียงใหม่ในเดือนเมษายน 2008 ทำการสกัด DNA และวิเคราะห์ พบว่า สังคมของ AMF ทั้งในรากและบริเวณรอบรากสบู่ดำ มีความหลากหลายและแตกต่างกัน บางชนิดที่พบในดินกลับไม่พบในราก ซึ่งตรงกันกับผลจากการวิเคราะห์ T-RF ซึ่งใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ *TaqI*, *HinfI* และ *Hsp96* การใช้ *TaqI* ให้ความแตกต่างมากที่สุด ในรูปแบบของสังคม AMF ที่ศึกษา

เมื่อใช้สบู่ดำเป็นเหยื่อล่อ AMF ที่เหมาะสมจากดินตัวอย่างและจากแปลงปลูก จำนวน 10 ตัวอย่างทำการศึกษาในโรงเรือน ช่วงเดือนมิถุนายน-กันยายน 2007 โดยใช้ดินบริเวณราก (500 กรัม) ผสมในดินทรายฆ่าเชื้อ 1.5 กิโลกรัมที่บรรจุในถุงพลาสติกสีดำสำหรับปลูก แล้วตรวจหาสปอร์หลังปลูก 90 วัน ได้สปอร์ชนิดเด่นที่สุด 2 ชนิด (จากดินตัวอย่างของจังหวัดเชียงใหม่บริเวณที่ 1 และ 3) คือ CMU05 และ CMU33

การศึกษาชนิดของพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อ AMF ชนิด CMU05 และ CMU33 โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial ใน complete randomized block design ประกอบด้วยพืช 4 ชนิด คือ ข้าวโพด ลูกเดือย ข้าว และข้าวฟ่าง, AMF treatment 3 แบบ และ ทำ 3 ซ้ำ โดยปลูกหัวเชื้อ AMF 50 สปอร์ เป็นเวลา 120 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมหัวเชื้อ พบว่าเชื้อ AMF จะเพิ่มจำนวนสปอร์และเข้าสู่รากข้าวฟ่างได้สูงที่สุด AMF ชนิด CMU05 และ CMU33 เร่งการเจริญของพืชได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ไม่พบการเพิ่มจำนวนของ CMU33 ในข้าวโพด ส่วน CMU05 ไม่เพิ่มจำนวนในข้าว ดังนั้นข้าวฟ่างจึงเป็นพืชอาศัยที่เหมาะสมในการผลิตและเก็บรักษาสปอร์ของ AMF ทั้งสองชนิด

จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานพบว่า CMU05 คล้ายกับ *Entrophospora colombiana* ส่วน CMU33 คล้ายกับ *Scutellospora heterogama* ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางอนุชีวภาพ โดยใช้สปอร์ 50

สปอร์จากราก และดินบริเวณรอบรากของข้าวฟ่าง และใช้ primers SSU (NS31-AM1) และ LSU rDNA (FLR-3-FLR-4) พบว่า SSU rDNA ของ CMU05 คล้ายกับ *Entrophospora colombiana* 99%; CMU33 คล้ายกับ *Scutellospora heterogama* 97% ความคล้ายกันของ LSU rDNA ของ CMU05 กับ *E. colombiana* 91% และ CMU33 กับ *S. heterogama* 97% เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ MEGA 4.1 BETA พบว่า CMU05 ไม่ได้อยู่ใน clade เดียวกับ *E. colombiana* และ CMU33 มีความใกล้เคียงกับ *S. heterogama* ซึ่งอยู่ใน clade เดียวกัน

การทดลองหาชนิดของ AMF ที่เหมาะสมกับสบู่ดำ โดยใช้กล้าสบู่ดำซึ่งปลูกในดินฆ่าเชื้อ ช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม 2008 ทดสอบกับหัวเชื้อ AMF ท้องถิ่น 8 ชนิด จำนวน 100 สปอร์ ต่อ 1 กล้าสบู่ดำ และวัดค่าการเจริญเติบโต (ความสูงลำต้น, เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น, น้ำหนักสดของลำต้น) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการเร่งการเจริญของสบู่ดำสูงที่สุดคือ *Scutellospora* sp. CMU33

ผลของความหนาแน่นของสปอร์ต่อการเจริญของสบู่ดำ ในดินที่มีการเติมฟอสฟอรัส ทำการทดลองในเดือนเมษายน-มิถุนายน 2009 วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized factorial design ประกอบด้วย สปอร์ที่มีความหนาแน่น 4 แบบ คือ 0, 50, 100, 200 สปอร์ต่อพีช ให้ฟอสฟอรัส 4 ระดับ (0, 50, 100, 200 mg P/kg ของดิน) ทำ 4 ซ้ำ พบว่า *Scutellospora* sp. CMU33 100 สปอร์กับดินที่เติมปุ๋ยฟอสฟอรัส 100 mg P/kg ของดิน ทำให้กล้าสบู่ดำมีการเจริญสูงที่สุดในสภาวะทดลอง

พืชเครื่องดื่ม-กาแฟ

การศึกษา AMF ที่มีความสัมพันธ์กับกาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica* L.) จำนวน 5 แหล่งในจังหวัดเชียงใหม่และ 4 แหล่งในจังหวัดเชียงราย เมื่อแยกสปอร์ออกจากดินตัวอย่างโดยการกรองด้วยน้ำและสารละลายน้ำตาล 50% และจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน พบ AMF จำนวน 29 ชนิด จัดอยู่ใน 3 สกุล (*Acaulospora* spp., *Ambispora* spp. และ *Glomus* spp.) ของไฟลัม Glomeromycota โดยพบว่า *G. aggregatum* เป็นชนิดที่พบจำนวนสปอร์มากที่สุด

จากการศึกษาผลของ AMF ต่อการเจริญเติบโตของกล้ากาแฟอาราบิก้าซึ่งปลูกในดินที่มีฟอสฟอรัสต่ำ พบว่า การใช้สปอร์ AMF แบบผสม ทำให้ความสูงของต้นและความยาวของรากเพิ่มขึ้น อีกทั้งเชื้อบริสุทธิ์ของ *Acaulospora morrowiae*, *Ac. mellea*, *G. etunicatum* และ *Ac. scrobiculata* ที่เพิ่มปริมาณได้ ช่วยให้กล้ากาแฟที่ปลูกในดินขาดธาตุอาหาร เจริญเติบโตได้ดีกว่าเชื้อผสม, เชื้อทางการค้า (Myco star®) และชุดควบคุม ปริมาณสปอร์ที่พืชได้รับเริ่มต้น (50 และ 200 สปอร์) ให้ผลไม่แตกต่างกัน

การเพิ่มปริมาณสปอร์ในกระถางโดยใช้ดินเป็นหัวเชื้อ ข้าวโพด (*Zea mays* L.) และข้าวฟ่าง (*Sorghum vulgare* Pers.) เป็นพืชอาศัย พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสปอร์ *Ac. mellea* ในข้าวโพดได้ดี

ที่สุด ในขณะที่สามารถเพิ่มปริมาณสปอร์ *Ac. morrowiae* ได้ดีที่สุดในช่วง 10 และเพิ่ม *Ac. scrobiculata* ในพืชทั้งสองได้ปานกลาง

พืชอาหาร รั้วพืช และถั่วกินเมล็ด

การตรวจเปอร์เซ็นต์การเข้ารากพืชของ AMF 5 สกุล คือ *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Glomus*, *Paraglomus* และ *Achaeospora* ใน ถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata*), ข้าวโพด (*Zea mays*), ลูกเดือย (*Coix lacryma-jobi*), ข้าวไร้ (*Oryza sativa*), ข้าวฟ่าง (*Sorghum vulgare*) และ ปะดะ (*Macaranga denticulata*) เพื่อหาเชื้อที่เหมาะสม พบว่า การติดเชื้อในรากสูง (60%-100%) ยกเว้นในข้าวไร้ ดินที่ใส่ฟอสฟอรัส 30 กก./เฮกเตอร์ มีปริมาณสปอร์น้อยกว่าในดินที่ใส่ 3 กก./เฮกเตอร์ จากการวิจัยนี้เชื้อราในสกุล *Acaulospora* เป็นชนิดเด่น แต่ทุกสกุลสามารถเพิ่มน้ำหนักยอดและรากของพืชทุกชนิดโดยเฉพาะเมื่อปลูกในดินที่มีฟอสฟอรัสต่ำ

พืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า

ทำการสำรวจความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และความสัมพันธ์ของ AMF กับพืชท้องถิ่นในป่าเขตร้อนของอุทยานแห่งชาติคอกยสุเทพ-ปุย ทางภาคเหนือของประเทศไทย แยกสปอร์จากดินและจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะฐานวิทยา ตรวจสอบการติดเชื้อของเชื้อ AMF ในไม้ยืนต้น 24 ชนิด (19 สกุล) พบสปอร์ของเชื้อ AMF ในดินรอบรากต้นไม้ทุกชนิด ซึ่งจัดจำแนกได้ทั้งหมด 21 ชนิด อยู่ในสกุล *Acaulospora* (6 ชนิด), *Glomus* (12 ชนิด) และ *Scutellospora* (3 ชนิด) โดยมีเชื้อราในสกุล *Glomus* และ *Acaulospora* เป็นชนิดเด่น ส่วนชนิดที่พบมากคือ *A. elegans*, *G. multicaule* และ *S. pellucid* จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า พืชพื้นเมืองทั้ง 24 ชนิด มีความสัมพันธ์กับเชื้อ AMF และเชื้อ AMF บางชนิดสามารถอาศัยร่วมกับพืชได้หลายชนิด

ผลการทดสอบเชื้อ AMF (*Ac. elegans*, *G. etunicatum*, *G. mosseae*) ร่วมกับการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส (KH_2PO_4) ที่มีต่อต้นกล้าก่อเดือย (*Castanopsis acuminatissima*) ในดินที่มีฟอสฟอรัสต่ำ และทดสอบภายในโรงเรือน พบว่า อัตราการให้ฟอสฟอรัสที่เพิ่มขึ้นสามารถเพิ่มการเจริญของต้นกล้าได้ การใช้ *G. etunicatum* ร่วมกับการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส ทำให้ความสูงของพืช น้ำหนักแห้งของยอดและรากเพิ่มขึ้นมากที่สุด ในขณะที่พืชที่ไม่ได้รับเชื้อและฟอสฟอรัส มีความสูงของต้นต่ำกว่ามาก

การปลูกเชื้อให้พืช 5 ชนิด (ข้าวฟ่าง, ข้าว, ถั่วเหลือง, ข้าวโพด และ ดาวเรือง) ด้วยสปอร์ 6 ชนิด เติบโตจากพืชที่ใช้ปลูกป่า (*A. elegans*, *A. mellea*, *A. scrobiculata*, *G. etunicatum*, *G. mosseae*, *S. heterogama*) เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าข้าวฟ่างและข้าวโพดสามารถเพิ่มปริมาณสปอร์ *A. elegans*, *G. etunicatum* และ *G. mosseae* ได้มากที่สุด

การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ AMF และการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการเก็บกักสปอร์ของ AMF

จากการปลูก AMF ในพืชอาศัยตระกูลหญ้า 3 ชนิด ได้แก่ ต้นเดือย หญ้ารูชี และข้าวฟ่าง เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า พืชอาศัยทั้งหมด สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ของ AMF ทุกชนิดได้น้อย โดยข้าวฟ่างสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Glomus* sp., *Scutellospora* sp. และ Mycostar® ได้มากกว่าต้นเดือยและหญ้ารูชีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่เปอร์เซ็นต์การเข้ารากของเชื้อต่ำ

การเพิ่มจำนวนสปอร์ในวัสดุเก็บกัก ทดสอบโดยใช้เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 2 ชนิด ได้แก่ *Glomus etunicatum* และ *Scutellospora* sp. ใช้สปอร์ชนิดละ 50 สปอร์เป็นหัวเชื้อ สำหรับปลูกพืชอาศัย 2 ชนิด ได้แก่ เบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium*) และหญ้ากีนีสีม่วง (*Panicum maximum* TD58) ศึกษาทั้งวัสดุปลูก 3 ชนิด ได้แก่ พีทม้าเชื้อ (2000 ml.), ดินผสมทรายในอัตราส่วน 1:1 หม้าเชื้อ และดินผสมทรายและเพอร์ไลต์อัตราส่วน 1:0.5:0.5 หม้าเชื้อ ทดลอง 3 เดือนจำนวน 12 ชุดการทดลอง การทดลองละ 4 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design พบว่าหญ้ากีนีสีม่วงที่ปลูกใน ดินผสมทรายและเพอร์ไลต์อัตราส่วน 2:1:1 สามารถเพิ่มจำนวน *G. etunicatum* (1604 สปอร์/ดิน 100 กรัม) ได้มากกว่า *Scutellospora* sp. (50 สปอร์/ดิน 100 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น การใช้ดินผสมทรายและเพอร์ไลต์เป็นวัสดุเพาะและเก็บกักเชื้อ *G. etunicatum* จึงมีศักยภาพสูงกว่าวัสดุอื่นที่ทำการทดลอง

Abstract

Biofuel crop - Physic nut

The biodiversity of AMF associated with physic nut at ten sites in six provinces of Thailand: Chiang Rai, Chiang Mai, Loei, Lumphun, Khon Kean and Nong Khai, was carried out between October 2006 – December 2007 by extracting spores from the rhizosphere soils of physic nut. The following 34 morpho-species of AMF were obtained: *Acaulospora* (17 species), *Gigaspora* (2 species), *Glomus* (10 species) and *Scutellospora* (5 species). The diversity index (DI) ranged from 0.18 to 0.95 (average 0.49) and the species richness of AMF ranged from 3 to 11 (average 6.1). Root colonization ranged from 38-94% suggesting that physic nut is readily colonized by AMF.

Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis, based on the large subunit of the rRNA gene, was used to assess the AMF community in roots and rhizosphere soil. Chiang Mai province was chosen as the target area. Forty randomized samples of rhizosphere soil and root samples from physic nut were collected from 6 sites in April, 2008. DNA was extracted and T-RFLP data subjected to principle component analysis. This study indicated that AMF communities in root and rhizosphere of physic nut are diverse and distinct. Not all AMF species in the rhizosphere were detected in host roots. Similar conclusions were made from T-RF analysis using three restriction enzymes (*TaqI*, *Hinfl*, and *Hsp96*). *TaqI* revealed the strongest difference in T-RF patterns of the AMF community in this study.

Physic nut was used as a bait plant to trap compatible AMF in 10 field soil samples in a greenhouse from June-September 2007. A whole clod of rhizosphere soil (ca. 500 g) from each sample was placed in the middle of 1.5 kg sterilized sandy soil in black plastic pots. The spores in the soil were recovered after 90 days and the two most abundant trapped AMF species from Chiang Mai site1 and Chiang Mai site3 were named CMU05 and CMU33.

The host preference of CMU05 and CMU33 was examined in a factorial experiment in a completely randomized block design consisting of 4 host species x 3 AMF treatments x 3 replications. Corn (*Zea mays* L.), jobs tears (*Coix lacryma-jobi* L.), rice (*Oryza sativa* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* (Linnacus) Moench) were inoculated with 50 spores of the AMF or were left uninoculated. Plants were grown in a screen-house for 120 days. Higher mycorrhizal colonization and spore production were

found in sorghum than with the other hosts. CMU05 and CMU33 promoted crop growth over the control. Spore production of CMU33 did not occur in corn and that of CMU05 was not observed in rice. It was concluded that sorghum is a suitable host plant to produce and maintain spores of the two AMF.

Identification of dominant species; CMU05 and CMU33 was based on morphology and molecular analysis. CMU05 was identified to either *Entrophospora* or *Acaulospora* and CMU33 to *Scutellospora* according to morphology. Molecular analysis was studied using 50 spores of each morphotype obtained from sorghum roots and the soil rhizosphere of sorghum, were extracted and DNA was amplified using AMF primers of SSU and LSU rDNA (NS31-AM1 and FLR3-FLR4, respectively). Sequences were obtained using all of forward and reverse primers and compared to the sequences in the internet databases. The percent similarity of SSU rDNA of CMU05 to *Entrophospora colombiana* was 99% and of CMU33 to *Scutellospora heterogama* was 97%. The percent similarity of LSU rDNA of CMU05 to *E. colombiana* was 91% and CMU33 to *S. heterogama* was 97%. Sequences were aligned and tree generated for phylogenetic analysis using MEGA 4.1 BETA. CMU05 was not obviously in the same clade with *E. colombiana* and CMU33 was close to *S. heterogama* in the same clade.

Compatible AMF species were selected on physic nut seedlings growth in sterile soil from January-March 2008. Eight indigenous AMF inocula were evaluated for their effect on seedling growth in pot culture using 100 spores/seedling. AMF species significantly increased biomass of seedling (height, stem diameter and shoot fresh weight) compared to non-inoculated plants. *Scutellospora* sp. CMU33 was the most effective in promoting growth.

The effect of spore density of compatible species with external phosphorus supply was assessed in a preliminary trial April-June 2009. The design was a completely randomized factorial design consisting of 4 spore densities (0, 50, 100, 200 spores per plant) x 4 phosphorus levels (0, 50, 100, 200 mg P/kg of soil) x 4 replicates. It was found that 100 spores of *Scutellospora* sp. CMU33 together with 100 mg P/kg of soil was optimum for improving the growth of physic nut seedling in a greenhouse trial.

Coffee

The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associated with arabica coffee (*Coffea arabica* L.) were discovered within rhizosphere soil samples of arabica coffee plantation from five and four study sites in Chiang Mai (CM) and Chiang Rai (CR) provinces, northern Thailand, respectively. Twenty-nine species belonging to three genera (*Acaulospora* spp., *Ambispora* spp. and *Glomus* spp.) in Glomeromycota were morphologically identified after wet sieving and sucrose centrifugation method. *G. aggregatum* was the most dominant AMF species.

The effect of AMF to coffee seedling growing in low phosphorus (P) soil revealed that mixed AMF spore species can improve shoot height and root length. Four AMF species; *G. etunicatum*, *Acaulospora mellea*, *Ac. morrowae* and *Ac. scrobiculata* propagated *in vitro* enhanced coffee seedlings growth in sterilized infertile soil. Each AMF species enhanced plant growth better than mixed inoculum, commercial and the control (non-inoculated). There were no significant differences between plant growth in using 50 and 200 spores.

The soil samples were inoculated by trap pot culture procedure with maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum vulgare* Pers.). *Acaulospora mellea* could be abundantly propagated with maize while *Acaulospora morrowiae* could be better propagated with sorghum and *Acaulospora scrobiculata* spores were moderately increased in both plants.

Food crops

The root colonization percentages of *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Paraglomus*, *Glomus*, and *Achaeospora* in cowpea (*Vigna unguiculata*), corn (*Zea mays*), job's tears (*Coix lachrymal-jobi*), upland rice (*Oryza sativa* cv. Bue Bang), sorghum (*Sorghum bicolor*) and pada (*Macaranga denticulata*) found that range from 60% to 100% except in upland rice. The spore density in added soil with phosphorus 30 kg/hectar less than added soil with 3 kg P/hectar. Although *Acaulospora* was dominant in this research but all AMF genus tested also can improve shoot and root weight of plants, especially in soil with low phosphorus.

The indigenous AMF for forest restoration plants

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungal diversity was surveyed in the forest restoration area of Doi Suthep-Pui Nation Park, northern Thailand. Twenty four indigenous tree species, used for forest restoration in a degraded watershed area were examined. Rhizosphere soil sample were collected and AMF spore were counted and identified morphologically. AM spores were found in the rhizosphere soils of all tree species. Twenty one AM species were identified: *Acaulospora* (6 species), *Glomus* (12 species) and *Scutellospora* (3 species). AM fungi belonging to the genera *Glomus* and *Acaulospora* were dominant. Abundant species present were *Acaulospora elegans*, *G. multicaule* and *S. pellucid*. These result showed that all 24 indigenous tree species were associated with AM fungi and some AM species had a broad host range.

The effect of AM inoculation (*Acaulospora elegans*, *Glomus etunicatum*, *Glomus mosseae*) together with phosphate fertilization (KH_2PO_4) on *Castanopsis acuminatissima* seedling in a P-deficient soil were studied under greenhouse condition. Increasing P-application rates greatly enhanced seedling growth. Growth was most rapid with *G. etunicatum*-colonized plants with P application; whereas much lower height was found with non-AM plants without P added.

The six AM fungi dominant species for forest restoration plants (*A. elegans*, *A. mellea*, *A. scrobiculata*, *G. etunicatum*, *G. mosseae*, *S. heterogama*) were used as inoculums for spore propagate on 5 plants species; sorghum (*Sorghum vulgare*), rice (*Oryza sativa*), soy bean (*Glycine max*), corn (*Zea mays*) and marigold (*Tegetes erecta*). After 4 month found that *S. vulgare* and *Z. Mays* were the best host plant for spore propagation of *A. elegans*, *G. etunicatum* and *G. mosseae*.

Selection of host plants to increase AMF spores and suitable materials for storage spores of AMF

The effects of AMF on 3 grass plants were evaluated after 3 months. The results showed that the propagation of AMF spores in 3 grass plant was low. Propagation of *Glomus* sp., *Scutellospora* sp. and Mycostar[®] spores in sorghum were significantly higher than Job's tear and Ruzi ($P < 0.05$) but root colonization and and spore production were low.

The propagation of *Glomus etunicatum* and *Scutellospora* sp. was carried out. Fifty spores of *Glomus etunicatum* and *Scutellospora* sp. were applied and used as inoculum using 2 host plants; *Chrysanthemum morifolium* and *Panicum maximum* TD58 in 3 suitable

carriers; sterilized peat (2000 ml.), sterilized soil mixed with sand (1:1), sterilized soil mixed with sand and perlite (2:1:1). All the experiments were carried out for 3 months based on Randomized Complete Block Design. There were 12 experiments with 4 replications.

Panicum maximum TD58 grew in soil mixed with sand and perlite significantly increased the number of *G. etunicatum* (1604 spores/100 g.soil) with was higher than *Scutellospora* sp. (55 spores/100 g.soil). It was found that the use of soil mixed with sand and perlite as carrier for *G. etunicatum* provided high potential for AMF inoculum production.

Executive Summary

การดำเนินงานตามโครงการ “การพัฒนามายคอร์ไรซาเพื่อเกษตรกรอินทรีย์” มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซา (AMF) ในพืชเป้าหมาย ซึ่งประกอบด้วย พืชที่ใช้สำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (สบู่ดำ), พืชเครื่องดื่มน้ำ (กาแฟ), พืชอาหาร (ข้าวไร่, ข้าวฟ่าง, ข้าวโพด, ลูกเดือย, ถั่วพุ่ม และปะดะ) และพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอนุชีววิทยาในการบ่งบอกชนิดของเชื้อรา จากนั้นจึงคัดเลือกเชื้อราที่เหมาะสมต่อพืชเพื่อนำไปคัดเลือกพืชอาศัยที่สามารถเพิ่มปริมาณของสปอร์นั้น

การดำเนินงานพบว่าพืชเป้าหมายทุกชนิดมีการอาศัยร่วมกันกับเชื้อราอาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซา จากการสำรวจในดินรอบรากของต้นสบู่ดำใน 6 จังหวัดของไทย พบเชื้อราในสกุล *Acaulospora* (17 ชนิด), *Gigaspora* (2 ชนิด), *Glomus* (10 ชนิด) และ *Scutellospora* (5 ชนิด) ในดินรอบรากกาแฟใน 2 จังหวัด พบเชื้อราในสกุล *Acaulospora* (11 ชนิด), *Ambispora* (2 ชนิด) และ *Glomus* (16 ชนิด) ในดินรอบรากไม้ยืนต้น 24 ชนิด (19 สกุล) ในอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ พบสปอร์ของเชื้อราในสกุล *Acaulospora* (6 ชนิด), *Glomus* (12 ชนิด) และ *Scutellospora* (3 ชนิด) การตรวจสอบรากของ ถั่ว, ข้าวโพด, ลูกเดือย, ข้าวไร่, ข้าวฟ่าง และ ปะดะ พบเชื้อราในสกุล *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Glomus*, *Paraglomus* และ *Achaeospora*

จากนั้นนำเชื้อรามายคอร์ไรซาที่พบมาทดสอบความเหมาะสม เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชเป้าหมายแต่ละชนิดจึงพบว่า เชื้อรามายคอร์ไรซาชนิดที่เหมาะสมในการเจริญของสบู่ดำ คือ *Scutellospora* sp. CMU33 ซึ่งทำการบ่งชนิดโดยใช้ primers SSS (NS31-AM1) และ LSU rDNA (FLR-3-FLR-4) จากเทคนิคนี้กล่าวได้ว่า CMU33 มีลักษณะทางอนุชีววิทยาใกล้เคียงกับ *Scutellospora heterogama* ส่วนเชื้อที่สามารถเพิ่มการเจริญของกาแฟได้ดี คือ *Acaulospora morrowiae*, *A. mellea*, *Glomus etunicatum* และ *A. scrobiculata* การตรวจสอบเชื้อราในสกุล *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Glomus*, *Paraglomus* และ *Achaeospora* พบว่าสามารถเพิ่มการเจริญของข้าวไร่, ข้าวฟ่าง, ข้าวโพด, ลูกเดือย, ถั่วพุ่ม และปะดะได้ โดยเฉพาะในดินที่มีธาตุฟอสฟอรัสต่ำ และเชื้อที่เพิ่มการเจริญได้ดีที่สุดคือเชื้อ *Acaulospora* sp. และพบว่าในดินปลูกพืชอาหารที่มีการเติมปุ๋ยฟอสฟอรัสจำนวนน้อย จะพบปริมาณสปอร์มากกว่า ในการฟื้นฟูป่าบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย มีพืชชนิดที่ใช้เป็นจำนวนมากได้แก่ ก่อเดือย โดยพบว่า *G. mosseae* และการใช้สปอร์แบบผสมพบความหนาแน่นสปอร์มากที่สุด ในขณะที่การใช้ *G. etunicatum* ร่วมกับการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตรา 150, 200 และ 250 ppm ทำให้ความสูงของพืช น้ำหนักแห้งของ ยอดและรากเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุด

การเพิ่มจำนวนสปอร์โดยการปลูกเชื้อให้พืชอาศัยทั้ง 3 ชนิด คือ ต้นเดือย ข้าวฟ่าง และหญ้ารูซี่ พบว่า ข้าวฟ่างมีเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากมากที่สุด รองลงมาคือต้นเดือยและหญ้ารูซี่ และดินที่ปลูกข้าวฟ่าง

ก็มีจำนวนสปอร์มากที่สุดรองลงมาก็คือต้นเคียวและหญ้าฐี่เช่นกัน ดังนั้นในพืชตระกูลหญ้าทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาทดสอบ ข้าวฟ่าง เป็นพืชอาศัยเพื่อเพิ่มปริมาณสปอร์ของ AMF ที่ดีที่สุด

พืชอาศัยที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณสปอร์ คือ ข้าวฟ่าง และข้าวโพด เมื่อทดสอบเปรียบเทียบกับ ข้าวไร้ ต้นเคียว และดาวเรือง การใช้ดินผสมทรายและเพอร์ไลต์ในอัตราส่วน 2:1:1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุที่มีศักยภาพสูงกว่าในการเก็บกักสปอร์ของ *G. etunicatum* เมื่อเปรียบเทียบกับ พืชฆ่าเชื้อ และดินผสมทรายในอัตราส่วน 1:1 ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Executive summary	x
สารบัญ	xii
บทนำ	1
พืชเป้าหมายและความหลากหลายของเชื้อรามายคอร์ไรซาที่มีผลต่อพืช	3
ปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายและการเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา	6
อนุกรมวิธานของราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา	9
การผลิตหัวเชื้อมายคอร์ไรซาเชิงอุตสาหกรรม	11
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	12
ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	
พืชที่ใช้ผลิต biofuel – สับปะรด	13
พืชเครื่องเคียง – กาแฟ	19
พืชอาหาร ธัญพืช และถั่วกินเมล็ด	22
พืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า	23
การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสปอร์ AMF และการคัดเลือกวัสดุที่ เหมาะสมในการเก็บกักสปอร์ AMF	25
ผลการวิจัย	
พืชที่ใช้ผลิต biofuel – สับปะรด	27
พืชเครื่องเคียง – กาแฟ	40
พืชอาหาร ธัญพืช และถั่วกินเมล็ด	50
พืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า	53
การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสปอร์ AMF และการคัดเลือกวัสดุที่ เหมาะสมในการเก็บกักสปอร์ AMF	62
สรุปผลการวิจัย	65
เอกสารอ้างอิง	68

	หน้า
ผลสัมฤทธิ์	77
ภาคผนวก	80

บทนำ

ความสำเร็จของโครงการหลวง ในการเปลี่ยนวิธีการใช้ที่ดินในที่สูงจากการปลูกฝิ่นมาเป็นการผลิตพืชผัก ผลไม้และดอกไม้เมืองหนาว ทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มมากขึ้นและมีการค้าขายเสียดินน้อยลง แต่การเปิดตลาดการค้าเสรีในโลกปัจจุบัน โดยเฉพาะการแข่งขันกับประเทศจีน ทำให้เกษตรกรทั่วโลกต้องมีการปรับตัวในหลายๆด้าน โดยเฉพาะประเทศที่มีรายได้หลักมาจากการเกษตร อย่างเช่นประเทศไทย เนื่องจากการเกษตรแบบดั้งเดิมของไทยไม่มีความได้เปรียบในตลาดโลก ในแง่การผลิตสินค้าทางการเกษตร ทำให้ขณะนี้สินค้าทางการเกษตร ทะลักเข้ามาจากจีนเป็นจำนวนมาก ที่เห็นเด่นชัด เช่น หอม กระเทียม และผลไม้เมืองหนาว ซึ่งไม่ใช่ประเทศไทยเพียงประเทศเดียวที่ได้รับผลกระทบดังกล่าว แม้แต่การผลิตแครอทในประเทศออสเตรเลีย ทั้งเพื่อการส่งออกและบริโภคภายในประเทศ ก็ไม่สามารถแข่งขันกับประเทศจีนได้ เพราะประเทศจีนมีความได้เปรียบทั้งพื้นที่เพาะปลูกซึ่งมากกว่า ค่าจ้างแรงงานต่ำกว่า และมีความก้าวหน้าทางวิชาการด้านการเกษตรมากขึ้น ดังนั้น ในภาวะการแข่งขันเพื่อจะเป็นประเทศผู้นำในตลาดสินค้าเกษตร ประเทศไทยจะต้องมีการพัฒนาสินค้าและนำพืชใหม่มาให้ผลผลิตดีและมีคุณภาพสูง มาสู่ตลาด เช่น พืชที่นำไปผลิตเป็นพลังงานชีวภาพ เช่น สับปะรด พืชเพื่อการบริโภค เช่น ข้าวไร้ ถั่ว งา กาแฟ เป็นต้น รวมทั้งมีการจัดการพื้นที่เพาะปลูกเดิมให้มีประสิทธิภาพและปลอดภัยเพื่อจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืน อีกทั้งผลิตผลจากระบบเกษตรอินทรีย์ยังมีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ผลิตผลทางการเกษตรที่ไม่มีการตกค้างจากสารเคมีและยาปราบศัตรูพืช ซึ่งเป็นแนวทางของระบบเกษตรอินทรีย์ คือสิ่งที่ผู้บริโภคต้องการมากในปัจจุบัน

การใช้ปุ๋ยเคมีสังเคราะห์และการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืชเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช จะทำให้เกิดปัญหาทั้งทางการแพทย์ ทางการเกษตรและสภาพแวดล้อมได้เนื่องจากสารเคมีจะทำลายโครงสร้างของดิน ทำให้เกิดสารตกค้างทั้งในดิน แหล่งน้ำและผลิตผล ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค เกษตรกร ผู้ใช้ก็จะได้รับผลกระทบโดยตรงในเรื่องสุขภาพ และจะต้องเสียค่าใช้จ่ายสำหรับสารเคมีเหล่านี้ในราคาสูง ไม่คุ้มค่าทั้งชีวิตและค่าใช้จ่ายที่เสียไป การจัดการเรื่องความอุดมสมบูรณ์ของดินและการเติบโตที่ดีของพืชอย่างมีประสิทธิภาพ เป็นสิ่งหนึ่งที่จะต้องเร่งทำในขณะที่ประเทศไทยกำลังได้รับผลกระทบอย่างมาก จากราคาน้ำมันที่สูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อทั้งในภาคธุรกิจการเกษตรและอุตสาหกรรมที่ใช้ผลิตผลทางการเกษตร

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

ผลกระทบจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์ดังกล่าวได้อย่างยั่งยืน งานดังกล่าวได้มีการศึกษาวิจัยมาก่อน โดยเฉพาะการผลิตหัวเชื้อของไรโซเบียมของกรมวิชาการเกษตร แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ส่วนการเติมหัวเชื้อจากเชื้อรามายคอร์ไรซา และกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างสารเร่งการเจริญของพืชนั้น ยังไม่มีการผลิตเพื่อนำไปใช้อย่างแพร่หลายในกลุ่มเกษตรกรไม่ว่าจะเป็นทางด้านพืชไร่หรือพืชสวน เนื่องจากมีปัจจัยพื้นฐานที่ยังไม่มีการทำความเข้าใจอยู่หลายประการ โดยเฉพาะกลไกของความสัมพันธ์ของพืชและจุลินทรีย์ ซึ่งมีอยู่แล้วในธรรมชาติแต่ถูกทำลายด้วยวิธีการทางการเกษตรที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้การตอบสนองของพืชต่อเชื้อรามายคอร์ไรซาก็มีความแตกต่างกันทั้งชนิดของพืชเองและชนิดของเชื้อรามายคอร์ไรซา จากข้อมูลทางการเกษตรในปัจจุบันพบว่าในต่างประเทศโดยเฉพาะออสเตรเลียซึ่งพื้นดินส่วนใหญ่เป็นดินที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ แต่เกษตรกรสามารถผลิตสินค้าทางการเกษตรที่มีคุณภาพและปลอดสารพิษโดยใช้ระบบเกษตรอินทรีย์ที่มีเชื้อรามายคอร์ไรซาเป็นหลัก เช่น พืชผัก และต้นยูคาลิปตัสที่นำมาใช้ผลิตเยื่อกระดาษ เช่นเดียวกันกับทางตะวันออกของประเทศเยอรมันซึ่งมีพื้นที่การเกษตรกว้างขวางก็มีการใช้เชื้อรามายคอร์ไรซาในกลุ่มเอนโดไมคอร์ไรซากับพืชไร่ในกลุ่มที่เป็นธัญพืช และมีการผลิตเชื้อรามายคอร์ไรซาขายในรูปแบบที่เกษตรกรใช้ได้ง่าย

ประเทศไทยก็มีการนำเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซาเข้ามาจำหน่ายหลายบริษัท แต่ยังมีราคาแพงมาก เช่น Mycostar[®] กิโลกรัมละ 1,200 บาท (ราคาท้องตลาด) เป็นเอนโดไมคอร์ไรซาที่ใช้ได้ดีกับกล้าส้ม กล้าสนและพืชผัก ซึ่งเกษตรกรมีความต้องการใช้มาก จากการสำรวจ (ติดต่อส่วนตัวที่แปลงสาธิตของบริษัท) พบการตอบสนองในทางบวกกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น กล้าปาล์ม น้ำมัน สน สตรอเบอร์รี่ พืชผักเมืองหนาว ดอกกุหลาบของโครงการหลวง เป็นต้น ปัญหาของเกษตรกรก็คือ ราคาที่แพงและยังไม่สามารถตรวจสอบประสิทธิภาพที่แน่นอนของผลิตภัณฑ์เชื้อรามายคอร์ไรซาที่มีขายตามท้องตลาดได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำวิจัยเกี่ยวกับเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซาของต้นตองเตบ ซึ่งเกษตรกรชาวกะเหรี่ยงในหมู่บ้านกระเหรี่ยงทิมจะใช้เป็นพืชที่เพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้กับดิน เพื่อใช้ดินในการปลูกข้าวและพืชพื้นเมืองสำหรับเป็นอาหารและยา จึงมีความสนใจในองค์ความรู้ที่จะใช้พัฒนาการนำเชื้อรามายคอร์ไรซาและจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGR มาใช้ช่วยในการเจริญของพืช โดยเฉพาะในพืชที่ต้องมีการย้ายปลูกเพื่อการเพาะปลูกเพื่อการค้า

องค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของเชื้อรามายคอร์ไรซากับพืชที่เป็นพืชอาศัยในการทดลองจะสามารถประเมินได้ โดยเฉพาะชนิดของเชื้อรามายคอร์ไรซาที่ตอบสนองต่อพืชเป้าหมายได้ดีในดินเลขของประเทศไทยโดยเฉพาะดินในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล (800 เมตร) ซึ่งมีชุมชนชาวเขาอาศัยอยู่จำนวนมาก และพื้นที่ซึ่งเกษตรกรมีการปรับเปลี่ยนพืชที่ปลูกใหม่ เช่น ยางพารา สน กาแฟ และพืชผักเกษตรอินทรีย์ ในภาคเหนือ อีสานและ ยูคาลิปตัสในภาคตะวันตก จึงเป็นสิ่งที่ควรจะมีการวิจัยเพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการคัดเลือกและตรวจสอบเชื้อรามายคอร์ไรซาและ PGR ที่เหมาะสมสำหรับพืชเป้าหมายที่ใช้ทดลอง เพื่อที่จะสามารถพัฒนาให้สามารถนำไปใช้ได้ทางปฏิบัติ นอกจากนี้การผลิตหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อพืชอาศัยที่เกษตรกรสามารถนำไปใช้กับพืชเป้าหมายที่มีแนวโน้มที่ดีในทางเศรษฐกิจ มีราคา

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

พืชเป้าหมาย

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

2. พืชเครื่องดื่มเป้าหมายในการศึกษานี้คือ กาแฟพันธุ์อาราบิก้า (*Coffea sativa* L.) ซึ่งเป็นพืชส่งเสริมสำคัญสำหรับการทำเกษตรที่สูง แต่เดิมพบว่าพื้นที่ป่าธรรมชาติบนที่สูงของภาคเหนือถูกบุกรุกทำลาย เพื่อนำพื้นที่มาใช้ในการปลูกพืชไร่ เช่น ข้าวโพด และข้าว ซึ่งไม่คุ้มทุนอย่างมาก และมีผลกระทบต่อประชากรบริเวณพื้นที่ราบ เนื่องจากทำให้เกิดการชะหน้าดิน การพังทลายของดิน และน้ำท่วมฉับพลัน ต่อมาจึงพบว่ากาแฟเป็นพืชที่เหมาะสมกับสภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ อีกทั้งยังสามารถแก้ปัญหาที่เกิดจากการปลูกพืชไร่ได้มาก และเกษตรกรชาวเขาก็มองคิดที่จะปลูกกาแฟมากกว่าพืชผลเมืองหนาวชนิดอื่นที่ให้ผลผลิตต่ำกว่า เนื่องจากกาแฟเป็นพืชที่ให้ผลตอบแทนสูง ตัวอย่างเช่น ที่ดอยยาววิ จังหวัดเชียงรายยังมีการปลูกและผลิตกาแฟเพิ่มมากขึ้นทุกปี กาแฟทำรายได้ให้เกษตรกรสูงกว่าการปลูกพืชอื่นๆ มาก จึงมีเกษตรกรที่สูงรวมกลุ่มปลูกและแปรรูปเมล็ดกาแฟจำหน่ายเอง ในปัจจุบันราคาเมล็ดกาแฟอาราบิก้าคั่วขึ้นอยู่กับคุณภาพ เริ่มต้นประมาณกิโลกรัมละ 300 บาท

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

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

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

4. พืชพื้นเมืองที่ใช้ในการปลูกและฟื้นฟูป่า พืชเหล่านี้ได้รับการศึกษาและคัดเลือกมาขยายพันธุ์จนเจริญเป็นกล้าไม้ในโรงเพาะชำของหน่วยวิจัยการเพาะกล้าไม้เพื่อฟื้นฟูป่า อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย สำหรับศึกษาเพื่อการปลูกป่าทดแทนในเขตภาคเหนือ

ความหลากหลายของเชื้อรามายคอร์ไรซาที่มีผลต่อพืช

ลักษณะการอยู่ร่วมของสิ่งมีชีวิตแบบเอื้อประโยชน์ต่อกัน (symbiosis) ระหว่างเชื้อราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาและพืชนั้นมีการค้นพบมาเป็นเวลานานมาก ซึ่งการทำความเข้าใจในความสัมพันธ์ดังกล่าวจะเป็นศูนย์กลางของความเข้าใจสังคมของพืชปัจจุบัน จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่มีการศึกษาและรายงานไว้มีจำนวนชนิดไม่มาก ซึ่งในปัจจุบันนี้เชื่อว่า AMF จะมีความหลากหลายของลักษณะสูงกว่าที่ได้มีการอธิบายไว้ ซึ่งในระบบนิเวศธรรมชาติเชื้อราในกลุ่มนี้จะเป็นทั้ง cryptic และมีบทบาทหลากหลาย ซึ่งทำให้การจัดจำแนกความสัมพันธ์ในทางนิเวศวิทยาที่แท้จริงยังคงทำได้ยากมากและถือเป็นความท้าทายสำหรับนักวิจัย

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

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

ของพืชเหล่านี้มีคุณภาพดีและปริมาณมาก โดยไม่มีการใช้ปุ๋ยเคมี เนื่องจากมีราคาแพงและต้องมีการขนส่งในระยะทางไกล ตัวอย่างที่ได้ทำการศึกษาแล้ว คือชุมชนปากะเยอที่บ้านทิวะ ซึ่งการปลูกข้าวตามระบบหมุนเวียนแปลงปลูกทุก 6-7 ปี โดยแปลงเก่าจะส่งเสริมให้มีการเจริญของต้นตองແບ (Macaranga denticulate) จนกว่าจะกลับมาใช้ที่ดินปลูกข้าวและพืชอาหารอื่นอีกในปีที่ 6-7 จากภูมิปัญญาที่สืบทอดกันมานี้พบว่า ดินที่มีการเจริญของต้นตองແບแล้ว จะให้ผลผลิตของข้าวเพิ่มขึ้น ทั้งนี้การศึกษายังพบว่า พืชตองແບ มีการเจริญร่วมกับเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซา (AMF) ซึ่งช่วยในการสะสมธาตุอาหาร จากการสำรวจพบว่าบริเวณรากของ ต้นตองແບในไร่ จะมี AMF หลายชนิดถึง 29 ชนิด และเมื่อตรวจสอบของต้นตองແບพบการเข้าไปอยู่ร่วมของ AMF (root colonization) ร้อยละ 63-82 ปริมาณสปอร์ของเชื้อราจะมีความหนาแน่นมากในช่วงฤดูฝน เมื่อทดสอบในกระถางพบว่าตองແບที่ปลูกด้วยดินที่ปลูกเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซา เป็นระยะเวลา 4 เดือนพบว่าทำให้พืชมีการเจริญและส่วนประกอบของสารอาหารในดินเพิ่มขึ้นมากเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการปลูกเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซา ในสภาวะที่ดินมีธาตุฟอสฟอรัสต่ำแต่มีการเติมไนโตรเจน (Youpensuk *et al.*, 2004) พบเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซาชนิด *Acaulospora morrowiae* มากที่สุดในดินที่ปลูกด้วยเชื้อนี้เดี่ยวๆ หรือที่เป็นเชื้อผสมร่วมกับ *Glomus* spp., และ *G. fasciculatum* แต่เชื้อที่ตองແບจะตอบสนองมากที่สุดต้องมีการตรวจสอบด้วยวิธีอื่นเนื่องจากสปอร์ที่ตรวจได้จากดินบริเวณรากอาจไม่มีผลโดยตรงกับการดูดซับธาตุอาหารของต้นตองແບเอง (Youpensuk *et al.*, 2005a) ดังนั้นเอนโดไมคอร์ไรซาก็น่าจะมีความสำคัญอย่างมากในการสะสมธาตุอาหารให้กับต้นตองແບในระบบปลูกพืชเลื่อนลอยแบบหมุนเวียนของหมู่บ้านกะเหรี่ยงทิวะ ซึ่งในการหมุนเวียนสารอาหารนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการรักษาผลผลิตของธัญพืชที่ปลูกและเป็นประโยชน์อย่างยิ่งยืนของระบบปลูกพืชเลื่อนลอยแบบหมุนเวียนดังกล่าว

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

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

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

ปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายและการเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซา

จำนวนและชนิดของ AMF ที่มาอาศัยอยู่กับรากฝอยของพืชจะมีความแตกต่างกันกับปัจจัยหลายชนิด เช่น

1. ฤดูกาล มีผลการศึกษาในพืชเขตทะเลทราย เช่น *Larrea tridentate* และ *Ambrosia dumosa* ว่าพบเชื้อราไมคอร์ไรซาสูงในฤดูใบไม้ร่วงและต่อเนื่องจนถึงตลอดฤดูใบไม้ผลิ จากนั้นจะลดลงในช่วงที่มีการขาดน้ำในฤดูร้อน (Apple *et al.* 2005) ซึ่งรายงานของ Youpensuk *et al.* (2004) ทำการสำรวจจากไร่บนที่สูงบริเวณหมู่บ้านทิวะซึ่งมีต้นตองเตบเจริญ พบโครงสร้างของเชื้อราในรากพืชที่เรียกว่า อาร์บัสคูล (arbuscule) จำนวนมากในช่วงฤดูฝน ทั้งนี้จะเห็นว่าความแตกต่างอาจขึ้นกับลักษณะภูมิประเทศด้วย

2. ชนิดของพืชที่เป็นพืชอาศัย การเข้ามาอาศัยร่วมกับรากของพืชอาศัยจะแตกต่างกันซึ่งมักจะสัมพันธ์กับอัตราการเจริญของรากและความอ่อนแอของพืชอาศัย (Smith and Read, 1997) เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่า เชื้อราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซามีความจำเพาะน้อยหรือไม่มีเลยต่อพืชที่เป็นพืชอาศัย โดย Zhu *et al.* (2000) ได้ตรวจสอบพบการเข้าสู่รากของ AMF ใน perennial ryegrass และ white clover จำนวนมากจากการปลูกเชื้อ AMF พืชในป่าดิบชื้นจะมีทั้งเอคโตไมคอร์ไรซา (ECM) และ AMF ซึ่งพบว่า พืชตอบสนองต่อ AMF สูงกว่า ECM จากการศึกษาพืช 100 ชนิดพบ พืช 5 ชนิดที่มี AMF เข้าอาศัยถึง 75% ซึ่ง 42 ชนิดมีการเข้าไปอยู่รวมน้อยกว่า 25% ส่วนอีก 23 ชนิดมีการเข้าอยู่รวมเพียง 1-5 % (Onguen and Kuiper, 2001)

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

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

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

5. ความชื้นของดิน จะมีผลต่อการออกของสปอร์ เช่น สปอร์ของเชื้อรา *G. epigaeum* จะออกได้ดีในช่วงความชื้นระหว่าง field capacity และ soil saturation ถ้าความชื้นต่ำกว่า field capacity การออกจะลดลง (Danial and Trappe, 1980) ในกรณีที่มีน้ำท่วม การตอบสนองก็จะขึ้นอยู่กับชนิดพืชและชนิดของ AMF ในการทดลองของ Rutto *et al.* (2002) ศึกษาในกล้าต้นท้อที่เจริญในอาหารที่มีฟอสฟอรัสต่ำ พบว่า มีการสะสมเอทานอลในรากแก้วของกล้าท้อที่ไม่มีการปลูกเชื้อ AMF ภายใน 3 วันที่น้ำขัง พืชจะอ่อนแอลงมากกว่า

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

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

8. แสง ความเข้มของแสงสูงและช่วงกลางวันที่ยาวจะเพิ่มการเข้าสู่รากหรือการสร้างสปอร์ในพืชหลายชนิด การเพิ่มของการเข้ารากของ AMF มีผลมาจากการเพิ่มกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชทั้งมีการสร้างคาร์บอนในรากและเพิ่มการขับออกของสารอาหารคาร์บอน (Powell and Bgyaraj, 1984) จากการศึกษาโดย NMR พบว่าน้ำตาลที่มีคาร์บอนหกตัวจะถูกนำเข้า AMF ที่อยู่ในราก และมีกระบวนการเปลี่ยนไปเป็น น้ำตาล trehalose และไขมันที่เก็บสะสม ในส่วนกลุ่มเส้นใยที่อยู่ในรากและส่งมายังกลุ่มเส้นใยที่อยู่นอกราก ซึ่งมีการรับ NO_3^- และ แอมโมเนียเข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปสังเคราะห์กรดอมิโน Arginine จากนั้นจึงส่งกลับไปยัง AMF ที่อยู่ในเซลล์ราก (Marsh and Schultze, 2001)

9. ยาฆ่ารา ยาฆ่าราในแปลงปลูกมีการใช้กันอย่างมากเพื่อควบคุมราซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืช ซึ่งยาฆ่ารานี้จำเพาะต่อราทั้งที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค ทั้งนี้ก็จะรวมเชื้อราที่ช่วยในการเจริญของพืช เช่น มาย

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

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

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

การประเมินการเข้าไปในราก (Root colonization)

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

การเก็บและการเพิ่มจำนวน AMF

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

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

อนุกรมวิธานของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา

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

การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

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

ข้อด้อยของวิธีการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา ก็คือ

1. สามารถใช้ได้เฉพาะเชื้อราที่สร้างสปอร์ในขณะนั้น เนื่องจากการบ่งบอกชนิด AMF โดยใช้ลักษณะของเส้นใยทำได้ยาก แต่ถ้าหากไม่มีสปอร์ ก็จำเป็นต้องใช้โครงสร้างในเซลล์ โดยการย้อมราก และ ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์ซึ่งวิธีนี้ใช้เวลานานและแรงงานสูง (McConigle *et al.*, 1990) และยังพบว่า AMF หลายชนิดไม่ติดสีย้อมในราก หรือติดจางมากเมื่อใช้สีมาตรฐาน (Morton and Redecker, 2001)
2. ในบางฤดูของแต่ละปี AMF จะสร้างสปอร์มากซึ่งทำให้ตรวจพบได้ง่าย (dominant) แต่ถ้าสภาวะแวดล้อมต่างไป อาจไม่มีการสร้างสปอร์เลย ทำให้ตรวจสอบไม่พบเชื้อชนิดนั้นๆ
3. เชื้อรา AM ต่างชนิดกันจะสามารถเข้าอาศัยร่วมกับพืชได้ต่างชนิดกัน (Bever *et al.*, 1996)
4. สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสปอร์จะไม่ถูกตรวจพบ

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

การใช้วิธีการทางอนุชีววิทยา

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

การผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซาเชิงอุตสาหกรรม

เนื่องจาก AMF ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารในห้องปฏิบัติการได้ จะต้องใช้ พืชที่เป็นพืชอาศัย เพื่อเพิ่มจำนวน และใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป แต่เนื่องจาก AMF อาศัยร่วมกับพืชได้หลายชนิด จึงมีพืชหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้เพาะหัวเชื้อได้ แต่ทั้งนี้ก็ต้องมีการคัดเลือกชนิดของพืชอาศัยที่มี AMF เข้า colonized อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณสปอร์จำนวนมากเพื่อเตรียมหัวเชื้อ โดยหัวเชื้อที่ได้ นั้น ก็จะมีทั้งส่วนของรากพืช เส้นใยและสปอร์ปะปนกัน หัวเชื้อที่มีขายในท้องตลาดของประเทศไทย ปัจจุบันเป็นหัวเชื้อที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ เช่นหัวเชื้อของ บริษัท Triton ประเทศเยอรมัน ซึ่งก็ต้องทำการทดลองกับพืชเป้าหมายในประเทศก่อนได้รับอนุญาตให้วางจำหน่าย แต่เนื่องจากหัวเชื้อมีราคาสูงถึง 1,200

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

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราไมคอร์ไรซา เพื่อพัฒนาองค์ความรู้และนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร และสิ่งแวดล้อมของประเทศไทยในการวิจัยนี้ การดำเนินงานมีวัตถุประสงค์ทั้งหมด 4 ข้อ คือ

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา อาร์บัสคูล่าไมคอร์ไรซา (AMF) ในพืชเป้าหมาย
2. เพื่อบ่งบอกชนิดของ AMF ที่พบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอนุชีววิทยา
3. เพื่อคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อพืชเป้าหมาย
4. เพื่อคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของ AMF ที่คัดเลือก

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานจะเริ่มจากการเก็บตัวอย่างในแปลงเพาะปลูก เพื่อศึกษาความหลากหลายของชนิดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบในแหล่งปลูกพืชเป้าหมาย จัดจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ/หรือเทคนิคทางอนุชีววิทยา จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่เป็นชนิดเด่น ซึ่งจะพิจารณาจากความถี่ในการพบ คือ สามารถพบได้บ่อยในหลายแหล่งตัวอย่างหรือพบในปริมาณมากบริเวณรอบรากพืชเป้าหมายแต่ละกลุ่ม เมื่อคัดเลือกเชื้อราชนิดที่คาดว่าจะเหมาะสมแล้ว จึงเข้าสู่ขั้นตอนของการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ โดยนำเชื้อราชนิดเด่นมาคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณสปอร์ ซึ่งจะใช้พืชทดสอบในกลุ่มที่เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุสั้นและมีรากแขนงมาก เช่น ใต้แก้วข้าวโพด ข้าวไร่ ข้าวฟ่าง ดาวเรือง ดาวเรือง ลูกเดือย ถั่วเหลือง เมื่อพบพืชอาศัยที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เพิ่มปริมาณของเชื้อราที่คัดเลือก จะปลูกเชื้อให้เจริญเติบโตร่วมกับพืชอาศัย เพื่อให้เชื้อราเจริญและเพิ่มปริมาณสปอร์

การดำเนินงานตามขั้นตอนทั้งหมดจะกล่าวถึงโดยแยกตามชนิดของพืชเป็น 4 ชนิด ดังนี้ พืชที่ใช้ผลิต biofuel (สบู่ดำ), พืชเครื่องดื่ม (กาแฟ), พืชอาหาร ธัญพืช และถั่วกินเมล็ด และ พืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า

1. พืชที่ใช้ผลิต biofuel – สบู่ดำ

1.1 ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (AMF) ในต้นสบู่ดำ

สถานที่และการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดินรอบรากและรากของสบู่ดำจาก 6 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ เชียงราย (2 แหล่งตัวอย่าง) เชียงใหม่ (4 แหล่งตัวอย่าง) ลำพูน (1 แหล่งตัวอย่าง) ขอนแก่น (1 แหล่งตัวอย่าง) หนองคาย (1 แหล่งตัวอย่าง) และเลย (1 แหล่งตัวอย่าง) กำหนดจุดเก็บตัวอย่างให้กระจายทั่วในแต่ละพื้นที่ พยายามหลีกเลี่ยงบริเวณทางเดินเก่า ขอบรั้ว คอกสัตว์ กองปุ๋ย ปูน หรือบริเวณที่คาดว่าจะปนเปื้อนสารเคมีใดๆ จากนั้นทำความสะอาดผิวดิน เก็บเศษพืชและหญ้าออกจากบริเวณทรงพุ่มให้หมด แล้วจึงขุดดินรอบต้นสบู่ดำ ต้นละ 4 จุด โดยใช้จอบ เสียม หรือพลั่วที่สะอาด ขุดเป็นหลุมรูปตัว V ลึกประมาณ 20 เซนติเมตร จากนั้นใช้พลั่วแซะดินด้านข้างของหลุมหนาประมาณ 3-5 เซนติเมตรจากปากหลุม ให้ขนานไปตามหน้าดินแล้วงัดขึ้นให้หน้าดินติดมากับพลั่ว ใช้มีดตัดดินบนพลั่วออกทั้ง 2 ข้าง เหลือดินตรงกลางไว้กว้างประมาณ 5 เซนติเมตร แยกเก็บดินใส่ถุงพลาสติกไว้ ล้างทำความสะอาดรากและเก็บในแอลกอฮอล์ 70% เพื่อเก็บรักษาโครงสร้างของเชื้อราเอ็นโดไมคอร์ไรซา (อาร์บัสคูล, เวสสิเคิล และเส้นใย) ภายในรากพืช พร้อมทั้งบันทึกรายละเอียดของตัวอย่างตามแบบฟอร์ม (ภาพที่ 1) ประกอบด้วย หมายเลขแปลงที่เก็บ, ชื่อเจ้าของ, ความลึกของดินที่เก็บ, ที่ตั้งสถานที่เก็บ, วันที่เก็บและพืชที่ปลูก นำตัวอย่างมาศึกษาต่อไปในห้องปฏิบัติการ

ในห้องปฏิบัติการ นำดินตัวอย่างบางส่วนไปอบเพื่อหาน้ำหนักแห้งของดิน ในตู้อบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 150°C จากนั้นชั่งน้ำหนักและคำนวณความชื้นในดิน และวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้ดินต่อน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 คนให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย pH meter

$$\text{ความชื้นในดิน} = \frac{\text{มวลของดินเปียก} - \text{มวลของดินแห้ง}}{\text{มวลของดินแห้ง}} \times 100$$

แปลงที่.....เจ้าของชื่อ.....
ความลึกที่เก็บ.....
เก็บจาก.....ตำบล.....
อำเภอ.....จังหวัด.....
วันที่เก็บ.....พืชที่ปลูก.....

ภาพที่ 1 แบบสำหรับบันทึกรายละเอียดของแหล่งตัวอย่างในแปลงสุ่มดำ

การตรวจสอบการเจริญของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาในดินและราก

การตรวจสอบการเจริญของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาจะแยกการตรวจสอบออกเป็น 2 ส่วน คือสปอร์ที่พบในดิน และโครงสร้างของเชื้อราที่พบในราก

สำหรับตัวอย่างดินบริเวณรอบรากต้นสุ่มดำนำมาศึกษาความหลากหลายของสปอร์ AMF โดยผสมดินตัวอย่างละ 100 กรัมกับน้ำสะอาดแล้วคนให้เข้ากันจนแน่ใจว่าเม็ดดินแตกดีแล้ว ทำซ้ำแหล่งละ 3 ครั้ง ทิ้งไว้จนตกตะกอน แล้วเทน้ำผ่านตะแกรงกรองที่มีขนาด 750-, 250-, 106 และ 45 ไมโครเมตร ตามลำดับ ผสมน้ำลงในดินและกรองซ้ำจนกระทั่งน้ำใส จากนั้น ใช้น้ำสะอาดชะสิ่งที่ยังค้างอยู่บนแต่ละตะแกรงขนาด 250-, 106 และ 45 ไมโครเมตร ลงในหลอดขนาด 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวที่มีเศษต่างๆ ด้านบนทิ้ง จากนั้นเติมสารละลายซูโครส 50% เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารแขวนลอยด้านบนลงในตะแกรงขนาด 45 ไมโครเมตร แล้วล้างสารละลายซูโครส ในสารแขวนลอยบนตะแกรงออกให้หมด ด้วยน้ำสะอาด เทสิ่งที่ค้างอยู่บนตะแกรงขนาด 45 ไมโครเมตรนั้น ลงบนกระดาษกรองที่ต่ออยู่กับปั๊มสุญญากาศ ล้างสิ่งที่ติดบนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น 1-2 นาที แล้วจึงเก็บกระดาษกรองลงในจานแก้ว

ทำการแยกสปอร์เป็นกลุ่มด้วยอุปกรณ์ปลายแหลมเล็ก ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ที่ใช้ในการบ่งบอกชนิด เช่น ขนาด สี พื้นผิว เป็นต้น และนับจำนวนสปอร์ ซึ่งขั้นตอนในการระบุลักษณะและนับจำนวนนี้ทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ

นำตัวอย่างรากสปูดำที่แช่ใน 70% แอลกอฮอล์ มาตรวจสอบการเจริญของ AMF ตามวิธีของ Brundrett *et al.* (1996) โดยนำตัวอย่างรากมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด และตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่ลงในภาชนะแล้วเติม 10% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (10% KOH) นำไปเข้าหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นล้างรากด้วยน้ำเปล่าให้สะอาด เติมน้ำย้อม 0.05% ทริปแฟนบลู (0.05% Trypan Blue) ให้ทั่วราก แล้วนำไปเข้าหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที จากนั้นนำมาตรวจสอบโครงสร้างของ AMF ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสุมตัวอย่างราก ที่ย้อมแล้วมาวางบนแผ่นสไลด์ที่มีน้ำเปล่า ปิดด้วยแผ่นแก้วใส นับโครงสร้างของ AMF ที่ปรากฏภายในราก เช่น เวสสิเคิล อาร์บัสคูล หรือเส้นใย แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้าราก

$$\% \text{ การเข้ารากพืช} = \frac{\text{จำนวนพื้นที่ใต้กล้องจุลทรรศน์ที่พบโครงสร้างของเชื้อราในราก} \times 100}{\text{จำนวนพื้นที่ใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้งหมดของราก}}$$

1.2 การบ่งบอกชนิดของ AMF ที่พบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอณูชีววิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน ทำให้สามารถบ่งบอกชนิดของเชื้อราจากสปอร์ได้ โดยใช้ขนาดของสปอร์ สีของผนังสปอร์ พื้นผิวของสปอร์ รวมถึงลักษณะเฉพาะอื่นๆของสปอร์บางชนิด

เทคนิคทางอณูชีววิทยา

การยืนยันชนิดของเชื้อ AMF นั้นปัจจุบันนิยมใช้ข้อมูลทางอณูชีววิทยาเข้ามาช่วยสนับสนุนข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ในการทดลองนี้จึงนำเชื้อ AMF ชนิดเด่นที่ได้จากการสำรวจมาทำการศึกษา โดยนำสปอร์แต่ละชนิดชนิดละ 50 สปอร์ ที่จำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว รวมทั้งรากพืชอาศัย ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นปริมาณ 0.5 กรัม มาฆ่าเชื้อบริเวณผิวโดยใช้ 4% chloramin T, 0.02% streptomycin, 0.01% gentamicin เป็นเวลา 15 นาที (Hijri *et al.* 2002) DNA ของเชื้อราจะถูกสกัดออกจากสปอร์และรากด้วย the Power Soil™ DNA extraction Kit (MoBio Laboratories, Solano Beach, USA) และ the Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega, WI, USA) ตามลำดับ

ชิ้นส่วนของ SSU จะถูกเพิ่มปริมาณโดยใช้ universal eukaryotic primer NS31 (Simon *et al.*, 1992) และ primer AM1 ซึ่งจะเพิ่มปริมาณในส่วนที่บ่งบอกเชื้อราใน 3 สกุล ได้แก่ *Glomeraceae*, *Gigasporaceae* และ *Acaulosporaceae* (Helgason *et al.*, 1998) ทำปฏิกิริยานี้ใน 2x Master Mix (*i-taq*™)

(IntroBiotechnology, South Korea) โดยประกอบด้วย *Taq* DNA polymerase, buffer, dNTP's, proprietary chelator , แมกนีเซียมเข้มข้น และ primer ชนิดละ 10 pmol ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

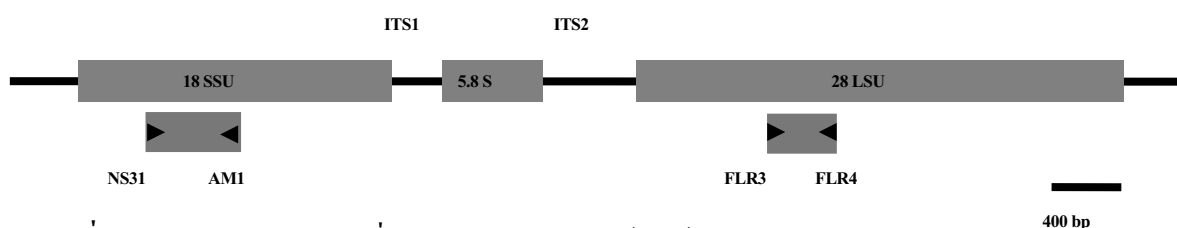
เข้าสู่ขั้นตอน Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้เครื่อง MJ Research PTC100 ทั้งหมด 30 รอบ ช่วงแรก 10 รอบที่อุณหภูมิ 95°C เวลา 1 นาที, 58°C เวลา 1 นาที และ 72°C เวลา 2 นาที ช่วงต่อมา 19 รอบ ที่อุณหภูมิ 95°C เวลา 30 วินาที, 58°C เวลา 1 นาที และ 72°C เวลา 3 นาที และช่วงสุดท้าย 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 95°C เวลา 30 วินาที, 58°C เวลา 1 นาที และ 72°C เวลา 10 นาที

ชิ้นส่วนของ LSU rDNA จะถูกจำลองด้วย primer FLR3 และ FLR4 ใน PCR master mix ชนิดเดียวกัน primer FLR3 จะจำลอง LSU rDNA ในช่วงโดเมน D1 และ D2 ในขณะที่ FLR4 อยู่ในโดเมน D2 (Gollotte *et al.*, 2004) (ภาพที่ 2)

สภาวะการทำ PCR คือ ที่อุณหภูมิ 94°C เวลา 2 นาที, 93°C เวลา 1 นาที, 58°C เวลา 1 นาที และ 72°C เวลา 1 นาที ทั้งหมด 39 รอบ จากนั้นใช้เครื่อง thermal cycler (PerkinElmer 9700) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ในแต่ละปฏิกิริยาด้วย 1.5% agarose gel ที่ 60 โวลต์ ใช้เวลา 60 นาที และทำให้บริสุทธิ์โดย NucleoSpin® Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany)

ปฏิกิริยาทั้งหมดจะถูกนำไปเรียงลำดับโดยใช้ automated sequencer ที่ Marcogen (Korea)



ภาพที่ 2 Fungal gene mapping ซึ่งเฉพาะเจาะจงกับ ไพร์เมอร์ NS31-AM1 และ FLR3-FLR4

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำลำดับเบสทั้งหมดที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ตรวจสอบโดยใช้ BLAST การจัดอันดับตามวิวัฒนาการ โดยใช้สารพันธุกรรมนอกกลุ่มเป้าหมายเพื่อเปรียบเทียบคือ เชื้อราชนิด *Amanita muscaria* ซึ่งจัดอยู่ใน Basidiomycota

ใช้โปรแกรม MEGA 4.1 BETA ในการทำแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) จากลำดับเบสที่ได้ (Tamura *et al.*, 2007; <http://www.megasoftware.net/>) การสร้างแผนภูมิจาก SSU จะอาศัยการวิเคราะห์ 1000-fold bootstrapped และ Neighbor-Joining ในการวิเคราะห์ LSU ด้วย Clustal W (Thompson, 1994) ใช้โปรแกรม Tree Explorer in MEGA4 ในการเขียนภาพ

1.3 การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อพืชสบูดำ

การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสม จะพิจารณาจากเชื้อชนิดเด่น (dominant species) คือสามารถพบได้ ในหลายแหล่งตัวอย่าง หรือพบจำนวนมาก ประมาณ 50 สปอร์ขึ้นไปต่อดิน 100 กรัม นำไปเพิ่มปริมาณ ด้วยการปลูกในทราย (sand culture) ร่วมกับข้าวฟ่าง จากนั้นนำสปอร์ของเชื้อ แต่ละชนิดที่เพิ่มปริมาณได้ เป็นหัวเชื้อสำหรับปลูกกับสบูดำ จากนั้นประเมินผลโดยตรวจวัดเปอร์เซ็นต์ การเข้าสู่รากของ AMF ตรวจนับปริมาณสปอร์ AMF เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของพืช โดยวัดน้ำหนักแห้งของยอดและราก วัดปริมาณการดูดใช้ธาตุ ในโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม หรือเปรียบเทียบปริมาณผลผลิต โดยวัดน้ำหนักเมล็ดเมื่อพืชเจริญเติบโตเต็มที่

การตรวจสอบผลของเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าชนิดเด่นที่มีต่อต้นกล้าสบูดำ เพื่อจะนำไปใช้ทดแทนปุ๋ยเคมีนั้น ได้วางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCB) แบ่งเป็น 8 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 ใช้เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าชนิดเดียว คือ *Acaulospora* sp. No.19 จากดินตัวอย่าง จำนวน 100 สปอร์

กรรมวิธีที่ 2 ใช้เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าชนิดเดียว คือ *Acaulospora* sp. No.22 จากดินตัวอย่าง จำนวน 100 สปอร์

กรรมวิธีที่ 3 ใช้เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าชนิดเดียว คือ *Scutellospora* sp. AMF33 จำนวน 100 สปอร์ จากห้องปฏิบัติการของ ศ.ดร.เบญจวรรณ อุทัยเกษม ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กรรมวิธีที่ 4 ใช้เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าชนิดเดียว คือ *Glomus etunicatum* AMF05 จำนวน 100 สปอร์ จากห้องปฏิบัติการสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ ด้านการพัฒนาระบบยั่งยืนของทรัพยากรชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กรรมวิธีที่ 5 ใช้เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าชนิดเดียว คือ *Glomus* sp. จำนวน 100 สปอร์จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ในดิน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กรรมวิธีที่ 6 ใช้เชื้อผสมของทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Acaulospora* sp. No.19, *Acaulospora* sp. No.22, *Scutellospora* sp. AMF33, *Glomus etunicatum* AMF05 และ *Glomus* sp. ชนิดละ 20 สปอร์ รวมทั้งหมด 100 สปอร์

กรรมวิธีที่ 7 ใช้ผลิตภัณฑ์ทางการค้า คือ Myco star[®] (ภาพที่ 3) ตามอัตราที่แนะนำให้ใช้

กรรมวิธีที่ 8 ชุดควบคุม ไม่ใส่เชื้อ

ทำการรมวิธีละ 4 ซ้ำ เปรียบเทียบกันในกระถางพลาสติกขนาด 10 นิ้ว ที่บรรจุด้วยดิน:ทราย ในอัตราส่วน 1:1 น้ำหนัก 5 กิโลกรัม ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยให้สารละลายธาตุอาหาร (1× modified Hoagland) 1 ครั้งต่อสัปดาห์ จากนั้นเก็บเกี่ยวและบันทึกความสูง เส้นรอบวงของลำต้น น้ำหนัก

สดและน้ำหนักแห้ง ของลำต้นและรากของต้นกล้าสบู่ดำ จำนวนสปอร์ต่อดิน 100 กรัม และเปอร์เซ็นต์การเข้าราก วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย ANOVA โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.5

1.4 การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของ AMF ที่เหมาะสมต่อสบู่ดำ

การเพิ่มปริมาณสปอร์ของเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซาในพืชอาศัยให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อรา เอนโดไมคอร์ไรซา ในการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCB) โดยใช้พืชอาศัย 5 ชนิด คือ ข้าว ข้าวฟ่าง ข้าวโพด ลูกเดือย และดาวเรืองฝรั่งเศส ปลูกร่วมกับ เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซา 4 ชนิด ได้แก่ *Acaulospora tuberculata* AMF05 จากต้นสบู่ดำ, *Scutellospora* sp. และ *Acaulospora* sp. จากพืชไร่บนที่สูงในหมู่บ้านทิมะ จ. แม่ฮ่องสอน, *Glomus etunicatum* จากพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า และเชื้อราเอนโดไฟท์ *Piriformospora indica* จาก Prof. Dr. R.J. Strasser, Laboratory of Bioenergetics and Microbiology, Department of Botany and Plant Biology, University of Geneva, Switzerland ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ โดยปลูกเชื้อจำนวน 100 สปอร์ หรือ เส้นใย 5 g (กรณี *P. indica* เนื่องจากเป็นเชื้อราแบบเส้นสายและสามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหาร PDB) กับต้นกล้าของพืชอาศัยแต่ละชนิด ในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว ที่บรรจุดิน:ทราย 2 kg ในอัตราส่วน 1:1 และรดด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรตัดแปลงของ Hoagland สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 4 เดือน ยกเว้นดาวเรืองฝรั่งเศสทำการทดลองเป็นเวลา 2 เดือน โดยงดการให้น้ำ 1 สัปดาห์ก่อนเก็บเกี่ยว แล้วเก็บเกี่ยวรากและดิน บันทึกจำนวนสปอร์ในดิน และเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่อำนาจ



ภาพที่ 3 เชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ใช้ชื่อทางการค้าคือ MycoStar®

2. พืชเครื่องดื่ม – กาแฟ

2.1 ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา อาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซา (AMF) ในต้นกาแฟ

สถานที่และการเก็บตัวอย่าง

เก็บดินตัวอย่างจากแปลงปลูกกาแฟขนาดใหญ่ ในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย จำนวนทั้งหมด 9 แหล่งตัวอย่าง โดยในจังหวัดเชียงใหม่ เก็บตัวอย่าง ที่อำเภอแม่แตง 3 แหล่ง อำเภอคอดอยสะเก็ด 2 แหล่ง ส่วนในจังหวัดเชียงราย เก็บตัวอย่างที่วาวี ตำบลคอดอยช้าง อำเภอแม่สรวย 4 แหล่ง ซึ่งที่ตั้งของแหล่งเก็บตัวอย่างดังกล่าว เป็นพื้นที่สูง และได้รับการส่งเสริมการปลูกกาแฟอาราบิก้าของจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย

กลุ่มชุดเก็บตัวอย่างดินบริเวณโคนต้นกาแฟที่รากแผ่มาถึง โดยกำหนดจุดเก็บตัวอย่างให้ กระจายทั่วพื้นที่นั้น และพยายามหลีกเลี่ยงบริเวณทางเดินเก่า ขอบรั้ว คอกสัตว์ กองปุ๋ย ปูน หรือ สารเคมี จากนั้นทำความสะอาดผิวดินโดยเฉยเศษพืชและหญ้าแห้งออกจากบริเวณทรงพุ่มที่ต้องการเก็บดินให้หมด แล้วจึงขุดดินรอบต้นกาแฟต้นละ 3 จุด โดยใช้เข็มขนาดเล็ก และช้อนปลูก ขุดเป็น รูปตัว V ลึกประมาณ 20 เซนติเมตร (cm.) จากนั้นแซะดินด้านข้างของหลุมหนาประมาณ 3-5 เซนติเมตร จากปากหลุมให้ขนานไปตามหน้าดินที่ขุด จนถึงก้นหลุมแล้วจัดขึ้น ให้หน้าดินติดมากับช้อนปลูก ใช้มีดตัดดินบนช้อนปลูกหรือเสียมออกทั้ง 2 ข้าง เหลือดินตรงกลางไว้ ใช้ถุงพลาสติกใหม่ สวมปลายช้อนปลูกให้หุ้มดินตัวอย่างไว้ เทดินใส่ถุงพลาสติก พร้อมทั้งบันทึกรายละเอียดของตัวอย่าง เช่น ลักษณะและสีของดิน และพืชที่ปลูกร่วมกันในแปลง ร่มเงาจากต้นไม้อื่น หรือการดูแลรักษา เป็นต้น

การตรวจสอบการเจริญของเชื้อราอาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซาในดิน

นำดินตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งปลูกกาแฟมาแยกหาสปอร์ในดินโดยกระบวนการ wet sieving and 50% sucrose centrifugation method โดยใช้หลักการ คือการปั่นเหวี่ยงด้วยน้ำในขั้นแรก ทำให้ สปอร์แยกไปรวมกับอนุภาคดินที่อยู่ด้านล่างหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยสารละลายน้ำตาล 50% สปอร์จะแยกออกจากอนุภาคดิน และลอยขึ้นมาอยู่ในสารละลายน้ำตาล จากนั้นกรองและล้างสารละลายน้ำตาล ออกจากสปอร์อย่างรวดเร็ว

ขั้นตอนของ wet sieving and 50% sucrose centrifugation method เริ่มจาก นำดินที่เก็บจากแหล่งปลูกกาแฟมาชั่งให้ได้น้ำหนัก 100 กรัม ใส่ใน บีกเกอร์ (beaker) เหล็ก ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำปริมาตร 800 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วใช้ไม้พายสำหรับกวนสาร กวนดินในบีกเกอร์เบาๆ โดยกวนไปในทางเดียวกัน ประมาณ 1 นาที ค่อยๆ เทน้ำในบีกเกอร์ ให้ผ่านตะแกรง เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว (Humboldt, US standard sieve series) ขนาด 500 (U.S. Std No. 35 Mesh), 250 (U.S. Std No. 60 Mesh), 125 (U.S. Std No. 120 Mesh) และ 45 (U.S. Std No. 325 Mesh) ไมโครเมตร (μm) ตามลำดับที่ตั้งซ้อนกันไว้แล้ว หลังจากเทน้ำออกจากบีกเกอร์ผ่านตะแกรงจนหมด เติมน้ำปริมาตร 800 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์เดิม กวนดินและเทน้ำผ่านตะแกรง ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง จึงเก็บตัวอย่างที่ค้างอยู่บน ตะแกรงขนาด

250, 125 และ 45 ไมโครเมตร ลงในหลอดขนาด 150 มิลลิลิตรสำหรับนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ น้ำกลั่นค่อยๆ ชะดินลง หลอด ดินแต่ละตัวอย่าง ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ได้ไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ น้ำกลั่นปรับสมดุล ที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที (round per minute หรือ rpm.) เป็นเวลา 5 นาที นำหลอดออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงแล้วเทน้ำที่อยู่ด้านบนทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนดินไว้ แล้วเติมสารละลาย น้ำตาล 50% ลงในหลอดที่มีตะกอนดิน ปรับสมดุลด้วยสาร ละลายน้ำตาล 50% และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เมื่อนำหลอดออกจาก เครื่องปั่นเหวี่ยงแล้ว เทสารละลาย ด้านบนผ่านตะแกรงขนาด 45 ไมโครเมตร ใช้ น้ำกลั่นล้างสารละลายน้ำตาล 50% บนตะแกรงให้หมด และ ชะสปอร์เชื้อรามายคอร์ไรซาบนตะแกรง ให้ตกลงไปบน กระดาษกรองที่ต่อเข้ากับชุดเครื่องกรองแบบลดความดัน ร่อนน้ำผ่านกระดาษกรองหมด ใช้ปาก คีบค่อยๆ คีบกระดาษกรองออกมาวางบนลงบนจานเลี้ยงเชื้อ และปิดฝาเพื่อ ป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศลงไปเจริญบนกระดาษกรอง จากนั้นนำสปอร์ไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.2 การบ่งบอกชนิดของ AMF ที่พบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำสปอร์ที่กรองได้จากดินตัวอย่าง (100 กรัม ทำ 3 ซ้ำ) มาตรวจนับความถี่และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยตรวจสอบสปอร์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ และกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ สังเกตลักษณะต่างๆ ได้แก่ ลักษณะการเกิดและพัฒนาการของสปอร์ ลักษณะของผนังสปอร์ สีของผนังสปอร์ ลักษณะ การเรียงตัว รูปร่าง และขนาดของสปอร์ และบ่งบอกชนิด โดยเปรียบเทียบกับตำรามาตรฐาน หรือสิ่งพิมพ์อิเล็กทรอนิกส์ (Schenck and Pérez, 1988; Brundett *et al.*, 1996; <http://www.agro.ar.szczecin.pl>; <http://invam.caf.wvu.edu>)

2.3 การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อกาแฟ

การทดลองนี้ ใช้เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทั้งแบบชนิดเดียว (pure culture), หลายชนิด (mixed culture) และ เชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาที่มีขายในท้องตลาด นำมาทดสอบ ปลุกให้กับกล้ากาแฟอราบิก้าสายพันธุ์คาร์ติมอร์ โปรเจนี 90 (Progeny 90) โดยได้รับความอนุเคราะห์กล้าจากศูนย์วิจัยกาแฟที่สูง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่นำมาตรวจสอบแล้วไม่พบการติดเชื้อในราก ปลุกในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ในอาคารเรือนเพาะชำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้รับแสงธรรมชาติ เชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซา ที่นำมาทดสอบ ประกอบด้วย *Gl. etunicatum*, *Ac. scrobiculata*, *Ac. morrowiae*, *Ac. mellea* และ เชื้อราที่ใช้ชื่อการค้า Myco star[®] ใช้วัสดุปลูกคือ ดินที่มีธาตุอาหารต่ำผสมทรายในอัตราส่วน 2:1 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ

ออกแบบการทดลองแบบ factorial จำนวน 8 ซ้ำ การเตรียมวัสดุปลูกใช้กระถางที่รองถุงพลาสติก ใส่ดินที่มีธาตุอาหารต่ำผสมทราย ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาณ 2,800 กรัม รดน้ำพอชุ่มแล้วใช้พลาสติก

คลุมดินพักไว้ในกระถาง 2 วัน เตรียมกล้ากาแฟ ที่จะนำมาทดสอบ โดยนำกล้ากาแฟมาแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เขย่าเบาๆ แล้วทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ดินที่ติดบริเวณรากหลุดออกจากนั้นนำออกไปล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง การนำลงปลูกจะนำเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอไรซา ใส่รองที่ก้นหลุม แล้วจึงวางกล้ากาแฟลงในวัสดุปลูก เชื้อราที่ใช้ ได้แก่ *Glomus etunicatum*, *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora morrowae*, *Acaulospora mellea* และ เชื้อราผสมของทั้ง 4 ชนิด ทั้ง 5 treatments นี้เปรียบเทียบจำนวนสปอร์ คือใช้ทั้ง 50 และ 200 สปอร์ และเปรียบเทียบกับเชื้อทางการค้า ปริมาณ 20 กรัม ตามคำแนะนำการใช้ โดยมีดินที่ไม่ได้รับเชื้อเป็นกลุ่มควบคุม ทุกชุดการทดลองทำ 8 ซ้ำ

จัดวางกระถางกล้ากาแฟแบบสุ่มโดยให้แต่ละต้นห่างกันประมาณ 30 เซนติเมตร รดน้ำกรองวันละ 80 มิลลิลิตร ให้ต้นกล้าเจริญในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 120 วัน แล้ววัดความสูงต้น ความยาวราก การแผ่ขยายของราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง เปรียบเทียบกันทุกตัวอย่าง

2.4 การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของ AMF ที่คัดเลือก

2.4.1 ดินตัวอย่าง + กล้ากาแฟที่ปลอดเชื้อ + ทราย

เนื่องจากกาแฟรามีการจำกัดเป็นพืชที่มีปริมาณการอาศัยร่วมกับเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอไรซาสูง (Miyasaka and Habte, 2001) จึงทดลองโดยใช้กาแฟรามีการจำกัดเป็นพืชอาศัย การทดลองนี้จะปลูกกล้ากาแฟในถุงดำ โดยรองถุงดำด้วยถุงพลาสติกใสแบบหนา ที่เจาะรูบริเวณก้นถุง นำทรายที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 1,200 กรัม ผสมกับดินตัวอย่างที่ใช้เป็นหัวเชื้อ ปริมาณ 300 กรัม คลุกให้เข้ากันทั่ว จากนั้น ใส่ลงในถุงดำ กดให้เป็นหลุม ใส่กล้ากาแฟปลอดเชื้อลงในถุง โดยในแต่ละถุงใส่กล้ากาแฟ 1 ต้น แล้วกลบหลุม ทำตัวอย่างดินละ 3 ซ้ำ รดต้นกล้าด้วยน้ำกรอง 30 มิลลิลิตร ทุกวัน และรดด้วยสารละลายธาตุอาหาร 30 มิลลิลิตร 2 ครั้ง/สัปดาห์ และปล่อยให้ต้นกล้าเจริญ ประมาณ 150 วัน จึงนำวัสดุปลูกมาตรวจสอบหาปริมาณสปอร์

2.4.2 ดินตัวอย่าง + ข้าวโพดหรือข้าวฟ่าง + ทราย

ทำการเพิ่มปริมาณ AMF โดยใช้ดินตัวอย่างเป็นหัวเชื้อ ทดสอบกับพืชอาศัย ได้แก่ ข้าวโพดและข้าวฟ่าง นำทรายฆ่าเชื้อ 800 กรัม ผสมกับดินตัวอย่าง 200 กรัม คลุกให้เข้ากัน แล้วนำกล้าข้าวโพดหรือข้าวฟ่างปลอดเชื้ออายุ 60 วัน ลงปลูกในกระถางที่รองด้านในด้วยถุงพลาสติก เจาะรูก้นถุง รดด้วยน้ำกรอง 30 มิลลิลิตร ทุกวัน และรดด้วยสารละลายธาตุอาหาร 30 มิลลิลิตรทุกๆ 2 วัน เลี้ยงให้ต้นข้าวโพดและข้าวฟ่างมีอายุ 120 วัน จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบหาปริมาณสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่ราก

3. พืชอาหาร รัญพืช และถั่วกินเมล็ด

การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อพืชอาหาร รัญพืช และถั่วกินเมล็ด

เก็บเมล็ดพืชอาหาร ได้แก่ ข้าวไร่ (*Oryza sativa* cv Bue Bang) ข้าวโพด (*Zea mays*) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) ลูกเดือย (*Coix lachryma-jobi*) ถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata*) และปะดะ (*Macaranga denticulata*) จากเกษตรกรในหมู่บ้านทิมะ จ. แม่ฮ่องสอน นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70% แอลกอฮอล์ นาน 5 นาที และล้างในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง แล้วแยกเพาะเมล็ดพืชดังกล่าว 3 เมล็ด ลงในกระถางพลาสติก (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางปากกระถาง 21 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางก้นกระถาง 4 ซม. ลึก 16 ซม.) ที่บรรจุดินร่วนปนทรายที่ฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 2:1 โดยแต่ละกระถางผสมฟอสฟอรัส ปริมาณ 3 หรือ 30 กก. P/เฮกเตอร์ และใช้ดินที่มีเชื้อ AMF แบบผสม 5 ชนิด ประกอบด้วยเชื้อราในสกุล *Acaulospora*: *Glomus*: *Scutellospora*: *Achaeospora*/Paraglomus ในสัดส่วน 4:3:2:1 ซึ่งเก็บจากไร่บนที่สูง ในหมู่บ้านกระเหรี่ยงทิซะ จังหวัดแม่ฮ่องสอน เป็นหัวเชื้อในปริมาณ 75 ก./กระถาง โดยแบ่งเป็นใช้หัวเชื้อที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อก่อน (AM0) และใช้หัวเชื้อที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (AM+) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ระหว่างการทดลองให้ธาตุอาหารพื้นฐานในรูปสารละลาย 100 กก. N/เฮกเตอร์ และ 50 กก. K/เฮกเตอร์ โดยรดสารละลาย 2 สัปดาห์ต่อครั้ง และรดน้ำทุกวัน จากนั้นประเมินผลโดยตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของ AMF ตรวจนับปริมาณสปอร์ AMF เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของพืชโดยวัดน้ำหนักแห้งของยอดและราก วัดปริมาณการดูดใช้ธาตุ NPK และเปรียบเทียบปริมาณผลผลิต โดยวัดน้ำหนักเมล็ดเมื่อพืชเจริญเติบโตเต็มที่

4. พืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า

4.1 ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา อาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซา (AMF)

สถานที่และการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างรากและดินบริเวณรอบต้นพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า 24 ชนิด (*Acrocarpus fraxinifolius*, *Balakata baccata*, *Castanopsis acuminatissima*, *Erythrina subumbrans*, *Ficus altissima*, *Ficus benjamina* var. *benjamina*, *Ficus glaberrima* var. *glaberrima*, *Ficus hispida* f. var. *hispida*, *Ficus racemosa* var. *racemosa*, *Ficus subulata* var. *subulata*, *Glochidion kerrii*, *Gmelina arborea*, *Heynea trijuga*, *Hovenia dulcis*, *Macaranga denticulata*, *Machilus bombycina*, *Melia toosendan*, *Michelia baillonii*, *Nyssa javanica*, *Prunus cerasoides*, *Rhus rhesoides*, *Sapindus rarak*, *Sarcosperma arboreum*, *Spondias axillaris*) จากบริเวณพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ขุดเก็บตัวอย่างดินที่โคนต้นพืชดังกล่าวเช่นเดียวกับการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากต้นสนุ่ดำหรือกาแฟ และบันทึกรายละเอียดของตัวอย่าง เช่น สภาพพื้นดิน การดูแล และพืชที่ปลูกไว้ในบริเวณแหล่งที่เก็บ การตรวจสอบการเจริญของเชื้อราอาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซาในดินและราก

นำตัวอย่างรากพืชจำนวน 30 รากต่อชนิดพืช ที่แช่ใน 50% แอลกอฮอล์ มาล้างด้วยน้ำเปล่า และตัดเป็นท่อนเล็กๆ ขนาด 1-2 ซม. ใส่งในภาชนะแล้วทำการเตรียมย้อมราก โดยมีขั้นตอนการย้อมเช่นเดียวกับรากสนุ่ดำ จากนั้นนำไปตรวจสอบโครงสร้างของ AMF ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สำหรับตัวอย่างดินนำมาศึกษาโดย นำดินตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งปลูกพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า 24 ชนิด ตัวอย่างละประมาณ 100 ก. มาร่อนหาสปอร์ในดินโดยวิธี wet-sieving method โดยมีขั้นตอนเช่นเดียวกับดินจากต้นสนุ่ดำ

4.2 การบ่งบอกชนิดของ AMF ที่พบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการบ่งบอกชนิดของสปอร์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่นเดียวกับสปอร์จากต้นสนุ่ดำ

4.3 การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อพืชที่ใช้ในการปลูกป่า 24 ชนิด

คัดเลือก AMF ที่เหมาะสมต่อพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่าโดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง

4.3.1 เพื่อทดสอบผลของ AMF กับการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส โดยปลูกต้นกล้าก่อเดือย (*Castanopsis acuminatissima*) ที่ได้จาก FORRU's nursery จำนวน 3 ต้นต่อกระถางดินเหนียว (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางปากกระถาง 22 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางก้นกระถาง 18 ซม. ลึก 19 ซม.) ที่บรรจุดินขาดธาตุ P และทรายที่ฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 2:1 แต่ละกระถางผสมฟอสฟอรัสปริมาณ 0, 50, 100, 150, 200 หรือ 250 ppm และไม่ใช่สปอร์ AMF หรือ ใช้สปอร์ *Acaulospora elegans*, *Glomus etunicatum*, *G. maosseae* หรือ สปอร์แบบผสม โดยใช้ AMF จำนวน 50 สปอร์ต่อกระถาง (เพิ่มปริมาณสปอร์ได้จาก การปลูก ข้าวโพด ดาวเรือง ถั่ว

เหลือง ข้าวฟ่าง และข้าวไร้) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ระหว่างการทดลอง ให้สารละลาย Hoagland โดยรดสารละลาย 80 มล. 2 ครั้งต่อเดือน และรดน้ำทุก 2 วัน จากนั้น ประเมินผลโดยตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของ AMF ตรวจนับปริมาณสปอร์ AMF เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของพืชโดยวัดความสูงและขนาดเส้นรอบวงของลำต้นพืช วัดน้ำหนักแห้ง ของยอดและราก วัดปริมาณธาตุ P ในยอดและราก หลังจากย้ายปลูกพืชในเรือนเพาะชำของ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ได้ 4 เดือน

4.3.2 เพื่อทดสอบผลของ AMF กับการใช้ปุ๋ยแบบ slow-release โดยปลูกต้นกล้าก่อเดือยและปลูกเชื้อ AMF เช่นเดียวกับการทดลองแรกแต่ใช้สปอร์จำนวน 150 สปอร์ต่อกระถาง แต่ละกระถางใช้ปุ๋ยแบบ slow-release ปริมาณ 0 หรือ 375 มก./กก. วัสดุปลูก โดยใส่ปุ๋ย 3 เดือนต่อครั้ง และรดน้ำทุกวัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นประเมินผลโดยตรวจวัด เปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของ AMF ตรวจนับปริมาณสปอร์ AMF เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของพืช โดยวัดความสูงและขนาดเส้นรอบวงของลำต้นพืช วัดน้ำหนักแห้งของยอดและราก วัดปริมาณธาตุ P ในยอดและราก หลังจากย้ายปลูกพืชในเรือนเพาะชำของ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ได้ 6 เดือน

4.4 การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของ AMF ที่คัดเลือก

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มปริมาณสปอร์ชนิดที่คัดเลือกแล้วว่ามีความสามารถในการเพิ่มการเจริญของพืชที่ใช้ในการปลูกป่า โดยการปลูกเชื้อลงในพืชอาศัยที่เหมาะสม จากนั้นจึงเก็บเกี่ยววัสดุปลูกที่มีสปอร์ของเชื้อ AMF เพื่อนำไปใช้กับพืช

ทดลองเพิ่มปริมาณสปอร์ AMF 6 ชนิด ได้แก่ *Acaulospora elegans*, *A. mellea*, *A. scrobiculata*, *Glomus etunicatum*, *G. mosseae* และ *Scutellospira heterogama* โดยใช้พืชอาศัย 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วเหลือง ข้าวไร้ และข้าวฟ่าง นำดินและทรายอัตราส่วน 2:1 ที่ฆ่าเชื้อแล้ว บรรจุในกระถางดินเผา ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางปากกระถาง 22 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางก้นกระถาง 18 ซม. ลึก 19 ซม. แล้วนำเมล็ดพืชแต่ละชนิดที่ปลอดเชื้อลงปลูกในกระถาง กระถางละ 3 เมล็ด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รดน้ำปริมาตร 500 มล. ทุก 2 วัน และรดด้วยสารละลายธาตุอาหาร 80 มล. ทุก 2 สัปดาห์ เลี้ยงให้ต้นพืชมีอายุ 4 เดือน จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบหาปริมาณสปอร์และเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่ราก

5. การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ AMF และการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการเก็บกักสปอร์ AMF

5.1 การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ AMF

วางแผนการทดลองเป็น Randomized complete block design (RCB) ทำ 4 ซ้ำ โดยพืชอาศัยที่นำมาศึกษาในขั้นตอนนี้ ประกอบด้วย ต้นเดือย (*Coix lachryma-jobi* L.) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* (Linnacus) Moench) และหญ้ารูซี่ (*Bachiaria ruziziensis*) ซึ่งเป็นพืชที่มีอายุสั้นและมีการแผ่ขยายของรากมาก นำเมล็ดพืชที่จะใช้มาฆ่าเชื้อในสารละลาย 10 % chlorox เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 5 นาที อีก 3 ครั้งโดยเขย่าตลอดเวลา จากนั้นเพาะเมล็ดให้เป็นต้นกล้าในสภาพปลอดเชื้อในสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

เชื้อ AMF ที่นำมาใช้ในขั้นตอนนี้ได้แก่ *Glomus* sp. (50 สปอร์) ซึ่งแยกจากผลิตภัณฑ์ Mycostar[®] ด้วยกรรมวิธีเดียวกับการแยกสปอร์จากดินตัวอย่าง, *Scutellospora* sp. (50 สปอร์) จากห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นเชื้อชนิดที่พบว่าสามารถเพิ่มการเจริญของพืชได้หลากหลายประเภทและผลิตภัณฑ์ Mycostar[®] (10 กรัม) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีการใส่เชื้อ

เตรียมดินที่มีธาตุอาหารต่ำ ผสมกับทรายในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ตักใส่ถุงพลาสติกให้ได้ น้ำหนัก 2 กิโลกรัม แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที 2 ครั้ง ให้แต่ละครั้งทิ้งช่วงห่างกัน 24 ชั่วโมง เป็นวัสดุปลูก กระถางสำหรับปลูกใช้กระถางพลาสติกสีดำ ขนาด 8 นิ้ว ฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลาย 10 % chlorox เวลา 10 นาที แล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำถุงพลาสติกใส่ที่เจาะรูแล้วเพื่อป้องกันไม่ให้ น้ำขัง ร่องลงไปในกระถางที่เตรียมไว้ นำถุงพลาสติกที่ไม่เจาะรูอีกถุงสวมกระถางด้านนอก ทำให้เป็นกระถางที่ไม่ให้มีการไหลออกของน้ำ บรรจุวัสดุปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปในกระถางละ 2 กิโลกรัม จากนั้นใช้ช้อนกดผิวหน้าของวัสดุปลูกในกระถางให้เป็นหลุมตรงกลาง 1 หลุม ใส่ต้นกล้าปลอดเชื้อลงไป ในหลุม ใช้ปากคืบ คีบเอากระดากกรองที่มีสปอร์ AMF มาแตะกับรากของต้นกล้า ใช้น้ำกลั่นชะสปอร์และกระดากกรองให้ตกไปที่ก้นหลุม กลบดินมาปิดหลุมเบาๆ พรมน้ำให้ต้นกล้าเล็กน้อย รดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อทุกวัน ให้ปริมาณน้ำในดินอยู่ในระดับ field capacity เพื่อป้องกันน้ำขัง และให้ปุ๋ยสูตร Modified Hoagland's Nutrient Solution ทุก 7 วัน เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 1 สัปดาห์ ใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โรยบริเวณผิวหน้าวัสดุปลูก เพื่อรักษาความชื้น ปลูกพืชเป็นเวลา 90 วัน แล้วตรวจสอบผลโดยการหาเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของเชื้อและจำนวนสปอร์ที่พบในดิน

5.2 การคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการเก็บกักสปอร์ AMF

เตรียมวัสดุ 3 ชุด ได้แก่ ดินผสมทรายในอัตราส่วน 1:1, พีท (peat) 2000 มิลลิลิตร และ ดินผสมเพอร์ไลต์และทราย ในอัตราส่วน 2:1:1 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งวัสดุไว้ให้เย็น 1 วัน จากนั้นนำวัสดุไปทำการฆ่าเชื้ออีกครั้ง ดินที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ มีธาตุอาหารต่ำ โดยเฉพาะฟอสฟอรัส

พืชที่ใช้ในการทดลองคือหญ้ากินนีสีม่วง (*Panicum maximum*) และเบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium*) โดยนำเมล็ดหญ้ากินนีสีม่วงและยอดเบญจมาศมาฆ่าเชื้อในสารละลาย 10 % chlorox เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 5 นาที อีก 3 ครั้ง เพาะเมล็ดหญ้ากินนีสีม่วง บนสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อพรมให้ทั่ว ส่วนยอดของเบญจมาศจะปักชำในกระบะเพาะที่บรรจุขี้เถ้ากลบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นรดน้ำทุกวัน ต้นกล้าจะเจริญเติบโตประมาณ 15-20 วัน จึงนำลงปลูกในกระถางขนาด 8 นิ้ว ที่มีถุงพลาสติกใสเจาะรู ป้องกันไม่ให้น้ำขังรองอยู่ นำกระถางวางลงในถาดรองกระถาง การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 ดินผสมทรายในอัตราส่วน 1:1

ชุดที่ 2 พีท (peat) 2000 มิลลิลิตร

ชุดที่ 3 ดิน: เพอร์ไลต์: ทราย ในอัตราส่วน 2:1:1

ชุดหลุมตรงกลางผิวหน้าวัสดุปลูกลึก 2 นิ้ว นำกล้าต้นหญ้ากินนีสีม่วง และเบญจมาศ ใส่ลงในหลุม โดยใช้หญ้ากินนีสีม่วง 3 ต้นต่อหนึ่งกระถาง และเบญจมาศ 1 ต้นต่อ 1 กระถาง แล้วจึงใช้ปากคืบ คีบกระดากกรองที่มีสปอร์ของ *G. etunicatum* (50 สปอร์) และ *Scutellospora* sp. (50 สปอร์) มาแตะกับรากของต้นกล้า ใช้น้ำกลั่นชะสปอร์และกระดากกรองให้ตกไปที่ก้นหลุม กลบดินปิดหลุมเบา ๆ พรมน้ำให้ต้นกล้าเล็กน้อย นำกระถางทั้งหมดไปวางสุมในเรือนเพาะชำ รดน้ำทุกวัน ให้ปริมาณน้ำในดินอยู่ในระดับ field capacity เพื่อป้องกันน้ำขัง และให้ปุ๋ยสูตร Modified Hoagland's Nutrient Solution ทุก 7 วัน ปลูกพืชเป็นเวลา 60 วัน แล้วตรวจสอบผลโดยการหาเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของเชื้อและจำนวนสปอร์ที่พบในดิน

ผลการดำเนินงานวิจัย

1. พืชที่ใช้ผลิต biofuel - สบู่ดำ

1.1 ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา อาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซา (AMF) ในต้นสบู่ดำและการบ่งบอกชนิดของ AMF ที่พบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ในการศึกษานี้ ทำศึกษาจากแปลงสบู่ดำทั้งหมด 10 แหล่งตัวอย่าง ได้แก่ พื้นที่ศึกษาในจังหวัดเชียงราย 2 แหล่งตัวอย่าง ได้แก่ CR1 (19°54'N, 99° 48'E) CR2 (19°52'N, 99° 26'E) พื้นที่ศึกษาในจังหวัดเชียงใหม่ 4 แหล่งตัวอย่าง ประกอบด้วย CM1 (18°45'N, 98° 55'E) CM2 (18°09'N, 98° 30'E) CM3 (18°45'N, 98° 55'E) CM4 (18°44'N, 98° 54'E) พื้นที่ศึกษาในจังหวัดลำพูน 1 แหล่งตัวอย่าง คือ LP1 (18°34'N, 99° 07'E) พื้นที่ศึกษาในจังหวัดเลย 1 แหล่งตัวอย่าง คือ LO1 (17° 27'N, 101° 21'E) พื้นที่ศึกษาในจังหวัดขอนแก่น 1 แหล่งตัวอย่าง คือ KK1 (16° 23'N, 102° 53'E) และพื้นที่ศึกษาในจังหวัดหนองคาย 1 แหล่งตัวอย่าง คือ NK1 (17°51'N, 102° 43'E)

จากการเก็บตัวอย่างดินรอบรากและรากของสบู่ดำจาก 6 จังหวัดในประเทศไทยพบว่า พื้นที่ต่างๆ มีความแตกต่างกันดังได้บันทึกลักษณะของแต่ละพื้นที่ ประกอบด้วย อายุของต้นสบู่ดำ, ค่า pH ของดิน, % สารอินทรีย์ (%OM), ปริมาณฟอสฟอรัส (mg/kg), ปริมาณโพแทสเซียมที่พบ (mg/kg), %การเข้าอาศัยในรากจากการนับ ภาพโครงสร้างของ AMF ที่ปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น เวสติเคิล อาร์บัสคูล หรือ เส้นใย, ความหนาแน่นของสปอร์ในดิน 100 g, จำนวนชนิดของ AMF ที่พบ, ค่าดัชนีความหลากหลาย และความหนาแน่นของสปอร์ชนิดเด่นแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่า ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเข้าราก มากที่สุดจากตัวอย่างรากที่เก็บจากต้นสบู่ดำในจังหวัดเชียงใหม่ พื้นที่ศึกษา CM4 94.30% (ตารางที่ 1) รองลงมาคือพื้นที่ CM3 (93.20%) และ CM2 (87.50%) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการตรวจพบ การอยู่อาศัยร่วมกันระหว่าง AMF กับพืชชนิดอื่นในแฟมิลีเดียวกับสบู่ดำ (Youpensuk *et al.*, 2004; Zhao และ Zhiwei, 2007; Straker *et al.*, 2010) และยังพบอีกว่า AMF สามารถเข้ารากของสบู่ดำได้ไม่ว่าจะมีอายุการเพาะปลูกนานเท่าใด (Narendra *et al.*, 2009)

ความหนาแน่นของสปอร์ที่พบในแต่ละพื้นที่ศึกษามีจำนวนตั้งแต่ 1-83 สปอร์ ในดิน 100 กรัม โดยในแต่ละพื้นที่ศึกษามีความหนาแน่นของสปอร์แตกต่างกัน ($P < 0.05$) เมื่อนำมาคำนวณโดยใช้ Shannon-Weiner Index พบว่าจังหวัดหนองคายมีความหนาแน่นของสปอร์มากที่สุดมีค่า $H' = 0.95$ จำนวน 163 สปอร์ในดิน 100 กรัม รองลงมาได้แก่พื้นที่เชียงใหม่ 3 (150 สปอร์ในดิน 100 กรัม) และ เลย (112 สปอร์ในดิน 100 กรัม) ส่วนพื้นที่จังหวัดขอนแก่นมีค่า $H' = 0.18$ และผลจากการใช้ Simpson's Index เพื่อหาสปอร์ชนิดเด่น พบว่า มีค่าที่ได้ตั้งแต่ 0.0001-0.0173 ตามตารางที่ 1 เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความหนาแน่นของสปอร์แยกตามสกุลแล้วจะได้ เชื้อในสกุล *Acaulospora* 67%, *Gigaspora* 15%, *Glomus* 12% และ *Scutellospora* 6%

การศึกษาความหลากหลายของชนิดสปอร์ AMF จากตัวอย่างดินรอบรากต้นสบู่ดำพบว่า พื้นที่ศึกษา CM4 มีจำนวนชนิดของสปอร์ที่พบมากที่สุด (11 ชนิด) รองลงมาได้แก่ พื้นที่ศึกษาในหนองคาย เลย และ เชียงใหม่พื้นที่ 1 (8, 7 และ 6 ชนิด ตามลำดับ) AMF ที่พบจากพื้นที่ศึกษาทั้งหมด 34 ชนิด (ตารางที่ 2) ประกอบด้วย เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 4 สกุล คือ เชื้อในสกุล *Acaulospora* 17 ชนิด, *Gigaspora* 2 ชนิด, *Glomus* 10 ชนิด และ *Scutellospora* 5 ชนิด 1 เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ปริมาณของสปอร์แยกตามสกุล พบว่า เชื้อในสกุล *Acaulospora* มากที่สุด คิดเป็น 49% และ *Gigaspora* พบน้อยที่สุดเพียง 6% เมื่อเปรียบเทียบกับดินหุบเขาทางตะวันตกเฉียงใต้ของจีนที่พบ AMF มากถึง 43 สปีชีส์ (Zhao และ Zhiwei, 2007) และ 51 สปีชีส์ เมื่อทำการตรวจสอบดินในไร่ชาของอินเดีย (Singh *et al.*, 2008) ดังนั้นจำนวน 34 ชนิดของ AMF ที่ได้จากดินรอบรากสบู่ดำจึงไม่จัดว่ามีความหลากหลายสูงมากนัก

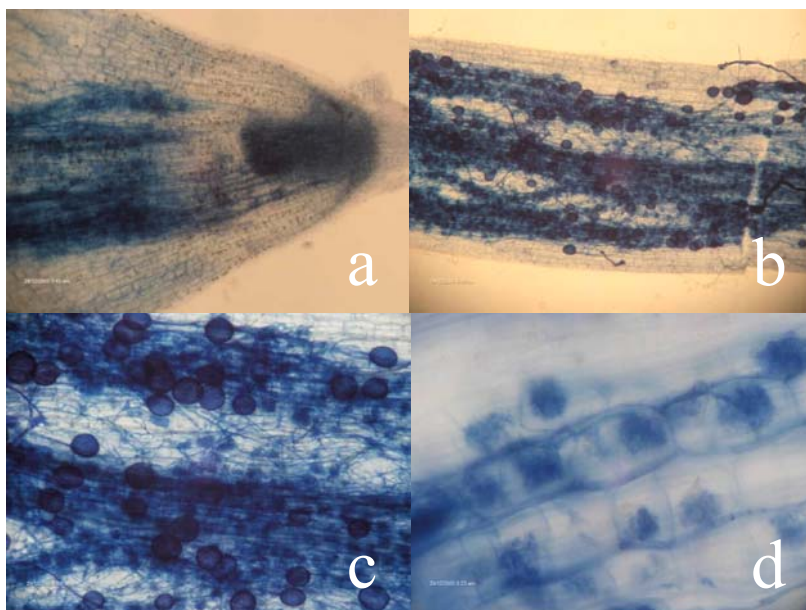
จากชนิดสปอร์ที่พบทั้งหมด พบว่าจัดเป็นชนิดเด่นได้ 7 ชนิด โดยคัดเลือกจากชนิดที่มีความหนาแน่นมากกว่า 40 สปอร์ในดิน 100 กรัม คือ *Acaulospora foveata*, *Acaulospora tuberculata*, *Acaulospora* sp. CMU-AMF09, *Acaulospora* sp. CMU-AMF14, *Acaulospora* sp. CMU-AMF26, *Gigaspora rosea* CMU-AMF29 และ *Gigaspora* sp. CMU-AMF28 ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานการพบเชื้อในจีนัส *Acaulospora* เป็น AMF ชนิดเด่นที่พบในดินบริเวณป่าแถบภาคเหนือของไทย (Nandakwang *et al.*, 2008; Wangmo, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าเป็น AMF ชนิดเด่นในดินที่มีความเป็นกรดสูงอีกด้วย (Abbott และ Robson, 1991)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างทั้งหมดจาก 6 จังหวัดแสดงอายุของต้นสุต๋า, ค่า pH ของดิน, % สารอินทรีย์ (%OM), ปริมาณฟอสฟอรัส (mg/kg), ปริมาณ โพแทสเซียมที่พบ (mg/kg), %การเข้าอาศัยในราก, ความหนาแน่นของสปอร์ในดิน 100 g, จำนวนชนิดของ AMF ที่พบ, ค่าดัชนีความหลากหลาย (diversity index) และความหนาแน่นของ สปอร์ชนิดเด่นของ 10 พื้นที่ศึกษาในประเทศไทย

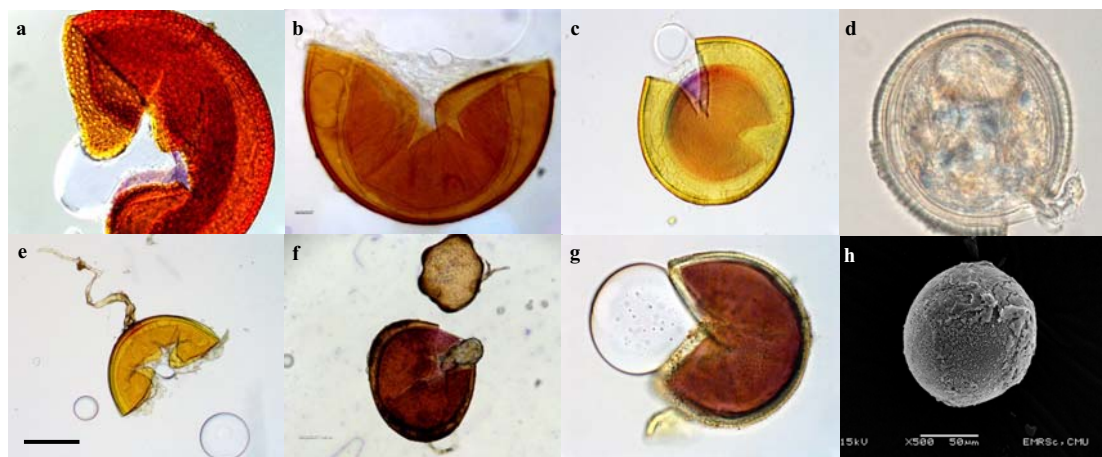
Site	Age (year)	pH ¹	OM ² (%)	N ³ (%)	Available P ⁴ (mg/kg)	Extractable K ⁵ (mg/kg)	Root colonization* (%)	Spore density* (100 g soil)	Species richness	Diversity index H'	Concentration of dominance C
Chiang Rai 1	>1	6.0	1.54	0.09	111.8	158.0	37.7±5.9a	27±0.9c	3	0.23	0.0006
Chiang Rai 2	5	5.3	7.22	0.44	121.4	1058.0	85.8±1.3d	44±1.4bc	4	0.31	0.0029
Chiang Mai 1	<1	6.0	3.30	0.15	94.3	198.5	66.0±4.9b	19±0.6a	6	0.21	0.0001
Chiang Mai 2	10	6.0	6.94	0.26	150.5	521.4	87.5±1.5d	34±0.7b	7	0.34	0.0004
Chiang Mai 3	10	6.9	4.30	0.19	75.2	204.0	93.2±2.7e	150±2.0f	5	0.85	0.0173
Chiang Mai 4	10	5.9	2.42	0.07	19.8	171.0	94.3±2.8e	85±1.8d	11	0.71	0.0030
Loei	4	5.9	2.68	0.15	147.4	232.4	64.4±4.2b	112±0.6e	7	0.77	0.0078
Lumphun	1	6.1	1.86	0.07	11.5	171.8	76.5±5.5c	41±0.6b	6	0.37	0.0009
Khon Kean	5	8.0	0.63	0.02	11.8	22.1	77.3±8.7b	21±0.6g	4	0.18	0.0006
Nong Khai	5	6.0	1.74	0.12	175.5	746.3	66.4±5.4c	163±1.5a	8	0.95	0.0172

¹1:5 H₂O, ²Organic matter by EDTA method ³Total nitrogen by Kjehldahl, ⁴Olsen method for phosphorus, ⁵NH₄OAc method for potassium

*The same letters in each column mean that there were no significant differences at $\alpha = 0.05$



ภาพที่ 4 โครงสร้างของ AMF ที่พบในรากของต้นสับดำ (a) โครงสร้าง AMF บริเวณปลายราก ขยาย 10 เท่า (b) การเข้าอาศัยในราก 100% ภาพขยาย 200 เท่า, (c) vesicles ภาพขยาย 400 เท่า และ (d) arbuscules ภาพขยาย 1000 เท่า



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อ AMF บางชนิดที่พบจากดินรอบรากต้นสับดำ; (a) *A. foveata* (AMF02), (b,h) *A. tuberculata* (AMF05), (c) *A. dilatata* (AMF09) , (d) *A. lacunosa* (AMF14) , (e) *Gigaspora rosea* (AMF29), (f) *Gigaspora* sp. (AMF28) และ (g) *A. scrobiculata* (AMF06) ย้อมสีด้วย Melzer's reagent hyphae. Bars: a, b, c, d, g = 38.125 μm (40x); e, f = 150 μm (10x); h = 50 μm

ตารางที่ 2 เปอร์เซนต์ของชนิด AMF ที่พบจากดินรอบรากต้นสับดำแยกตามแหล่งตัวอย่าง

Code	Species	Sample sites*										Occurrence (%)
		CR1	CR2	CM1	CM2	CM3	CM4	LO1	LP1	KK1	NK1	
AMF01	<i>Acaulospora spinosa</i>									+		1.64
AMF02	<i>Acaulospora foveata</i>									+	+	3.28
AMF03	<i>Acaulospora tuberculata</i>				+			+				3.28
AMF04	<i>Acaulospora colossica</i>							+	+			3.28
AMF05	<i>Acaulospora</i> sp.					+						1.64
AMF06	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	+	+	+	+	+	+				+	11.48
AMF07	<i>Acaulospora</i> sp.										+	1.64
AMF08	<i>Acaulospora denticulata</i>						+					1.64
AMF09	<i>Acaulospora dilatata</i>						+				+	3.28
AMF10	<i>Acaulospora rehmsii</i>			+	+							3.28
AMF11	<i>Acaulospora nicolsonii</i>				+				+		+	4.92
AMF12	<i>Acaulospora excavata</i>			+		+	+	+	+			8.2
AMF13	<i>Acaulospora</i> sp.		+									1.64
AMF14	<i>Acaulospora lacunosa</i>		+				+	+				4.92
AMF15	<i>Acaulospora</i> sp.		+									1.64
AMF16	<i>Acaulospora morrowiae</i>						+	+				3.28
AMF17	<i>Glomus</i> sp.							+		+		3.28
AMF18	<i>Glomus etunicatum</i>										+	1.64
AMF19	<i>Glomus</i> sp.								+			1.64
AMF20	<i>Glomus</i> sp.								+			1.64
AMF21	<i>Glomus clavisporum</i>				+							1.64
AMF22	<i>Glomus sinuosum</i>			+	+							3.28
AMF23	<i>Glomus</i> sp.									+		1.64
AMF24	<i>Glomus</i> sp.						+					1.64
AMF25	<i>Glomus</i> sp.					+	+					3.28
AMF26	<i>Acaulospora</i> sp.										+	1.64
AMF27	<i>Glomus fulvum</i>	+										1.64
AMF28	<i>Gigaspora</i> sp.						+	+				3.28
AMF29	<i>Gigaspora rosea</i>					+						1.64
AMF30	<i>Scutellospora</i> sp.						+					1.64
AMF31	<i>Scutellospora pellucida</i>	+		+			+				+	6.56
AMF32	<i>Scutellospora</i> sp.				+							1.64
AMF33	<i>Scutellospora</i> sp.			+								1.64
AMF34	<i>Scutellospora</i> sp.								+			1.64
Species richness		3	4	6	7	5	11	7	6	4	8	

*CR1: Chiang Rai (site 1); CR2: Chiang Rai (site 2); CM1: Chiang Mai (site 1); CM2: Chiang Mai (site 2); CM3: Chiang Mai (site 3); CM4: Chiang Mai (site 4); LO1: Loei; LP1: Lumphun; KK1: Khon Kean; NK1: Nong Khai

1.2 การบ่งบอกชนิดของ AMF ที่พบโดยใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา

DNA ที่มีคุณภาพจะถูกจำลองด้วย primer ที่เฉพาะเจาะจงกับ SSU และ LSU จากนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับเบสจากการทำ PCR ซึ่งลำดับเบสที่ได้ฝากไว้ใน GenBank (accession number GQ202191, GQ202192, GQ202193 และ GQ202194) หลังจากการ BLAST และวิเคราะห์แล้วพบว่า ลำดับเบสของเชื้อชนิด CMU05 และ CMU33 ในการศึกษาครั้งนี้ อ้างอิงได้จาก NCBI ว่าเป็นเชื้อราที่มีวิวัฒนาการมาจากกลุ่ม glomeralean เมื่อนำ SSU rDNA ของ CMU05 ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Entrophospora colombiana* ถึง 99% และ CMU33 คล้ายกับ *Scutellospora heterogama* 97% และ เมื่อนำ LSU rDNA ของ CMU05 ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Entrophospora colombiana* 91% และ CMU33 คล้ายกับ *Scutellospora heterogama* 97%

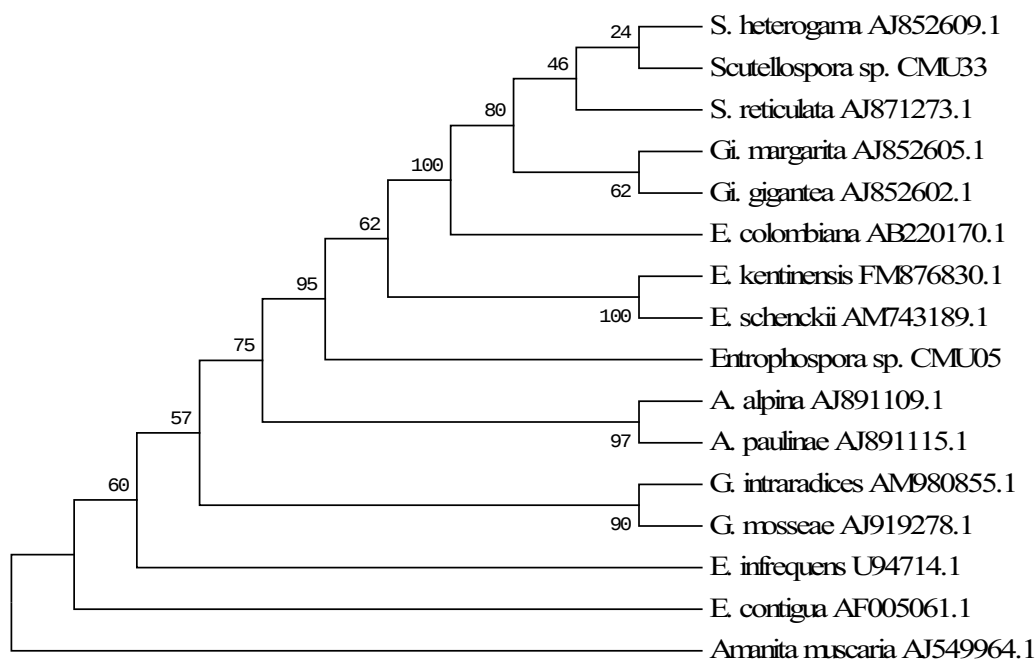
การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการทำในโปรแกรม MEGA4 ซึ่งใช้ Maximum Parsimony Method ในการวินิจฉัย SSU rDNA และเลือก parsimonious tree ที่ 3 ในทั้งหมด 11 แผนภูมิ (ความยาว = 437) ดังแสดงในภาพที่ 6

สำหรับการวินิจฉัย LSU rDNA ใช้ Neighbor-Joining Method ซึ่งได้ parsimonious tree เพียงแบบเดียวที่เหมาะสมที่สุดและมีความยาวเฉลี่ยเพียง 2.22462796 ดังแสดงในภาพที่ 7

สายวิวัฒนาการนี้ แสดงความสัมพันธ์ของ AMF เป้าหมาย กับเชื้อราในกลุ่ม Glomeromycota ชนิดอื่นๆ และ *Amanita muscaria* ซึ่งอยู่นอกกลุ่ม

Primer ชนิด NS31-AM1 ซึ่งใช้กับ SSU rDNA นั้นให้ค่า bootstrap ต่ำ เมื่อใช้กับ CMU05 และ ชนิดใกล้เคียง แต่ให้ค่า bootstrap สูง ใน CMU33 และ *Scutellospora heterogama* ในขณะที่ Primer ชนิด FLR3 และ FLR4 ที่ใช้สำหรับ LSU rDNA ให้ค่า bootstrap = 67 ใน CMU05, *Entrophospora colombiana* และ *Acaulospora mellae* แต่ให้ค่า bootstrap สูงใน CMU33 และ *Scutellospora heterogama*

จากข้อมูลดังกล่าว Primer ชนิด NS31-AM1 และ ชนิด FLR3-FLR4 เหมาะสมที่จะใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อราในสกุล *Scutellospora* มากกว่า *Entrophospora* เนื่องจากสามารถจัดกลุ่ม *Scutellospora* และ *Gigaspora* เข้าไว้ใน family เดียวกัน



ภาพที่ 6 Phylogenetic relationships ของ *Entrophospora* sp. CMU05 และ *Scutellospora* sp. CMU33 ในการวิเคราะห์ *Glomeromycota* ด้วย Maximum Parsimony จาก partial SSU rDNA sequences ของ AMF โดย The percentage values แสดง bootstrap values based on 1,000 replicates

การยืนยันชนิด

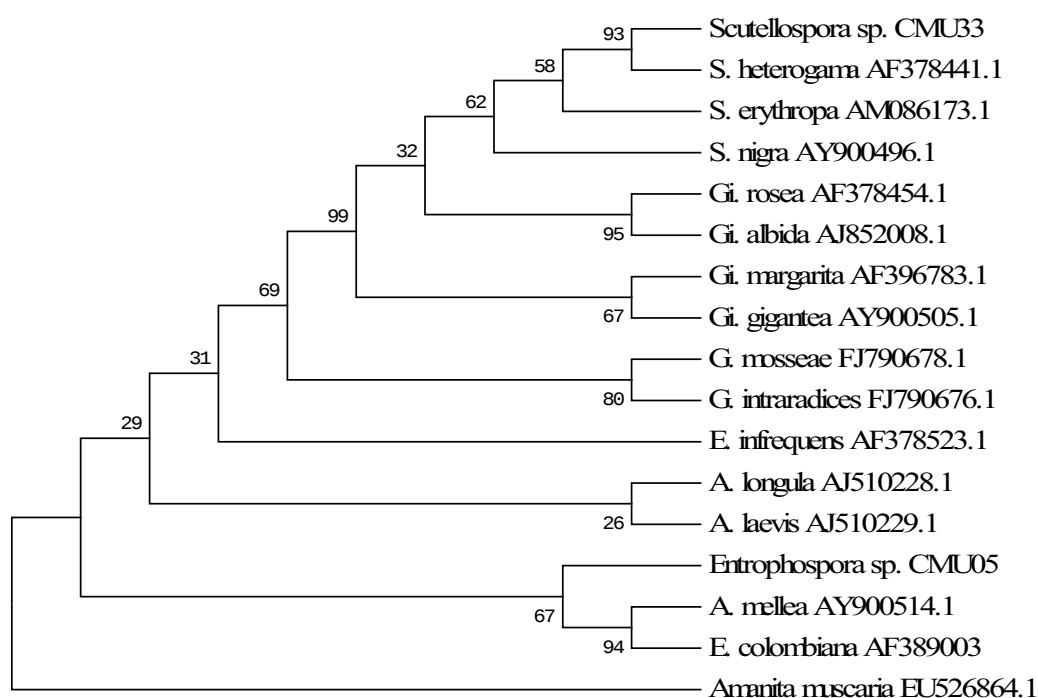
ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ของรากข้าวฟ่าง และสิ่งที่ได้จากดินรอบรากข้าวฟ่างที่ปลูกเชื้อทั้ง 2 ชนิด คือ CMU05 และ CMU33 ถูกนำมาลำดับและวิเคราะห์ พบว่า ผลจากการทำ PCR โดยใช้ Primer ชนิด NS31-AM1 ใน SSU rDNA ได้ความยาวประมาณ 550 คู่เบส และ การใช้ FLR3-FLR4 ใน LSU rDNA ได้ความยาวประมาณ 300-400 คู่เบส

ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ของ SSU rDNA และ LSU rDNA ได้จากการสร้างสปอร์ในดินรอบรากและรากต้นข้าวฟ่างหลังจากการปลูกสปอร์ ซึ่งหลังจากนำมาวิเคราะห์แล้ว จึงพบว่า ในแต่ละลำดับของนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างเหมือนกัน (100%) ทั้งใน CMU05 และ CMU33 การศึกษาครั้งนี้ ค้นพบว่า การปลูกเชื้อทั้ง CMU05 และ CMU33 ในรากของพืชอาศัย ทำให้เชื้อสามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ ในดินรอบราก

ผลของการใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยากับ SSU rDNA และ LSU rDNA สนับสนุนผลจากการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน ซึ่งจัด CMU05 เป็นสกุล *Entrophospora* เนื่องจากมีความใกล้เคียงมากกว่าสกุล *Acaulospora* อีกทั้งยังพบว่า มีรูปแบบของการสร้าง sporiferous saccule ซึ่งเป็นลักษณะของ *Entrophospora* สิ่งสำคัญอีกประการหนึ่งคือ *E. colombiana* และ *Ac. mellae* มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก จึง

ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานแยกออกจากกันอย่างชัดเจน หากไม่พบ saccule หรือ observing scar ซึ่งมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

อย่างไรก็ตามความแตกต่างของลำดับเบสระหว่าง CMU05 และ *Entrophospora colombiana* มีน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *Acaulospora mellea* เมื่อนำมาประกอบกับโครงสร้างของผนัง และองค์ประกอบต่างๆ ซึ่งสนับสนุนข้อมูลตาม phylogenetic tree ดังนั้นจึงอาจจะจัด CMU05 เป็น *Entrophospora colombiana* เนื่องจากข้อมูลทั้งทางอนุชีววิทยาและสัณฐานวิทยาที่สัมพันธ์กับเชื้อชนิดนี้ แม้ว่าจะยังมีบางลักษณะที่ไม่แน่นอน ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมในขณะที่สปอร์เจริญ ดังเช่นที่ Morton (1988) พิจารณา ความไม่แน่นอนในการเกิดปฏิกริยาของผนังชั้นนอกสปอร์ ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากสภาวะแวดล้อม ดังนั้น ในกรณีศึกษาจึงไม่นำความแตกต่างนี้มาใช้ในการจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน



ภาพที่ 7 Phylogenetic relationships ของ *Entrophospora* sp. CMU05 และ *Scutellospora* sp. CMU33 ในการวิเคราะห์ *Glomeromycota* ด้วย Maximum Parsimony จาก partial LSU rDNA sequences ของ AMF โดย The percentage values แสดง bootstrap values based on 1,000 replicates

ส่วนเชื้อที่นำมาศึกษาอีกชนิดหนึ่ง คือ CMU33 นั้น มีความคล้ายคลึงกับ *Scutellospora heterogama* มากที่สุด แต่ขนาดและการทำปฏิกิริยากับสารละลาย Melzer's ยังคงแตกต่างกันกับ *Scutellospora heterogama* โดย CMU33 มีขนาดใหญ่กว่าและผนังสปอร์มีสีต่างกับ *Scutellospora heterogama* เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย Melzer's

1.3 การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อสับดำ

จากการทดสอบผลของเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซาชนิดต่าง ๆ กับการเจริญเติบโตของต้นกล้าสับดำ พบว่าการใส่เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซาทุกกรรมวิธีโดยเฉพาะหลังการปลูกเชื้อ 15, 30 และ 45 วัน ทำให้ลำต้นสับดำสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยตลอดการทดลอง *Scutellospora* sp. AMF33 มีผลต่อการเพิ่มความสูงของต้นกล้ามากที่สุด มีความสูงของลำต้นหลังจากปลูกเชื้อ 15–90 วัน เท่ากับ 11.83–15.93 cm และสูงกว่าชุดควบคุมถึง 4.7 cm ส่วนการใช้ *Glomus etunicatum*, สปอร์ผสมของเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซาทั้ง 5 ชนิด และราเอนโดไมคอร์ไรซาที่ขายเป็นการค้า มีผลต่อการเพิ่มความสูงของต้นกล้ารองลงมา (ตารางที่ 5, ภาพที่ 8) หลังจากปลูกเชื้อ 30 วัน เป็นต้นไป พบว่าการใส่เชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซาทุกกรรมวิธีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมช่วยเพิ่มขนาดเส้นรอบวงลำต้นสับดำอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการปลูกเชื้อแต่ละชนิดให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตาม การใช้ *Scutellospora* sp. AMF33 ทำให้ขนาดเส้นรอบวงลำต้นใหญ่มากที่สุดโดยมีขนาดเพิ่มขึ้นถึง 2.4 cm ภายใน 90 วัน (ตารางที่ 6) และเชื้อชนิดนี้ยังมีผลต่อน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและราก ของสับดำในทำนองเดียวกัน (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 5 ผลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 5 ชนิด ต่อความสูงของต้นสับดำ เปรียบเทียบกับ ชุดควบคุม

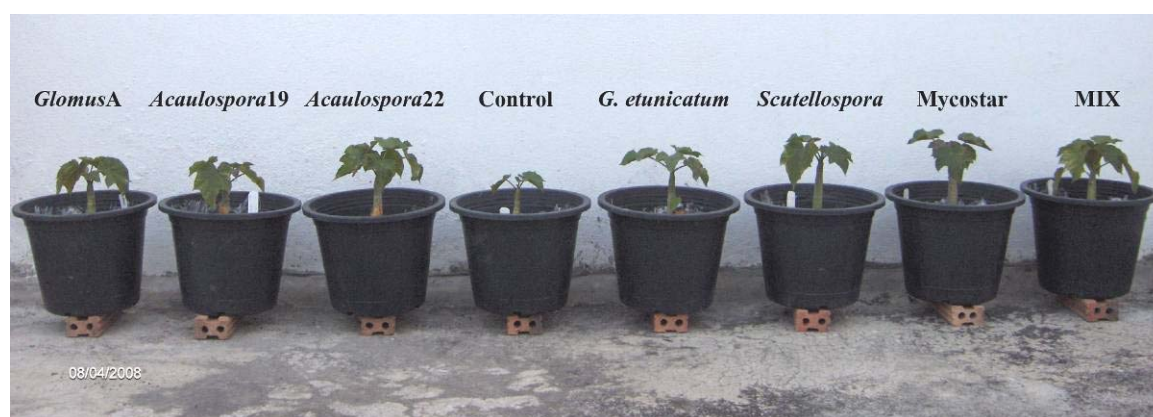
Treatment	Plant height after inoculation date (cm, mean $\pm$ SD)					
	15 days	30 days	45 days	60 days	75 days	90 days
• Control	7.13 $\pm$ 0.48a	9.58 $\pm$ 1.73a	9.68 $\pm$ 1.64a	9.83 $\pm$ 1.51a	9.88 $\pm$ 1.49a	11.60 $\pm$ 2.29a
• <i>Acaulospora</i> sp. No.19	8.50 $\pm$ 1.47ab	10.33 $\pm$ 1.56ab	10.63 $\pm$ 1.75ab	11.18 $\pm$ 1.79a	11.25 $\pm$ 1.85a	13.10 $\pm$ 1.61a
• <i>Acaulospora</i> sp. No.22	9.63 $\pm$ 3.01ab	10.95 $\pm$ 2.87ab	11.05 $\pm$ 2.86ab	11.30 $\pm$ 2.97a	11.43 $\pm$ 3.10a	13.35 $\pm$ 3.28a
• <i>Glomus</i> sp.	8.75 $\pm$ 1.32ab	10.75 $\pm$ 1.19ab	11.15 $\pm$ 1.25ab	11.50 $\pm$ 1.16a	11.88 $\pm$ 1.01a	13.58 $\pm$ 1.31a
• <i>Glomus etunicatum</i>	10.33 $\pm$ 3.19ab	11.83 $\pm$ 2.55ab	12.23 $\pm$ 2.53ab	12.68 $\pm$ 2.49a	13.05 $\pm$ 2.58a	13.43 $\pm$ 3.33a
• <i>Scutellospora</i> sp. AMF33	11.83 $\pm$ 3.03b	13.63 $\pm$ 2.93b	13.88 $\pm$ 2.66b	14.13 $\pm$ 2.39a	14.13 $\pm$ 2.39a	15.93 $\pm$ 1.51a
• Mycostar	10.38 $\pm$ 3.12b	11.63 $\pm$ 2.61ab	11.80 $\pm$ 2.39b	11.93 $\pm$ 2.25a	12.05 $\pm$ 2.11a	13.83 $\pm$ 2.29a
• Mix 5 species	10.25 $\pm$ 3.52b	12.00 $\pm$ 2.89ab	12.25 $\pm$ 2.63b	12.60 $\pm$ 2.36a	12.88 $\pm$ 2.21a	14.38 $\pm$ 2.22a

*The same letters in each column mean that there were no significant differences at $\alpha \leq 0.05$

ตารางที่ 6 ผลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซ่า 5 ชนิด ต่อเส้นรอบวงลำต้นของต้นสนุ่ดำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Treatment	Stem diameter after inoculation date (cm, mean $\pm$ SD)					
	15 days	30 days	45 days	60 days	75 days	90 days
• Control	2.38 $\pm$ 1.80a	2.58 $\pm$ 0.65a	2.70 $\pm$ 0.57a	3.00 $\pm$ 0.77a	3.18 $\pm$ 0.83a	3.68 $\pm$ 0.56a
• <i>Acaulospora</i> sp. No.19	1.93 $\pm$ 0.43a	3.25 $\pm$ 0.29abc	3.50 $\pm$ 0.24b	3.83 $\pm$ 0.32ab	4.13 $\pm$ 0.25ab	4.30 $\pm$ 0.24ab
• <i>Acaulospora</i> sp. No.22	2.13 $\pm$ 0.48a	3.13 $\pm$ 0.75abc	3.53 $\pm$ 0.90b	3.85 $\pm$ 0.97ab	4.05 $\pm$ 1.04ab	4.45 $\pm$ 0.91ab
• <i>Glomus</i> sp.	2.28 $\pm$ 0.52a	2.95 $\pm$ 0.67ab	3.53 $\pm$ 0.52b	4.00 $\pm$ 0.47bc	4.63 $\pm$ 0.75b	4.63 $\pm$ 0.75b
• <i>Glomus etunicatum</i>	2.63 $\pm$ 0.25a	3.58 $\pm$ 0.15bc	3.85 $\pm$ 0.29b	4.13 $\pm$ 0.46bc	4.38 $\pm$ 0.63b	4.75 $\pm$ 0.33b
• <i>Scutellospora</i> sp. AMF33	2.60 $\pm$ 0.49a	3.90 $\pm$ 0.12c	4.23 $\pm$ 0.17b	4.65 $\pm$ 0.24bc	5.00 $\pm$ 0.00b	5.00 $\pm$ 0.00b
• Mycostar	2.68 $\pm$ 0.24a	3.80 $\pm$ 0.34c	4.13 $\pm$ 0.45b	4.40 $\pm$ 0.68bc	4.68 $\pm$ 0.83b	4.55 $\pm$ 0.64b
• Mix 5 species	2.63 $\pm$ 0.48a	3.70 $\pm$ 0.60bc	4.13 $\pm$ 0.25b	4.80 $\pm$ 0.24c	4.88 $\pm$ 0.25b	4.93 $\pm$ 0.30b

*The same letters in each column mean that there were no significant differences at $\alpha \leq 0.05$



ภาพที่ 8 ต้นสนุ่ดำหลังจากการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซ่าชนิดต่างๆ 90 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 7 ผลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 5 ชนิด ต่อน้ำหนักสดและแห้งของลำต้นและราก ของสับปะรดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Treatment	Shoot fresh weight (g, mean $\pm$ SD)	Shoot dry weight (g, mean $\pm$ SD)	Root fresh weight (g, mean $\pm$ SD)	Root dry weight (g, mean $\pm$ SD)	Root colonization (%)
• Control	13.59 $\pm$ 8.72a	4.86 $\pm$ 4.62a	2.91 $\pm$ 2.44a	0.96 $\pm$ 0.82a	0
• <i>Acaulospora</i> sp. No.19	20.12 $\pm$ 5.33ab	7.16 $\pm$ 2.22ab	3.68 $\pm$ 1.29a	1.22 $\pm$ 0.44a	75
• <i>Acaulospora</i> sp. No.22	24.31 $\pm$ 4.99b	9.28 $\pm$ 3.72ab	3.83 $\pm$ 1.85a	1.21 $\pm$ 0.63a	73
• <i>Glomus</i> sp.	21.60 $\pm$ 4.45ab	8.15 $\pm$ 1.95ab	3.59 $\pm$ 0.60a	1.07 $\pm$ 0.21a	85
• <i>Glomus etunicatum</i>	25.24 $\pm$ 6.28b	8.20 $\pm$ 4.53ab	3.44 $\pm$ 1.36a	0.93 $\pm$ 0.49a	55
• <i>Scutellospora</i> sp.	28.52 $\pm$ 3.54b	11.70 $\pm$ 2.54b	4.91 $\pm$ 1.01a	1.66 $\pm$ 0.46a	80
AMF33					
• Mycostar	26.21 $\pm$ 5.12b	10.20 $\pm$ 2.60ab	4.31 $\pm$ 0.60a	1.24 $\pm$ 0.18a	77
• Mix 5 species	27.70 $\pm$ 4.65b	11.53 $\pm$ 4.22b	4.15 $\pm$ 0.23a	1.22 $\pm$ 0.19a	87

*The same letters in each column mean that there were no significant differences at $\alpha \leq 0.05$

1.4 การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของ AMF ที่เหมาะสมต่อสับปะรด

จากการปลูกเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซาแต่ละชนิดในต้นข้าว ข้าวฟ่าง ข้าวโพด เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าการใส่ *A. tuberculata* AMF05 หรือ *Scutellospora* sp. มีผลช่วยเพิ่มการเจริญ ของพืชดังกล่าวเพียงเล็กน้อย โดยความสูงของลำต้น น้ำหนักแห้งของลำต้นและรากใกล้เคียงกับ พืชในชุดควบคุม (ตารางที่ 8) ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากความสามารถในการผลิตสปอร์ที่แตกต่างกันเมื่อ AMF อยู่อาศัยกับพืชอาศัยที่แตกต่างกันออกไป (Mukerji *et al.*, 2002) หรือแม้แต่วิธีการคัดเลือกก็มีส่วนต่อการเพิ่มจำนวนของ AMF เช่นเดียวกัน (Ryan and Graham, 2002) ในขณะที่การปลูกเชื้อแต่ละชนิดในต้นลูกเดี๋ยเป็นเวลา 4 เดือน พบว่าการใส่เชื้อรา AMF ทุกชนิดมีผลต่อการเจริญของต้นลูกเดี๋ย โดยเฉพาะ *Piriformospora indica* ทำให้น้ำหนักแห้งของลำต้นลูกเดี๋ยมากกว่าในชุดควบคุม หรือการปลูกเชื้อรา AMF ชนิดอื่น อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9) สำหรับต้นดาวเรืองหลังจากการปลูกเชื้อแต่ละชนิดเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าการใส่เชื้อมีผลต่อการเจริญของต้นดาวเรืองฝรั่งเศษอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะ *G. etunicatum* ทำให้ความสูงของลำต้น น้ำหนักแห้งของลำต้น ความกว้างของทรงพุ่ม และจำนวนดอก ต่อต้นของดาวเรืองฝรั่งเศษมากที่สุด คือ 8.35 cm, 12.25 g/pot, 7.75 cm และประมาณ 8 ดอกต่อต้น ตามลำดับ สำหรับเชื้อที่มีผลต่อลักษณะดังกล่าวของต้นดาวเรืองฝรั่งเศษรองลงมาคือ *P. indica* อย่างไรก็ตามการปลูกเชื้อด้วย *P. indica* มีผลต่อความสูงของลำต้นมากที่สุด (ตารางที่ 10) นอกจากนี้ พบว่าการปลูกเชื้อ *G. etunicatum* กับต้นลูกเดี๋ยและดาวเรืองฝรั่งเศษสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้มาก ถึง 2739 และ 1493 สปอร์ต่อดิน 100 g ตามลำดับ การ

ปลูกเชื้อ *Scutellospora* sp. กับต้นข้าวฟ่าง และลูกเดี๋ย สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้มากถึง 2633 และ 1460 สปอร์ต่อดิน 100 g ตามลำดับ ส่วนการปลูกเชื้อ *A. tuberculata* AMF05 กับต้นข้าวฟ่างและข้าวโพด สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้ มากที่สุด คือ 19835 และ 5166 สปอร์ต่อดิน 100 g ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยจำนวนมากที่พบว่า สามารถใช้ข้าวฟ่างเป็นพืชอาศัยสำหรับเพิ่มปริมาณสปอร์ของ AMF ได้เป็นอย่างดี (Brundrett *et al.*, 1996; Dabire *et al.*, 2007; Habte และ Osorio, 2001) สำหรับการปลูกเชื้อกับต้นข้าว ยังไม่สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้แม้ว่าจะพบการเจริญของเชื้อราในรากก็ตาม (ตารางที่ 8-10)

ตารางที่ 8 ผลของการใส่ราเอนโดไมคอร์ไรซาต่อการตอบสนองของต้นข้าว ข้าวฟ่าง และ ข้าวโพด

AMF species	Height (cm)	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root fresh weight (g)	Root dry weight (g)	Colonization (%)	Spore density (/100 g soil)
Rice							
• <i>Acaulospora tuberculata</i> AMF05	62.33	70.62	51.54	54.29	44.07	24.00	0
• <i>Scutellospora</i> sp.	62.67	71.41	52.33	57.18	45.31	48.67	0
• Control	62.50	69.47	51.24	53.24	43.70	0.00	0
Sorghum							
• <i>Acaulospora tuberculata</i> AMF05	67.33	77.00	63.36	71.66	66.40	68.00	19835
• <i>Scutellospora</i> sp.	63.92	74.63	55.36	69.05	63.39	64.00	2633
• Control	64.30	73.21	56.49	67.40	59.87	0.00	0
Corn							
• <i>Acaulospora tuberculata</i> AMF05	67.50	53.67	48.24	45.93	41.97	54.00	5166
• <i>Scutellospora</i> sp.	66.33	53.50	48.91	45.77	40.91	32.00	0.00
• Control	67.00	52.50	47.19	43.27	38.49	0.00	0.00

ตารางที่ 9 ผลของการใส่เชื้อทดสอบต่อการตอบสนองของต้นลูกเดี๋ย

Fungal species	Height (cm)	Shoot dry weight (g/pot)	Root dry weight (g/pot)	Colonization (%)	Spore density (/100 g soil)
• <i>Glomus etunicatum</i>	70.52a	57.37a	55.22a	31.50	2738.75
• <i>Acaulospora</i> sp.	70.60a	54.17a	59.67a	46.00	8.25
• <i>Acaulospora tuberculata</i> AMF005	66.50a	56.45a	52.78a	49.33	300.33
• <i>Scutellospora</i> sp.	68.21a	55.96a	56.02a	64.29	1459.96
• <i>Piriformospora indica</i>	72.72a	71.39b	44.81a	74.50	-
• Control	68.47a	57.09a	49.28a	0	0

ตารางที่ 10 ผลของการใส่เชื้อทดสอบต่อการตอบสนองของต้นดาวเรือง

Fungal species	Height (cm)	Shoot dry weight (g/pot)	Shuerb diameter (cm)	No. flower/ plant	Colonization (%)	Spore density (/100 g soil)
1. <i>Glomus etunicatum</i>	11.12b	8.35c	12.25c	7.75b	92.75	1493
2. <i>Scutellospora</i> sp.	7.22a	5.29ab	4.83a	1.75a	67.75	20
3. <i>Piriformospora indica</i>	11.76b	6.07b	8.74b	2.75a	78.25	-
4. Control	6.81a	5.22a	4.31a	1.00a	0	0

2. พืชเครื่องดื่ม – กาแฟ

2.1 ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา อาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซา (AMF) ในดินกาแฟ และการบ่งบอกชนิดของ AMF ที่พบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากกาแฟจาก 9 แหล่งในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย ซึ่งแต่ละพื้นที่ที่มีความแตกต่างกันทางสภาพแวดล้อมคือ มีทั้งไร่กาแฟที่เป็นระบบวนเกษตรและบางแหล่งเป็นระบบปลูกร่วมกับไม้ผล จึงมีชนิดของพืชให้ร่มเงาแตกต่างกัน และลักษณะของสี รวมทั้งเนื้อดินก็มีลักษณะที่แตกต่างกันด้วย (ภาคผนวก ก) หลังจากนำสปอร์ของเชื้อรา AMF ที่ได้จากขั้นตอน wet sieving และ 50% sucrose centrifugation method มาจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological identification) ที่สามารถตรวจสอบได้โดยกล้องกล้องจุลทรรศน์ พบว่า ดินจากแต่ละแหล่งตัวอย่างมีสปอร์ของ เชื้อรา AMF แตกต่างกันทั้งชนิดและจำนวน สามารถจำแนกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาที่พบเป็น 3 สกุล รวมทั้งหมด 29 ชนิด ได้แก่ *Acaulospora* 11 ชนิด, *Ambispora* 2 ชนิด และ *Glomus* 16 ชนิด ซึ่งมีรายงานว่าพบเชื้อราทั้ง 3 สกุล ในดินรอบรากของพืชหลายชนิด เช่น ดาวเรือง (Linderman and Davis, 2004) มะเขือเทศ (Scervino *et al.*, 2005) หนุ่ย (Renker *et al.*, 2005) มะกอก (Calvente *et al.*, 2004) รวมถึงพืชที่เจริญในดินเค็ม เช่น *Aster tripolium* และ *Inula crithmoides* (Carvalho *et al.*, 2001) หรือแม้กระทั่งพืชทะเลทรายที่เจริญในที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ (Shi *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามเชื้อราชนิดเด่นที่พบในพืชดังกล่าว มักจะเป็นเชื้อราในสกุล *Glomus* แต่ดินรอบรากกาแฟในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อราสกุล *Acaulospora* เป็นชนิดเด่น โดยเฉพาะ *Acaulospora koskei*, *Ac. laevis*, *Ac. morrowiae* และ *Ac. scrobiculata* ซึ่งมีความถี่ในการพบได้มากทั้งในดินจากต้นกาแฟจากเชียงใหม่และเชียงราย ส่วนเชื้อ *Gl. aggregatum* แม้ว่าจะพบจำนวนสปอร์มากที่สุดแต่พบเฉพาะในดินจากต้นกาแฟเพียงแหล่งเดียวจากหมู่บ้านคอยช้าง จังหวัดเชียงรายเท่านั้น

ดินตัวอย่าง บริเวณหมู่บ้าน คอยช้าง ตำบลวาวี อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย (CR4) มีความหนาแน่นของสปอร์ เชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซา มากที่สุดจำนวน 63.66 สปอร์ ต่อดิน 100 กรัม รองลงมาเป็นดินตัวอย่างจากจังหวัดเชียงรายเช่นเดียวกัน (CR3 และ CR2) ซึ่งมีจำนวน 41.00 และ 40.33 สปอร์ ต่อดิน 100 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 5) ในแปลงปลูกกาแฟอาราบิก้ากลางแจ้งนั้นมี เชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาอาศัยอยู่ร่วมกับพืช ทั้งที่เป็นระบบวนเกษตร (ปลูกพืชหลายชนิดร่วมกัน) และแปลงที่ปลูกเฉพาะต้นกาแฟ แต่จะพบในระบบวนเกษตรมากกว่า (Cardoso *et al.*, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าในระบบการปลูกกาแฟปะปนไปกับพืชป่าตามธรรมชาติ มีทั้งความหนาแน่น และความหลากหลายของสปอร์มากที่สุดในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 9 แหล่ง

ดินตัวอย่างจากบ้านป่าแป๋ อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ (CM3) พบชนิดของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซามากที่สุดคือ 15 ชนิด แม้ว่าจะมีความหนาแน่นของสปอร์เพียง 29.66 สปอร์ในดิน 100 กรัม รองลงมาเป็นดินตัวอย่างจาก จังหวัดเชียงใหม่ (CM4) และเชียงราย (CR3 และ CR4) จำนวน 12 และ

11 ชนิด ตามลำดับ (ภาพที่ 6) เชื้อที่พบจำนวนสปอร์มากที่สุด คือ *Gl. aggregatum* แต่พบเฉพาะในจังหวัด เชียงรายเท่านั้น และเชื้อที่พบบ่อยในแหล่งที่เก็บตัวอย่าง โดยพบในดินตัวอย่างจาก 5 แหล่งขึ้นไป คือ *Acaulospora koskei*, *Ac. laevis*, *Ac. morrowiae* และ *Ac. scrobiculata* (ตารางที่ 11) องค์ประกอบของเนื้อ ดินมีผลต่อปริมาณของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Muchvej, 2009) ในการศึกษาพบว่า ดินตัวอย่าง ที่มีเนื้อเหนียวเป็นดินที่พบจำนวนชนิดของ เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา มากที่สุด ซึ่งขัดแย้งกับผล การศึกษาก่อนหน้าที่รายงานว่าดินที่มีส่วนประกอบของโคลนปริมาณมาก จะพบความหลากหลายของเชื้อ ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาน้อยกว่า (Mathimaran *et al.*, 2005) และดินจากแหล่งเดียวกันนี้เองก็พบว่ามี ความหนาแน่นของสปอร์มากเป็นอันดับ 4 คือ 29.66 สปอร์ในดิน 100 g. ซึ่งสาเหตุที่พบจำนวนชนิด และ ความหนาแน่นของเชื้อเช่นนี้ น่าจะมีสาเหตุมาจากดินที่มีลักษณะเหนียวและสีส้มแดงนี้ เป็นดินที่ขาด ความอุดมสมบูรณ์ จึงมี เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก

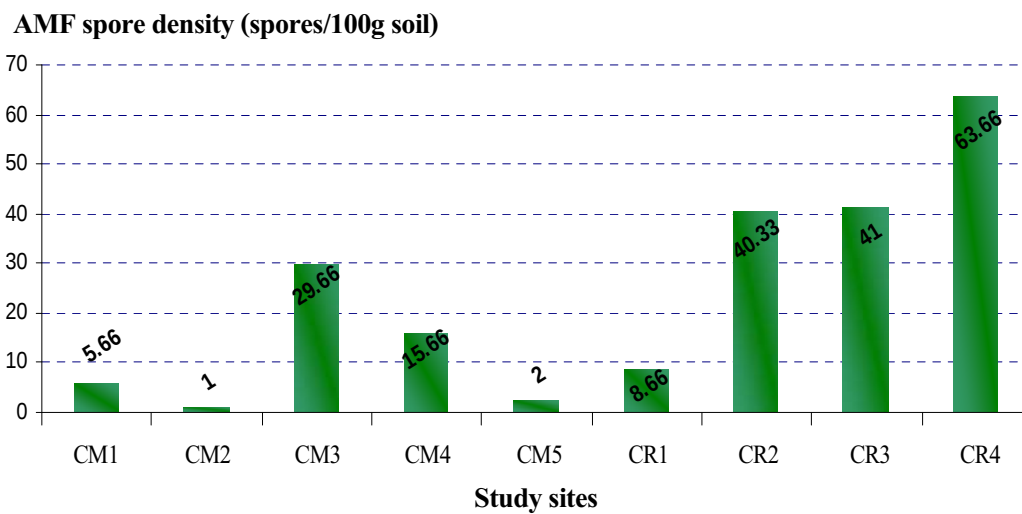
ตารางที่ 11 ชนิดและจำนวน ของ เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ที่พบในดินรอบรากต้นกาแฟอราบิก้า
(CM=Chiang Mai, CR= Chiang Rai)

AMF Species	% Relative Abundance									%
	CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CR1	CR2	CR3	CR4	ORA*
<i>Acaulospora koskei</i>	29.4	33.33	11.2	4.25		7.69	4.13	18.70	6.28	9.62
<i>Acaulospora laevis</i>			4.49		33.33	61.54		17.89	4.19	8.33
<i>Acaulospora mellea</i>				2.13	16.67		12.40			3.05
<i>Acaulospora morrowiae</i>			2.25	6.38	50.00	3.85	34.71		5.24	9.29
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	11.76		4.49	10.64		3.85	42.15	4.07		10.91
<i>Acaulospora</i> sp. 1								0.81	7.85	2.73
<i>Acaulospora</i> sp. 3								13.82	1.05	3.05
<i>Glomus aggregatum</i>								6.50	56.02	18.46
<i>Glomus etunicatum</i>			31.46	12.77					3.66	6.58
<i>Glomus fasciculatum</i>	5.88			2.13				8.13	0.52	2.09
<i>Glomus glomerulatum</i>			19.10							2.73
<i>Glomus</i> sp.1									11.52	3.53
<i>Glomus</i> sp.2				44.68						3.37
<i>Glomus</i> sp.4								25.20	3.14	5.94
Rare AMF ***	52.92	66.67	27.01	17.02	0.00	23.07	6.61	4.88	0.53	10.32
Total spore number	17	3	89	47	6	26	121	123	191	
Spore density **	5.66	1.00	29.66	15.66	2.00	8.66	40.33	41.00	63.66	
AMF species richness	5	2	14	12	3	6	7	11	11	

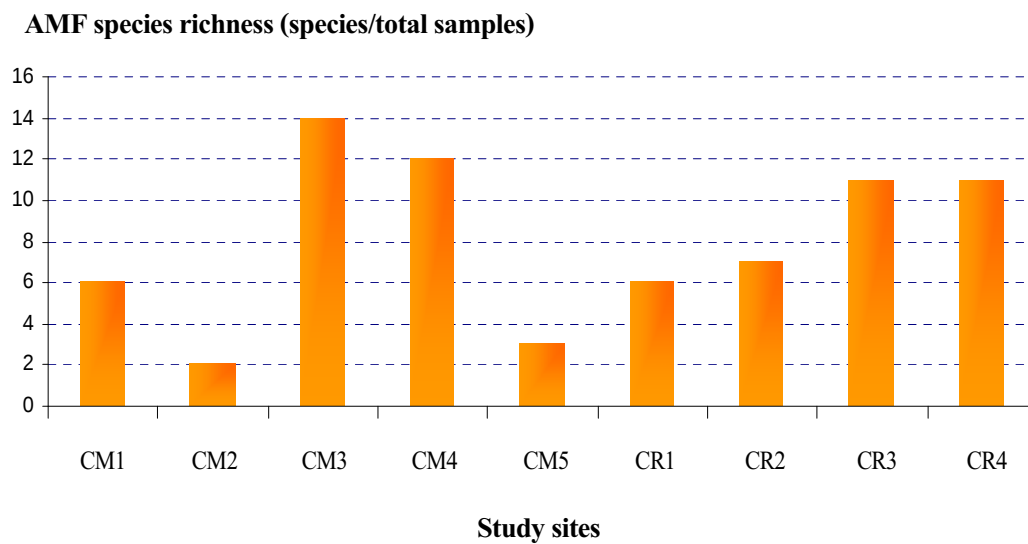
* % ORA = % Overall Relative Abundance, ** Spore Density (per 100 g. soil)

*** AMF Species have % Overall Relative Abundance less than 2 % consist in

<i>Acaulospora elegans</i> [1.12%]	<i>Acaulospora longula</i> [0.32%]	<i>Acaulospora spinosa</i> [0.32%]
<i>Acaulospora</i> sp. 2 [1.12%]	<i>Ambispora appendicula</i> [0.32%]	<i>Ambispora leptoticha</i> [0.16%]
<i>Glomus ambisporum</i> [1.77%]	<i>Glomus constrictum</i> [0.16%]	<i>Glomus delhiense</i> [0.64%]
<i>Glomus geosporum</i> [1.77%]	<i>Glomus magnicaule</i> [0.16%]	<i>Glomus microaggregatum</i> [0.32%]
<i>Glomus tortuosum</i> [0.48%]	<i>Glomus rubiforme</i> [1.44%]	<i>Glomus</i> sp. 3 [0.16%]



ภาพที่ 5 แผนภูมิเปรียบเทียบความหนาแน่นของสปอร์ AMF ที่พบในดินจาก 9 แหล่งตัวอย่าง



ภาพที่ 6 แผนภูมิเปรียบเทียบจำนวนชนิดของสปอร์ AMF ที่พบในดินจาก 9 แหล่งตัวอย่าง

2.2 การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อกาแฟ

ตรวจสอบผลการทดลองโดยวัดความสูงของต้น ความยาว และการแผ่ขยายของราก น้ำหนักสด และ น้ำหนักแห้งของต้นและราก ค่าที่นำมาใช้เพื่อดูการเจริญของรากคือค่าการแผ่ขยายของราก/ความยาว ราก โดยความยาวและการแผ่ขยายของรากนี้ เป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการใช้ฟอสฟอรัสใน ดินของกล้าพืช (Green *et al.*, 2005) ซึ่งเป็นจุดมุ่งหมายโดยตรงที่จะพัฒนาความสามารถของกล้า และ ระบบรากสำหรับนำออกปลูกในแปลง ส่วนค่าอื่นๆแสดงการเพิ่มการเจริญเติบโตของกล้า

เมื่อนำค่าทั้งหมดที่วัดได้ไปคำนวณโดยวิธีการทางสถิติแล้ว พบว่าปริมาณสปอร์ที่ให้ในแต่ละ กลุ่มคือ 50 และ 200 สปอร์นั้น ไม่มีผลต่อการตอบสนองของกล้ากาแฟ ในทุกๆกลุ่มการทดลองที่ได้รับ สปอร์ ทั้งได้รับ 50 และ 200 สปอร์ ตอบสนองไม่ต่างกัน การเจริญของโครงสร้างพืชที่มีความแตกต่างกัน เป็นผลมาจากชนิดของเชื้อที่ได้รับเท่านั้น โดยการประมวลผลจะแยกเป็นการตอบสนองด้านต่างๆ คือ ความสูงของต้น, อัตราส่วนการแผ่ขยายของราก: ความยาวราก (ตารางที่ 12) น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ของต้นและของราก (ตารางที่ 13) ซึ่งจากผลการทดลอง *A. morrowae* ให้ผลการเจริญของทั้งต้น และรากดี ที่สุด *A. scrobiculata*, *A. mellea* และ *G. etunicatum* สามารถสนับสนุนการเจริญของกล้าได้ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่เชื้อทั้ง 4 ชนิดผสมกัน เพิ่มการเจริญได้น้อยกว่าการใช้เชื้อชนิดเดียว ส่วนต้นที่ไม่ได้รับเชื้อมีการ เจริญมากกว่า ต้นที่ได้รับ Myco star® ส่วนการเจริญของรากนั้น *A. morrowae* และ *G. etunicatum* มีการ แผ่ของระบบรากมากกว่าการให้ *A. scrobiculata* และ *A. mellea* อยู่เล็กน้อย ในขณะที่ กล้าที่ไม่ได้รับเชื้อมี การขยายระบบรากมากกว่าต้นที่ได้รับเชื้อผสมและ Myco star® ซึ่งผลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า การที่มีความ หลากหลายของเชื้อรามากนั้น ไม่ได้หมายความว่าผลการเจริญในระยะกล้าของพืชจะดีกว่าเสมอไป เนื่องจาก อาจเกิดการแข่งขันหรือยับยั้งกันเองได้ อีกกรณีหนึ่งในระยะกล้าอาจไม่จำเป็นต้องมีเชื้อราหลายชนิด แต่ เมื่อต้นเจริญมากขึ้นเข้าระยะที่ติดดอกออกผล ความหลากหลายของชนิดเชื้อราจะสำคัญกว่า โดยเฉพาะ ในสภาพธรรมชาติ ซึ่งต้องอาศัยการล่าเหยื่อน้ำและธาตุมากขึ้น เพราะในแปลงปลูกกาแฟอาราบิก้ากลางแจ้ง จะมีเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาท้องถิ่นในระบบวนเกษตรมากกว่าแปลงที่ปลูกเฉพาะต้นกาแฟ (Cardoso *et al.*, 2003)

ตารางที่ 12 ความสูงของต้นและอัตราส่วนการแผ่ขยาย: ความยาวของรากกาแฟ

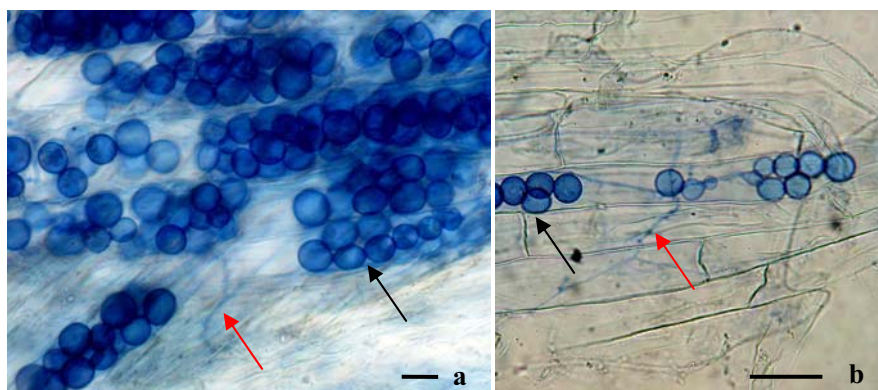
Treatment	ความสูงของต้น	การแผ่ขยายราก:ความยาวราก
	(cm.)	
<i>Glomus etunicatum</i>	13.79 ^{abc}	1.53 ^a
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	14.54 ^{ab}	1.40 ^{ab}
<i>Acaulospora morrowae</i>	17.17 ^a	1.54 ^a
<i>Acaulospora mellea</i>	14.62 ^{ab}	1.40 ^{ab}
<i>G. Etunicatum</i> + <i>A. scrobiculata</i> + <i>A. morrowae</i> + <i>A. mellea</i>	14.24 ^{abc}	1.04 ^c
Myco star ®	10.64 ^c	0.92 ^c
ไม่ได้รับเชื้อ	11.21 ^{bc}	1.10 ^b

ตารางที่ 13 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและรากกาแฟ

Treatment	น้ำหนักสด (g.)		น้ำหนักแห้ง (g.)	
	ต้น	ราก	ต้น	ราก
<i>Glomus etunicatum</i>	5.28 ^{ab}	1.68 ^{ab}	1.45 ^{abc}	0.43 ^{abc}
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	5.58 ^{ab}	1.73 ^a	1.64 ^{ab}	0.50 ^{ab}
<i>Acaulospora morrowae</i>	7.20 ^a	1.49 ^{abc}	2.09 ^a	0.54 ^a
<i>Acaulospora mellea</i>	6.19 ^{ab}	1.42 ^{abc}	1.69 ^a	0.42 ^{abc}
<i>G. Etunicatum</i> + <i>A. scrobiculata</i> + <i>A. morrowae</i> + <i>A. mellea</i>	5.53 ^{ab}	1.49 ^{abc}	1.51 ^{ab}	0.42 ^{abc}
Myco star ®	2.93 ^c	0.76 ^{bc}	0.79 ^c	0.25 ^{bc}
ไม่ได้รับเชื้อ	3.92 ^{bc}	0.69 ^c	0.99 ^{bc}	0.21 ^c

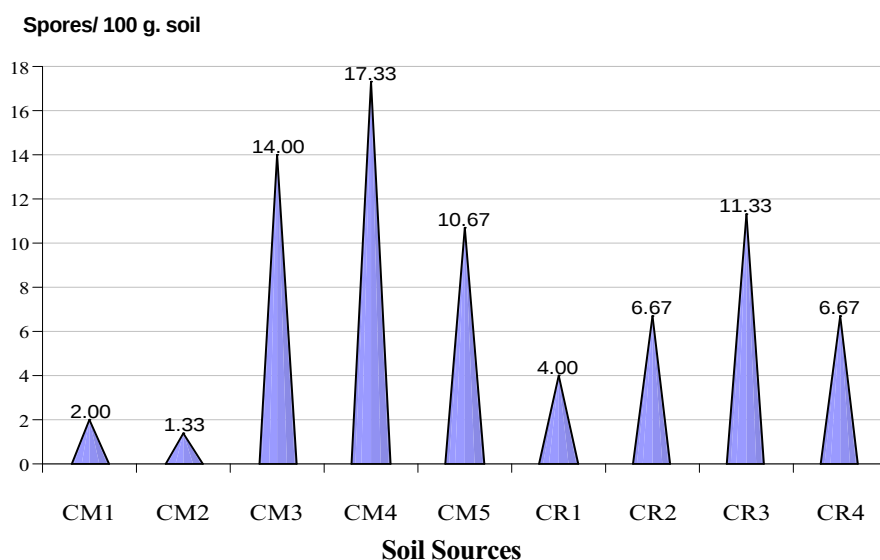
2.3 การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของ AMF ที่เหมาะสมต่อพืชเป้าหมาย

หลังจากเก็บชุดการทดลองมาตรวจสอบ พบโครงสร้างภายในรากทั้งข้าวโพดและข้าวฟ่าง (ภาพที่ 7) และสปอร์จากหัวเชื้อดินทุกตัวอย่าง แต่มีความหนาแน่นเฉลี่ยเพียง 8.44 สปอร์/ดิน 100 กรัม พบปริมาณสปอร์มากที่สุดจากตัวอย่างที่ใช้ดินจากแหล่งตัวอย่างในจังหวัดเชียงใหม่เป็นหัวเชื้อ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 โครงสร้างของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในรากข้าว (a) และข้าวฟ่าง (b)

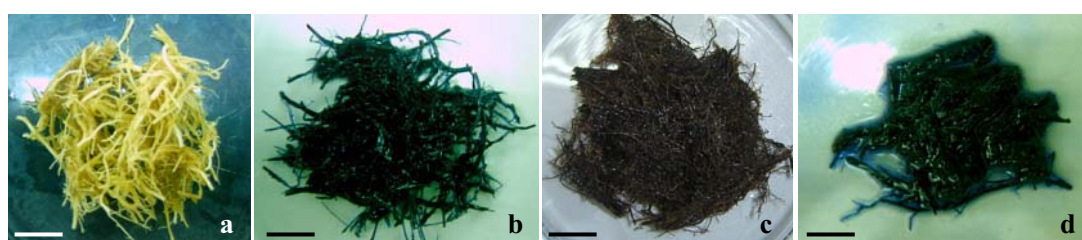
แสดง vesicles (→) และ hyphae (→), bar=100 μm.



ภาพที่ 8 ความหนาแน่นของสปอร์ในดิน 100 กรัม แยกตามแหล่งดินหัวเชื้อ

หลังจากเก็บชุดการทดลองมาตรวจสอบแล้ว พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณสปอร์ของเชื้อราได้จำนวนมาก (ตารางที่ 14) โดยเฉพาะในดินจากแหล่งตัวอย่าง CM1 ซึ่งพบปริมาณสปอร์ในทั้งข้าวโพดและข้าวฟ่างมากกว่า 4,000 สปอร์ในดิน 100 กรัม และเมื่อตรวจสอบการติดเชื้อในราก (ภาพที่ 9) ก็พบว่ามีความสูงเช่นกัน

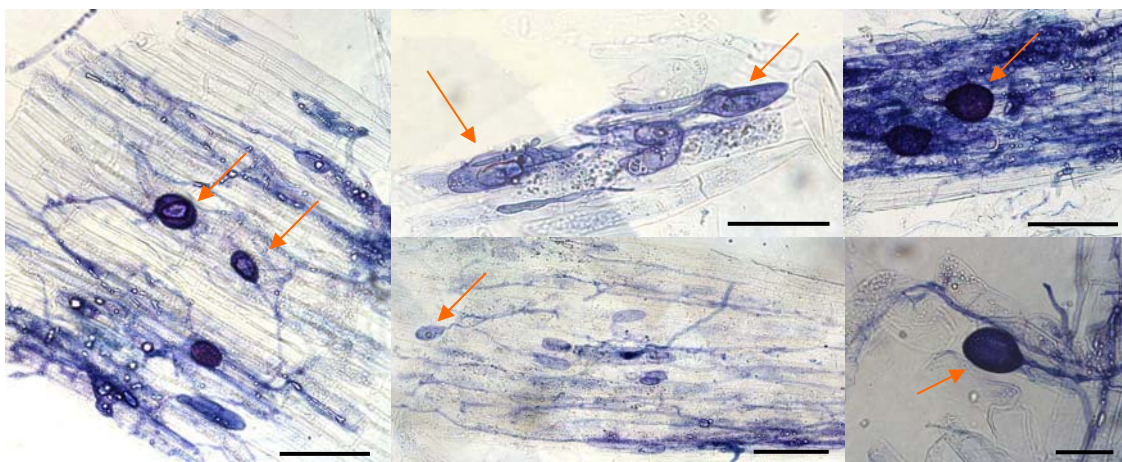
โครงสร้างของเชื้อที่พบในรากนั้น พบทั้งเส้นใย, เวสสิเคิล และ อาร์บัสคูล จำนวนมากทั้งในข้าวโพดและข้าวฟ่าง (ภาพที่ 10-12) เมื่อนำค่าความหนาแน่นของสปอร์ที่พบไปคำนวณตามหลักสถิติพบว่า พืชอาศัยที่ใช้คือ ต้นกล้าข้าวโพดและข้าวฟ่าง ให้ปริมาณสปอร์ที่ได้ไม่แตกต่างกัน แต่ดินหัวเชื้อแต่ละแหล่ง เป็นปัจจัยที่ทำให้จำนวนที่ได้แตกต่างกัน



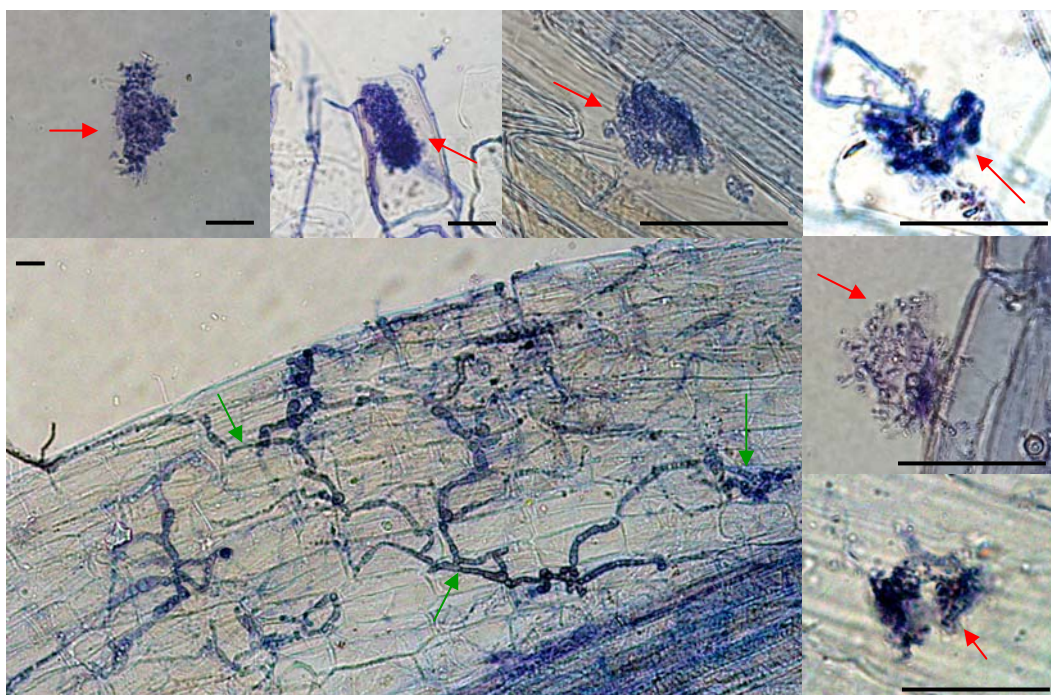
ภาพที่ 9 รากข้าวโพด (a) และรากข้าวฟ่าง (c) เมื่อตรวจสอบโครงสร้างของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซา ก่อน (a, b) และหลังการย้อมสีด้วย 0.05% trypan blue (b, d), bar=1 cm.

ตารางที่ 14 Spore Density ในดิน 100 g. และ % Root colonization ของดินตัวอย่างทั้ง 9 แหล่งแยกตามชนิดพืชอาศัยคือข้าวโพดและข้าวฟ่าง

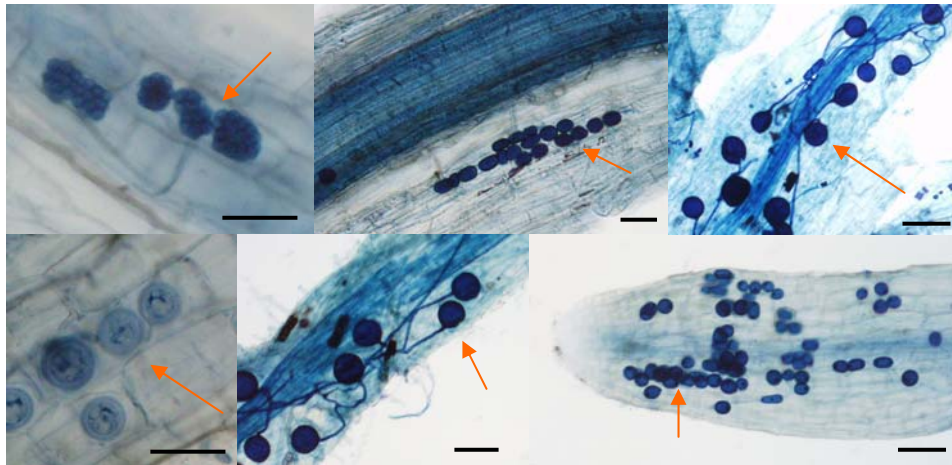
	Study Sources								
	CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CR1	CR2	CR3	CR4
ข้าวโพด									
Spore Density	4190	553	3581	2040	1230	1274	2758	670	3435
%Root colonization	100	90	67	73	65	79	76	61	95
ข้าวฟ่าง									
Spore Density	4295	650	4520	505	1345	1200	520	1010	3493
%Root colonization	94	96.11	96.68	88.61	86.58	90	81.69	97.29	99.2



ภาพที่ 10 โครงสร้าง vesicles ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาในรากข้าวโพด (—>),
bar = 50 μ m.



ภาพที่ 11 โครงสร้าง arbuscules (—>) และ เส้นใย (hyphae) (—>)ที่กำลังพัฒนาไปเป็น vesicles
หรือ arbuscules ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาในรากข้าวโพด, bar=50 μ m.



ภาพที่ 12 โครงสร้าง vesicles ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากข้าวฟ่าง (—→),
bar=50 μ m.

3. พืชอาหาร รัญพืช และถั่วกินเมล็ด

การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อรัญพืช และถั่วกินเมล็ด

จากการตรวจเปอร์เซ็นต์การเข้ารากพบว่าพืชทุกชนิดยกเว้นข้าวไร่ (39% กรณีใส่ 3 กก. P/เฮกเตอร์ และ 27% กรณีใส่ 30 กก. P/เฮกเตอร์) มี AMF เจริญในรากพืชแต่ละชนิดสูงมากระหว่าง 60-100% (ภาพที่ 13a) นอกจากนี้ยังพบว่าในดินที่ใส่ 30 กก. P/เฮกเตอร์ มีปริมาณสปอร์น้อยกว่าในดินที่ใส่ 3 กก. P/เฮกเตอร์ โดยเฉพาะในข้าวไร่พบว่าในดินที่ใส่ 30 กก. P/เฮกเตอร์ มีปริมาณสปอร์น้อยกว่า ในดินที่ใส่ 3 กก. P/เฮกเตอร์อย่างชัดเจน (ภาพที่ 13b) จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า *Acualospora* พบเป็น AMF ชนิดเด่นโดยพบจำนวนสปอร์มากที่สุดในดินที่ปลูกพืชเหล่านี้ และ AMF ชนิดเด่นรองลงมาคือ *Scutellospora* สำหรับ *Glomus* พบค่อนข้างน้อย *Paraglomus* และ *Achaeospora* พบน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตโดยทั่วไปเมื่อพืชเจริญเต็มที่พบว่า AMF มีผลในการช่วยเพิ่มน้ำหนัก ยอด และรากของพืชทุกชนิด โดยเฉพาะเมื่อปลูกในดินที่มี P ต่ำ (3 กก. P/เฮกเตอร์) (ตารางที่ 15-16) สำหรับผลผลิตของข้าวไร่พบว่า AMF มีผลต่อการเพิ่มปริมาณผลผลิตเป็น 67% เมื่อปลูกในดินที่ใส่ 3 กก. P/เฮกเตอร์ แต่ไม่มีความแตกต่างของผลผลิตเมื่อปลูกในดินที่ใส่ 30 กก. P/เฮกเตอร์ และพบปริมาณผลผลิตเช่นเดียวกันในข้าวฟ่าง สำหรับในลูกเดี๋ยพบว่าการใช้ AMF ช่วยเพิ่มผลผลิตได้ 4 เท่า เมื่อปลูกในดินที่ใส่ 3 กก. P/เฮกเตอร์ (ตารางที่ 17) และในข้าวไร่จะเห็นได้ว่าการใส่ AMF ช่วยในการ ดูดใช้ ธาตุ P (32%) ได้ดีในดินที่มี P ต่ำ (3 กก. P/เฮกเตอร์) ในขณะที่ลูกเดี๋ยและรัญพืชอื่นๆ ช่วยในการดูดใช้ ธาตุ P ได้น้อยกว่าประมาณครึ่งหนึ่ง (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 15 แสดงผลของ AMF และการใช้ธาตุ P ต่อน้ำหนักแห้ง (กรัม/กระถาง) ของยอดพืช 6 ชนิด

P-level	AM	Cowpea		Corn		Job's tears		Upland rice		Sorghum		Pada
(kg/ha)	Inoculation	H1	H2	H1	H2	H1	H2	H1	H2	H1	H2	H2
3	AM0	0.97 C	4.99 C	5.47	1.89	5.33	6.66	10.17	1.07	4.09 C	0.26	
3	AM+	9.52 B	9.33 B	10.85	3.89	12.37	5.95	11.65	1.52	13.79 B	10.40	
30	AM0	13.04 A	24.10 A	20.72	10.61	24.89	18.32	29.46	11.9	31.04 A	8.48	
30	AM+	13.92 A	22.87 A	24.89	13.11	31.29	19.23	25.46	12.96	34.85A	13.30	

Analysis of variance											
Effect	F-test										
P	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*
AM	**	NS	**	*	*	NS	NS	NS	NS	NS	*
P x AM	**	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS

Different letters down each column are indicated significant differences (by LSD $P < 0.05$). * significant at $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS = not significant.

ตารางที่ 16 แสดงผลของ AMF และการใช้ธาตุ P ต่อน้ำหนักแห้ง (ก./กระถาง) ของรากพืช 6 ชนิด

P-level (kg/ha)	AM Inoculation	Cowpea H1	Corn H1	H2	Job's tears H1	H2	Upland rice H1	H2	Sorghum H1	H2	Pada H2
3	AM0	0.29 C	0.75 C	1.55	0.44	1.39	4.00	4.12	0.29	0.91 C	0.13 B
3	AM+	1.21 B	1.85 B	2.63	1.07	4.63	5.30	4.35	0.32	2.43 B	6.72 A
30	AM0	1.45 A	3.00 A	3.30	2.10	4.76	10.75	9.236	3.15	5.84 A	6.09 A
30	AM+	1.57 A	3.03 A	3.56	2.56	6.19	12.08	11.13	3.90	5.53 A	6.59 A

Analysis of variance

Effect	F-test										
P	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*
AM	**	NS	**	*	**	NS	NS	NS	NS	NS	**
P x AM	**	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	*

Different letters down each column are indicated significant differences (by LSD $P < 0.05$). * significant at $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS = not significant.

ตารางที่ 17 แสดงผลของ AMF และการใช้ธาตุ P ต่อปริมาณผลผลิต (ก./กระถาง) ของเมล็ดลูกเดือย ข้าวไร และข้าวฟ่าง

P-level (kg/ha)	AM Inoculation	Job's tears	Upland rice	Sorghum
3	AM0	0.1 c	2.4 c	0.1 c
3	AM+	0.5 c	4.0 b	1.3 b
30	AM0	4.1 b	8.4 a	11.8 a
30	AM+	7.3 a	8.5 a	11.7 a

Analysis of variance

Effect	F-test			
P	**	**	**	**
AM	**	*	*	*
P x AM	*	*	*	**

For same plant species, different letters are significantly different by LSD ($P < 0.05$). Significant levels: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

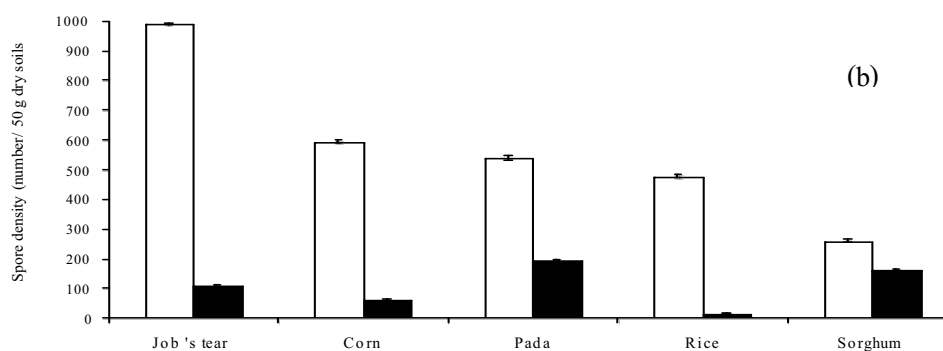
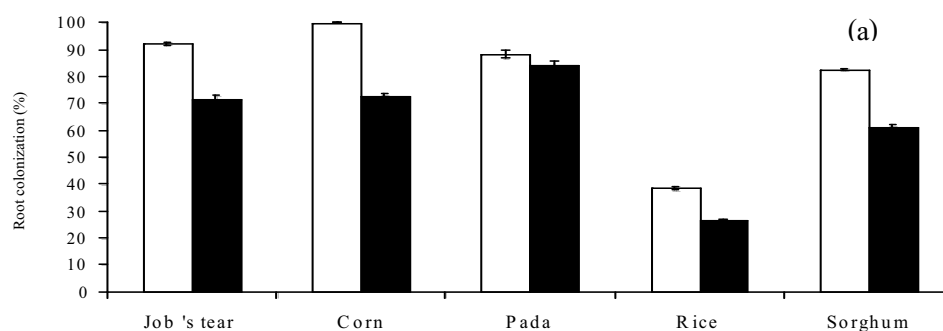
ตารางที่ 18 แสดงผลของ AMF และการใช้ธาตุ P ต่อการดูดใช้ธาตุ P น้ำหนักแห้ง (มก./กระถาง) ของพืช 6 ชนิด

P-level	AM	Cowpea	Corn		Job's tears		Upland rice		Sorghum		Pada
(kg/ha)	Inoculation	H1	H1	H2	H1	H2	H1	H2	H1	H2	H2
3	AM0	1.2 C	4.0 C	2.6	2.5 C	5.4	4.6	6.8 C	1.4 C	2.8	0.1 C
3	AM+	10.1 B	8.2 B	5.8	6.8 B	10.6	5.8	10.4 B	3.1 B	7.2	9.5 B
30	AM0	15.3 B	21.6 A	14.5	20.2 A	43.4	24.6	37.9 A	24.4 A	28.4	8.4 B
30	AM+	37.4 A	25.0 A	22.7	23.7 A	59.6	26.4	37.9 A	25.1 A	37.5	25.1 A

Analysis of variance

Effect	F-test										
P	*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
AM	**	**	**	**	*	NS	**	**	**	*	**
P x AM	*	*	NS	**	NS	NS	**	**	**	NS	*

Different letters down each column are indicated significant differences (by LSD $P < 0.05$). * significant at $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS = not significant.



ภาพที่ 13 แสดงเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากพืชของ AMF และความหนาแน่นสปอร์ AMF ในดิน

เปอร์เซ็นต์การเข้ารากของ AMF จะต่ำที่สุดในข้าวฟ่าง (50%) และสูงที่สุดในปะดะ (95%) ซึ่งการศึกษามาก่อนในพื้นที่เดียวกันนี้โดย Youpensuk *et al.*, (2004) รายงานว่า 81% ของรากขนาดเล็กของปะดะจะมี AMF เข้าอยู่ในรากและความหนาแน่นของสปอร์ในบริเวณรอบรากปะดะจะมี AMF เป็น 4 เท่าของการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งสาเหตุอาจมาจากระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง และความชันของพื้นที่ภูเขาต่างกัน เนื่องจากพื้นที่ศึกษาต่างกัน ซึ่งจากการศึกษายังไม่ทราบว่าความหนาแน่นของสปอร์ หรือการเข้าสู่รากของ AMF มีการผันแปรเนื่องจากความอุดมสมบูรณ์ ของดินในแปลงปลูกหรือไม่ ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

4. พืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า

4.1 ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซ่า (AMF) ในพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า

จากการเก็บตัวอย่างรากและดินบริเวณรากของพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า 24 ชนิด จากบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ โดยพืชทั้งหมดจะมีระดับความเหมาะสมต่อการฟื้นคืนผืนป่าได้แตกต่างกันแบ่งเป็นระดับที่มีประสิทธิภาพดีเยี่ยม 15 ชนิด และระดับที่ยอมรับได้อีก 9 ชนิด (Blakesley *et al.*, 2002; Elliott *et al.*, 2003) พบว่าจำนวนสปอร์ AMF และค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเข้ารากพืชชนิดต่างๆ ในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 19) ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากความจำเพาะเจาะจงระหว่างชนิดของ AMF และพืชอาศัย (Janos, 1980; Onguene และ Kuyper, 2001) รวมทั้งความสัมพันธ์ระหว่างพืชตระกูลหญ้าบริเวณรอบรากไม้กับเชื้อรา AMF ด้วย (Smith *et al.* 1998; Murakoshi *et al.*, 1998) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเข้ารากพืชที่แตกต่างกันนี้ยังมีความสอดคล้องกับลักษณะที่แตกต่างกันของรากพืชและชนิดของป่าดังรายงานของ Baylis, 1975 และ Muthukumar *et al.*, 2003 ด้วย

สำหรับการบ่งบอกชนิดของสปอร์ AMF บนกระดาษกรองที่ได้จากวิธี wet-sieving method โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่สามารถมองเห็นได้ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ที่อ้างอิงจาก Schenck และ Perez, 1988; INVAM WebPages พบสปอร์ AMF 24 species ที่พบ แบ่งออกเป็น 3 genera คือ *Acaulospora* (6), *Glomus* (15) และ *Scutellospora* (3) (ตารางที่ 20) (Nandakwang *et al.*, 2008) ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงความสำคัญในการเลือกชนิดพืชท้องถิ่นในการปลูกป่าเพื่อเป็นการส่งเสริมให้การฟื้นฟูป่ามีประสิทธิภาพมากขึ้น และยังช่วยลดระยะเวลาในการดำเนินการลงอีกด้วย

ตารางที่ 19 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเข้ารากพืชและจำนวนสปอร์ AMF ที่พบในแต่ละพื้นที่จากตัวอย่างดิน

Tree species	Study site					
	FORRU's research nursery		Forest restoration plots		Natural evergreen forests	
	Colonization (%)	Spore density	Colonization (%)	Spore density	Colonization (%)	Spore density
<i>Acrocarpus fraxinifolius</i>	65.56	120.67	94.77	60.67	74.38	12.00
<i>Balakata baccata</i>	97.22	4.00	100	216.67	26.14	8.67
<i>Castanopsis acuminatissima</i>	11.46	4.33	83.42	16.00	82.12	8.00
<i>Erythrina subumbrans</i>	83.22	8.33	98.34	75.67	94.54	4.33
<i>Ficus altissima</i>	93.28	32.67	94.76	59.67	51.94	4.33
<i>Ficus benjamina</i>	75.66	32.67	75.18	23.67	87.05	119.67
<i>Ficus glaberrima</i>	69.64	16.67	89.68	4.00	8.61	8.33
<i>Ficus hispida</i>	70.92	29.00	49.98	60.00	55.99	251.33
<i>Ficus racemosa</i>	88.14	68.67	98.41	204.33	32.68	4.00
<i>Ficus subulata</i>	39.75	39.67	69.68	56.67	98.86	124.66
<i>Glochidion kerrii</i>	83.35	36.67	89.06	23.67	64.00	64.67
<i>Gmelina arborea</i>	98.00	32.33	100	48.33	67.30	23.67
<i>Heynea trijuga</i>	84.48	19.67	99.28	595.67	94.09	8.33
<i>Hovenia dulcis</i>	100	28.00	84.35	292.00	93.73	64.67
<i>Macaranga denticulate</i>	100	56.67	96.22	128.33	98.68	64.00
<i>Machilus bombycina</i>	75.43	51.67	49.45	55.33	95.34	15.67
<i>Milia toosendan</i>	92.08	20.33	96.94	104.33	93.02	8.00
<i>Michelia baillonii</i>	100	40.00	97.66	15.67	68.61	24.00
<i>Nyssa javanica</i>	92.19	108.33	100	172.00	98.18	200.67
<i>Prunus cerasoides</i>	76.85	32.00	21.24	43.33	87.72	112.67
<i>Rhus rhesoides</i>	100	204.33	91.26	40.33	84.74	28.00
<i>Sapindus rarak</i>	88.87	28.67	82.10	12.33	62.67	196.33
<i>Sarcosperma arboreum</i>	40.90	8.67	92.38	24.33	55.67	12.33
<i>Spondias axillaris</i>	93.34	128.33	72.20	4.00	51.24	8.00
Average spore density		48.01		97.38		57.35
Spore number		1152		2337		1376

ตารางที่ 20 ชนิดและจำนวน (Frequency, F%; relative abundance, RA%) AMF ที่พบจากตัวอย่างดินรอบรากต้นพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า 24 ชนิดในแต่ละพื้นที่

AM fungal species	Study site											
	Degraded watershed area			Forest soil extraction area			FORRU' s research			Forest restoration plots		
	F%	RA%	F%	RA%	F%	RA%	F%	RA%	F%	RA%	F%	RA%
<i>Acaulospora</i>	75.00	52.71	66.67	29.48	66.67	40.50	66.67	43.63	33.33	5.91		
1. <i>A. bireticulata</i> Rothwell & Trappe					4.17	0.66	4.17	0.33				
2. <i>A. elegans</i> Trappe & Gerd.			33.33	9.27	16.67	2.37	50.00	39.17	16.67	4.38		
3. <i>A. foveata</i> Trappe & Janos					4.17	0.69	8.33	1.36	4.17	0.31		
4. <i>A. laevis</i> Gerd. & Trappe					4.17	0.40	4.17	0.19	4.17	0.31		
5. <i>A. mellea</i> Spain & Schenck			33.33	5.02	20.83	6.31	4.17	0.36				
6. <i>A. scrobiculata</i> Trappe	75.00	52.71	50.00	15.19	58.33	30.06	20.83	2.24	12.50	0.90		
<i>Glomus</i>	87.50	44.19	100	68.78	91.67	56.03	87.50	49.332	91.67	94.09		
7. <i>G. aggregatum</i> Schenck & Smith							8.33	0.38	4.17	0.29		
8. <i>G. ambisporum</i> Smith & Schenck			33.33	12.54	54.17	14.23	12.50	3.05	58.33	31.29		
9. <i>G. clavissporum</i> Trappe							8.33	0.33	4.17	0.61		
10. <i>G. coremioides</i> Berk. & Broome							25.00	2.03	4.17	4.65		
11. <i>G. fulvum</i> (Berke. & Broome) Trappe & Gerd.									8.33	7.85		
12. <i>G. intraradices</i> Schenck & Smith					4.17	3.53	4.17	0.70	8.33	0.61		
13. <i>G. microaggregatum</i> Koske, Gemma & Olexia	12.50	3.62					4.17	0.36				

ตารางที่ 20 (ต่อ)

AM fungal species	Study site									
	Degraded watershed area			Forest soil extraction area			FORRU's research nursery			Natural forests
	F%	RA%	F%	RA%	F%	RA%	F%	RA%	F%	
14. <i>G. microcarpus</i> Iqbal & Bushra	25.00	6.71	33.33	22.58	16.67	4.57	16.67	9.94	25.00	7.22
15. <i>G. mosseae</i> (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe					12.50	3.24	8.33	5.43	12.50	16.88
16. <i>G. multicaule</i> Gerd. & Bakshi					33.33	12.76	29.17	14.23	29.17	15.19
17. <i>G. rubiforme</i> Gerd. & Trappe	50.00	25.07	100	31.22	58.33	10.38	41.67	12.02	29.17	6.73
18. <i>G. scintillans</i> Rose & Trappe					4.17	2.78				
19. <i>G. sinuosum</i> Gerd. & Bakshi	25.00	8.79			4.17	0.35	4.17	0.33	16.67	2.88
20. <i>G. tortuosum</i> Schenck & Smith					4.17	1.42				
21. <i>G. viscosum</i> Nicol.			16.67	2.44	8.33	2.78	8.33	0.51		
<i>Scutellospora</i>	12.50	3.10	16.67	1.74	12.50	3.47	50.00	7.05		
22. <i>S. gregaria</i> (Schenck & Nicol.) Walker & Sanders							4.17	1.01		
23. <i>S. heterogama</i> Walker & Sanders	12.50	3.10					8.33	0.50		
24. <i>S. pellucida</i> (Nicol. & Schenck) Walker & Sanders			16.67	1.74	12.50	3.47	41.67	5.53		
Species richness	6		8		17		21		15	

4.2 การคัดเลือกเชื้อ AMF ที่เหมาะสมต่อพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า 24 ชนิด

เมื่อทดสอบผลของ AMF และการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสกับต้นกล้าก่อเดือย (*Castanopsis acuminatissima*) เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าการใช้ AMF การใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส และการใช้ AMF ร่วมกับ ปุ๋ยฟอสฟอรัส ทำให้ความสูงของพืช น้ำหนักแห้งของยอดและราก รวมถึงปริมาณธาตุฟอสฟอรัส ในยอดเพิ่มสูงขึ้น (ตารางที่ 21-24) ฟอสฟอรัสมีผลต่อขนาดของต้นไม้ทั่วไป รวมทั้งไม้ป่าที่เป็นพืชอาศัยของ AMF ที่ปลูกในสภาวะที่ควบคุมไว้ด้วย (Siqueira *et al.*, 1998; Youpensuk *et al.*, 2005) แต่การใช้ AMF เพียงอย่างเดียวหรือการใช้ AMF ร่วมกับ ปุ๋ยฟอสฟอรัสไม่มีผลต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น (ตารางที่ 21, 22) โดยการใช้ *Glomus etunicatum* ร่วมกับการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตรา 150, 200 และ 250 ppm ทำให้ความสูงของพืช น้ำหนักแห้งของยอดและรากเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุด ทั้งนี้เป็นเพราะ AMF ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมฟอสฟอรัสในดินของรากพืชที่เพาะปลูกในสภาพดินที่ขาดแคลนสารอาหารที่มีปริมาณฟอสฟอรัสต่ำได้ดียิ่งขึ้น (Janos, 1983; Pacovsky *et al.*, 1986; Marschner *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ AMF การใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส และการใช้ AMF ร่วมกับปุ๋ยฟอสฟอรัสมีผลต่อความหนาแน่นของสปอร์ โดยกรณีที่ใช้ *Glomerella mosseae* และการใช้สปอร์แบบผสมพบความหนาแน่นสปอร์มากที่สุด (33.5 และ 38.33 สปอร์/ดิน 100 กรัม ตามลำดับ, ตารางที่ 20)

จากการทดสอบผลของ AMF และการใช้ปุ๋ยแบบ slow-release กับต้นกล้าก่อเดือยเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าการใช้ AMF ไม่มีผลต่อความสูงของพืช น้ำหนักแห้ง และปริมาณธาตุฟอสฟอรัสในยอด อย่างไรก็ตามการใช้ AMF มีผลช่วยเพิ่มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ลำต้น โดยเฉพาะกรณีที่ใช้สปอร์แบบผสม (ตารางที่ 25) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในดินมีธาตุอาหารอยู่อย่างเพียงพอในสภาพดังกล่าว จึงไม่มีความจำเป็นต่อการส่งเสริมการดูดซึมแร่ธาตุของรากพืชให้มากขึ้น (Maffia *et al.*, 1993)

ตารางที่ 21 แสดงผลของ AMF และการใช้ธาตุ P ต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้า *C. acuminatissima* เปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากและความหนาแน่นของสปอร์ AMF

Treatments	Plant height (cm)	Stem diameter (cm)	Shoot dry weight (g plant ⁻¹)	Root dry weight (g plant ⁻¹)
AM inoculation				
Uninoculation	17.89c	0.23ns	0.66c	0.89d
<i>A. elegans</i>	24.25b	0.24ns	1.40ab	2.59a
<i>G. etunicatum</i>	27.36a	0.23ns	1.60a	2.08bc
<i>G. mosseae</i>	22.44b	0.24ns	1.17b	2.04c
Mixed species	19.85c	0.22ns	0.84c	2.04a
P applied (mg P kg⁻¹medium)				
0	15.29d	0.21c	0.54c	1.36c
50	16.30d	0.21c	0.58c	1.51c
100	19.87c	0.22bc	0.77c	1.67c
150	25.80b	0.23bc	1.49b	2.33b
200	32.11a	0.24b	1.36b	2.39b
250	17.86a	0.27a	2.07a	2.77a
Analysis of variance				
AM inoculation	***	ns	***	***
P applied	***	***	***	***
AM inoculation × P applied	***	ns	**	*

Treatments	Root to shoot ratio (dry weight)	Shoot P content (mg plant ⁻¹)	Root P content (mg plant ⁻¹)	Root colonization (%)	Spore density (spores/100g soil)
AM inoculation					
Uninoculation	1.44c	0.20c	0.22d	0.00c	0.00d
<i>A. elegans</i>	2.26b	0.64a	0.76a	53.72a	23.11c
<i>G. etunicatum</i>	1.86bc	0.74a	0.67ab	55.33a	31.83b
<i>G. mosseae</i>	2.28b	0.42b	0.50bc	55.26a	33.50ab
Mixed species	2.83a	0.40b	0.45c	40.10b	38.33a
P applied (mg P kg⁻¹medium)					
0	2.68a	0.15c	0.25c	43.92ns	24.20abc
50	2.73a	0.18c	0.29c	45.39ns	28.07a
100	2.37ab	0.23c	0.32c	38.14ns	27.00ab
150	1.81bc	0.61b	0.62b	41.47ns	30.07a
200	1.89bc	0.52b	0.63b	39.64ns	21.93bc
250	1.35c	1.21a	1.02a	36.71ns	20.87c
Analysis of variance					
AM inoculation	***	***	***	***	***
P applied	**	***	***	ns	**
AM inoculation × P applied	ns	***	0.074	ns	*

Means in the same column followed by different letter(s) are significantly different by ANOVA and Duncan, s Multiple Range test. *, **, ***: Significant at p<0.05, 0.01, 0.001, respectively; ns: not significant

ตารางที่ 22 แสดงผลของ AMF และการใช้ธาตุ P ต่อความสูงและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของต้นกล้า *C.*

acuminatissima

		Plant height (cm)			
Treatments	Uninoculation	<i>A. elegans</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	Mixed species
P applied (mg P kg⁻¹medium)					
0	14.44bNS	16.56cNS	15.59bNS	14.84cNS	15.02cNS
50	16.19bNS	18.02cNS	15.97bNS	16.05cNS	15.26cNS
100	18.13bNS	22.12bcNS	18.56bNS	22.19bNS	18.35bcNS
150	17.76bB	27.05bB	39.19aA	25.69bB	19.28bcB
200	17.89bC	26.81bAB	33.97acA	24.03bB	21.21bBC
250	22.92aC	34.95aAB	40.85aA	31.81aABC	30.00aBC
		Stem diameter (cm)			
Treatments	Uninoculation	<i>A. elegans</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	Mixed species
P applied (mg P kg⁻¹medium)					
0	0.22nsNS	0.21bNS	0.22nsNS	0.19bNS	0.21nsNS
50	0.22nsNS	0.21bNS	0.219nsNS	0.21bNS	0.21nsNS
100	0.22nsNS	0.20bNS	0.23nsNS	0.24abNS	0.22nsNS
150	0.22nsNS	0.24bNS	0.25nsNS	0.25abNS	0.20nsNS
200	0.23nsNS	0.23bNS	0.25nsNS	0.24abNS	0.25nsNS
250	0.24nsB	0.32aA	0.24nsB	0.29aA	0.24nsB

Means followed by the same letter (lower case within columns and capitals within rows) are not significantly different by Duncan's Multiple Range Test; ns: not significant

ตารางที่ 23 แสดงผลของ AMF และการใช้ธาตุ P ต่อน้ำหนักแห้งยอดและรากของต้นกล้า *C. acuminatissima*

		Shoot dry weight (g plant ⁻¹)			
Treatments	Uninoculation	<i>A. elegans</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	Mixed species
P applied (mg kg⁻¹ KH₂PO₄)					
0	0.45bB	0.76bA	0.67bAB	0.42dB	0.42cB
50	0.54bAB	0.83bA	0.51bAB	0.53cdAB	0.46bcB
100	0.65bNS	0.82bNS	0.91bNS	0.96cNS	0.51bcNS
150	0.62bB	1.81abAB	2.63aA	1.45bAB	0.96bB
200	0.62bD	1.64abAB	2.136aA	1.46bBC	0.94bCD
250	1.07aC	2.58aAB	2.74aA	2.18aAB	1.77aBC
		Root dry weigh (g plant ⁻¹)			
Treatments	Uninoculation	<i>A. elegans</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	Mixed species
P applied (mg kg⁻¹ KH₂PO₄)					
0	0.96nsB	1.77nsA	1.54bAB	1.48cAB	1.05cB
50	0.78nsC	2.28nsA	1.63bB	1.53cB	1.35bcB
100	0.91nsB	1.93nsA	1.42bAB	2.15bA	1.96bA
150	0.76nsC	3.13nsAB	3.51aA	2.34bAB	1.89bBC
200	0.82nsC	3.05nsA	3.11aA	2.13bB	2.83aAB
250	1.11nsB	3.37nsA	3.39aA	2.87aA	3.13aA

Means followed by the same letter (lower case within columns and capitals within rows) are not significantly different by Duncan's Multiple Range Test; ns: Not significant

ตารางที่ 24 แสดงผลของ AMF และการใช้ธาตุ P ต่อการดูดใช้ธาตุ P ของต้นกล้า *C. acuminatissima*

Treatments	Shoot P content (g plant ⁻¹)				
	Uninoculation	<i>A. elegans</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	Mixed species
P applied (mg kg⁻¹ KH₂PO₄)					
0	0.12nsNS	0.21cNS	0.15bNS	0.11bNS	0.14cNS
50	0.13nsB	0.25cA	0.19bAB	0.15bAB	0.16cAB
100	0.20nsNS	0.20cNS	0.33bNS	0.24bNS	0.17cNS
150	0.19nsB	0.76bAB	1.23aA	0.31bB	0.57bB
200	0.16nsC	0.71bB	1.02aA	0.30bC	0.42bBC
250	0.40nsB	1.70aA	1.55aA	1.44aA	0.96aAB
Treatments	Root P content (g plant ⁻¹)				
	Uninoculation	<i>A. elegans</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	Mixed species
P applied (mg kg⁻¹ KH₂PO₄)					
0	0.21nsNS	0.29bNS	0.30bNS	0.23bNS	0.20dNS
50	0.21nsC	0.40bA	0.35bAB	0.26bBC	0.21dC
100	0.22nsNS	0.34bNS	0.35bNS	0.38bNS	0.31cdNS
150	0.23nsB	0.94abA	0.98abA	0.54bAB	0.43cAB
200	0.20nsB	1.05abA	0.85abAB	0.40bAB	0.64bAB
250	0.26nsB	1.54aA	1.18aA	1.22aA	0.89aAB

Means followed by the same letter (s) (lower case within columns and capitals within rows) are not significantly different by Duncan's Multiple Range Test; ns: not significant

ตารางที่ 25 แสดงผลของ AMF และการใช้ปุ๋ยแบบ slow-release ต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้า *C.*

acuminatissima เปรียบเทียบการเข้าสู่รากและความหนาแน่นของสปอร์ AMF

Treatments	Plant height (cm)	Stem diameter (cm)	Shoot dry weight (g plant ⁻¹)	Root dry weight (g plant ⁻¹)
Uninoculated	10.89cd	0.15cd	0.39bcd	0.62bcd
Uninoculated+Fertilizer	14.54a	0.16bc	0.58ab	0.78ab
<i>A. elegans</i>	10.89cd	0.15bcd	0.25d	0.51d
<i>A. elegans</i> +Fertilizer	11.41bcd	0.16bc	0.62a	0.61bcd
<i>G. etunicatum</i>	9.71d	0.14d	0.43abcd	0.64bcd
<i>G. etunicatum</i> +Fertilizer	12.73abc	0.17b	0.42abcd	0.76ab
<i>G. mosseae</i>	10.04d	0.15bcd	0.35cd	0.57cd
<i>G. mosseae</i> +Fertilizer	13.13ab	0.16bc	0.62a	0.83a
Mixed species	11.52bcd	0.16bc	0.39bcd	0.63bcd
Mixed species+Fertilizer	13.05ab	0.20a	0.52abc	0.70abc
Analysis of variance				
AM inoculation	0.075	*	ns	0.061
Fertilization	***	***	***	***
AM inoculation × Fertilization	ns	ns	0.053	ns

Treatments	Root to shoot ratio (dry weight)	Shoot P content (mg plant ⁻¹)	Root P content (mg plant ⁻¹)	Root colonization (%)	Spore density (spores 100 g ⁻¹ soil)
Uninoculated	1.83bc	0.05cd	0.04c	0.00f	0.00f
Uninoculated+Fertilizer	1.77cd	0.13b	0.10a	0.00f	0.00f
<i>A. elegans</i>	2.58a	0.03d	0.03c	52.56d	22.43e
<i>A. elegans</i> +Fertilizer	1.14d	0.19a	0.10a	79.52a	57.71ab
<i>G. etunicatum</i>	2.44ab	0.04d	0.03c	41.96e	20.86e
<i>G. etunicatum</i> +Fertilizer	1.95bc	0.10bc	0.09ab	65.30c	16.14e
<i>G. mosseae</i>	1.72cd	0.04d	0.03c	38.38e	42.28d
<i>G. mosseae</i> +Fertilizer	1.89bc	0.15ab	0.12a	77.58ab	49.14cd
Mixed species	1.65cd	0.07cd	0.05bc	58.87cd	65.14ab
Mixed species+Fertilizer	1.77cd	0.16ab	0.12a	68.32bc	74.57a
Analysis of variance					
AM inoculation	ns	ns	ns	***	***
Fertilization	*	***	***	***	***
AM inoculation × Fertilization	***	ns	ns	***	***

Means in the same column followed by different letter (s) are significantly different by ANOVA and Duncan, s Multiple Range Test. *, **, ***: Significant at p<0.05, 0.01, 0.001 respectively; ns: Not significant

4.3 ความเหมาะสมของพืชอาศัยต่อการเพิ่มปริมาณของ AMF

หลังจากปลูกเชื้อร่วมกับต้นพืชทั้ง 5 ชนิด โดยใช้สปอร์ AMF ชนิดเด่นที่ได้จากพืชที่ใช้ปลูกป่า 24 ชนิด ซึ่งทำการปลูกไว้จนพืชมีอายุ 4 เดือน และทำการตรวจสอบปริมาณการติดเชื้อในรากและปริมาณสปอร์ที่พบในดินรอบรากพืชดังกล่าว พบว่า ดินที่ปลูกทั้งข้าวฟ่างและข้าวโพด มีสปอร์ของ *Acaulospora elegans*, *Glomus etunicatum* และ *G. mosseae* มากที่สุด โดยในข้าวฟ่างมีจำนวนสปอร์ของ AMF ที่พบมากกว่าในข้าวโพดอย่างมีนัยสำคัญ และในดินที่ปลูกข้าวฟ่างพบ *G. etunicatum* (6149 ต่อดิน 100 กรัม) และ *A. elegans* (2714 ต่อดิน 100 กรัม) มากที่สุดตามลำดับ (ตารางที่ 26) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *Glomus* และ *Acaulospora* สามารถสร้างสปอร์ได้มากกว่า *Gigaspora* และ *Scutellospora* เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน เพราะสปอร์ขนาดเล็กจะใช้เวลาในการสร้างน้อยกว่าสปอร์ที่มีขนาดใหญ่กว่า (Hepper, 1984; Bever *et al.*, 1996) เมื่อขุดมึลรากเพื่อตรวจสอบการติดเชื้อในรากพบว่า รากพืชทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณการติดเชื้อแตกต่างกันไปดังตารางที่ 27

ตารางที่ 26 จำนวนสปอร์ของเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าในดิน (100 g) ที่ปลูกพืชทดสอบ 5 ชนิด

Spore density of AM fungi (spores/100 g soil)						
Host plant	<i>A. elegans</i>	<i>A. mellea</i>	<i>A. scrobiculata</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	<i>S. heterogama</i>
<i>G. max</i>	426.33dB	13.33 nsC	14.67abC	598.00cdA	40.00dC	9.33bC
<i>O. sativa</i>	1683.33bcA	14.67 nsD	13.33abD	396.00dB	190.00bcC	6.67bD
<i>S. vulgare</i>	2713.33aB	13.33 nsC	16.67abC	6148.67aA	642.67aC	22.67aC
<i>T. erecta</i>	967.67cdB	9.33 nsC	6.00bC	1457.33cA	102.00cdC	11.33abC
<i>Z. mays</i>	1867.33bB	10.00 nsC	19.33aC	3933.33bA	231.33bC	4.67bC
Analysis of variance						
AM species	***					
Host plant species	***					
AM species × Host plant species	***					

Means followed by the same letter (s) (lower case within columns and capitals within rows) are not significantly different by Duncan's Multiple Range Test; ns: not significant. ***: significant at $p < 0.001$

ตารางที่ 27 เปอร์เซ็นต์การเข้ารากของเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซ่าในพืชทดสอบ 5 ชนิด

AM colonization (%)						
Host plant	<i>A. elegans</i>	<i>A. mellea</i>	<i>A. scrobiculata</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	<i>S. heterogama</i>
<i>G. max</i>	87.95aB	20.00nsC	14.81abC	90.00bB	100.00aA	5.00cD
<i>O. sativa</i>	73.00bB	11.11nsC	3.70abC	100.00aA	95.00bA	3.33cC
<i>S. vulgare</i>	100.00aA	51.85nsC	13.33abD	100.00aA	100.00aA	78.33aB
<i>T. erecta</i>	92.16aAB	73.33nsB	16.66bC	93.33abAB	100.00aA	25.00bC
<i>Z. mays</i>	93.79aA	55.00nsB	56.67aB	100.00aA	100.00aA	11.66cC
Analysis of variance						
AM species	***					
Host plant species	***					
AM species × Host plant species	***					

Means followed by the same letter (s) (lower case within columns and capitals within rows) are not significantly different by Duncan's Multiple Range Test; ns: not significant. ***: significant at $p < 0.001$

5. การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ AMF และการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการเก็บกักสปอร์ AMF

5.1 การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ AMF

จากการศึกษาการเพิ่มจำนวนสปอร์โดยการปลูกเชื้อให้พืชอาศัยทั้ง 3 ชนิด คือ ต้นเดือย ข้าวฟ่าง และ หนุ่ยรัฐ พบว่า พืชอาศัยทั้ง 3 ชนิด เพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อที่นำมาศึกษาได้น้อย (ตารางที่ 28) เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากพืช โดยพบว่า ข้าวฟ่างมีเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากมากที่สุด รองลงมาคือต้นเดือยและ หนุ่ยรัฐ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากลักษณะทางกายภาพของดินดังที่มีรายงานว่าปริมาณน้ำในดินมีผลต่อการเข้าสู่รากพืชและ เพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อ (สมจิตร, 2549) นอกจากนี้ฤดูกาลก็มีผลต่ออัตราการเข้าสู่รากพืชด้วย โดยพบว่าช่วงฤดูหนาวอัตราการเข้าสู่รากพืชของเชื้อจะต่ำกว่าฤดูกาลอื่น (Mendoza, 2005) เมื่อเปรียบเทียบจำนวนสปอร์ที่พบในดิน พบว่าดินที่ปลูกข้าวฟ่างมีจำนวนสปอร์มากที่สุดรองลงมาคือต้นเดือยและ หนุ่ยรัฐ เช่นกัน ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าในพืชทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบกันนี้ ข้าวฟ่าง เป็นพืชอาศัยเพื่อเพิ่มปริมาณสปอร์ของ AMF ที่ดีที่สุด

ตารางที่ 28 เปอร์เซ็นต์การเข้ารากและจำนวนสปอร์ของ *Glomus* sp. ที่แยกจากผลิตภัณฑ์ Mycostar®, *Scutellospora* sp. และ Mycostar® เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อใช้ต้นเดือย ข้าวฟ่าง และ หนุ่ยรัฐ เป็นพืชอาศัย

ต้นเดือย	เปอร์เซ็นต์การเข้าสู่ราก	จำนวนสปอร์ในดิน 100 กรัม
ชุดควบคุม (ไม่ใส่เชื้อ)	0.00a	0.00a
<i>Glomus</i> sp.	8.20b	4.00b
<i>Scutellospora</i> sp.	7.79b	2.75b
Mycostar®	7.12a	5.00a
ข้าวฟ่าง		
ชุดควบคุม (ไม่ใส่เชื้อ)	0.00a	0.00a
<i>Glomus</i> sp.	9.08b	5.00b
<i>Scutellospora</i> sp.	10.06b	2.25a
Mycostar®	13.10b	7.50b
หนุ่ยรัฐ		
ชุดควบคุม (ไม่ใส่เชื้อ)	0.00a	0.00a
<i>Glomus</i> sp.	5.85b	1.25a
<i>Scutellospora</i> sp.	6.56b	3.50ab
Mycostar®	5.59a	5.75b

5.2 การคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการเก็บกักสปอร์ AMF

จากการทดลอง พบว่าวัสดุปลูกดินผสมทราย เพอร์ไลต์และพีทมียุทธต่อจำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแตกต่างกัน เมื่อใช้เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *Glomus etunicatum* และ *Scutellospora* sp. ร่วมกับหญ้านิสีม่วง และเบญจมาศที่ถูกใช้เป็นพืชอาศัย โดยวัสดุปลูกแต่ละชนิดมีผลต่อจำนวนสปอร์ดังแสดงในตารางที่ 29 กล่าวคือ สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ของ *G. etunicatum* และ *Scutellospora* sp. ได้ในดินผสมทรายและดิน: เพอร์ไลต์: ทรายเท่านั้น เมื่อเทียบกับพีท ซึ่งไม่สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้เลย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเพอร์ไลต์เป็นวัสดุที่มีความพรุนเหมาะกับการนำมาใช้เป็น carrier ในการผสมกับดิน เพื่อเป็นการปรับปรุงลักษณะทางกายภาพของดินให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา และพืชอาศัย การผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซาทางการค้าจึงนิยมนำเพอร์ไลต์และเวอร์มิคูไลต์มาช่วยในการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อรามากยิ่งขึ้น (Rai, 2006)

ในขณะที่ผลของวัสดุปลูกต่อเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของ AMF ในเบญจมาศและหญ้านิสีม่วง ก็มีความแตกต่างกัน โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดในหญ้านิสีม่วงมีมากกว่าเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากในเบญจมาศเมื่อใช้วัสดุปลูกทุกชนิด ขณะที่ดินผสมทรายและเพอร์ไลต์จะมีเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากในหญ้านิสีม่วงมากที่สุด เมื่อเทียบกับวัสดุปลูกอีก 2 ชนิด ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากกับจำนวนสปอร์ดต่อดิน 100 กรัม จึงมีความสอดคล้องกัน โดยวัสดุปลูกดินผสมเพอร์ไลต์และทรายมีผลดีต่อการเพิ่มจำนวนสปอร์ *G. etunicatum* และ *Scutellospora* sp. ในหญ้านิสีม่วงมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Graham และ Timmer (1984) และ Vestberg และคณะ (2000) ที่รายงานว่าพีทมีปริมาณสารอินทรีย์สูงซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้มีผลต่อการยับยั้งการเข้าสู่รากพืชอาศัยของเชื้อรา AMF

ตารางที่ 29 เปอร์เซนต์การเข้าราก และจำนวนสปอร์ของ *G. etunicatum* และ *Scutellospora* sp. ในหญ้ากีนีสี่ม่วง และเบญจมาศ เมื่อปลูกในวัสดุปลูกแต่ละชนิด

ดินผสมทราย ในอัตราส่วน 1:1	เปอร์เซนต์การเข้าสู่ราก	จำนวนสปอร์ในดิน 100 กรัม
<i>Scutellospora</i> sp. + เบญจมาศ	13.33a	4.50a
<i>Scutellospora</i> sp. + หญ้ากีนีสี่ม่วง	23.75ab	7.25ab
<i>G. etunicatum</i> + เบญจมาศ	17.08a	3.50a
<i>G. etunicatum</i> + หญ้ากีนีสี่ม่วง	18.54a	9.25ab
พีท (peat) 2000 มิลลิลิตร		
<i>Scutellospora</i> sp. + เบญจมาศ	8.75a	0
<i>Scutellospora</i> sp. + หญ้ากีนีสี่ม่วง	8.75a	0
<i>G. etunicatum</i> + เบญจมาศ	10.00a	0
<i>G. etunicatum</i> + หญ้ากีนีสี่ม่วง	16.67a	0
ตารางที่ 29 (ต่อ)		
ดิน: เพอร์ไลต์: ทราย ในอัตราส่วน 2:1:1		
<i>Scutellospora</i> sp. + เบญจมาศ	17.92a	9.50a
<i>Scutellospora</i> sp. + หญ้ากีนีสี่ม่วง	47.83bc	55.00a
<i>G. etunicatum</i> + เบญจมาศ	20.42a	13.75a
<i>G. etunicatum</i> + หญ้ากีนีสี่ม่วง	72.67c	1604.25b

สรุปผลการวิจัย

AMF มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับพืชทั้ง 4 กลุ่มที่ศึกษา ซึ่ง AMF มีความหลากหลายมากในบริเวณรากพืชแต่ละชนิดโดยมีชนิดที่เด่นใกล้เคียงกัน คือ

พืชที่ใช้ผลิต biofuel – สบู่ดำ

จากการสำรวจความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (AMF) ที่มีพืชอาศัยเป็นสบู่ดำ พบว่ามี AMF ทั้งหมด 34 ชนิด คือ *Acaulospora* 17 ชนิด, *Gigaspora* 2 ชนิด, *Glomus* 10 ชนิด, และ *Scutellospora* 5 ชนิด ในดินบริเวณรากของสบู่ดำ 10 แหล่ง ใน 6 จังหวัดของประเทศไทย ซึ่งพบว่ามีค่าดัชนีความหลากหลาย (H') เฉลี่ยอยู่ที่ 0.49 และความอุดมสมบูรณ์ของชนิด AMF เฉลี่ย 6.1 ชนิด การเข้าอาศัยของ AMF ในรากสบู่ดำ พบตั้งแต่ 38-94% ของพื้นที่ราก จากการวิเคราะห์ rDNA ของ AMF ในตัวอย่างรากและดินบริเวณรอบรากของสบู่ดำจำนวน 40 ตัวอย่าง ใน 6 แหล่งของจังหวัดเชียงใหม่ด้วยวิธี T-RFLP พบว่า สังคมของ AMF ทั้งในราก และบริเวณรอบรากสบู่ดำ มีความหลากหลายที่แตกต่างกัน บางชนิดที่พบในดินกลับไม่พบในราก ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ T-RF เมื่อทำการศึกษาโดยใช้สบู่ดำเป็นเหยื่อล่อ AMF ทั้งในโรงเรือน และแปลงปลูก พบว่ามีสปอร์ชนิดเด่นที่สุด 2 ชนิด คือ CMU05 และ CMU33

จากการศึกษาชนิดของพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อ AMF ชนิด CMU05 และ CMU33 พบว่าเชื้อ AMF จะเพิ่มจำนวนสปอร์และเข้าสู่รากข้าวฟ่างได้สูงที่สุด AMF ชนิด CMU05 และ CMU33 เร่งการเจริญของพืชได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ไม่พบการเพิ่มจำนวนของ CMU33 ในข้าวโพด ส่วน CMU05 ไม่เพิ่มจำนวนในข้าว ดังนั้นข้าวฟ่างจึงเป็นพืชอาศัยที่เหมาะสมในการผลิตและเก็บรักษาสปอร์ของ AMF ทั้งสองชนิด การปลูกเชื้อ *G. etunicatum* กับต้นลูกเดือยและดาวเรืองฝรั่งเศสสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้มาก ถึง 2739 และ 1493 สปอร์ต่อดิน 100 g ตามลำดับ การปลูกเชื้อ *Scutellospora* sp. กับต้นข้าวฟ่าง และลูกเดือย สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้มากถึง 2633 และ 1460 สปอร์ต่อดิน 100 g ตามลำดับ ส่วนการปลูกเชื้อ *A. tuberculata* AMF05 กับต้นข้าวฟ่างและข้าวโพดสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้ มากที่สุด คือ 19835 และ 5166 สปอร์ต่อดิน 100 g ตามลำดับ

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า CMU05 คล้ายกับ *Entrophospora colombiana* ส่วน CMU33 คล้ายกับ *Scutellospora heterogama* ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางอนุชีวภาพพบว่า SSU rDNA ของ CMU05 คล้ายกับ *E. colombiana* 99% และ CMU33 คล้ายกับ *S. heterogama* 97% ความคล้ายกันของ LSU rDNA ใน CMU05 กับ *E. colombiana* 91% และ CMU33 กับ *S. heterogama* 97% เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ MEGA 4.1 BETA พบว่า CMU05 ไม่ได้อยู่ใน clade เดียวกับ *E. colombiana* และ CMU33 มีความใกล้ชิดกับ *S. heterogama* ซึ่งอยู่ใน clade เดียวกัน

เมื่อทำการทดลองหาชนิดของ AMF ที่เหมาะสมกับสบู่ดำพบว่า เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการเร่งการเจริญของสบู่ดำสูงสุด คือ *Scutellospora* sp. CMU33 และจากการวิเคราะห์ความหนาแน่นของสปอร์ต่อการเจริญของสบู่ดำ ในดินที่มีการเติมฟอสฟอรัส พบว่า *Scutellospora* sp. CMU33 100 สปอร์กับดินที่เติมปุ๋ยฟอสฟอรัส 100 mg P/kg ของดิน ช่วยส่งเสริมให้กล้าสบู่ดำมีการเจริญสูงสุด

พืชเครื่องดื่ม-กาแฟ

AMF มีความสัมพันธ์กับกาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica* L.) ที่เพาะปลูกในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย โดยพบ AMF ทั้งสิ้น 29 ชนิด จัดอยู่ใน 3 สกุล คือ *Acaulospora* spp., *Ambispora* spp. และ *Glomus* spp. โดยพบว่า *G. aggregatum* เป็นชนิดที่พบจำนวนสปอร์มากที่สุด จากการศึกษาผลของ AMF ต่อการเจริญเติบโตของกล้ากาแฟอาราบิก้าที่ปลูกในดินที่มีฟอสฟอรัสต่ำพบว่า การใช้สปอร์ AMF แบบผสม ทำให้ความสูงของต้น และความยาวของรากเพิ่มขึ้น นอกจากนี้เชื้อบริสุทธิ์ของ *Acaulospora morrowiae*, *Ac. mellea*, *G. etunicatum*, และ *Ac. scrobiculata* ก็สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้ากาแฟที่ปลูกในดินขาดธาตุอาหารได้ด้วย จากการเพิ่มปริมาณสปอร์ในกระถางโดยใช้ดินเป็นหัวเชื้อพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณสปอร์ของ *Ac. mellea* ในข้าวโพดได้ดีที่สุด ขณะที่สามารถเพิ่มปริมาณสปอร์ของ *Ac. morrowiae* ได้ดีที่สุด ในข้าวฟ่าง และ *Ac. scrobiculata* ที่สามารถเพิ่มปริมาณสปอร์ได้ปานกลางในพืชทั้งสอง

พืชอาหาร ธัญพืช และถั่วกินเมล็ด

จากการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเข้ารากพืชของ AMF 5 สกุล คือ *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Glomus*, *Paraglomus* และ *Achaetospora* ในถั่วพุ่ม ข้าวโพด ลูกเดือย ข้าวไร่ ข้าวฟ่าง และปะดะ พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเข้ารากพืชสูง (60%-100%) ยกเว้นในข้าวไร่ นอกจากนี้ดินที่ใส่ฟอสฟอรัส 30 กก./เฮกเตอร์ จะพบปริมาณสปอร์น้อยกว่าดินที่ใส่ฟอสฟอรัส 3 กก./เฮกเตอร์ จากการทดลองนี้เชื้อราสกุล *Acaulospora* เป็นชนิดเด่น แต่ทุกสกุลสามารถเพิ่มน้ำหนักยอด และรากของพืชทุกชนิดได้เมื่อปลูกในดินที่มีฟอสฟอรัสต่ำ

พืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า

จากการสำรวจความหลากหลายของ AMF ที่มีความสัมพันธ์กับพืชท้องถิ่นในป่าเขตร้อนของอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย พบว่ามีสปอร์ของ AMF ทั้งสิ้น 21 ชนิด ในดินรอบรากต้นไม้ทั้ง 24 ชนิด ที่ทำการศึกษา โดยจัดจำแนกอยู่ในสกุล *Acaulospora* 6 ชนิด, *Glomus* 12 ชนิด, และ *Scutellospora* 3 ชนิด โดย *Glomus* และ *Acaulospora* เป็นชนิดเด่น ส่วนชนิดที่พบบ่อยคือ *A. elegans*, *G. multicaule*, และ *S. pellucid* นอกจากนี้ยังพบว่า AMF บางชนิดสามารถอาศัยอยู่ร่วมกับพืชได้หลายชนิด เมื่อทดสอบเชื้อ *Ac. elegans*, *G. etunicatum*, และ *G. mosseae* ร่วมกับการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในการปลูกต้นกล้าก่อเดือยพบว่า อัตราการใช้ฟอสฟอรัสที่เพิ่มขึ้นสามารถเพิ่มการเจริญของต้นกล้าได้ แต่การใช้ *G. etunicatum* ร่วมกับการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส ทำให้ความสูงของพืช น้ำหนักแห้งของยอดและรากเพิ่มขึ้นมากที่สุด จากการปลูกเชื้อ *Ac. elegans*, *Ac. mellea*, *Ac. scrobiculata*, *G. etunicatum*, *G. mosseae* และ *S. heterogama* โดยใช้พืช 5 ชนิด คือ ข้าวฟ่าง ข้าว ถั่วเหลือง ข้าวโพด และ ดาวเรือง พบว่าข้าวฟ่าง และข้าวโพดสามารถเพิ่มปริมาณสปอร์ของ *Ac. elegans*, *G. etunicatum*, และ *G. mosseae* ได้มากที่สุด

การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ AMF และการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการเก็บกักสปอร์ของ AMF

จากการปลูกเชื้อ AMF ในพืชอาศัยตระกูลหญ้า 3 ชนิด คือ ต้นเดือย หญ้าธูปี่ และข้าวฟ่าง พบว่า พืชอาศัยทั้งหมด สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ของ AMF ทุกชนิดได้น้อย ซึ่งข้าวฟ่างสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Glomus* sp., *Scutellospora* sp. และ Mycostar[®] ได้มากกว่าต้นเดือย และหญ้าธูปี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่เปอร์เซ็นต์การเข้ารากของเชื้อต่ำ เมื่อทำการทดสอบการเพิ่มจำนวนสปอร์ของ *Glomus etunicatum* และ *Scutellospora* sp. กับพืชอาศัย 2 ชนิด คือ เบญจมาศ และหญ้ากีนีสีม่วง โดยใช้วัสดุปลูกที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ พีทม้าเชื้อ, ดินม้าเชื้อผสมทรายม้าเชื้ออัตราส่วน 1:1, และดินม้าเชื้อผสมทรายและเพอร์ไลต์ม้าเชื้ออัตราส่วน 1:0.5:0.5 พบว่าหญ้ากีนีสีม่วงที่ปลูกในวัสดุปลูกแบบที่สามสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ของ *G. etunicatum* ได้ 1,604 สปอร์/ดิน 100 ก. ซึ่งมากกว่า *Scutellospora* sp. (50 สปอร์/ดิน 100 ก.) อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น การใช้ดินผสมทรายและเพอร์ไลต์เป็นวัสดุปลูก และเก็บกักเชื้อ *G. etunicatum* จึงมีศักยภาพสูงกว่าวัสดุอื่นที่ทำการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- สมจิตร อยู่เป็นสุข. 2549. ไมคอร์ไรซา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Abbott, L.K., Robson, A.D. 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 35: 121-150.
- Anonymous. 1988. *The Wealth of India. Raw Material Vol. IV: F-G.* Publication and Information Directorate, Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India.
- Apple, M.E., Thee, C.I., Smith-Longozo, V.L., Cogar, C.R., Wall, C.E., Nowak, R.S. 2005. Arbuscular mycorrhizal colonization of *larrea tridentate* and *Ambrosia dumosa* roots varies with precipitation and season in the Mojave Desert. *Symbiosis* 39: 131-135.
- Bagyaraj, B.J., Manjunath A. 1980. Response of crop plants to VA mycorrhizal inoculation in an unsterile Indian soil. *New Phytologist* 85: 35-36.
- Baylis, G.T.S. 1975. The magnolioid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. In Sanders, F.E., Mosse, B. and Tinker, P.B. (Eds.), *Endomycorrhizas*. Academic Press, New York, pp. 373-389.
- Bever, J. D., Morton, J. B., Antonovics, J., Schultz, P.A. 1996. Host dependent sporulation and species diversity of mycorrhizal fungi in a mown grassland. *Journal of Ecology* 84:71-82.
- Blakesley, D., Elliott, S., Kuarak, C., Navakitbumrung, P., Zangkum, S. and Anusarnsunthorn, V. 2002. Propagating framework tree species to restore seasonally dry tropical forest; implications of seasonal seed dispersal and dormancy. *Forest Ecology Management* 164: 31-38.
- Bonito, R.D., Elliott, M.L., Jardin, E.A.D. 1995. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2809-2810.
- Braunberger, P. G., Abbott, L.K., Robson, A.D. 1994. The effect of rain in the dry season on the formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas in the growing season of annual clover-based pastures. *New Phytologist* 127: 107-114.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., Malajczuk, N. 1996. *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture.* ACIAR Monograph. Canberra.

- Brundrett, M., Juniper, S. 1995. Non-destructive assessment of spore germination of VAM fungi and production of pot cultures from single spores. *Soil Biology & Biochemistry* 27: 85–91.
- Calvente, R., Cano, C., Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C. and Barea, J.M. 2004. Analysing natural diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in olive tree (*Olea europea* L.) plantations and assessment of the effectiveness of native fungal isolates as inoculants for commercial cultivars of olive plantlets. *Applied Soil Ecology* 26: 11–19.
- Cardoso, I.M., Boddington C., Janssen B.H., Oenema O. and Kuyper, T.W. 2003. Distribution of mycorrhizal fungal spores in soils under agroforestry and monocultural coffee systems in Brazil. *Agroforestry System* 58: 33–43.
- Carvalho, L.M., Caçador, I. and Martins-Loução, M.A. 2001. Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of the Tagus estuary (Portugal). *Mycorrhiza* 11: 303–309.
- Clapp, J.P., Fitter, A.H., Young, J.P.W. 1999. Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. *Molecular Ecology* 8: 915–921.
- Clapperton, M.J. Reid, D.M. 1992. A relationship between plant growth and increasing VA mycorrhizal inoculum density. *New Phytologist* 120: 227–234.
- Clark, R.B., Zeto, S.K., Zobel, R.W. 1999. Arbuscular mycorrhizal fungal isolate effectiveness on growth and root colonization of *Panicum virgatum* in acidic soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1757–1763.
- Dabire, A.P., Hien, V., Kisa, M., Bilog, A., Sangare, K.S., Galiana, A., Prin, Y. and Duponnois, R. 2007. Responses of soil microbial catabolic diversity to arbuscular mycorrhizal inoculation and soil disinfection. *Mycorrhiza* 17: 537–545.
- Daniels, B.A. and Trappe, J.M. 1980. factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*. *Mycologia* 72:457.
- Elliott, S., Navakitbumrung, P., Kuarak, C., Zangkum, S., Anusarnsunthorn V. and Blakesley, D. 2003. Selecting framework tree species for restoring seasonally dry tropical forests in Northern Thailand based on field performance. *Forest Ecology Management* 184: 177–191.
- Entry, J.A., Reeves, D.W., Mudd, E., Lee, W.J., Guertal, E., Raper, R.L. 1996. Influence of compaction from wheel traffic and tillage on arbuscular mycorrhizae infection and nutrient uptake by *Zea mays*. *Plant and Soil* 180: 139 –146.

- Gavito, M.E., Miller, M.H. 1998. Changes in mycorrhiza development in maize induced by crop management practices. *Plant and Soil* 198: 185-192.
- Gollotte, A., van Tuinen, D., 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.
- Graham, J.H. and Timmer, L.W. 1984. Vesicular-arbuscular mycorrhizal development and growth response of rough lemon in soil and soilless media: Effect of phosphorus source. *Journal of American Society of Horticultural Science* 107: 324-327.
- Green, J.J., Baddeley, J.A., Cortina, J. and Watson, C.A. 2005. Root development in the Mediterranean shrub *Pistacia lentiscus* as affected by nursery treatments. *Journal of Arid Environments* 61: 1–12.
- Habte, M., Osorio, N.W. 2001. Arbuscular mycorrhizas: producing and applying arbuscular mycorrhizal inoculum. Honolulu (HI): University of Hawaii at Manoa, College of Tropical Agriculture and Human Resources, p.47.
- Helgason T, Daniell T.J., Husband, R., Fitter, A.H., Young, J.P.W. 1998. Ploughing up the wood-wide web. *Nature* 394: 431.
- Hepper, C.M., 1984. Isolation and Culture of VA Mycorrhizal (VAM) Fungi. In: VA Mycorrhizae, Powell, C.L. and D.J. Bagyaraj (Eds.). CRC Press, Florida, USA., pp: 95-112.
- Hijri, M., Redecker, D., MacDonald-Comber Petitot, J.A., Voigt, K., Wostemeyer, J., Sanders, I.R. 2002. Identification and isolation of two ascomycete fungi from spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea*. *Applied and environmental microbiology* 68: 4567–4573.
- INVAM website, <http://invam.caf.wvu.edu>
- Isayenkov, S., Fester, T., Hause, B. 2004. Rapid determination of fungal colonization and arbuscular formation in roots of *Medicago truncatula* using real-time (RT) PCR. *Journal of Plant Physiology* 161: 1379-1383.
- Janos, D.P. 1980. Vesicular arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. *Ecology* 61: 151-162.
- Janos, D.P. 1983. Tropical mycorrhizas, nutrient cycles and plant growth. In: Sutton, S.L., Whitmore, T.C. and Chadwick, A.C. (Eds.), *Tropical Rain Forest: Ecology and Management*. Blackwell Scientific Publication, Oxford. pp. 327-345.

- Kabir, Z., Ohallooran, 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 Ecosystemand Environment* 68:151-163.
- Kapoor, K., Giri, B. Mukerji, K.G. 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. *Bioresource Technology*. 93: 307-311.
- Karasawa, T., Kasahara, Y., Takebe, M. 2002. Difference in growth responses of maize to preceding cropping caused by fluctuation in the population of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 851-857.
- Kjoller, R., Rosendahl, S. 2001. Molecular diversity of glomalean (arbuscular mycorrhizal) fungi determined as distinct *Glomus* specific DNA sequences from roots of field grown peas. *Mycological Research* 105: 1027-1032.
- Krüger M., Stockinger H., Krüger C., Schüßler A. 2009. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 183: 212-23.
- Lanfranco, L., delpero, M., Bonfante, P. 1999. Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology* 8: 37-45.
- Linderman, R.G. and Davis, E.A. 2004. Varied response of marigold (*Tagetes* spp.) genotypes to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae* 99: 67–78.
- Maffia, B., Nadkarni, N.M. and Janos, D.P.1993. Vesicular-arbuscular mycorrhizae of epiphytic and terrestrial Piperaceae under field and greenhouse conditions. *Mycorrhiza* 4: 5-9.
- March, J.F., Schultze, M. 2001. Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants. *New Phytologist* 150: 525-532.
- Marschner, H., Kirby, E. and Cakmak, I. 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany* 47: 1255-1263.
- Mathimaran, N., Ruh, R., Vullioud, P., Frossard, E. and Jansa, J. 2005. *Glomus intraradices* dominates arbuscular mycorrhizal communities in a heavy textured agricultural soil. *Mycorrhiza* 16: 61–66.
- Mathur, N., Vyas, A. 2000. Influence of arbuscular Mycorrhizae on biomass production, nutrient uptake and physiological changes in *Ziziphus mauritiana* Lam. under water stress. *Journal of Arid Environments* 45: 191-195.

- McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.I., Swan, J.A. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495-501.
- Mendosa, R. 2005. Seasonal variation of arbuscular mycorrhizal fungi in temperate grasslands along a wide hydrologic gradient. *Lotus Newsletter* 35(1): 23.
- Mukerji, K.G., Manoharachary, C., Chamola, B.P. 2002. *Techniques in Mycorrhizal studies*. 1st edn., Kluwer academic publishers. London-Netherlands, pp 285-296.
- Miyasaka, S.C., Habte, M. 2001. Plant mechanisms and mycorrhizal symbioses to increase phosphorus uptake efficiency. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 32: 1101–1147.
- Morton, J.B., Redecker, D. 2001. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera, *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93: 181-195.
- Muchvej, R.M. 2009. Important of Mycorrhizae for agricultural Crops. Institute of food and Agricultural Science University of Florida. [online] <http://www.tandjenterprises.com> (26 March 2009).
- Murakoshi, T., Tojo, M., Walker, C. and Saito, M. 1998. Arbuscular mycorrhizal fungi on adjacent semi-natural grasslands with different vegetation in Japan. *Mycoscience* 39: 455-462.
- Muthukumar, T., Sha, L., Yang, X., Cao, M., Tang, J. and Zheng, Z. 2003. Distribution of roots and arbuscular mycorrhizal associations in tropical forest types of Xishuangbanna, Southwest China. *Applied Soil Ecology* 22: 241-253.
- Mycosym Company, 2004. Personal contact.
- Nandakwang, P., Elliott, S., Youpensuk, S., Dell, B., Teaumroong, N. and Lumyong, S. 2008. Arbuscular mycorrhizal status of indigenous tree species used to restore seasonally dry tropical forest in Northern Thailand. *Research Journal of Microbiology* 3: 51-61.
- Narendra, K.S., Ashwani, K., Satyawati, S., Naik, S.N. 2009. Interaction of *Jatropha Curcas* Plantation with Ecosystem. *Proceeding of International conference on energy and environment (ENVIROENERGY2009)*. 19-21 March, 2009. p 666-671.
- Newsham, K.K., Fitter, A.H. Watkinson, A.R. 1995. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Tree* 10: 407-411.
- Onguene, N.A., Kuyper, T.W. 2001. Mycorrhizal associations in the rain forest of South Cameroon. *Forest Ecology and Management* 140: 277-287.

- Pacovsky, R.S., Bethlenfalvay, G.J. and Paul, E.A. 1986. Comparisons between P-fertilized and mycorrhizal plants. *Crop Science* 26: 151-156.
- Palenzuela, J., Ferrol, N., Boller, T., Azcón-Aguilar, C., Oehl, F. 2008. *Otospora bareai*, a new fungal species in the Glomeromycetes from a dolomitic shrub land in Sierra de Baza National Park (Granada, Spain). *Mycologia* 100: 296–305.
- Powell, C.L., Bagyaraj, D.J. 1984. VA mycorrhiza. CRC Press, Florida.
- Rai, M.K. 2006. Handbook of Microbial Biofertilizers. Food Product Press, New York.
- Redecker, D. 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73-80.
- Renker, C., Blanke, V. and Buscot, F. 2005. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. *Environmental Pollution* 135: 255–266.
- Rerkasem, K., Yimyam, N., Kosamphan, C., Thong-Ngam, C., Rerkasem, B. 2002. Agrodiversity lessons in mountain land management. *Mountain Research and Development* 22: 4-9.
- Rohyadi, A., Smith, S.E., Smith, F.A., Murray, R.S. 2001. The effect of two arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on cowpea growth under low pH condition. *Processing of the Third International Conference on Mycorrhizas, Adelaide, South Australia*, pp 79.
- Rutto, K.L., Mizutani, F., Kadoya, K. 2002. Effect of root-zone flooding on mycorrhizal and non-mycorrhizal peach (*Prunus persica* Batsch) seedlings. *Scientia Horticulturae* 94: 285-295.
- Ryan, M.H., Graham, J.H. 2002. Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? *Plant and Soil*. 244: 263-271.
- Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-Bassells, R., Vierheilig, H., Ocampo, J.A. and Godeas, A. 2005. Arbuscular mycorrhizal colonization of tomato by *Gigaspora* and *Glomus* species in the presence of root flavonoids. *Journal of Plant Physiology* 162: 625–633.
- Schenck, N.C., Pérez, Y. 1988. Manual of the Identification of VA Mycorrhizal Fungi, 2nd Edition. INVAM, Florida.
- Schenck, N.C., Smith, G.S. 1982. Response of six species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and their effects on soybean at four soil temperatures. *New Phytologist* 92: 193-201.

- Schubler, A., Shwazott, D., Walker, C. 2001a. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological research* 105: 141-142.
- Schubler, A., Gehrig, H., Shwazott, D., Walker, C. 2001b. Analysis of partial *Glomales* SSU rRNA gene sequence: implications for primer design and phylogeny. *Mycological Research* 105: 5-15.
- Shi, Z.Y., Zhang, L.Y., Li, X.L., Feng, G., Tian, C.Y. and Christie, P. 2007. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with desert ephemerals in plant communities of Junggar Basin, northwest China. *Applied Soil Ecology* 35: 10–20.
- Singh, S., Pandey, A., Chaurasia, B., Palni, L.M.S. 2008. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with the rhizosphere of tea growing in ‘natural’ and ‘cultivated’ ecosites. *Biology and Fertility of Soils* 44: 491-500.
- Simon, L., Lalonde, M., Bruns, T.D. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology* 58:291-295.
- Simon, L., Levesque, M., Lalonde, M. 1993. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing root by fluorescent single-strand conformational polymorphism-poly chain reaction. Academic Press, London.
- Siqueira, J.O., Saggin-Junior, O.J., Flores-Aylas, W.W. and Guimarães, P.T.G. 1998. Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. *Mycorrhiza* 7: 293-300.
- Smith, M.R., Charvat, I. and Jacobson, R.L. 1998. Arbuscular mycorrhizae promote establishment of prairie species in a tall grass prairie restoration. *Canadian Journal of Botany* 76: 1947-1954.
- Smith, S. E., Read, D. J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Second edition. Academic press. California, USA.
- St. John. 2000. Mycorrhizae on the job: the experience of experts. *Land and Water*, September-October : 49-52.
- Straker, C.J., Hilditch, A.J., Rey, M.E.C. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *South African Journal of Botany* 76: 102-111.
- Stutz, J.C., Copeman, R., Martinand, C.A., Morton, J.B. 2000. Patterns of species composition and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in arid regions of southwestern North America and Namibia, Africa. *Canadian Journal of Botany* 78: 237-245.

- Sukarno, N., Smith, F.A., Smith, S.E., Scott, E.S. 1993. The Effect of Fungicides on Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. II. The Effects on Area of Interface and Efficiency of P Uptake and Transfer to Plant. *New Phytologist* 132: 583-592.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Sylvia, D.M., Neal L.H. 1990. Nitrogen affects the phosphorus response of VA mycorrhiza. *New Phytologist* 115: 303-310.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22: 4673-4680.
- Vays, S.C. 1988. Non-target Effects of Agricultural Fungicides. CRC Press Inc, Boca Raton, FL.
- Vestberg, M., Kukkonen, S., Neuvonen, E.L. and Uosukainen, M. 2000. Mycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry - case studies on mineral soil and mined peat bog. *Acta Horticulture* 530: 297-304.
- Walker, C., Trappe, J.M. 1993. Names and epithets in the Glomales and Endogonales. *Mycological research*. 97: 339-344.
- Wangmo, J. 2008. Influences of arbuscular mycorrhizal fungi on different food crops. Ph.D. Thesis, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp 315-322.
- Wyss, P., Bonfante, P. 1993. Amplification of genomic DNA of arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. *Mycological Research* 97: 1351-1357.
- Yano, K., Yamauchi, A., Iijima, M., Kono, Y. 1998. Arbuscular mycorrhizal formation in undisturbed soil counteracts compacted soil stress for pigeon pea. *Apply Soil Ecology* 10: 95-102.
- Youpensuk, S., Rerkasem, B., Dell, B., Lumyong, S. 2005. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on a fallow enriching tree (*Macaranga denticulate*). *Fungal Diversity*. 18: 189-199.

- Youpensuk, S., Lumyong, S., Dell, B., Rerkasem, B. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of *Macaranga denticulata* Muell. Arg., and their effect on the host plant. *Agroforestry Systems* 60: 239-246.
- Youpensuk, S., Yimyan, N., Lumyong, S., Rerkasem B., Dell, B. 2005b. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with upland rice in a rotational shifting cultivation system. *International Rice Research Notes* 30: 22-23.
- Zhao, D., Zhiwei, Z. 2007. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the hot-dry valley of the Jinsha River, southwest China. *Applied Soil Ecology* 37: 118-128.
- Zhu, Y.G., Laidlaw, A.S., Christie, P., Hammond, M.E.R. 2000. The specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in perennial ryegrass-white clover pasture. *Agricultural Ecosystem and Environmental* 77: 221-218.

ผลสัมฤทธิ์

การจัดอบรมเชิงปฏิบัติการ

1. เรื่อง “การใช้มายคอร์ไรซาเพื่อเพิ่มผลผลิตของพืช”
ระหว่างวันที่ 7-9 มีนาคม 2550
ณ อาคาร 40 ปี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. เรื่อง “การใช้มายคอร์ไรซาเพื่อเพิ่มผลผลิตของพืช”
วันที่ 25 เมษายน 2551
ณ อาคาร 40 ปี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. เรื่อง “การอบรมมายคอร์ไรซาเพื่อเกษตรกรอินทรีย์”
ระหว่างวันที่ 22–23 เมษายน 2552
ณ อาคาร 40 ปี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. เรื่อง “การใช้ประโยชน์จากไมคอร์ไรซาเพื่อการอนุรักษ์และการเกษตร”
ระหว่างวันที่ 13-14 พฤษภาคม 2553
ณ อาคาร 40 ปี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การนำเสนอผลงาน

1. Chanthiboon, P. and S. Lumyong. 2006. Biodiversity of mycorrhiza in coffee seedling. 5th International Symbiosis Society Congress, 4-10 August 2006, Vienna, Austria.
2. Charoenpakdee, S., B. Dell and S. Lumyong. 2006. Biodiversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) associated with physic nut (*Jatropha curcas* L.) in some areas of Thailand. Crop Science Meso 2006 (งานประชุมสัมมนาและเสนอผลงานเมธีวิจัยอาวุโส สกว. สาขาพืชไร่ ประจำปี 2549), 3-4 December 2006, Faculty of Agroindustry, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
3. Charoenpakdee, S., Chunhaluechanon, S., Dell, B., Bussaban, B., Lumyong, P. and Lumyong, S. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the biofuel plant Physic Nut (*Jatropha carcass* L.) in Thailand. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, November 1-3. Khon Kaen University, Nong Kai Campus, Nong Khai, Thailand.
4. Chanthiboon, P., Lumyong, S. Biodiversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in arabica coffee's rhizosphere soil. การประชุม “วันวิชาการ ครั้งที่ 2 วิถีวิจัย: ตามรอยพระยุคลบาท” ณ หอประชุม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 8-10 ธันวาคม 2549

5. Chanthiboon, P., Yimyam, N., Lumyong, P., Lumyong, S. Diversity and propagation of Arbuscular mycorrhiza fungi associated with coffee (*Coffea arabica* L.) seedling in Chiang mai and Chiang rai, Thailand. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, November 1-3. Khon Kaen University, Nong Kai Campus, Nong Khai, Thailand.
6. Jaiyasen, A., Lumyong, S. การเพิ่มจำนวนสปอร์เอนโดไมคอร์ไรซาและผลของเชื้อราต่อพืชอาศัย. ในงานประชุม “เดินตามรอยเบื้องพระยุคลบาท” IRPUS 51 ระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2551 ณ ศูนย์การค้าสยามพารากอน กรุงเทพฯ
7. เจนใจ สุธีพรวิโรจน์ และ ศ.ดร. สายสมร ถ้ายอง “การเพิ่มจำนวนสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในพืชตระกูลหญ้า” นิทรรศการแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญญาตรี สกว. ครั้งที่ 7 IRPUS 52 ระหว่าง 27-29 มีนาคม 2552 ณ ศูนย์การค้าสยามพารากอน กรุงเทพฯ

เอกสารตีพิมพ์

1. Nandakwang, P., S. Elliott, S Youpensuk, B. Dell, N. Teaumroong and S. Lumyong. 2008. Arbuscular mycorrhizal status of indigenous tree species used to restore seasonally dry tropical forest in northern Thailand. *Research Journal of Microbiology* 3: 51-61.
2. Nandakwang, P., S. Elliott, S Youpensuk and S. Lumyong. 2008. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and fertilizer on production of *Castanopsis acuminatissima* saplings for forest restoration in northern Thailand. *Research Journal of Microbiology* 3: 225-236.
3. Patipan Nandakwang, Stephen Elliott, Saisamorn Lumyong. 2008. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in forest restoration area of Doi Suthep-Pui national park, northern Thailand. *Journal of Microscopy Society of Thailand* 22: 60-64.
4. Wongmo, J., Dell, B., Lumyong, S., Rerkasem, B. 2008. Shifting cultivation system and crop symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi. *Chiang Mai University journal of natural sciences* 7: 269-277.
5. Charoenpakdee S., Phosri C., Dell B. and Lumyong S. 2010. The mycorrhizal status of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in Thailand. *Mycosphere* 1 (in press)
6. Chanthiboon, P., Yimyam, N., Lumyong, P., Lumyong, S. The indigenous arbuscular mycorrhizal fungi spores in rhizosphere soils of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) plantation, northern Thailand. (in preparation)

7. Jaiyasan, A., Lumyong, S. Propagation and comparative effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Piriformospora indica* on *Coix lacryma-jobi* L. and *Tagetes patula* L. (in preparation)

นักศึกษา

1. ระดับคุษฎีบัณฑิต จำนวน 3 คน

นางสาวจำเนียร วงศ์ไม้	วิทยาศาสตร์คุษฎีบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
ว่าที่ ร.ต. ปฏิพันธ์ นันทขว้าง	วิทยาศาสตร์คุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
นางสาวสุพัตรา เจริญศักดิ์	วิทยาศาสตร์คุษฎีบัณฑิต (ความหลากหลายชีวภาพและชีววิทยา ชาติพันธุ์)

2. ระดับมหาบัณฑิต จำนวน 1 คน

นางสาวปัสลณี จันธิบูลย์	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
-------------------------	---------------------------------------

3. ระดับบัณฑิต จำนวน 3 คน

นางสาวอมรรัตน์ ใจยะเสน	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
นางสาวจันทร์จิรา วิริยา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
นางสาวเจนใจ สุทธิพรวิโรจน์	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ภาคผนวก

เอกสารตีพิมพ์

Title:	Arbuscular mycorrhizal status of indigenous tree species used to restore seasonally dry tropical forest in northern Thailand
Authors:	Nandakwang, P., S. Elliott, S Youpensuk, B. Dell, N. Teaumroong and S. Lumyong
Journal:	Research Journal of Microbiology
Published :	Academic Journals
ISSN:	1816-4935
Issue:	Volume 3(2),2008
Page:	51-61

Arbuscular Mycorrhizal Status of Indigenous Tree Species Used to Restore Seasonally Dry Tropical Forest in Northern Thailand

¹P. Nandakwang, ¹S. Elliott, ¹S. Youpensuk, ²B. Dell, ³N. Teaumroong and ¹S. Lumyong

¹Department of Biology, Chiang Mai University, 50200, Chiang Mai, Thailand

²School of Biological Sciences and Biotechnology,
Murdoch University, 6150, Perth, Australia

³School of Biotechnology, Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

Abstract: Arbuscular Mycorrhizal (AM) status of native plants in the tropical forest of northern Thailand was surveyed. Twenty four framework tree species, used to forest restoration were examined at 3 sites: FORRU's research tree Nursery (FN), Forest Restoration plot (FR) and Natural Forest (NF). Eleven dominant herb species were examined at 2 sites: Degraded Watershed (DW) and Forest Soil extraction area (FS). Rhizosphere soil samples were collected and AM fungal spores were counted and identified morphologically. Most plant species were intensively colonized by AM fungi except *Cyperus cyperoides*. Twenty four AM species were identified: *Glomus* (15 species), *Acaulospora* (6 species) and *Scutellospora* (3 species). *Glomus rubiforme* was the dominant species. Spore density varied from 16.1 to 97.4 per 100 g soil (averaged 59.7). Spore number at DW and FS were 129 and 479 spores, respectively, with species richness of 6 and 8, respectively. Spore number at FN, FR and NF were 1,152, 2,337 and 1,376 spores, respectively, with species richness of 17, 21 and 15, respectively. The AM diversity was lower in the sites dominated by herbs than in sites examined for trees. In the deforested sites, reduced plant diversity was related with reduced mycorrhizal diversity. In contrast, the trial plot had the highest AM fungal community. Therefore, the forest restoration techniques allow tree species grown in nursery to become AM associated. The association is still maintained after planting out trees in restored area.

Key words: Arbuscular mycorrhizal fungi, framework tree species, herb species, tropical forest restoration

INTRODUCTION

Tropical deforestation causes forest fragmentation and permits the extensive areas of degraded land. This leads to losses of biodiversity, a decline in soil fertility and deterioration of soil physical and biological properties. The seasonally dry tropical forests of Doi Suthep-Pui National Park in northern Thailand support more than 480 indigenous tree species. Deforestation within the park has had adverse consequences for biodiversity and environmental quality. Previous reforestation programs, to counteract this problem, used mainly exotic tree species. This was partly due to lack of knowledge about the environmental requirements of indigenous trees. One method of forest restoration that have proved very successful in Queensland, Australia, is the so-called framework species method (Goosem and Tucker, 1995; FORRU, 2006), which involves planting mixtures of several indigenous tree species in a single step. Therefore, the Forest Restoration Research Unit (FORRU) at Chiang Mai University (CMU) began assessing the suitability of a wide range of indigenous trees to restore evergreen forest

on degraded sites within the national park. The unit looked for trees likely to act as framework species i.e., those that would out-compete weeds and attract seed-dispersing animals. Candidate framework species were selected, grown in a nursery and tested in trial plot, established in 1998 in a degraded watershed area in the north of national park (Elliott *et al.*, 2003).

Most sites requiring forest restoration have soil with low-fertility and a low inoculum potential of microorganisms beneficial to plants, such as Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi (Setiadi, 2000; Korb *et al.*, 2003). AM fungi are only one of numerable microorganisms in soil that provide a direct link between plant roots and the soil matrix. AM fungi are widespread in natural ecosystems; play a crucial role in the mineral nutrition of forest trees and provide important nutrient-acquiring mechanisms (Koide and Mosse, 2004). Inoculation with effective AM fungi, combined with early intense colonization of seedlings in tree nurseries, stimulates plant growth and establishment in the field under nutrient-deficient and drought-stressed conditions (Setiadi, 2000). Thus, the capacity of potential framework species to associate with indigenous AM fungi is a very important strategy for forest restoration. The purposes of the present study were to: (1) obtain information on the AM status of 24 framework trees and 11 weedy herbs in Doi Suthep-Pui National Park (2) assess the diversity and distribution of AM fungi associated with plant species in natural forest, degraded area and restoration area. In addition this study was carried out to select AM fungi to produce inoculum for improving nursery tree seedling performance and promoting sapling growth in reforestation areas.

MATERIALS AND METHODS

Study Sites

This study was carried out at 5 sites within Doi Suthep-Pui National Park, Chiang Mai, Thailand. There are two kinds of forest, including deciduous forest (from the lowlands up to about 950 m a.s.l) and Evergreen Forest (EGF) (from about 950 m a.s.l to the summit, 1,685 m a.s.l). Average annual rainfall was 2094.9 mm. Temperatures range from 4.5°C in December to 35.5°C in March (Elliott *et al.*, 2003).

FORRU's research tree Nursery (FN) is situated near the accommodation center of national Park (18°50'N, 98°50'E) at about 1,000 m a.s.l. FORRU screened indigenous tree species to select potential framework species for field trials. Saplings were grown in black plastic bags containing a nursery potting medium of primary evergreen forest soil, coconut husk and peanut husk (2:1:1).

Forest Restoration plot (FR) was established in a degraded watershed area (18°52'N, 98°51'E). Trial plot was positioned along the ridges of a degraded watershed area at 1,207-1,310 m a.s.l. At least 48 nursery saplings of each of 24 framework species were planted out randomly in the field plot.

The Natural evergreen Forest (NF) of Doi Suthep-Pui is one of the most luxuriant in northern Thailand. The forest supports many indigenous tree species, but the framework species in this sampling are sparsely scattered across the national park at 1,050-1,475 m a.s.l.

The Degraded Watershed area (DW) had originally been covered in EGF, but the forest was cleared for cultivation about 20 years previously. Degraded areas at about 1,207-1,310 m a.s.l, near the field plot still supported a few remnant forest trees and were dominated by herbaceous weeds.

The Forest Soil extraction area (FS) was in disturbed EGF at 1,685 m a.s.l. The area, surrounded by natural forest was covered with a mature tree canopy and herbaceous weeds. The forest soil is rich in organic matter with high moisture-holding capacity.

Study Plants

Among the plants of the evergreen forest zone of national park, 24 potential framework species (representing 19 families) were selected for study. All tree species are reported to be multipurpose and

suitable for acceleration forest regeneration. Root and soil samples from saplings at the FN, planted trees at the PR and mature trees at the NF of each species were collected. At the other study sites, dominant herb species (representing 5 families) were chosen as study plants; 8 species were sampled at the DW and 6 species at the FS.

Root and Soil Sampling

Sampling of plant roots and their rhizosphere soil took place at 5 study sites between February and April 2005 (dry season). Soil and root samples (about 500 g) were collected to a depth of 10 cm of three individual plants of each species and stored at 4°C until analyzed.

Estimation of Mycorrhizal Colonization

Roots of study plants were separated from each soil sample. The root samples were cleared in 10% (w/v) KOH at 121°C for 15 min and rinsed with water on a 90 µm sieve. Cleared roots were stained with 0.5% acid fuchsin (Brundrett *et al.*, 1996). Thirty stained root segments from each plant (about 1 cm long) were taken at random and mounted on microscopic slides to assess mycorrhizal colonization (McGonigle *et al.*, 1990).

Spore Extraction and Counting

Spores were isolated from 100 g air-dried soil taken from each field soil sample using the wet-sieving method as described by An *et al.* (1990). Spores were recovered by filtering through a 53 µm sieve onto filter paper. The intact spores on filter paper were counted under a dissecting microscope. A sporocarp was counted as one unit.

Identification of AM Fungi

Spores of AM fungi isolated from the field soils were mounted on glass slides in polyvinyl lactic acid (PVA) or PVA+Melzers reagent (Morton, 1988). The spores were identified according to morphological characteristics of original published species descriptions and using the Internet information from the INVAM website (<http://invam.caf.wvu.edu>).

Data Analysis

Species richness, spore density, spore number, frequency and relative abundance of AM fungi were expressed as follows: species richness = species observed per sample; spore density = No. of spores per 100 g dried field soil; spore number = No. of spores observed per total samples; frequency = (No. of the samples in which the species or genus observed per total samples) × 100%; relative abundance = (No. of spores of a species or a genus per total spores) × 100%. The data were subjected to one-way ANOVA. Duncan's Multiple Range Test ($p < 0.05$) was used to compare means.

RESULTS

Arbuscular Mycorrhizal Status of Plant Species and Extent of Mycorrhizal Colonization

All plants studied formed AM symbioses. The extent of AM colonization (Table 1 and 2) was uneven among the different growth stages of individual tree species (saplings and mature) and ground herbs. All the typical AM features, such as arbuscules, vesicles, intracellular hyphal coils, extra and intraradical hyphae, were observed in the samples. Most plant species were usually densely colonized by intraradical hyphae, followed by arbuscules and vesicles in the root cortical tissues. Colonization percentages in tree roots across all sites, ranged from 56.0% for *Ficus glaberrima* to 98.3% for *Macaranga denticulata*. Seven species had colonization percentages higher than 90%: *M. denticulata*,

Table 1: Mean arbuscular mycorrhizal colonization percentages±S.E. (per 30 root pieces of plant species) (n = 2) and spore density±SE (per 100 g dry wt soil) (n = 3) associated with different herb species at two study sites

Herb species	Study site			
	Degraded watershed area		Forest soil extraction area	
	Colonization (%)	Spore density	Colonization (%)	Spore density
<i>Agrostis corymbosa</i> L. (Compositae)	95.10±0.36ns	12.67±1.20b	81.71±8.03ns	84.66±14.33a
<i>Anaphalis margaritacea</i> (L.) Bth. and Hk.f. (Compositae)	65.80±12.97ns	7.67±1.20b	99.09±0.91ns	52.67±6.06a
<i>Conyza sumatrensis</i> (Retz.) Walk. (Compositae)	47.76±9.50	8.00±1.53		
<i>Crassocephalum crepidioides</i> (Bth.) S. Moore (Compositae)	83.22±7.52	15.67±2.60		
<i>Cyperus cyperoides</i> (L.) O.K. (Cyperaceae)	2.44±2.44	32.67±2.40		
<i>Eupatorium adenophorum</i> Spreng. (Compositae)			84.01±1.84	64.33±8.51
<i>Microstegium vagans</i> (Nees ex Steud.) A. Camus (Gramineae)			73.46±6.80	112.67±11.46
<i>Mitracarpus villosus</i> (SW.) DC. (Rubiaceae)	81.31±8.41	28.00±6.08		
<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn ssp. (Dennstaedtiaceae)	82.26±0.16b	7.67±1.86b	100.00±0.00a	36.33±6.12a
<i>Spilanthes paniculata</i> Wall. ex DC. (Compositae)			91.58±8.42	127.67±20.10
<i>Thysanolaena latifolia</i> (Roxb. ex Horn.) Honda (Gramineae)	89.84±4.94	16.67±3.71		
Average spore density*		16.13±3.37d		79.72±14.44b
Spore number		129.00		479.00

Letter(s) indicate significant differences within each row at $p < 0.05$ as determined by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test; ns, not significant, *: Values were analyzed to compare statistically across all five study sites in Table 1 and 2

Nyssa javanica, *Melia toosendan*, *Hovenia dulcis*, *Heynea trifuga*, *Erythrina subumbrans* and *Rhus rhettoides*. *Cyperus cyperoides*, which is considered to be non-mycorrhizal or rarely forming mycorrhizas, was also found to be colonized by AM fungi in this study, but had a low (<2.4%) colonization percentage.

Arbuscular Mycorrhizal Species and Frequency of Occurrence

Five thousand four hundred and seventy three AM fungal spores (including sporocarps) were retrieved from the 86 composite soil samples from all 5 study sites, representing 24 AM species, identified according to published descriptions. The frequency (F%) and relative abundance (RA%) of the genera and species of AM fungi are presented in Table 3. Most of the isolated species belonged to the family *Glomaceae*, all of which were *Glomus* (15 species). The most abundant species present was *G. rubiforme*. Four species had formerly been assigned to *Sclerocystis* (*G. claviforme*, *G. coremioides*, *G. rubiforme* and *G. sinuosum*). Six species were in the family *Acaulosporaceae*, all of which were in the genus *Acaulospora*. The most abundant species present was *A. scrobiculata*. Three species were members of the family *Gigasporaceae* and belonged to the genus *Scutellospora*. Species in the genera *Archaeospora*, *Paraglomus*, *Entrophospora* and *Gigaspora* were not found.

Some species of AM fungi appeared to be generalists since they were found in the rhizospheres of study plant species at virtually all study sites: *A. elegans*, *A. scrobiculata*, *G. ambisporum*, *G. microcarpum*, *G. rubiforme* and *G. sinuosum*. Of these, *A. scrobiculata*, *G. microcarpum* and *G. rubiforme* were dominant at the FS, FN, RF and NF, but they were also abundant at the DW. Some species (*G. microaggregatum* and *S. heterogama*) were found in the soils of disturbed areas both at the DW and FR, but were absent from natural evergreen forest soils at the FS, FN and NF. Some AM species (*A. bireticulata* and *S. pellucida*) were found in the soils of the FN and FR but were absent from the soils at the DW, FS and NF. In the rhizosphere of herb species, some species (*G. microaggregatum*, *G. sinuosum* and *S. heterogama*) were found in the DW but were absent from the FS.

Table 2: Mean arbuscular mycorrhizal colonization percentages $\pm$ SE (per 30 root pieces of plant species) (n = 2) and spore density $\pm$ SE (per 100 g dry wt. soil) (n = 3) associated with different tree species at three study sites

Tree species	Study site					
	FORRU's research nursery		Forest restoration plots		Natural evergreen forests	
	Colonization (%)	Spore density	Colonization (%)	Spore density	Colonization (%)	Spore density
<i>Acrocarpus fraxinifolius</i>	65.56 $\pm$ 4.44b	120.67 $\pm$ 4.33a	94.77 $\pm$ 0.83a	60.67 $\pm$ 6.36b	74.38 $\pm$ 4.20b	12.00 $\pm$ 1.73c
Wight ex Arn. (Caesalpinioideae)						
<i>Balanata baccata</i> (Roxb.)	97.22 $\pm$ 2.78a	4.00 $\pm$ 2.08b	100.00 $\pm$ 0.00a	216.67 $\pm$ 32.69a	26.14 $\pm$ 1.14b	8.67 $\pm$ 2.33b
Ess. (Euphorbiaceae)						
<i>Castanopsis acuminatissima</i> (Bl.) A. DC. (Fagaceae)	11.46 $\pm$ 1.16b	4.33 $\pm$ 2.19b	83.42 $\pm$ 14.20a	16.00 $\pm$ 2.08a	82.12 $\pm$ 0.64a	8.00 $\pm$ 2.65ab
<i>Erythrina subabundans</i> (Hassk.) Merr. (Papilionoideae)	83.22 $\pm$ 9.48ns	8.33 $\pm$ 1.43b	98.34 $\pm$ 1.66ns	75.67 $\pm$ 4.63a	94.54 $\pm$ 5.46ns	4.33 $\pm$ 2.33b
<i>Ficus altissima</i> Bl. (Moraceae)	93.28 $\pm$ 2.96a	32.67 $\pm$ 5.17b	94.76 $\pm$ 5.24a	59.67 $\pm$ 8.29a	51.94 $\pm$ 5.94b	4.33 $\pm$ 0.88c
<i>Ficus benjamina</i> L. var. <i>benjamina</i> (Moraceae)	75.66 $\pm$ 19.34ns	32.67 $\pm$ 2.85b	75.18 $\pm$ 2.90ns	23.67 $\pm$ 2.90b	87.05 $\pm$ 1.63ns	119.67 $\pm$ 6.33a
<i>Ficus glaberrima</i> Bl. var. <i>glaberrima</i> (Moraceae)	69.64 $\pm$ 17.46a	16.67 $\pm$ 3.18a	89.68 $\pm$ 3.18a	4.00 $\pm$ 2.31b	8.61 $\pm$ 3.25b	8.33 $\pm$ 2.03ab
<i>Ficus hispida</i> L. f. var. <i>hispida</i> (Moraceae)	70.92 $\pm$ 4.64ns	29.00 $\pm$ 2.08b	49.98 $\pm$ 0.86ns	60.00 $\pm$ 7.81b	55.99 $\pm$ 8.92ns	251.33 $\pm$ 34.12a
<i>Ficus racemosa</i> L. var. <i>racemosa</i> (Moraceae)	88.14 $\pm$ 9.92a	68.67 $\pm$ 12.35b	98.41 $\pm$ 1.58a	204.33 $\pm$ 22.82a	32.68 $\pm$ 7.68b	4.00 $\pm$ 1.00c
<i>Ficus subulata</i> Bl. var. <i>subulata</i> (Moraceae)	39.75 $\pm$ 4.37b	39.67 $\pm$ 3.48b	69.68 $\pm$ 20.32ab	56.67 $\pm$ 3.36b	98.86 $\pm$ 1.14a	124.66 $\pm$ 20.50a
<i>Occhialion kerrii</i> Craib (Euphorbiaceae)	83.35 $\pm$ 3.66a	36.67 $\pm$ 1.76b	89.06 $\pm$ 0.17a	23.67 $\pm$ 3.53b	64.00 $\pm$ 4.62b	64.67 $\pm$ 6.94a
<i>Omelina arborea</i> Roxb. (Verbenaceae)	98.00 $\pm$ 2.00ns	32.33 $\pm$ 7.88ab	100.00 $\pm$ 0.00ns	48.33 $\pm$ 4.91a	67.30 $\pm$ 14.52ns	23.67 $\pm$ 5.24b
<i>Heynea trijuga</i> Roxb. ex Sims (Meliaceae)	84.48 $\pm$ 7.38ns	19.67 $\pm$ 4.33b	99.28 $\pm$ 0.72ns	595.67 $\pm$ 58.89a	94.09 $\pm$ 0.65ns	8.33 $\pm$ 1.76b
<i>Hovenia dulcis</i> Thunb. (Rhamnaceae)	100.00 $\pm$ 0.00a	28.00 $\pm$ 2.00c	84.35 $\pm$ 2.53b	292.00 $\pm$ 12.17a	93.73 $\pm$ 4.60ab	64.67 $\pm$ 6.88b
<i>Macaranga denticulata</i> (Bl.) M.-A. (Euphorbiaceae)	100.00 $\pm$ 0.00ns	56.67 $\pm$ 13.30b	96.22 $\pm$ 2.28ns	128.33 $\pm$ 2.33a	98.68 $\pm$ 1.32ns	64.00 $\pm$ 19.55b
<i>Machilus bombycina</i> King ex Hk. f. (Lauraceae)	75.43 $\pm$ 2.35ns	51.67 $\pm$ 2.90a	49.45 $\pm$ 25.00ns	55.33 $\pm$ 9.24a	95.34 $\pm$ 0.90ns	15.67 $\pm$ 6.69b
<i>Melia toosendan</i> Sieb. and Zucc. (Meliaceae)	92.08 $\pm$ 6.38ns	20.33 $\pm$ 2.98b	96.94 $\pm$ 3.06ns	104.33 $\pm$ 21.49a	93.02 $\pm$ 5.30ns	8.00 $\pm$ 2.65b
<i>Michelia ballantii</i> Pierre (Magnoliaceae)	100.00 $\pm$ 0.00a	40.00 $\pm$ 5.03a	97.66 $\pm$ 2.34a	15.67 $\pm$ 0.33b	68.61 $\pm$ 6.39b	24.00 $\pm$ 6.03b
<i>Nyssa javanica</i> (Bl.) Wang. (Nyssaceae)	92.19 $\pm$ 7.81ns	108.33 $\pm$ 4.63b	100.00 $\pm$ 0.00ns	172.00 $\pm$ 22.37ab	98.18 $\pm$ 1.82ns	200.67 $\pm$ 23.69a
<i>Prunus cerasoides</i> D. Don (Rosaceae)	76.95 $\pm$ 6.48a	32.00 $\pm$ 12.06b	21.24 $\pm$ 5.68b	43.33 $\pm$ 2.73b	87.72 $\pm$ 7.72a	112.67 $\pm$ 9.26a
<i>Rhus rhazoides</i> Craib (Anacardiaceae)	100.00 $\pm$ 0.00ns	204.33 $\pm$ 12.84a	91.26 $\pm$ 7.26ns	40.33 $\pm$ 3.28b	84.74 $\pm$ 1.80ns	28.00 $\pm$ 4.58b
<i>Sapindus rarak</i> D.C. (Sapindaceae)	88.87 $\pm$ 2.20a	28.67 $\pm$ 2.60b	82.10 $\pm$ 0.16ab	12.33 $\pm$ 2.40b	62.67 $\pm$ 9.55b	196.33 $\pm$ 25.64a
<i>Sarcosperma arboreum</i> Bth. (Sapotaceae)	40.90 $\pm$ 23.25ns	8.67 $\pm$ 2.91b	92.38 $\pm$ 0.48ns	24.33 $\pm$ 0.88a	55.67 $\pm$ 8.61ns	12.33 $\pm$ 3.71b
<i>Spondias axillaris</i> Roxb. (Anacardiaceae)	93.34 $\pm$ 3.48ns	128.33 $\pm$ 17.84a	72.20 $\pm$ 13.50ns	4.00 $\pm$ 1.53b	51.24 $\pm$ 9.94ns	8.00 $\pm$ 0.58b
Average spore density*		48.01 $\pm$ 9.72c		97.38 $\pm$ 26.55a		57.35 $\pm$ 14.80c
Spore number		1152.00		2337.00		1376.00

Letter(s) indicate significant differences within each row at $p < 0.05$ as determined by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test, ns: Not significant, *. Values were analyzed to compare statistically across all five study sites in Table 1 and 2.

Fourteen of the 15 AM species recorded in natural evergreen forest were maintained in the forest restoration plot (all except *G. fulvum*). Furthermore, the restoration plot supported 7 additional recruit species that were not recorded in the rhizospheres of forest trees (Table 3). Even in the nursery, only 4 of the AM species recorded in natural evergreen forest were absent. It should be noted that forest soil, incorporated into the nursery potting medium carried only 5 of the 15 forest AM species. Therefore, at least 9 species must have colonized the nursery potting medium as the trees were growing in their containers on the ground.

Spore Abundance and Species Richness of Arbuscular Mycorrhizal Fungi

From all composite soil samples, spore density and species richness of AM fungi differed substantially. Average spore densities in the soils at 5 study sites ranged from 16.1 to 97.4 spores per

Table 3: Frequency (F%) and relative abundance (RA%) of genera and species of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of different plant species for each study site

AM fungal species	Study site			
	Degraded watershed area		Forest soil extraction area	
	F%	RA%	F%	RA%
Acaulospora	75.00	52.71	66.67	29.48
1. <i>A. bireticulata</i> Rothwell and Trappe				
2. <i>A. elegans</i> Trappe and Gerd.			33.33	9.27
3. <i>A. foveata</i> Trappe and Janos				
4. <i>A. laevis</i> Gerd. and Trappe				
5. <i>A. mellea</i> Spain and Schenck			33.33	5.02
6. <i>A. scrobiculata</i> Trappe	75.00	52.71	50.00	15.19
Glomus	87.50	44.19	100.00	68.78
7. <i>G. aggregatum</i> Schenck and Smith				
8. <i>G. ambisporum</i> Smith and Schenck			33.33	12.54
9. <i>G. clavisporum</i> Trappe				
10. <i>G. coremioides</i> Berk. and Broome				
11. <i>G. fulvum</i> (Berke. and Broome) Trappe and Gerd.				
12. <i>G. intraradices</i> Schenck and Smith				
13. <i>G. microaggregatum</i> Koske, Gemma and Olexia	12.50	3.62		
14. <i>G. microcarpum</i> Iqbal and Bushra	25.00	6.71	33.33	22.58
15. <i>G. mosseae</i> (Nicol. and Gerd.) Gerd. and Trappe				
16. <i>G. multicaule</i> Gerd. and Bakshi				
17. <i>G. rubiforme</i> Gerd. and Trappe	50.00	25.07	100.00	31.22
18. <i>G. scintillans</i> Rose and Trappe				
19. <i>G. simosum</i> Gerd. and Bakshi	25.00	8.79		
20. <i>G. tortuosum</i> Schenck and Smith				
21. <i>G. viscosum</i> Nicol.			16.67	2.44
Scutellospora	12.50	3.10	16.67	1.74
22. <i>S. gregaria</i> (Schenck and Nicol.) Walker and Sanders				
23. <i>S. heterogama</i> Walker and Sanders	12.50	3.10		
24. <i>S. pellucida</i> (Nicol. and Schenck) Walker and Sanders			16.67	1.74
Species richness	6.00		8.00	

AM fungal species	Study site					
	FORRU's research nursery		Forest restoration plots		Natural evergreen forests	
	F%	RA%	F%	RA%	F%	RA%
Acaulospora	66.67	40.50	66.67	43.63	33.33	5.91
1. <i>A. bireticulata</i> Rothwell and Trappe	4.17	0.66	4.17	0.33		
2. <i>A. elegans</i> Trappe and Gerd.	16.67	2.37	50.00	39.17	16.67	4.38
3. <i>A. foveata</i> Trappe and Janos	4.17	0.69	8.33	1.36	4.17	0.31
4. <i>A. laevis</i> Gerd. and Trappe	4.17	0.40	4.17	0.19	4.17	0.31
5. <i>A. mellea</i> Spain and Schenck	20.83	6.31	4.17	0.36		
6. <i>A. scrobiculata</i> Trappe	58.33	30.06	20.83	2.24	12.50	0.90
Glomus	91.67	56.03	87.50	49.32	91.67	94.09
7. <i>G. aggregatum</i> Schenck and Smith			8.33	0.38	4.17	0.29
8. <i>G. ambisporum</i> Smith and Schenck	54.17	14.23	12.50	3.05	58.33	31.19
9. <i>G. clavisporum</i> Trappe			8.33	0.33	4.17	0.61
10. <i>G. coremioides</i> Berk. and Broome			25.00	2.03	4.17	4.65
11. <i>G. fulvum</i> (Berke. and Broome) Trappe and Gerd.					8.33	7.85
12. <i>G. intraradices</i> Schenck and Smith	4.17	3.53	4.17	0.70	8.33	0.61
13. <i>G. microaggregatum</i> Koske, Gemma and Olexia			4.17	0.36		
14. <i>G. microcarpum</i> Iqbal and Bushra	16.67	4.57	16.67	9.94	25.00	7.22
15. <i>G. mosseae</i> (Nicol. and Gerd.) Gerd. and Trappe	12.50	3.24	8.33	5.43	12.50	16.88
16. <i>G. multicaule</i> Gerd. and Bakshi	33.33	12.76	29.17	14.23	29.17	15.19
17. <i>G. rubiforme</i> Gerd. and Trappe	58.33	10.38	41.67	12.02	29.17	6.73
18. <i>G. scintillans</i> Rose and Trappe	4.17	2.78				

Table 3: Continued

	Study site					
	FORRU's research nursery		Forest restoration plots		Natural evergreen forests	
AM fungal species	F%	RA%	F%	RA%	F%	RA%
19. <i>G. sinuosum</i> Gerd. and Bakshi	4.17	0.35	4.17	0.33	16.67	2.88
20. <i>G. tortuosum</i> Schenck and Smith	4.17	1.42				
21. <i>G. viscosum</i> Nicol.	8.33	2.78	8.33	0.51		
<i>Scutellospora</i>	12.50	3.47	50.00	7.05		
22. <i>S. gregaria</i> (Schenck and Nicol.) Walker and Sanders			4.17	1.01		
23. <i>S. heterogama</i> Walker and Sanders			8.33	0.50		
24. <i>S. pellucida</i> (Nicol. and Schenck) Walker and Sanders	12.50	3.47	41.67	5.53		
Species richness	17.00		21.00		15.00	

Table 4: Arbuscular mycorrhizal species and species richness associated with different herb species at two study sites

	Study sites	
	Degraded watershed area	Forest soil extraction area
Herb species	Species ^a ; (Species richness) ^b	Species ^a ; (Species richness) ^b
<i>A. conyzoides</i>	6, 17; (2)	2, 6, 17; (3)
<i>A. margaritacea</i>	18; (1)	6, 17; (2)
<i>C. sumatrensis</i>	6, 18; (2)	
<i>C. crepidioides</i>	6; (1)	
<i>C. cyperoides</i>	6, 14, 17, 22; (4)	
<i>E. adenophorum</i>		5, 6, 7, 17; (4)
<i>M. vagans</i>		2, 5, 7, 14, 17; (5)
<i>M. villosus</i>	13, 6; (2)	
<i>P. aquilinum</i>	6, 17; (2)	17, 20, 23; (3)
<i>S. paniculata</i>		14, 17; (2)
<i>T. latifolia</i>	14, 17; (2)	
Species richness	6	8
Average species richness	2.00	3.17

^a: No. of column refer to the codes of AM fungal species in Table 3, ^b: No. of brackets refer to the number of AM fungal species observed per rhizosphere of each herb species

100 g dry soil, with an average of 59.7 (Table 1 and 2). Average spore density at the FS, FN, FR and NF were high 79.7, 48.0, 97.4 and 57.4, respectively while the lowest spore density at the DW was 16.1. At the degraded watershed area, average spore density was significantly the lowest while it was highest at the forest restoration plot. Spore density in the rhizosphere of each plant species was highly variable, ranging from 4.0 to 595.7 spores per 100 g dry soil. The spore numbers of AM fungi at the study sites varied from 129 to 2,337 spores (Table 1 and 2). The spore numbers in the soils at the FN, FR and NF were high (1,152, 2,337 and 1,376, respectively). Much lower numbers were found at the DW and FS; 129 and 479, respectively.

Similarly, species richness of AM fungi at the study sites varied from 6 to 21 species per soil sample (Table 3). Species richness in the soils at the FN, FR and NF were also high (17, 21 and 15, respectively) and were lower at the DW and FS (6 and 8, respectively) showing trends with positively related to spore numbers. Species richness of AM fungi in the rhizosphere of each plant species was highly variable, ranging from 1 to 8 species per soil samples (Table 4 and 5). Average species richness of AM fungi in the soils ranged from 2.0 to 3.2 per soil samples, with an average of 2.8. In the rhizosphere of indigenous trees at the FN, RF and NF, species richness and spore number were higher than for ground herbs at the DW and FS.

Table 5: Arbuscular mycorrhizal species and species richness associated with different tree species at three study sites

Tree species	Study site		
	FORRU's research nursery	Forest restoration plots	Natural evergreen forests
	Species ^a ; (Species richness) ^b	Species ^a ; (Species richness) ^b	Species ^a ; (Species richness) ^b
<i>A. fraxinifolius</i>	2, 6, 7, 16, 17, 23; (6)	3, 4, 16, 17; (4)	12, 14; (2)
<i>B. baccata</i>	5; (1)	14, 23; (2)	2, 12; (2)
<i>C. acuminatissima</i>	7; (1)	1, 16; (2)	8, 17; (2)
<i>E. subumbrans</i>	15, 17; (2)	2, 7, 13, 22; (4)	4; (1)
<i>F. albus</i>	5, 6; (2)	2, 6, 10; (3)	17; (1)
<i>F. benjamina</i>	7, 16, 17; (3)	6, 22, 23; (3)	7, 14, 16, 18; (4)
<i>F. glaberrima</i>	5, 6, 7, 16; (4)	17; (1)	7; (1)
<i>F. hispida</i>	6, 14, 19; (3)	2, 5, 17, 20; (4)	7, 10, 15; (3)
<i>F. racemosa</i>	6, 7, 14, 17, 20; (5)	2, 8, 15, 17, 18; (5)	7; (1)
<i>F. subulata</i>	1, 6, 7, 16, 17; (5)	2, 15, 17, 23; (4)	7, 14, 16, 17; (4)
<i>G. kerrii</i>	7, 14, 16; (3)	24; (1)	15, 16; (2)
<i>G. arborea</i>	6, 17; (2)	2, 6, 14, 16; (4)	7, 17, 18; (3)
<i>H. trijuga</i>	7, 17; (2)	2, 3, 8, 10, 23; (5)	11; (1)
<i>H. dulcis</i>	2, 3, 6, 15; (4)	2, 7, 16; (3)	2, 15, 18; (3)
<i>M. denticulata</i>	7, 17, 21; (3)	9, 10, 17, 23; (4)	7; (1)
<i>M. bombycina</i>	2, 6, 7, 16, 18; (5)	2, 10, 17, 23; (4)	6, 7, 14, 17; (4)
<i>M. toosendan</i>	4, 17; (2)	2, 9, 23; (3)	2; (1)
<i>M. baillonii</i>	6, 17; (2)	17, 20; (2)	3, 7, 18; (3)
<i>N. javanica</i>	5, 6, 17, 20, 23; (5)	6, 16, 23; (3)	7, 16, 17; (3)
<i>P. cerasoides</i>	7, 16, 17; (3)	7, 10, 14, 16, 17; (5)	7, 9, 14, 17; (4)
<i>R. rhesoides</i>	2, 5, 6, 7, 14, 16, 17, 23; (8)	2, 6, 14, 17; (4)	6, 7, 14, 16; (4)
<i>S. rarak</i>	15; (1)	2, 23; (2)	2, 6, 11, 16; (4)
<i>S. arboreum</i>	6, 7; (2)	10, 12, 23; (3)	7, 16; (2)
<i>S. axillaris</i>	6, 12, 17; (3)	16; (1)	7; (1)
Species richness	17	21	15
Average species richness	3.21	3.17	2.38

^a: No. of column refer to the codes of AM fungal species in Table 3, ^b: No. of brackets refer to the number of AM fungal species observed per rhizosphere of each tree species

DISCUSSION

The results of our study on the 24 framework tree species and 11 dominant herb species in the seasonally dry tropical forests of northern Thailand showed that most plant species are highly colonized hosts of AM fungi. This reflects the mycotrophic nature of the plant species studied, the age of the sites and the ability of AM fungi in soils to colonize a wide range of host species. It has been reported that many tree species are highly dependent on AM fungi (Janos, 1980; Onguene and Kuyper, 2001) and most herbaceous weeds and grasses are associated with AM fungi (Murakoshi *et al.*, 1998). There were many intraradical hyphae, arbuscules and vesicles in the fine roots. Mycorrhizal colonization percentages differed among plant species and among sites. Colonization percentages were uneven in framework tree roots belonging to all growth stages. Some tree species had high colonization percentages at all sites: *M. denticulata*, *N. javanica*, *M. toosendan*, *H. dulcis*, *H. trijuga*, *E. subumbrans* and *R. rhesoides*. This showed that indigenous forest trees may have a strong dependency on AM, as all surveyed plants formed AM and their roots were intensively colonized. The only exception was *C. cyperoides*, which is considered to be non-mycorrhizal or rarely mycorrhizal (Muthukumar and Udaiyan, 2000). In this study, it was found that this species commonly formed AM, with low colonization percentages (<2.4%).

Twenty four AM species were found in the rhizosphere of the plant species at surveyed study sites. AM fungi belonging to the genera *Glomus* and *Acaulospora* were dominant. This fact must be related to their sporogenous characteristics, i.e., *Glomus* and *Acaulospora* species usually take a short time to produce small spores, compared with the large spores of *Gigaspora* and *Scutellospora* species

in the same environment (Hepper, 1984; Bever *et al.*, 1996). *Acaulospora* species are often associated with acidic soils. Most of the soils in our study sites were acidic and this could explain our frequent detection of *Acaulospora*. Among these, *A. elegans*, *A. scrobiculata*, *G. ambisporum*, *G. microcarpum*, *G. rubiforme* and *G. sinuatum* were the most commonly encountered species. This suggests that these species have a widespread and broad host range.

Spore densities of AM fungi vary greatly in different ecosystem. Here, the average density varied from 16.1 to 97.4 spores per 100 g soil and the species richness ranged from 6 to 21. The results of the current work showed that spore density was not related to colonization levels and species richness when all the study sites were considered together. Of the 24 tree species studied, 16 species had higher colonization percentage, 10 species were colonized by more AM species and 13 species supported higher spore densities in the forest restoration plot than in the natural evergreen forest. This clearly demonstrates that the forest restoration techniques used by FORRU maintains or increases AM fungal communities in the rhizosphere of most tree species planted. This may also help to account for the very high growth rates recorded for these tree species after planting them out in degraded areas (Elliott *et al.*, 2003). This indicates that local environmental conditions and host plant species in each study site override AM fungal colonization, diversity and spore production.

The Degraded Watershed area (DW) had the lowest species richness (6 species) and average spore density (16.1 spores per 100g soil) in the rhizosphere of 8 herb species. These results indicate the influence of disturbance on mycorrhizal fungi in this site. It is well-known that land disturbance reduce below-ground AM fungal communities, depending on the disturbance intensity (Allen *et al.*, 1998; Korb *et al.*, 2003). In the Forest Soil extraction area (FS), the rhizosphere of 6 herb species supported higher species richness and average spore density (8 species and 79.7 spores 100 g soil, respectively) than the DW, even though the number of herb species examined from the FS was less than at the DW. Some species, such as *M. vagans* and *S. paniculata*, had high spore densities of AM fungi. This was probably because the FS was surrounded by an undisturbed area that still supported some favourable host plants. These plants may directly influence the below-ground AM fungal community composition, because different plant species exhibit varied abilities to establish mycorrhizal associations and to benefit from them (Lovelock *et al.*, 2003).

The diversity of the AM fungi and the abundance of each species in the rhizosphere of 11 herbs at the DW and FS were low; very low compared to the rhizosphere of 24 indigenous trees at the other three sites. In FORRU's research Nursery (FN), the rhizosphere of selected tree saplings supported high AM diversity (17 species) and average spore density (48.0 spores per 100 g soil), but only a few AM species (5 species) were probably derived from the forest soil that is included as a component of the nursery potting medium. Furthermore, the growing of many tree species in close proximity in the nursery, the practice of raising plants on the ground or the location of the nursery within Evergreen Forest (EGF) all potentially contributed to high AM diversity and spore density in the nursery.

Highest AM diversity (21 species) and average spore density (97.4 spores per 100 g soil) were found in the rhizosphere of planted trees in the Forest Restoration plot (FR). This may be the result of the plant growth stage and plant diversity in the plot. This contrasts markedly with nearby degraded areas which support few AM fungal spores. After planting with framework trees however the AM fungal community was re-established. Forest restoration by planting 24 framework species therefore clearly promoted re-establishment of below-ground AM fungi that were still present or provided host trees for spores dispersed into the plot from nearby forest and enhanced establishment of new residual AM fungi that were inside the potting medium of transplanted saplings.

A denser plant community helps the colonizing obligate AM fungi to spread extensively, with less propagules being lost to passive stochastic dispersal. Dense plant cover also produces a high litterfall and great amount of root biomass for maintaining a diverse AM fungal community (Friberg, 2001). Similarly, the rhizosphere of mature trees showed high AM diversity (15 species) and average

spore density (57.4 spores per 100 g soil) in the Natural evergreen Forest (NF). The density and diversity of AM fungi increased with increasing tree canopy cover especially in deciduous forest, because plants in this habitat may more effectively convert the higher interception of light into photosynthate which can then be directed to the roots, providing a food source for AM fungi (Koske, 1987). In contrast, almost all samples in this study site were collected in the EGF with much higher and denser tree canopy than that of the deciduous forest. Fewer AM fungal spores were observed with increasing canopy cover, because the trees grew close to each other, strongly limiting light penetration to the soil, reducing soil temperature and possibly limiting sporulation and colonization of AM fungi.

In addition, the knowledge provided here has practical implications to forest management and regeneration technologies as follows (1). Including forest soil with indigenous AM fungi in the potting medium mix, allows most framework tree species grown in nurseries to become AM associated. The association is maintained after planting out trees in deforested sites (2). Tree nurseries should be located within forest areas and deforested landscapes should retain at least some natural forest to provide a continuous supply of AM fungal spores (3). Using forest soil with indigenous AM fungi as inoculum is preferable to the introduction of commercial inoculant products containing exotic AM fungi for growing framework tree saplings. Based on these studies, forest soil with indigenous AM fungi in the potting medium mix are important for the establishment, growth and survival of framework tree saplings at trial plot that might possibly accelerate natural regeneration of forest ecosystems and encourage biodiversity recovery in a degraded watershed area in Doi Suthep-Pui National Park.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge financial support from Chiang Mai University Graduate School and Pibulsongkram Rajabhat University for partial support to the first author's Ph.D. study. This research was supported by the Thailand Research Fund DBG980004. The authors are grateful to Dr. Pranee Palee for identifying the plant species named in this study. We thank Mr. Cherdasak Kuarak and volunteers for helping collect the samples.

REFERENCES

- Allen, E.B., E. Rincon, M.F. Allen, A. Perez-Jimenez and P. Huante, 1998. Disturbance and seasonal dynamics of mycorrhizae in a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica*, 30: 261-274.
- An, Z.Q., J.W. Hendrix, D.E. Hershman and G.T. Henson, 1990. Evaluation of the Most Probable Number (MPN) and wet-sieving methods for determining soil-borne populations of endogoneaceous mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 82: 516-581.
- Bever, J.D., J.B. Morton, J. Antonovics and P.A. Schultz, 1996. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *J. Ecol.*, 84: 71-82.
- Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove and N. Malajczuk, 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32, ACIAR, Canberra, Australia, pp: 374.
- Elliott, S., P. Navakitbumrung, C. Kuarak, S. Zangkum, V. Anusamsunthorn and D. Blakesley, 2003. Selecting framework tree species for restoring seasonally dry tropical forests in Northern Thailand based on field performance. *For. Ecol. Manage.*, 184: 177-191.
- FORRU, 2006. How to Plant a Forest: The Principles and Practice of Restoring Tropical Forests. Forest Restoration Research Unit. 1st Edn., Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand, pp: 200.
- Friberg, S., 2001. Distribution and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in traditional agriculture on the Niger inland delta, Mali, West Africa. *CBM:s Skriftserie*, 3: 53-80.

- Goosem, S.P. and N.I.J. Tucker, 1995. Repairing the rainforest, theory and practice of rainforest re-establishment in North Queensland's Wet Tropics. Wet Tropics Management Authority, Cairns, pp: 71.
- Hepper, C.M., 1984. Isolation and Culture of VA Mycorrhizal (VAM) Fungi. In: VA Mycorrhizae. Powell, C.L. and D.J. Bagyaraj (Eds.), CRC Press, Florida, USA., pp: 95-112.
- Janos, D.P., 1980. Vesicular arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. *Ecology*, 61: 151-162.
- Koide, R.T. and B. Mosse, 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza*, 14: 145-163.
- Korb, J.E., N.C. Johnson and W.W. Covington, 2003. Arbuscular mycorrhizal propagule densities respond rapidly to ponderosa pine restoration treatments. *J. Applied Ecol.*, 40: 101-110.
- Koske, R.E., 1987. Distribution of VAM fungi along a latitudinal temperature gradient. *Mycologia*, 79: 55-68.
- Lovelock, C.E., K. Andersen and J.B. Morton, 2003. Arbuscular mycorrhizal communities in tropical forests are affected by host tree species and environment. *Oecologia*, 135: 268-279.
- McGonigle, T.P., D.G. Evans and M.H. Miller, 1990. Effect of degree of soil disturbance on mycorrhizal colonization and phosphorus absorption by maize in growth chamber and field experiment. *New Phytol.*, 116: 629-636.
- Morton, J.B., 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature and identification. *Mycotaxon*, 37: 267-324.
- Murakoshi, T., M. Tojo, C. Walker and M. Saito, 1998. Arbuscular mycorrhizal fungi on adjacent semi-natural grasslands with different vegetation in Japan. *Mycoscience*, 39: 455-462.
- Muthukumar, T. and K. Udaiyan, 2000. Arbuscular mycorrhizas of plants growing in the Western Ghats region, Southern India. *Mycorrhiza*, 9: 297-313.
- Onguene, N.A. and T.W. Kuyper, 2001. Mycorrhizal associations in the rain forest of South Cameroon. *For. Ecol. Manage.*, 140: 277-287.
- Setiadi, Y., 2000. Mycorrhizal Seedling Production for Enhancing Rehabilitation of Degraded Forest in Indonesia. In: Forest Restoration for Wildlife Conservation. Elliott, S., J. Kerby, D. Blakesley, K. Hardwick, K. Woods and V. Anusarnsunthorn (Eds.), Chiang Mai University, Thailand, pp: 235-243.

เอกสารตีพิมพ์

Title:	Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and fertilizer on production of <i>Castanopsis acuminatissima</i> saplings for forest restoration in northern Thailand
Authors:	Nandakwang, P., S. Elliott, S Youpensuk and S. Lumyong
Journal:	Research Journal of Microbiology
Published :	Academic Journals
ISSN:	1816-4935
Issue:	Volume 3(4),2008
Page:	225-236

Effects of Arbuscular Mycorrhizal Inoculation and Fertilizer on Production of *Castanopsis acuminatissima* Saplings for Forest Restoration in Northern Thailand

P. Nandakwang, S. Elliott, S. Youpensuk and S. Lumyong

Department of Biology, Chiang Mai University, 50200, Chiang Mai, Thailand

Abstract: *Castanopsis acuminatissima* is a native tree used to restore forest in Thailand. To accelerate seedling growth experiments were carried out to determine the efficacy of applying to *C. acuminatissima*. Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi, produced on sorghum, were used as inoculum to investigate the symbiosis on seedlings. The effects of AM inoculation (*Acaulospora elegans*, *Glomus etunicatum*, *Glomus mosseae*) together with phosphate fertilization (KH_2PO_4) on seedlings in a P-deficient soil were studied under greenhouse conditions. Increasing P-application rates greatly enhanced seedling growth (maximum at 250 mg kg^{-1} soil). Growth was most rapid with *G. etunicatum*-colonized plants with P application (40.8 cm), whereas much lower height was found with non-AM plants without P added (14.4 cm). The mycorrhizal effective for *C. acuminatissima* in previous experiments were confirmed by growing seedlings in a forest soil with slow-release fertilizer (NPK) and combined with AM species under nursery performance conditions. Plant height was significantly enhanced by fertilizer but not by fungi. The greatest height was found in non-AM plants with fertilization (14.5 cm), whereas lower height was found for non-AM plants with no fertilizer added (10.9 cm). AM inoculation greatly enhanced seedling growth in P-deficient soil more than in forest soil due to differences in abilities of AM species to establish a symbiosis. Therefore, in sapling production, the soil properties and level of fertilization should be evaluated keeping secondary effects caused by changed mycorrhizal association.

Key words: Arbuscular mycorrhizal fungi, framework tree species, forest restoration, mycorrhizal seedling production, phosphorus fertilizer

INTRODUCTION

Forest restoration means the re-establishment of the original forest ecosystem that was present before deforestation occurred. The goals of forest restoration are environmental protection and wildlife conservation (Anonymous, 2006). In 1994, the Forest Restoration Research Unit at Chiang Mai University (FORRU), started to investigate the possibility of restoring forests on degraded sites in northern Thailand by adapting the framework species method (first developed in Queensland, Australia) (Goosem and Tucker, 1995; Anonymous, 2006) to local conditions. FORRU screened indigenous forest tree species to select potential candidate framework species for field trials. In the FORRU's research tree nursery, experiments were designed to develop seedling production for high quality planting stock. *Castanopsis acuminatissima* (Bl.) A. DC. (Fagaceae), was confirmed as a potential framework species that could be used to restore seasonally dry tropical forest in northern Thailand but this species grow relatively slowly and difficult to raise in nursery. To solve such problems, studies have been made on modified potting media and fertilizer application (Anonymous, 2006). Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi have form symbiosis with a wide range of forest tree

Corresponding Author: S. Lumyong, Department of Biology, Chiang Mai University, 50200, Chiang Mai, Thailand

species (Gai *et al.*, 2006). Such symbioses provide many benefits to host trees and are especially important in development of seedlings grown in nurseries and establishment of saplings planted in deforested sites.

AM symbioses result in increased growth of plants depending on the fungal strains (Pattinson *et al.*, 2004; Youpensuk *et al.*, 2005). AM fungi also protect plants against root pathogens, confer resistance to drought and increase soil aggregation (Dubský *et al.*, 2002; Rilling *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006). Lack of nutrient availability in tropical soils often limits plant growth. The ability of AM fungi to enhance nutrient absorption, (particularly phosphorus) by hyphal uptake and translocation towards the plant, is an important advantage (Koide and Mosse, 2004). The possibility of using beneficial attributes of AM fungi in planting stock will depend on preliminary assessments of whether inoculation is a suitable management option. AM fungi are obligate symbionts, usually propagated by growing them with living host plants in pot cultures. For starting pot cultures of AM fungi, the combination of appropriate host plant and substrate media for production of mycorrhizal inoculum is crucial (Setiadi, 2000). Pot cultures, which consist of soil, spores and mycorrhizal roots etc., can be used as inoculum for experiments or applied to seedling grown in a nursery or broadcast in the field (Brundrett *et al.*, 1996; Setiadi, 2000; Klironomos and Hart, 2002). Knowledge about the ability of plant species to form symbiosis with AM fungi is very important for restoration success and indicates the need for inoculum in plants cultivated in forest nurseries (Wubet *et al.*, 2003). The purposes of present experiment were to: (1) select appropriate host plants under pot culture conditions for production of indigenous AM fungal inoculum in the nursery, (2) examine the effects of 3 AM species with 6 rates of P application on plant development in P-deficient soil medium under greenhouse conditions and (3) examine the effects of AM fungal inoculation and conventional fertilization on growth of seedlings in forest soil under nursery performance conditions.

MATERIALS AND METHODS

Inoculum Production

The first experiment consisted of 30 treatments with 6 indigenous AM species [*Acaulospora elegans* Trappe and Gerd., *A. mellea* Spain and Schenck, *A. scrobiculata* Trappe, *Glomus etunicatum* Becker and Gerd., *G. mosseae* (Nicol. and Gerd.) Gerd. and Trappe and *Scutellospora heterogama* Walker and Sanders] and 5 host plants [maize (*Zea mays* L.), marigold (*Tagetes erecta* L.), soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), sorghum (*Sorghum vulgare* Pers.) and upland rice (*Oryza sativa* L. cv. Bue Bang)] with 3 replications. The experiment was undertaken in clay pots (22 cm top diameter, 18 cm bottom diameter and 19 cm depth) with drainage hole containing 3 kg P-deficient soil medium (P-deficient soil and coarse sand ratio 2:1), autoclaved twice at 121°C for 30 min with a 2 day interval. The soil pH (H₂O) was 5.98 and contained 0.041% total N (Kjeldahl method), 1.4 mg kg⁻¹ available P (Bray II method) and 44.0 mg kg⁻¹ extractable K (1 M NH₄OAc, pH 7). Seeds were surface-sterilized with 10% sodium hypochlorite for 5 min, rinsed with sterile water and sown in Petri dishes, containing the moist tissue paper for 1 week. Seedlings were transplanted 3 seedlings per pot. AM spores were extracted from the soil samples by wet-sieving and 50% sucrose centrifugation (Brundrett *et al.*, 1996) and collected on a 53 µm sieve. Fifty spores were inoculated into each pot. Seedlings were grown in a greenhouse at the Chiang Mai University (CMU) for 4 months between November 2005 and February 2006. Seedlings were watered once every 2 days with 500 mL of tap water. Twice a month, 80 mL of 4 full strength Hoagland' solution (Hoagland and Arnon, 1950), without P was added to each pot. At harvest, root samples were separated from soil and cleaned with tap water. The root samples were cleared in 10% KOH at 121°C for 15 min and stained with 0.05% trypan blue in lactoglycerol (Brundrett *et al.*, 1996). Thirty stained root segments from each plant (1 cm long) were taken at random and mounted on microscopic slides to assess mycorrhizal colonization (McGonigle *et al.*, 1990). One hundred gram dried soil of all different treatments were used to determine spore density.

Effects of AM fungi with Phosphorus Fertilizer on Seedling Growth in Greenhouse Experiment

The second experiment consisted of 90 pots with 5 inoculation treatments (no inoculation and AM inoculation: *A. elegans*, *G. etunicatum*, *G. mosseae* and mixed AM species) and 6 levels of P application (KH_2PO_4) (at the rates of 0, 50, 100, 150, 200 and 250 mg P kg^{-1} medium) with 3 replications. Spores of AM species were produced on sorghum pot cultures in P-deficient soil medium as shown above and used for inoculation. The experiment was undertaken in clay pots containing 3 kg autoclaved P-deficient soil medium. Seeds of *C. acuminatissima* were surface-sterilized with 10% sodium hypochlorite for 10 min, rinsed with sterile water and sown in a plastic tray containing the autoclaved forest soil medium (primary evergreen forest soil, coconut husk and peanut husk ratio 2:1:1). The medium pH (H_2O) was 5.60 and contained 0.628% total N, 15.8 mg kg^{-1} available P and 132.0 mg kg^{-1} extractable K. Three month-old seedlings (5-6 cm tall) were transplanted one seedling per pot. In each AM treatment, 150 spores were inoculated into each pot. Seedlings were grown in a greenhouse at the CMU for 6 months between December 2005 and March 2006. Seedlings were watered once every 2 days with 500 mL of tap water. Two weeks after transplanting, 6 levels of KH_2PO_4 were added to each treatment. Twice a month, 80 mL of 4 full strength Hoagland's solution without P was added to each pot. At harvest, height and stem diameter of seedlings were measured. Roots were divided into 2 random sub-samples. Shoot samples and one root sub-sample were oven dried at 60°C for 48 h. Dry samples were analyzed for P content by the dry ashing and molybdovanado-phosphoric acid method. The second root sub-sample was used to determine AM colonization and soil sub-samples were assessed for spore density.

Effects of AM fungi with Slow-Release Fertilizer on Seedling Growth in Nursery Sapling Production

The third experiment consisted of 10 treatments with 5 inoculation treatments (no inoculation and AM inoculation: *A. elegans*, *G. etunicatum*, *G. mosseae* and mixed AM species) and 2 levels of slow-release fertilizer (NPK 14-14-14) (at the rates of 0 and 375 mg kg^{-1} medium) with 28 replications. Slow-release fertilizer has been used successfully at FORRU for many framework species (Anonymous, 2006). The experiment was undertaken in plastic bags (23×6 cm) with drainage holes, containing 800 g autoclaved forest soil medium. Three month-old seedlings of *C. acuminatissima* were transplanted one seedling per bag. In each AM treatment, 150 spores were inoculated into each pot. Slow-release fertilizer was applied in fertilization treatments at the start of the experimental period. Seedlings were grown at the FORRU's nursery for 6 months between April and September 2006. Seedlings were watered once a day with tap water. Every 3 months, slow-release fertilizer was applied to each treatment. At harvest, height and stem diameter of seedlings were measured. Fresh shoot and root samples were treated in the same way as described previously. Dry plant samples were analyzed for P content. Root sub-samples were used to determine colonization percentage and soil sub-samples were assessed for spore density.

Data Analysis

All data were subjected to analysis of variance (ANOVA) for a completely randomized design. Residuals were normally distributed with constant variance. SPSS software version 12.0 was used to conduct the ANOVA. Duncan's Multiple Range Test ($p < 0.05$) was used to compare treatment means.

RESULTS

Inoculum Production of Arbuscular Mycorrhizal Fungi

Four months after starting the pot culture, all 5 host plant species inoculated with 6 AM species had developed mycorrhizas. Spore density and colonization percentage varied greatly among the

Table 1: Spore density of AM fungi (per 100 g dry wt. soil) (n = 3) in pot cultures with 5 host plants inoculated with spores of 6 AM fungal isolates

Spore density of AM fungi (spores/100 g soil)						
Host plant	<i>A. elegans</i>	<i>A. mellea</i>	<i>A. scrobiculata</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	<i>S. heterogama</i>
<i>G. max</i>	426.33dB	13.33 nsC	14.67abC	598.00cdA	40.00dC	9.33bC
<i>O. sativa</i>	1683.33bcA	14.67 nsD	13.33abD	396.00dB	190.00bcC	6.67bD
<i>S. vulgare</i>	2713.33aB	13.33 nsC	16.67abC	6148.67aA	642.67aC	22.67aC
<i>T. erecta</i>	967.67cdB	9.33 nsC	6.00bC	1457.33cA	102.00cdC	11.33abC
<i>Z. mays</i>	1867.33bB	10.00 nsC	19.33aC	3933.33bA	231.33bC	4.67bC
Analysis of variance						
AM species			***			
Host plant species			***			
AM species × Host plant species			***			

Means followed by the same letter (s) (lower case within columns and capitals within rows) are not significantly different by Duncan's Multiple Range Test; ns: not significant. ***: significant at $p < 0.001$

Table 2: Root colonization (per 30 root pieces of plant species) (n=3) in pot cultures with 5 host plants inoculated with spores of 6 AM fungal isolates

AM colonization (%)						
Host plant	<i>A. elegans</i>	<i>A. mellea</i>	<i>A. scrobiculata</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	<i>S. heterogama</i>
<i>G. max</i>	87.95aB	20.00nsC	14.81abC	90.00bB	100.00aA	5.00cD
<i>O. sativa</i>	73.00bB	11.11nsC	3.70abC	100.00aA	95.00bA	3.33cC
<i>S. vulgare</i>	100.00aA	51.85nsC	13.33abD	100.00aA	100.00aA	78.33aB
<i>T. erecta</i>	92.16aAB	73.33nsB	16.66bC	93.33abAB	100.00aA	25.00bC
<i>Z. mays</i>	93.79aA	55.00nsB	56.67aB	100.00aA	100.00aA	11.66cC
Analysis of variance						
AM species			***			
Host plant species			***			
AM species × Host plant species			***			

Means followed by the same letter (s) (lower case within columns and capitals within rows) are not significantly different by Duncan's Multiple Range Test; ns: not significant. ***: significant at $p < 0.001$

different host species. Spore density and mycorrhizal colonization were increased by the host species and AM species which interacted (Table 1 and 2). Three fungal species: *A. elegans*, *G. etunicatum* and *G. mosseae* produced significantly the highest spore densities and colonization abilities on *S. vulgare* and *Z. mays*. The spore density of these AM species on sorghum was significantly higher than on maize, whereas mycorrhizal colonization on both plants did not differ from each other (93.8-100.0%). The highest spore number were found on sorghum inoculated with *G. etunicatum* (6148.7 spores/100 g soil), *A. elegans* (2713.3 spores/100 g soil) and *G. mosseae* (642.7 spores/100 g soil), respectively. Whilst much lower densities and root colonization of other 3 AM species were found on all host species (Table 1 and 2).

Effects of AM Inoculation with P Application on Growth of *C. acuminatissima* in P-Deficient Soil Medium

Growth of *C. acuminatissima* seedlings in the P-deficient soil experiment was highly influenced by both AM inoculation and P-application rates (Table 3). Six months after transplant, plant height, shoot and root dry weights as well as shoot P content were all significantly increased by both factors which interacted, whereas root to shoot ratio and root P content were also increased by both factors but not by their interaction. The only exception was stem diameter, which was only increased by P rates. AM colonization was only increased by fungal inoculation, whereas spore density on the other hand, was increased by both P rates and fungus which interacted (Table 3). Root colonization ranged in the P applied treatments from 36.7-45.4%, which did not differ with P rates (Table 3). In the AM treatments, colonization percentages ranged from 40.1-55.3%. Root colonization in the plants

Table 3: Effects of AM inoculation and P application (KH_2PO_4) on growth of *C. acuminatissima* seedlings grown in P-deficient soil medium and root colonization and spore density of AM fungi in plant rhizosphere (n = 3)

Treatments	Plant height (cm)	Stem diameter (cm)	Shoot dry weight (g plant ⁻¹)	Root dry weight (g plant ⁻¹)
AM inoculation				
Uninoculation	17.89c	0.23ns	0.66c	0.89d
<i>A. elegans</i>	24.25b	0.24ns	1.40ab	2.59a
<i>G. etunicatum</i>	27.36a	0.23ns	1.60a	2.08bc
<i>G. mosseae</i>	22.44b	0.24ns	1.17b	2.04c
Mixed species	19.85c	0.22ns	0.84c	2.04a
P applied (mg P kg⁻¹medium)				
0	15.29d	0.21c	0.54c	1.36c
50	16.30d	0.21c	0.58c	1.51c
100	19.87c	0.22bc	0.77c	1.67c
150	25.80b	0.23bc	1.49b	2.33b
200	32.11a	0.24b	1.36b	2.39b
250	17.86a	0.27a	2.07a	2.77a
Analysis of variance				
AM inoculation	***	ns	***	***
P applied	***	***	***	***
AM inoculation × P applied	***	ns	**	*

Treatments	Root to shoot ratio (dry weight)	Shoot P content (mg plant ⁻¹)	Root P content (mg plant ⁻¹)	Root colonization (%)	Spore density (spores/100g soil)
AM inoculation					
Uninoculation	1.44c	0.20c	0.22d	0.00c	0.00d
<i>A. elegans</i>	2.26b	0.64a	0.76a	53.72a	23.11c
<i>G. etunicatum</i>	1.86bc	0.74a	0.67ab	55.33a	31.83b
<i>G. mosseae</i>	2.28b	0.42b	0.50bc	55.26a	33.50ab
Mixed species	2.83a	0.40b	0.45c	40.10b	38.33a
P applied (mg P kg⁻¹medium)					
0	2.68a	0.15c	0.25c	43.92ns	24.20abc
50	2.73a	0.18c	0.29c	45.39ns	28.07a
100	2.37ab	0.23c	0.32c	38.14ns	27.00ab
150	1.81bc	0.61b	0.62b	41.47ns	30.07a
200	1.89bc	0.52b	0.63b	39.64ns	21.93bc
250	1.35c	1.21a	1.02a	36.71ns	20.87c
Analysis of variance					
AM inoculation	***	***	***	***	***
P applied	***	***	***	ns	***
AM inoculation × P applied	ns	***	0.074	ns	*

Means in the same column followed by different letter(s) are significantly different by ANOVA and Duncan, s Multiple Range test. *, **, ***: Significant at $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 , respectively; ns: not significant

inoculated with the single species of AM fungi was significantly higher than for the mixed species inoculum. Spore density was significantly increased by P rates and AM fungi which interacted. Spore density in the P applied treatments ranged from 20.9-30.1 spores/100 g soil which reached maximum at 150 mg kg⁻¹soil (30.1 spores/100 g soil) and continued to decrease with the lowest at 250 mg kg⁻¹ soil (20.9 spores/100 g soil). Spore density ranged from 23.1-38.3 spores/100 g soil and the highest density was found in plants inoculated with mixed AM species.

P applications were highly beneficial for growth parameters of plants as measure by height, stem diameter (Table 4), dry weights (Table 5) and P contents (Table 6) and AM inoculations also had significant effects on plant growth. Six months after transplant, non-AM plants grown in P-deficient soil exhibited increasing either height or shoot dry weight to increasing P rates, whereas the other growth parameters showed no such differences. Contrast with all growth parameters of AM plants, tended to increase with increasing P rates (maximum at 250 mg P kg⁻¹) and mycorrhizal enhancement varied with the different kinds of AM species. In P applied treatments, seedlings generally grew very little and no significant differences between AM plants and non-AM plants were observed for plant height, stem diameter and P contents, whereas dry weights of AM plants significantly trended to be higher than non-AM plants.

Table 4: Height and diameter (n = 3) of *C. acuminatissima* seedlings grown in P-deficient soil medium containing increasing P application with AM inoculation

Plant height (cm)					
Treatments	Uninoculation	<i>A. elegans</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	Mixed species
P applied (mg P kg⁻¹medium)					
0	14.44bNS	16.56cNS	15.59bNS	14.84cNS	15.02cNS
50	16.19bNS	18.02cNS	15.97bNS	16.05cNS	15.26cNS
100	18.13bNS	22.12bcNS	18.56bNS	22.19bNS	18.35bcNS
150	17.76bB	27.05bB	39.19aA	25.69bB	19.28bcB
200	17.89bC	26.81bAB	33.97acA	24.03bB	21.21bBC
250	22.92aC	34.95aAB	40.85aA	31.81aABC	30.00aBC
Stem diameter (cm)					
Treatments	Uninoculation	<i>A. elegans</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	Mixed species
P applied (mg P kg⁻¹medium)					
0	0.22nsNS	0.21bNS	0.22nsNS	0.19bNS	0.21nsNS
50	0.22nsNS	0.21bNS	0.219nsNS	0.21bNS	0.21nsNS
100	0.22nsNS	0.20bNS	0.23nsNS	0.24abNS	0.22nsNS
150	0.22nsNS	0.24bNS	0.25nsNS	0.25abNS	0.20nsNS
200	0.23nsNS	0.23bNS	0.25nsNS	0.24abNS	0.25nsNS
250	0.24nsB	0.32aA	0.24nsB	0.29aA	0.24nsB

Means followed by the same letter (lower case within columns and capitals within rows) are not significantly different by Duncan's Multiple Range Test; ns: not significant

Table 5: Shoot and root dry weights (n = 3) of *C. acuminatissima* seedlings grown in P-deficient soil medium containing increasing P application with AM inoculation

Shoot dry weight (g plant ⁻¹)					
Treatments	Uninoculation	<i>A. elegans</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	Mixed species
P applied (mg kg⁻¹ KH₂PO₄)					
0	0.45bB	0.76bA	0.67bAB	0.42dB	0.42cB
50	0.54bAB	0.83bA	0.51bAB	0.53cdAB	0.46bcB
100	0.65bNS	0.82bNS	0.91bNS	0.96cNS	0.51bcNS
150	0.62bB	1.81abAB	2.63aA	1.45bAB	0.96bB
200	0.62bD	1.64abAB	2.136aA	1.46bBC	0.94bCD
250	1.07aC	2.58aAB	2.74aA	2.18aAB	1.77aBC
Root dry weigh (g plant ⁻¹)					
Treatments	Uninoculation	<i>A. elegans</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	Mixed species
P applied (mg kg⁻¹ KH₂PO₄)					
0	0.96nsB	1.77nsA	1.54bAB	1.48cAB	1.05cB
50	0.78nsC	2.28nsA	1.63bB	1.53cB	1.35bcB
100	0.91nsB	1.93nsA	1.42bAB	2.15bA	1.96bA
150	0.76nsC	3.13nsAB	3.51aA	2.34bAB	1.89bBC
200	0.82nsC	3.05nsA	3.11aA	2.13bB	2.83aAB
250	1.11nsB	3.37nsA	3.39aA	2.87aA	3.13aA

Means followed by the same letter (lower case within columns and capitals within rows) are not significantly different by Duncan's Multiple Range Test; ns: Not significant

AM inoculation significantly increased plant height over non-inoculated controls were found in *A. elegans* at 200-250 mg P kg⁻¹, *G. etunicatum* at 150-250 mg P kg and *G. mosseae* at 200 mg P kg⁻¹. The maximum height was 1.52 and 1.78 fold higher than the control in *A. elegans* and *G. etunicatum* at 250 mg P kg⁻¹, respectively, whereas, height of *G. etunicatum* plants was the highest (40.8 cm) (Table 4). Stem diameter was only influenced by P rates. Stem diameter had a 1.45 and 1.32 fold increase over control with no P added in *A. elegans* and *G. mosseae* at 250 mg P kg⁻¹, respectively, which did not differ from one another (0.3 cm) (Table 4).

Only *A. elegans* plants at the lowest P rate significantly had a higher shoot dry weight than non-AM plants and other AM plants. Whilst at high P rates, AM inoculation significantly increased over

Table 6: Shoot and root P contents (n = 3) of *C. acuminatissima* seedlings grown in P-deficient soil medium containing increasing P application with AM inoculation

Treatments	Shoot P content (mg plant ⁻¹)				
	Uninoculation	<i>A. elegans</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	Mixed species
P applied (mg kg⁻¹ KH₂PO₄)					
0	0.12nsNS	0.21cNS	0.15bNS	0.11bNS	0.14cNS
50	0.13nsB	0.25cA	0.19bAB	0.15bAB	0.16cAB
100	0.20nsNS	0.20cNS	0.33bNS	0.24bNS	0.17cNS
150	0.19nsB	0.76bAB	1.23aA	0.31bB	0.57bB
200	0.16nsC	0.71bB	1.02aA	0.30bC	0.42bBC
250	0.40nsB	1.70aA	1.55aA	1.44aA	0.96aAB
Treatments	Root P content (mg plant ⁻¹)				
	Uninoculation	<i>A. elegans</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. mosseae</i>	Mixed species
P applied (mg kg⁻¹ KH₂PO₄)					
0	0.21nsNS	0.29bNS	0.30bNS	0.23bNS	0.20dNS
50	0.21nsC	0.40bA	0.35bAB	0.26bBC	0.21dC
100	0.22nsNS	0.34bNS	0.35bNS	0.38bNS	0.31cdNS
150	0.23nsB	0.94abA	0.98abA	0.54bAB	0.43cAB
200	0.20nsB	1.05abA	0.85abAB	0.40bAB	0.64bAB
250	0.26nsB	1.54aA	1.18aA	1.22aA	0.89aAB

Means followed by the same letter (s) (lower case within columns and capitals within rows) are not significantly different by Duncan's Multiple Range Test; ns: not significant

non-AM plants were found in most fungus treatments, except for mixed fungal species. At 250 mg P kg⁻¹, the maximal shoot biomass exhibited 2.41, 2.56 and 2.34 fold increase over control in *A. elegans*, *G. etunicatum* and *G. mosseae*, respectively, whereas *G. etunicatum* plants gave the highest shoot biomass (2.7 g plant⁻¹) (Table 5). *A. elegans* plants with no P added also had a significantly higher root dry weight than non-AM plants and other AM plants. AM inoculation significantly increased over non-AM plants were found in all fungus treatments at the first 50 mg P kg⁻¹ and continued to increase with further increase in the level of P rates. Root biomass reached their maximum at 250 mg P kg⁻¹ and exhibited 3.04, 3.05, 2.58 and 2.82 fold increase over non-inoculated controls in *A. elegans* and *G. etunicatum* *G. mosseae* and mixed AM species, respectively, which did not differ from one another (2.8-3.4 g plant⁻¹) (Table 5).

At 50 mg P kg⁻¹, AM inoculation significantly increased shoot P content over non-AM plants was only found in *A. elegans*. Whilst at higher P rates, AM inoculation significantly increased shoot P content were found in *A. elegans* at 200-250 mg P kg⁻¹, *G. etunicatum* at 150-250 mg P kg⁻¹ and *G. mosseae* at 250 mg P kg⁻¹. At the highest rate, the maximal shoot P content exhibited 3.04, 3.05, 2.58 and 2.82 fold increase over non-AM plants in *A. elegans* and *G. etunicatum* and *G. mosseae*, respectively which did not differ from one another (1.4-1.7 mg plant⁻¹) (Table 6). Fungal inoculation significantly increased root P content over non-inoculated controls were found in *A. elegans* and *G. etunicatum* at first 50 mg P kg⁻¹ and still increased at 150 mg P kg⁻¹. Whilst at 200 mg P kg⁻¹, only root P content of *A. elegans* plants were significant increased over controls. At 250 mg P kg⁻¹, root P content of most AM plants exhibited 5.92, 4.54 and 4.69 fold increase over non-AM plants in *A. elegans*, *G. etunicatum* and *G. mosseae*, respectively which did not differ from one another (1.2-1.5 mg plant⁻¹) (Table 6).

Effects of AM Inoculation with Slow-Release Fertilizer on Growth of *C. acuminatissima* in Forest Soil Medium

Growth of *C. acuminatissima* seedlings in the forest soil measured for 6 months showed consistent effects of slow-release fertilization throughout the experiment (Table 7). Plant height, dry weights and P contents were increased by fertilizer but not by AM fungi. However, fertilization effects

Table 7: Effects of AM inoculation and slow-release fertilizer application on growth of *C. acuminatissima* seedlings grown in forest soil medium and root colonization and spore density of AM fungi in plant rhizosphere (n = 28)

Treatments	Plant height (cm)	Stem diameter (cm)	Shoot dry weight (g plant ⁻¹)	Root dry weight (g plant ⁻¹)
Uninoculated	10.89cd	0.15cd	0.39bcd	0.62bcd
Uninoculated+Fertilizer	14.54a	0.16bc	0.58ab	0.78ab
<i>A. elegans</i>	10.89cd	0.15bcd	0.25d	0.51d
<i>A. elegans</i> +Fertilizer	11.41bcd	0.16bc	0.62a	0.61bcd
<i>G. etunicatum</i>	9.71d	0.14d	0.43abcd	0.64bcd
<i>G. etunicatum</i> +Fertilizer	12.73abc	0.17b	0.42abcd	0.76ab
<i>G. mosseae</i>	10.04d	0.15bcd	0.35cd	0.57cd
<i>G. mosseae</i> +Fertilizer	13.13ab	0.16bc	0.62a	0.83a
Mixed species	11.52bcd	0.16bc	0.39bcd	0.63bcd
Mixed species+Fertilizer	13.05ab	0.20a	0.52abc	0.70abc
Analysis of variance				
AM inoculation	0.075	*	ns	0.061
Fertilization	***	***	***	***
AM inoculation × Fertilization	ns	ns	0.053	ns

Treatments	Root to shoot ratio (dry weight)	Shoot P content (mg plant ⁻¹)	Root P content (mg plant ⁻¹)	Root colonization (%)	Spore density (spores 100 g ⁻¹ soil)
Uninoculated	1.83bc	0.05cd	0.04c	0.00f	0.00f
Uninoculated+Fertilizer	1.77cd	0.13b	0.10a	0.00f	0.00f
<i>A. elegans</i>	2.58a	0.03d	0.03c	52.56d	22.43e
<i>A. elegans</i> +Fertilizer	1.14d	0.19a	0.10a	79.52a	57.71ab
<i>G. etunicatum</i>	2.44ab	0.04d	0.03c	41.96e	20.86e
<i>G. etunicatum</i> +Fertilizer	1.95bc	0.10bc	0.09ab	65.30c	16.14e
<i>G. mosseae</i>	1.72cd	0.04d	0.03c	38.38e	42.28d
<i>G. mosseae</i> +Fertilizer	1.89bc	0.15ab	0.12a	77.58ab	49.14cd
Mixed species	1.65cd	0.07cd	0.05bc	58.87cd	65.14ab
Mixed species+Fertilizer	1.77cd	0.16ab	0.12a	68.32bc	74.57a
Analysis of variance					
AM inoculation	ns	ns	ns	***	***
Fertilization	*	***	***	***	***
AM inoculation × Fertilization	***	ns	ns	***	***

Means in the same column followed by different letter (s) are significantly different by ANOVA and Duncan, s Multiple Range Test. *, **, ***: Significant at p<0.05, 0.01, 0.001 respectively; ns: Not significant

on growth parameters were slightly higher it increased growth than non-AM plants without fertilization (controls). Plant growth was highest in all fertilization treatments for plant height (14.5 cm), shoot and root dry weights (0.6 and 0.8 g plant⁻¹, respectively) and shoot and root P contents (0.2 and 0.1 mg plant⁻¹, respectively). Whilst significant mycorrhizal effects were only found in stem diameter, which fungal-fertilizer interactions were not found (Table 7). Stem diameter of *G. etunicatum* and mixed AM species plants with fertilization were highly increased by AM fungi, whereas the highest diameter was found in AM plants with fertilization (0.2 cm). Root colonization and spore density were increased by both fungus species and fertilizer, which interacted (Table 7). Colonization percentages of all AM plants with fertilization were higher than without fertilization. The percentages were high, ranging from 38.4-79.5%, with the highest percentage found in *A. elegans* plants. Spores in fungal treatments with fertilization, generally recovered in higher number than without fertilization. The spore number ranged from 16.1-74.6 spores/100 g soil and the highest density was found in mixed AM species with fertilization.

DISCUSSION

Pot cultures, using host plants grown in soil diluted with sterile sand, are most commonly used to propagate AM fungi (Brundrett *et al.*, 1996). In our present study, all 6 indigenous AM fungi were recovered from all 5 host plant pot cultures. Variation in spore density and mycorrhizal colonization

was increased by host plants and AM fungi. Results presented here for spore density and root colonization are in agreement with those found in the greenhouse and the field showing that AM species, host plant species and soil conditions have been reported to effect on mycorrhizal formation and sporulation in pot cultures (Brundrett *et al.*, 1996; Liu and Wang, 2003). From our observation, most plants inoculated with small to medium sized spores of *Glomus* and *Acaulospora* species was generally more successful than inoculation with the larger sized spores of *Scutellospora* species. The spore abundance must be related to their sporogenous characteristics. It has been reported that *Glomus* and *Acaulospora* species usually produce more spores than *Gigaspora* and *Scutellospora* species in the same environment conditions, because smaller spores require a short time to produce spores than large spores (Hepper, 1984; Bever *et al.*, 1996). The high success rates of spore density and colonization percentage of at least 3 of 6 AM species were observed on sorghum and maize suggested that these plants are favorable hosts especially for *A. elegans*, *G. etunicatum* and *G. mosseae* compared to other hosts tested. Thus, sorghum and maize pot culture-produced spores as inoculum in P-deficient soil medium are more suitable for large scale production as well as for research purposes and nursery practice.

In the greenhouse experiment, growth of non-AM plants was very stunted in P-deficient soil medium (available P 1.4 ppm). Applying additional P fertilizer to non-AM plants could enhance growth of plants. However, even with the different allotments of P fertilizer, all AM species greatly stimulated plant growth with bigger size than non-AM plants in this unsuitable soil condition. Enhancement effects on plant growth, tended to increase with increasing P rates and more efficiency varied with the different kinds of AM species. Phosphorus responses for the plant growth agreed with that reported for other AM plants grown in a controlled environment (Siqueira *et al.*, 1998a; Youpensuk *et al.*, 2005), thereby confirming mycorrhizal nutritional benefits and the strong interrelationship between P supply and mycorrhizal response under nutrient-stressed conditions. AM inoculation had slightly effects on seedling growth when plants received low P rates at planting, whereas strongly effects were found at higher P rates. The present results suggested that addition 250 mg P kg⁻¹ to *C. acuminatissima* seedlings was suitable to produce either non-AM plants or AM plants in P-deficient soil. Although, non-AM plants at maximal P rate were higher than at minimal rate but still significantly lower than AM plants at the same P addition. The greatest height of AM plants was found in *G. etunicatum* plants with 250 mg P kg⁻¹, exhibited 1.8 fold over non-AM plants. Contrast with stem diameter of seedlings was not improved by the mycorrhizal symbiosis but diameter was also greatest with the highest P added, exhibited 1.5 fold increase over control with no P added. The Mycorrhizal Dependence (MD) of *C. acuminatissima* was high and trended to increase with applying fertilizer into P-deficient soil. In the absence of fertilizer, maximum MD exhibited 43.1% when fertilized with 150 mg P kg⁻¹, maximum MD exhibited 75.9% (data not shown). P-deficient plants lacking AM symbiosis tend to have a high root to shoot ratios usually associated with nutrient-stressed plants (Pacovsky *et al.*, 1986). Whilst, root to shoot ratios of AM plants in our study were higher than for non-AM plants, especially in the absence of P fertilizer or low P rates, the higher ratios probably resulted in mycorrhizal stimulation of root growth for improving P acquisition under limiting P condition. Plants characterized as inefficient at acquiring soil P, may substantially improve P acquisition by morphological and physical adaptations include changes in P and dry matter partitioning that favor growth of roots over shoots and the induction of a high-affinity P uptake and transport system in roots during the development (Cogliatti and Clarkson, 1983; Marschner *et al.*, 1996).

P contents in AM plants were significantly increased with levels of P application. AM fungi most likely increased nutrient uptake from the soil due to the external hyphae can exploring greater soil volume and delivering nutrients to the host plants (Joner and Jakobsen, 1995; Koide and Mosse, 2004). Root colonization of plant species in many greenhouse experiments is diminished by high soil

P availability and concomitant enhanced P concentration in plant tissues (Vaast *et al.*, 1996; Youpensuk *et al.*, 2005). Contrasting with this suppressive effect observed with AM colonization in *C. acuminatissima* was not differed by increasing P levels application while P status remained unaffected. This experiment showed that AM inoculation of *C. acuminatissima* seedlings produces large plants with improved P status, thus confirming the high AM-dependency of host plant. This study also indicates the tolerance abilities of selected AM species on P-application rates, resulting from their abilities to promote plant P accumulation.

In the nursery experiment, seedlings grown in forest soil medium with slow-release fertilizer applied were slightly bigger than controls. Most AM plants without fertilizer added grew poorly with growth parameters similar to those of non-AM plants. Plant height, shoot and root dry weights and shoot and root P contents were increased by fertilizer but not by mycorrhiza, whereas only stem diameter was increased by both factors. Higher stem diameter of *G. etunicatum* and mixed AM species plants with fertilization may result from direct fungal efficiency effects or fungal-fertilizer interactions in such soil condition. AM colonization and P concentrations of *C. acuminatissima* seedlings were quite high with slow-release fertilizer added. This may be fertilization effect on P accumulation through its influence on AM symbiosis. Heavy application of P fertilizer or sufficient P condition at planting may reduce mycorrhizal formation, sporulation and the MD of host and thus mycorrhizal effectiveness for the seedling growth (Siqueira *et al.*, 1998b). From our observation, growth of AM plants grown in forest soil was less than grown in P-deficient soil. This may be the result of plants responding well to mycorrhizas in low or moderate P soils are regarded as mycorrhizal dependent. That is, they depend on mycorrhiza to show their full potential (Haselwandter and Bowen, 1996). The components of forest soil medium (available P 15.8 ppm) were rich in both organic and inorganic nutrients. Thus, AM fungi may be lose their function on stimulating plant growth in this nutrient condition. High dissolved inorganic nutrients in tropical forest soil may make AM fungi unnecessary to meet nutrient (Maffia *et al.*, 1993). The consistent effects of AM fungi on plant growth were diminished or disappeared with nutrient abundance in the soil. Strongly mycorrhizal effects on external P requirement for maximal growth of seedlings were high and consistent in nutrient poor soil but were diminished and varied unpredictably with levels of fertilizer and P requirement of individual plant species. Phosphorus is not only a suppressed factor on AM symbiosis. Further, Youpensuk *et al.* (2005) reports that application of high rates of P or N can depressed AM colonization and spore formation. *C. acuminatissima* seedling grown in forest soil medium with nutrient abundance did not respond to AM inoculation although root colonization was high. Without fertilizer added, all AM plants were still equal size with non-AM plants. It may be resulted in reduction of AM symbiosis caused decreasing nutrient uptake ability for growth of mycorrhizal plants.

In addition, mycorrhizal inoculation with selected AM fungi and application of optimal P rate on early plant development are highly advantageous for high quality sapling production in forest tree nurseries and sapling establishment in low nutrient soils in forest restoration areas in Thailand. All AM species tested were greatly effective in promoting growth parameters of AM seedling in nutrient poor medium, but diminished their function in nutrient abundant medium. Differential responses of AM seedlings in these experiments appear to be related to nutrient available (inorganic and organic forms) in medium and form of fertilizer (easy soluble or slow-releasing) by plant and AM fungi. Therefore, the success of AM technology will depend upon dependent mycorrhizal host, optimal soil condition and well-adapted effective fungal strains.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge financial support from Chiang Mai University Graduate School and Pibulsongkram Rajabhat University for partial support to the first author's Ph.D. study. This

research was supported by the Thailand Research Fund DBG4980004. The authors are grateful Mr. Sittichai Lordkaew and Mrs. Kanjanaporn Lordkaew for plant analysis and the Multiple Cropping Centre, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University for experimental facilities.

REFERENCES

- Anonymous, 2006. How to Plant a Forest: The Principles and Practice of Restoring Tropical Forests. Forest Restoration Research Unit. 1st Edn. Chiang Mai University, Thailand FORRU, pp: 200.
- Bever, J.D., J.B. Morton, J. Antonovics and P.A. Schultz, 1996. Host-dependent sporulation and species diversity of *Arbuscular mycorrhizal* fungi in a mown grassland. *J. Ecol.*, 84: 71-82.
- Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove and N. Malajczuk, 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR monograph 32, ACIAR, Canberra, Australia, pp: 374.
- Cogliatti, D.H. and D.T. Clarkson, 1983. Physiological changes in potato plants during development and recovery from phosphate stress. *Plant Physiol.*, 58: 287-294.
- Dubský, M., F. Šrámek and M. Vosátka, 2002. Inoculation of cyclamen (*Cyclamen persicum*) and poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) with arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum*. *Rostlinná Výroba*, 48: 63-68.
- Gai, J.P., P. Christie, G. Feng and X.L. Li, 2006. Twenty years of research on community composition and species distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 16: 229-239.
- Goosem, S.P. and N.I.J. Tucker, 1995. Repairing the Rainforest-Theory and Practice of Rainforest Re-establishment in North Queensland's Wet Tropics. Wet Tropics Management Authority, Cairns, pp: 71.
- Haselwandter, K. and G.D. Bowen, 1996. Mycorrhizal relations in trees for agroforestry and land rehabilitation. *For. Ecol. Manage.*, 81: 1-17.
- Hepper, C.M., 1984. Isolation and Culture of VA Mycorrhizal (VAM) Fungi. In: VA Mycorrhizae. Powell, C.L. and D.J. Bagyaraj (Eds.), CRC Press, Florida, USA, pp: 95-112.
- Hoagland, D.R. and D.I. Arnon, 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experimental Station Circular No. 347. University of California, Berkeley.
- Joner, E.J. and I. Jakobsen, 1995. Growth and extracellular phosphatase activity of *Arbuscular mycorrhizal* hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.*, 27: 1153-1159.
- Klironomos, J.N. and M.M. Hart, 2002. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza*, 12: 181-184.
- Koide, R.T. and B. Mosse, 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza*, 14: 145-163.
- Liu, R. and F. Wang, 2003. Selection of appropriate host plants used in trap culture of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 13: 123-127.
- Maffia, B., N.M. Nadkarni and D.P. Janos, 1993. Vesicular-arbuscular mycorrhizae of epiphytic and terrestrial Piperaceae under field and greenhouse conditions. *Mycorrhiza*, 4: 5-9.
- Marschner, H., E. Kirby and I. Cakmak, 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *J. Exp. Bot.*, 47: 1255-1263.
- McGonigle, T.P., D.G. Evans and M.H. Miller, 1990. Effect of degree of soil disturbance on mycorrhizal colonization and phosphorus absorption by maize in growth chamber and field experiment. *New Phytol.*, 116: 629-636.
- Pacovsky, R.S., G.J. Bethlenfalvay and E.A. Paul, 1986. Comparisons between P-fertilized and mycorrhizal plants. *Crop Sci.*, 26: 151-156.
- Pattinson, G.S., K.A. Hammill, B.G. Sutton and P.A. McGee, 2004. Growth and survival of seedlings of native plants in an impoverished and highly disturbed soil following inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 14: 339-346.

- Rilling, M.C., E.R. Lutgen, P.W. Ramsey, N. Klironomos and J.E. Gannon, 2005. Microbiota accompanying different arbuscular mycorrhizal isolates influence soil aggregation. *Pedobiologia*, 49: 251-259.
- Setiadi, Y., 2000. Mycorrhizal Seedling Production for Enhancing Rehabilitation of Degraded Forest in Indonesia. In: Forest Restoration for Wildlife Conservation. Elliott, S., J. Kerby, D. Blakesley, K. Hardwick, K. Woods and V. Anusarnsunthorn (Eds.). Chiang Mai University, Thailand, pp: 235-243.
- Siqueira, J.O., M.A.C. Carneiro, N. Curi, S.C.S. Rosado and A.C. Davide, 1998a. Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to successional group in Southeastern Brazil. *For. Ecol. Manage.*, 107: 241-252.
- Siqueira, J.O., O.J. Saggin-Júnior, W.W. Flores-Aylas and P.T.G. Guimarães, 1998b. Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. *Mycorrhiza*, 7: 293-300.
- Vaast, P.H., R.J. Zasoski and C.S. Bledsoe, 1996. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation at different soil P availabilities on growth and nutrient uptake of *in vitro* propagated coffee (*Coffea arabica* L.) plants. *Mycorrhiza*, 6: 493-497.
- Wu, Q., R. Xia and Z. Hu, 2006. Effect of arbuscular mycorrhiza on the drought tolerance of *Poncirus trifoliata* seedlings. *Front. For. China*, 1: 100-104.
- Wubet, T., I. Kottke, D. Teketay and F. Oberwinkler, 2003. Mycorrhizal status of indigenous trees in dry Afromontane forests of Ethiopia. *For. Ecol. Manage.*, 179: 387-399.
- Youpensuk, S., B. Rerkasem, B. Dell and S. Lumyong, 2005. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi fallow enriching tree (*Macaranga denticulata*). *Fungal. Divers.*, 18: 189-199.

เอกสารตีพิมพ์

Title:	Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in forest restoration area of Doi Suthep-Pui national park, northern Thailand
Authors:	Patipan Nandakwang, Stephen Elliott, Saisamorn Lumyong
Journal:	Journal of Microscopy Society of Thailand
Published :	Microscopy Society of Thailand
ISSN:	0857-5258
Issue:	Volume 22,2008
Page:	60-64

Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Forest Restoration Area of Doi Suthep-Pui National Park, Northern Thailand

Patipan Nandakwang^{1*}, Stephen Elliott² and Saisamorn Lumyong^{2*}

¹Applied Biology Programme, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanuloke, 65000, Thailand

²Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand

e-mail: patipan263@hotmail.com; scboi009@chiangmai.ac.th

Abstract

Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungal diversity was surveyed in the forest restoration area of Doi Suthep-Pui National Park, northern Thailand. Twenty four indigenous tree species, used for forest restoration in a degraded watershed area were examined. Rhizosphere soil samples were collected and AM spores were counted and identified morphologically. AM spores were found in the rhizosphere soils of all tree species. Twenty one AM species were identified: *Acaulospora* (6 species), *Glomus* (12 species) and *Scutellospora* (3 species). AM fungi belonging to the genera *Glomus* and *Acaulospora* were dominant. Abundant species present were *Acaulospora elegans*, *Glomus multicaule* and *Scutellospora pellucida*. These results showed that all 24 indigenous tree species were associated with AM fungi and some AM species had a broad host range.

Background

The tropical forests of Doi Suthep-Pui National Park are one of the most important watershed areas which composed of a number of indigenous tree species. Deforestation within the national park has had adverse consequences on biodiversity and environmental quality. One method of forest restoration, which involves planting mixtures of several indigenous tree species, has been used to counteract this problem (Goosem and Tucker, 1995; FORRU, 2006). Many indigenous species were selected and tested in the experimental plot, established in the north of national park (Elliott *et al.*, 2003). AM fungi are one of the beneficial soil microorganisms that play a crucial role in the mineral nutrition of forest trees (Koide and Mosse, 2004). Information on the capacity of indigenous tree species in association with AM fungi is very important to forest restoration. The purpose of this study was to obtain information on the diversity of AM fungi associated with indigenous tree species in the forest restoration plot.

Materials and Methods

Among the planted tree species in forest restoration plot, 24 potential indigenous species were selected for study. All tree species are reported to be multipurpose and suitable for acceleration of the forest regeneration. Rhizosphere soil samples (about 500 g) of each indigenous species were collected and stored at 4°C until analyzed. AM spores were extracted from 100 g air-dried soil samples by wet-sieving and 50% sucrose centrifugation (Brundrett *et al.*, 1996). Spores were recovered by filtering through a 53 µm sieve onto filter paper. The intact spores on filter

paper were counted under a stereomicroscope (Olympus SZ40). Spores were mounted on microscopic slides in polyvinyl lactic acid (PVA), with or without Melzer's reagent (Morton, 1988) and identified according to morphological characteristics of the originally published species descriptions under a light microscope (Olympus CH30). Light microscopic photographs were taken under an Olympus BX61.

Results and Discussion

The results of our study on the AM fungal diversity in the forest restoration area of Doi Suthep-Pui National Park showed that all 24 indigenous tree species are associated with AM fungi. Spores of AM fungi were found in the rhizosphere soils of all individual tree species. This reflects the mycotrophic nature of the plant species studied and the ability of AM fungi in soils to associate a wide range of host species. It has been reported that many tree species are highly associated with AM fungi (Janos, 1980; Onguene and Kuyper, 2001). Twenty one AM species were identified based on morphological characteristics of their spores according to published descriptions (Table 1). The diversity of AM species was varied among the different tree species (Table 2). Most of the isolated species belonged to the family *Glomaceae*, all of which were *Glomus* (12 species, 49.3%). Abundant species present was *G. multicaule* (14.2%) (figure 1). Six species were in the family *Acaulosporaceae*, all of which were in the genus *Acaulospora* (43.6%). Abundant species present was *A. elegans* (39.2%) (figure 2). Three species were members of the family

Gigasporaceae and belonged to the genus *Scutellospora* (7.1%). Abundant species present was *S. pellucida* (5.5%) (figure 3). Species in the genera *Archaeospora*, *Paraglomus*, *Entrophospora* and *Gigaspora* were not found. AM fungi belonged to the genera *Glomus* and *Acaulospora* were dominant. This fact must be related to their sporogenous characteristics, i.e. *Glomus* and *Acaulospora* species usually take a short time to produce small spores, compared with the large spores of *Gigaspora* and *Scutellospora* species in the same environment (Hepper, 1984; Bever *et al.*, 1996). *A. elegans*, *G. multicaule* and *S. pellucida* were the most commonly encountered species. This suggests that these species have a widespread and broad host range.

Conclusion

In the forest restoration area of Doi Suthep-Pui National Park, all surveyed indigenous tree species were associated with AM fungi. The AM fungal diversity in the plant rhizospheres was variable among the different tree species. Twenty one AM species were identified as 3 genera and 12 species of *Glomus*, 6 species of *Acaulospora* and 3 species of *Scutellospora*. *Glomus* and *Acaulospora* were the dominant genera. The present study obtains the information on the AM association of 24 potential indigenous trees used to restore tropical forest of Doi Suthep-Pui National Park.

Acknowledgment

This research was partially supported by Pibulsongkram Rajabhat University. We thank Mr. Cherdsak Kuarak and volunteers for helping collect the samples.

References

1. Bever JD, Morton JB, Antonovics J, Schultz PA. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *J. Ecol* 1996, 84: 71-82.
2. Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. *ACIAR Monograph* 32, ACIAR, Canberra, Australia 1996, pp: 374.
3. Elliott S, Navakitbumrung P, Kuarak C, Zangkum S, Anusarnsunthorn V, Blakesley D. Selecting framework tree species for restoring seasonally dry tropical forests in northern Thailand based on field performance. *For. Ecol. Manage* 2003, 184: 177-191.
4. FORRU. How to Plant a Forest: The Principles and Practice of Restoring Tropical Forests. *Forest Restoration Research Unit. 1st Edn., Biology Department, Science Faculty, Chiang Mai University, Thailand* 2006, pp: 200.
5. Goosem SP, Tucker NIJ. Repairing the Rainforest-Theory and Practice of Rainforest Re-establishment in North Queensland's Wet Tropics. *Wet Tropics Management Authority, Cairns* 1995, pp: 71.
6. Hepper CM. Isolation and Culture of VA Mycorrhizal (VAM) Fungi. In: *VA Mycorrhizae. Powell, C.L. and D.J. Bagyaraj (Eds.), CRC Press, Florida, USA* 1984, pp: 95-112.
7. Janos DP. Vesicular arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. *Ecology* 1980, 61: 151-162.
8. Koide RT, Mosse B. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 2004, 14: 145-163.
9. Morton JB. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 1988, 37: 267-324.
10. Onguene NA, Kuyper TW. Mycorrhizal associations in the rain forest of South Cameroon. *For. Ecol. Manage* 2001, 140: 277-287.

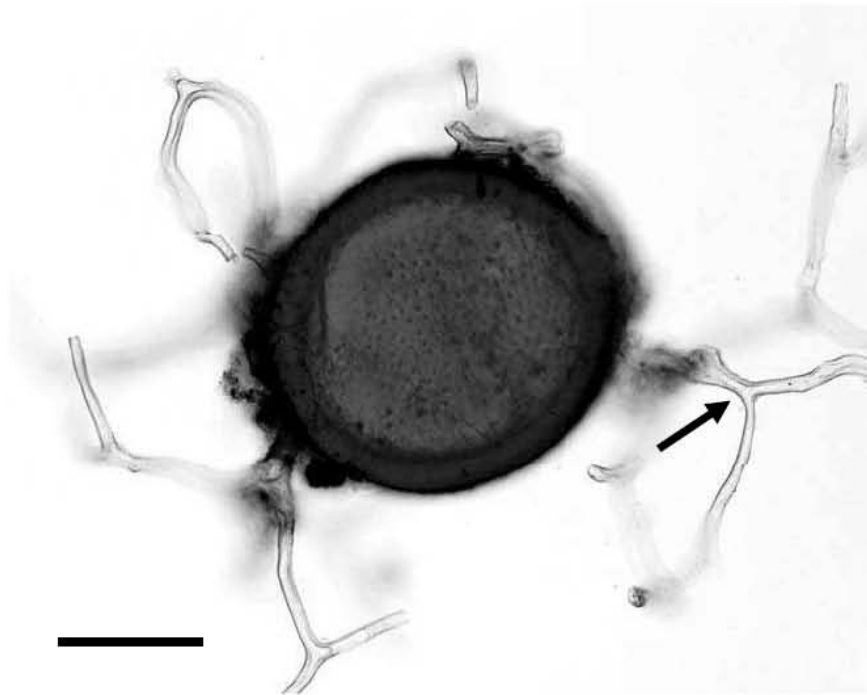


Fig. 1 *Glomus multicaulis*: Spore with multiple subtending hypha (arrow) and rounded projections on the surface, bar = 50 μ m.



Fig. 2 *Acaulospora elegans*: Cracked spore with sporiferous saccule (arrow) and crowded spines on the surface, bar = 50 μ m.

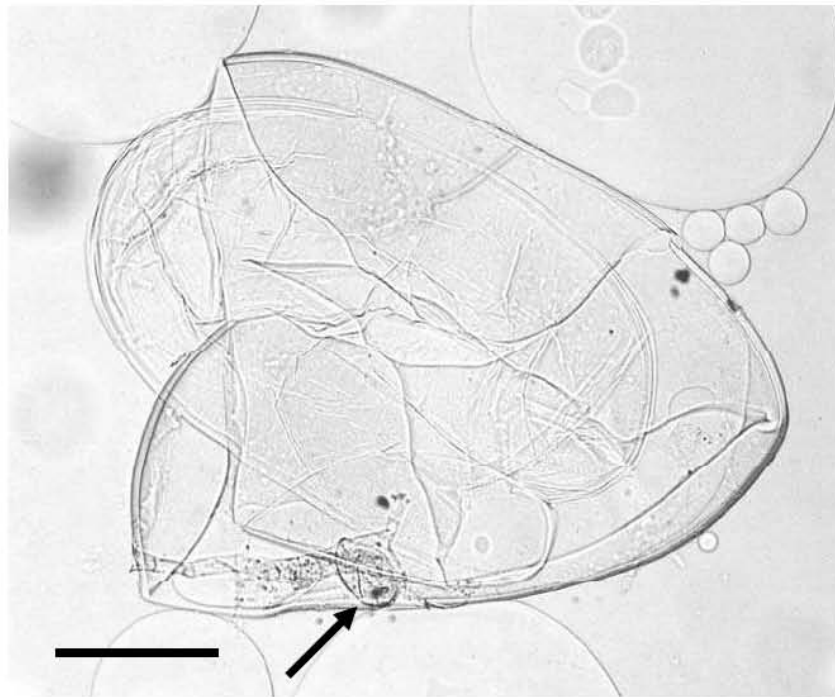


Fig. 3 *Scutellospora pellucida*: Cracked hyaline spore with hyaline bulbous subtending hypha, bar = 50 μ m.

Table 1 Diversity of AM fungi from the rhizosphere soils of 24 indigenous tree species in the forest restoration area of Doi Suthep-Pui National Park, northern Thailand.

Code of AM species	Genus	Species
<i>Acaulospora</i>		
1	<i>A. bireticulata</i>	Rothwell & Trappe
2	<i>A. elegans</i>	Trappe & Gerd.
3	<i>A. foveata</i>	Trappe & Janos
4	<i>A. laevis</i>	Gerd. & Trappe
5	<i>A. mellea</i>	Spain & Schenck
6	<i>A. scrobiculata</i>	Trappe
<i>Glomus</i>		
7	<i>G. aggregatum</i>	Schenck & Smith
8	<i>G. ambisporum</i>	Smith & Schenck
9	<i>G. clavisporum</i>	Trappe
10	<i>G. coremioides</i>	Berk. & Broome
11	<i>G. intraradices</i>	Schenck & Smith
12	<i>G. microaggregatum</i>	Koske, Gemma & Olexia
13	<i>G. microcarpus</i>	Iqbal & Bushra
14	<i>G. mosseae</i>	(Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe
15	<i>G. multicaule</i>	Gerd. & Bakshi
16	<i>G. rubiforme</i>	Gerd. & Trappe
17	<i>G. sinuosum</i>	Gerd. & Bakshi
18	<i>G. viscosum</i>	Nicol.
<i>Scutellospora</i>		
19	<i>S. gregaria</i>	(Schenck & Nicol.) Walker & Sanders
20	<i>S. heterogama</i>	Walker & Sanders
21	<i>S. pellucida</i>	(Nicol. & Schenck) Walker & Sanders

Table 2 Diversity of AM fungi found in the rhizospheres of 24 indigenous tree species in the forest restoration area of Doi Suthep-Pui National Park, northern Thailand.

Indigenous tree species	AM species*
<i>Acrocarpus fraxinifolius</i> Wight ex Arn. (Caesalpinoideae)	3, 4, 14, 15
<i>Balakata baccata</i> (Roxb.) Ess. (Euphorbiaceae)	12, 20
<i>Castanopsis acuminatissima</i> (Bl.) A. DC. (Fagaceae)	1, 15
<i>Erythrina subumbrans</i> (Hassk.) Merr. (Papilionoideae)	2, 7, 12, 19
<i>Ficus altissima</i> Bl. (Moraceae)	2, 6, 10
<i>Ficus benjamina</i> L. var. <i>benjamina</i> (Moraceae)	6, 19, 20
<i>Ficus glaberrima</i> Bl. var. <i>glaberrima</i> (Moraceae)	16
<i>Ficus hispida</i> L. f. var. <i>hispida</i> (Moraceae)	2, 5, 16, 17
<i>Ficus racemosa</i> L. var. <i>racemosa</i> (Moraceae)	2, 8, 14, 16, 18
<i>Ficus subulata</i> Bl. var. <i>subulata</i> (Moraceae)	2, 14, 16, 20
<i>Glochidion kerrii</i> Craib (Euphorbiaceae)	21
<i>Gmelina arborea</i> Roxb. (Verbenaceae)	2, 6, 13, 15
<i>Heynea trijuga</i> Roxb. ex Sims (Meliaceae)	2, 3, 8, 10, 20
<i>Hovenia dulcis</i> Thunb. (Rhamnaceae)	2, 7, 15
<i>Macaranga denticulata</i> (Bl.) M.-A. (Euphorbiaceae)	9, 10, 16, 20
<i>Machilus bombycina</i> King ex Hk.f. (Lauraceae)	2, 10, 16, 20
<i>Melia toosendan</i> Sieb. and Zuc. (Meliaceae)	2, 9, 20
<i>Michelia baillonii</i> Pierre (Magnoliaceae)	16, 17
<i>Nyssa javanica</i> (Bl.) Wang. (Nyssaceae)	6, 15, 20
<i>Prunus cerasoides</i> D. Don (Rosaceae)	7, 10, 13, 15, 16
<i>Rhus rhesoides</i> Craib (Anacardiaceae)	2, 6, 13, 16
<i>Sapindus rarak</i> DC. (Sapindaceae)	2, 20
<i>Sarcosperma arboreum</i> Bth. (Sapotaceae)	10, 11, 20
<i>Spondias axillaris</i> Roxb. (Anacardiaceae)	15

* Numbers in column refer to the codes of AM species in Table 1.

เอกสารตีพิมพ์

Title:	Shifting cultivation system and crop symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi
Authors:	Wongmo, J., Dell, B., Lumyong, S., Rerkasem, B.
Journal:	Chiang Mai Universtiy journal of natural sciences
Published :	Chiang Mai University
ISSN:	1685-1994
Issue:	Volume 7(2),2008
Page:	269-277

Shifting Cultivation System and Crop Symbiosis with Arbuscular Mycorrhizal Fungi

Jumnian Wongmo^{1*}, Bernard Dell³, Saisamorn Lumyong²
and Benjavan Rerkasem¹

¹Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

³School of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Sustainability, Environmental and Life Sciences, Murdoch University, Perth 6150, Australia

*Corresponding author: E-mail: g4668008@cmu.edu

ABSTRACT

*Farmers of the Karen ethnic group who live in Huai Tee Cha village, Mae Hong Son province in northern Thailand, still practice the rotational shifting cultivation or swidden agriculture system for food and some cash crops. This study investigated the association of upland rice (*Oryza sativa* cv. Bue Bang), other food crops [Job's tears (*Coix lachryma-jobi*), corn (*Zea mays*), sesame (*Sesamum indicum*) and sorghum (*Sorghum bicolor*)] and pada (*Macaranga denticulata*) with AM fungi in farmers' fields. Soils in the farmers' fields were mildly acidic to neutral (pH 5.2 to 7.0) and showed diversity in P status (6.8-271 mg kg⁻¹ soil, Bray II) but not in N (0.29-0.35% total N) or K (103-130 mg kg⁻¹). The roots of all plants investigated were colonized by AM fungi with upland rice and corn the most infected (≥ 90%), followed by Job's tears (75%), then sorghum (50%) and sesame (45%). Rhizosphere spore density ranged from 160 spores 100 g⁻¹ soil for pada and sorghum, to 120 for sesame and half of this in Job's tears, corn and upland rice.*

This study suggests that swidden crops in northern Thailand have a strong relationship with indigenous AM fungi.

Key words: Arbuscular mycorrhizal fungi, Shifting cultivation system, Swidden crops

INTRODUCTION

Karen is the largest of the minority groups living in the mountainous areas of northern Thailand. Karen farmers in Huai Tee Cha village, Sob Moei district, Mae Hong Son province, located at 19° 78' N, 93° 84' E, 700 MASL, manage fields ranging in altitude from 600 to 900 m with steep slopes (Rerkasem and Rerkasem, 1994). These people have lived in this neighborhood for more than 200 years. Crop

production in this area is generally referred to as rotational shifting cultivation. It involves clearing land for crop production by slashing and burning the forest. After one year of cropping, the field is left in fallow for several years, and then cleared and cropped again when the rotation cycle is completed. The Karen farmers at Huai Tee Cha village grow over 50 crops including upland rice (the major staple crop), maize, sorghum, sesame, cowpea, Job's tears, vegetables, some cash crops (passion fruit, coffee, chili, etc.) and other traditional crops in their swidden fields. Most soils in this region are reddish clay loams (Yimyam et al., 2003) and the climate is tropical monsoon with wet, cool and hot seasons. The shifting cultivation cycle at Huai Tee Cha village has been reduced from 10-15 to 7 years. In spite of this, farmers appear to have been able to maintain rice yields by managing their short fallow with *Macaranga denticulata* (local name is pada), one of the pioneer tree species in the area (Rerkasem et al., 2002; Yimyam et al., 2003). The successful management of this local fallow species by farmers is evident by the higher grain yield and grain N content in upland rice grown after dense pada stands (Yimyam et al., 2003). Pot trials have shown that pada is highly dependent on arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in Huai Tee Cha field soil (Youpensuk, 2004). However, it is unknown whether these AM fungi also directly benefit the food crops and other crops in the farmers' fields. This field study was undertaken to provide baseline data on AM fungi and crops in Huai Tee Cha fields.

MATERIALS AND METHODS

Soil properties, plant sampling and spore density

In the 2005 cropping year, at the end of the hot season, about 2 months after upland rice had been sown, when the crop was approximately 20 cm high, 34 soil samples (0-15 cm depth) were collected by randomly coring (4.5 cm diameter and 15 cm deep) 3 farmers' fields (Kayo, Takae and Murkur) for determining soil properties [pH (water, 1:1); Bray II phosphorus (Wanatabe and Olsen, 1962); Kjeldahl nitrogen (Jackson, 1967); and extractable potassium (1 M NH_4OAc , pH7)] and for spore density assessment. Fine root samples from the root zone of five common upland crops, grown after slashing and burning the forest [Job's tears (*Coix lachryma-jobi* L.), corn (*Zea mays* L.), sesame (*Sesamum indicum* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and upland rice cv. Bue Bang (*Oryza sativa* L.)] and seedlings of one fallow-enriching tree, pada (*Macaranga denticulata* (Bl.) Muell. Arg) were obtained by digging part of the root systems (15 cm depth; 10 cm from the base) of three plants species⁻¹ from each farmer's field. Roots and soils were transported to the laboratory for determining root colonization and examination of spore density. Youngest fully-expanded leaf (YFEL) samples of each crop were taken from the farmers' fields to the laboratory and were dried at 75°C for 48 hours and then analysed: N by the Kjeldahl method (Jackson, 1967); P by dry ashing followed by the molybdovanado phosphorus acid method (Murphy and Riley, 1962) and K by dry ashing and atomic absorption spectrophotometry.

Arbuscular mycorrhizal fungi assessment

a) Determination of arbuscular mycorrhizal colonization

The root system was separated from the soil, washed over a 106 μm mesh sieve, then subsampled. Roots in the subsample were cut into pieces 1-2 cm in length, cleared in 10% KOH at 121°C, rinsed with water on a sieve and stained with 0.05% trypan blue in lactoglycerol at 121°C (Brundrett et al., 1996). Thirty root pieces were taken at random from each sample, mounted on glass slides and AM colonization determined, using the gridline intersect method (McGonigle et al., 1990) under a compound Olympus microscope, model CX41RF.

b) Determination of arbuscular mycorrhizal spore density

Spores of AM fungi in 50 g soil were obtained by wet sieving through 710, 250, 106 and 53 μm mesh sieves. The 250, 106 and 53 μm fractions were centrifuged for 5 minutes at 2000 r min^{-1} to remove floating debris, the spores were resuspended in 50% sucrose with vigorous shaking and centrifuged for 1 minute at 2000 r min^{-1} . The spores were washed with water, transferred to filter paper with gridlines and counted under a stereomicroscope (Brundrett et al., 1996).

Effect of soil profile on spore density

Soil pits were dug at random locations at high, middle and low slope positions in Kayo fields. Soil samples were taken at 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40 and 40-50 cm depth and spores were obtained by wet sieving (see above).

Yield and crop use

Grain yield and crop use data were obtained from farmer interviews after they finished crop harvesting.

Data analysis

Data are presented as means and standard errors (S.E.), rice yield of each farmer was explored as standard deviation (S.D.).

RESULTS

Soil properties

Soil pH_{water} in the farmers' fields was mildly acidic to neutral, ranging from 5.2 to 7.0 and soils varied considerably in their Bray II P status, ranging from 6.8 to 271 mg kg^{-1} soil. There was a wide range in the soil P among farmers' fields: it ranged from 53.5-271.0, 6.8-65.3 and 12.4-27.8 mg kg^{-1} soil in the fields of Takae, Kayo and Murkur, respectively. By contrast, the levels of N and K laid within a narrow range, 0.29-0.35% for N and 103-130 mg kg^{-1} for K (Table 1).

Leaf nutrient concentrations

Leaf nitrogen (N) concentrations were 2.10 to 2.46 %, P concentrations were 0.18 to 0.33 % and K concentrations were 1.83 to 8.44 %. There was a narrow range in N concentration for all crops sampled whereas the P concentration was lower in

upland rice and pada (0.18, 0.20%) than in corn or Job's tears (0.33, 0.30%), respectively. Sesame and sorghum had intermediate foliar P concentrations. By contrast, corn and upland rice had higher K concentrations (6.74 and 8.44 %, respectively) than the other crop species (pada, Job's tears, sesame and sorghum: 2.08, 1.83, 3.05 and 2.08 %, respectively) (Figure 1).

Spore number with soil depth

Abundance of AM spores varied with depth with most concentrated in the 0-20 cm part of the profile. The highest spore density was at 5-10 cm [225 spores 100 g⁻¹ soil], followed by 0-5 and 15-20 cm [36 and 27 spores 100 g⁻¹ soil, respectively]. Spore numbers declined in soil deeper than 20 cm. Spore density differed with position in the landscape. Higher spore numbers occurred at the upper slope with 758 spores 100 g⁻¹ soil than at the middle and low slopes, 109 and 105 spores 100 g⁻¹ soil, respectively (Table 2).

Root colonization and spore density

The roots of all plants sampled were infected with AM fungi. The extent of root colonization was highest in upland rice, corn and pada (90-95%), followed by Job's tears (75%), then sorghum (50%) and was lowest in sesame (45%). Rhizosphere spore density was about 160 spores 100 g⁻¹ soil for pada and sorghum, 120 spores 100 g⁻¹ soil for sesame and half of this in Job's tears, corn and upland rice (Table 3).

Crop yield and usage

The dominant crop in the field area was upland rice and other swidden crops were sown as intercrop with rice in the main fields. Rice and sorghum were harvested at grain maturity and used for food and ceremonies. Some corn was harvested for eating at the green ear stage and the remainder harvested dry for animal feed. Seeds of Job's tears were collected for ornamental decoration of clothes. Job's tears and sorghum were also used for cooking by mixing with rice and for animal feed (Table 4). However, in this cropping year, the farmers left the sorghum in the field for birds as they believe that birds will eat sorghum in preference to eating rice. All farmers keep swidden crop seeds for growing the next crop. Rice yields from the fields of Kayo, Murkur and Takae were 555, 360 and 200 kg rai⁻¹ or 3.47, 2.25 and 1.25 ton ha⁻¹, respectively (Figure 2).

Table 1. Properties of the field soils at Huai Tee Cha village.

<i>Soil property^a</i>	
Texture	Sandy loam
pH (water)	5.2 – 7.0 (6.2)
Bray II P (mg kg ⁻¹)	6.8 – 271 (81.9)
N (%)	0.29 – 0.35 (0.31)
K (mg kg ⁻¹)	103 – 130 (122)

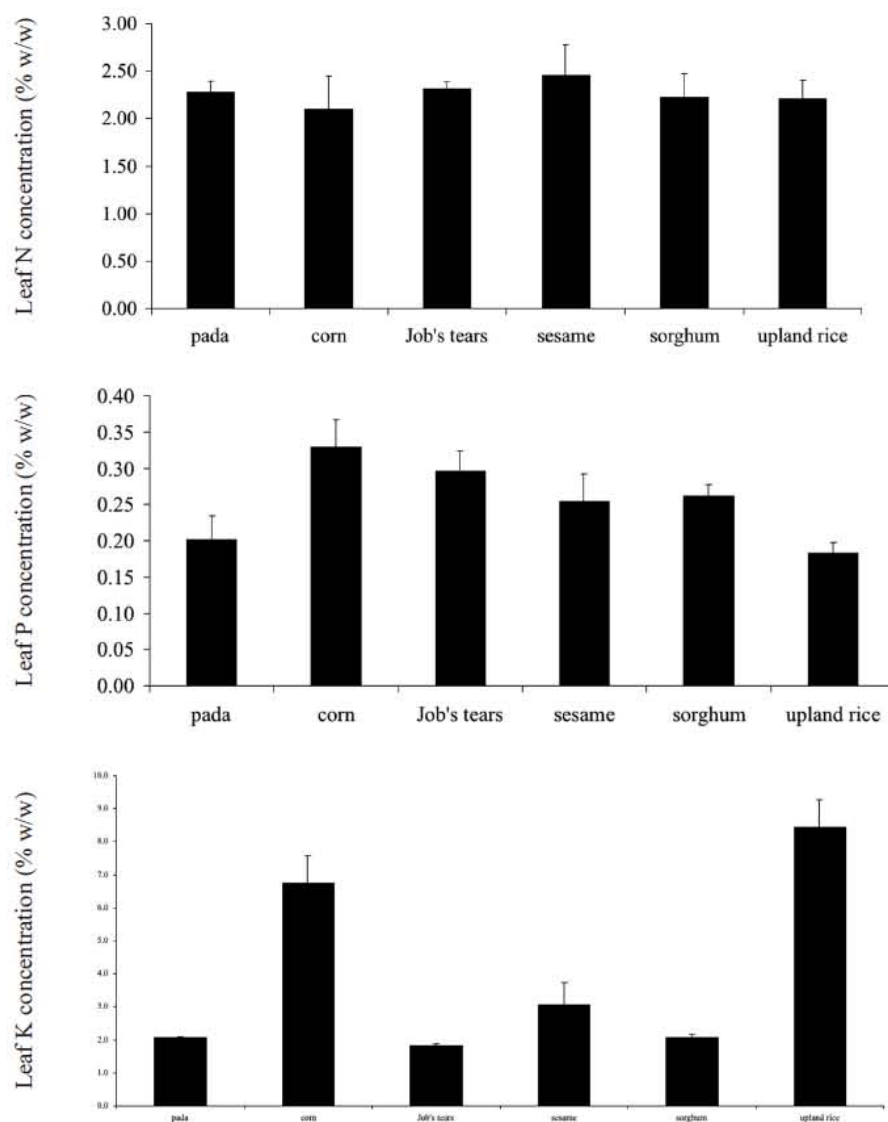
^a Values are the range with the mean in brackets**Figure 1.** Foliar nutrient concentrations (N, P, K) in pada and swidden crops at Huai Tee Cha fields (vertical bar above each column represents one S.E.).

Table 2. Spore density of AM fungi in three soil profiles in Huai Tee Cha fields.

Soil depth (cm)	Spore numbers 100 g ⁻¹ soil				
	Upper slope	Mid slope	Lower slope	Average	S.E.
0-5	30	24	54	36	9.1
5-10	650	17	9	225	212.4
10-15	10	10	14	11	1.4
15-20	46	15	19	27	9.7
20-30	15	9	4	9	3.1
30-40	1	18	4	8	5.2
40-50	5	16	1	8	4.4
Total spore	758	109	105		
CV	221	32	121		

Table 3. Root colonization by AM fungi and spore density of pada and five swidden crops in farmers' fields at Huai Tee Cha village.

Plant species	Root colonization (%)	Spore numbers 100 g ⁻¹ soil
Pada	95 ± 2.1	163.9 ± 49.0
Corn	90 ± 2.8	64.4 ± 12.6
Job's tears	75 ± 10.2	82.8 ± 13.9
Sesame	46 ± 14.5	122.2 ± 40.3
Sorghum	50 ± 8.1	151.7 ± 60.8
Upland rice	95 ± 1.8	63.9 ± 11.5

values are mean ± S.E.

Table 4. The use of swidden crop seed in Huai Tee Cha village.

Common name or local name	Scientific name	Main use			
		F1	F2	Or	SC
Job's tears	<i>Coix lachryma-jobi</i> L.	*	*	*	
Glutinous corn	<i>Zea mays</i> L.	*	*		
Sorghum	<i>Sorghum bicolor</i> L.	*	*		
Rice	<i>Oryza sativa</i> L.	*			*
White/black seed sesame	<i>Sesame indicum</i> L.	*			*

Sources: household interview in 2005 (after crop harvests)

F1=Food, F2=Animal feed, Or=Ornamental, SC=Spirit ceremony

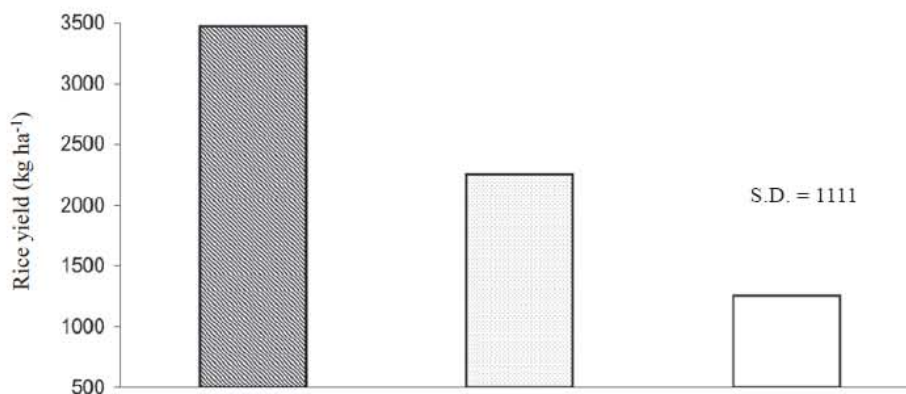


Figure 2. Rice yield (kg ha⁻¹) of Kayo, Murkur and Takae fields at Huai Tee Cha village in cropping year 2005.

DISCUSSION

Available soil P as measured in samples taken from Huai Tee Cha fields in 2005 were higher (average 81.9 mg kg⁻¹ soil) and wide-ranging (6.8-271 mg kg⁻¹ soil), compared to an earlier study of Yimyam et al., (2003) who reported 2-4 mg kg⁻¹ soil. Yimyam sampled fields before burning and 30 days after sowing rice in 2000. The differences in soil P measured in the two studies may be due to location or crop rotation. Because the fields are used once and then returned to forest succession, different fields were sampled in these two studies. The fields sampled by Yimyam were also more acidic than those used in the present study. The rice fields of Takae were located near a valley floor that is the lowest point of the village's land use area, so the source of high P accumulation in these fields may have resulted from leaching by rain from fields higher up. Another factor likely to influence the soil P reserves is the distribution of pada trees in the fields before the cropping period. Yimyam (2006) found that the distribution of pada between shifting cultivation fields varied greatly, in 2000 was mostly dense whereas in 2003 was sparse, so the distribution of pada may have been dense in 1998, resulting in very high soil fertilities.

The percentage root colonization by AM fungi was lowest in sorghum (50%) and highest in pada and upland rice (95%). In a previous study at the same village, Youpensuk et al., (2004) reported that 81% of the fine roots of pada were colonised by AM fungi, and the spore density in pada rhizosphere was four times more than what is found in this study. These differences can be attributed to sampling time and variation between mountain slopes (the fields were different in the two studies).

Upland rice yields varied among farmers' fields, Kayo had the higher rice yield compared to Murkur and Takae. Rice yield of Takae was lowest although this soil had high P levels. The farmers in Huai Tee Cha village grow both glutinous and non-glutinous rice, and use 3-5 varieties each, depending on the conditions

of the field and their preference. Rice yield of farmers was estimated for the total yield, and some of the difference between seed yield of each farmer may be due to differences in rice variety.

Another factor affecting yield may be weed control. The common practice for weed control is by hand, and is normally done three times during the entire cropping phase (Yimyam, 2006). Hence, farmers who are able to control weeds on time may achieve higher crop yield than farmers who have poorer weed control. Soil analysis revealed that the fields varied considerably in available phosphorus. It is not known whether the density of spores or the extent of root colonization by AM fungi varies with soil fertility within a field, and this is an area where further work is needed.

CONCLUSION

Although the addition of fertilizer P is probably a simple way for improving crop productivity on soils low in available P, most farmers in this area have severe poverty and have weak purchasing power to buy artificial fertilizers. Fortunately, the farmers in Huai Tee Cha village have tacit knowledge of using pada as a fallow-enriching tree species in their rotational shifting cultivation system as it helps benefit their crops. As this tree has high dependence on AM fungi and there is high diversity of AM fungi associated with its root system, it is possible that these fungi may also be contributing to nutrient uptake by the swidden crops, thus assisting farmers to increase their yields and decrease inorganic fertilizer inputs. This small field study has shown that swidden crops are also colonized by AM fungi. However, the dependence of swidden crops on AM fungi is yet to be determined.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the farmers at Huai Tee Cha village, Mae Hong Son province for access to their fields, for providing seeds of their swidden crops and for generously sharing their knowledge. Dr. Narit Yimyam of the Highland Coffee Research and Development Centre, Chiang Mai University, kindly facilitated work in the upland fields. Thanks also to Dr. Sittichai Lordkaew and Mrs. Kanjanaporn Lordkaew for plant and soil analysis and our colleagues at CMUPN*lab* for fruitful discussion. The authors acknowledge funding support from the Collaborative Crop Research Programme of the McKnight Foundation, Thailand Research Fund and the United Nations University for this research.

REFERENCES

- Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove, and N. Malajczuk. 1996. Working with mycorrhizas in forest and agriculture. ACIAR Monograph. Canberra, Australia.
- Jackson, H. 1967. Soil chemistry analysis. Prentice-Hall of India Private Limited. New Delhi.

- McGonigle, T.P., M.H. Miller, D.G. Evans, G.L. Fairchild, and J.A. Swan. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of root by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495-501.
- Murphy, J., and J.P. Riley. 1962. A modified single solution for determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31-36.
- Rerkasem, K., and B. Rerkasem. 1994. Shifting cultivation in Thailand: Its current situation and dynamics in the context of highland development. IIED Forest and Land Use Series No. 4. London: International Institute of Environment and Development.
- Rerkasem, K., N. Yimyam, C. Kosamphan, C. Thong-Ngam, and B. Rerkasem. 2002. Agrobiodiversity lessons in mountain land management. *Mountain Research Development* 22: 4-9.
- Wanatabe, F.S., and S.R. Olsen. 1962. Colorimetric determination of phosphorus in water extracts of soil. *Soil Science* 93: 183-188.
- Yimyam, N., K. Rerkasem, and B. Rerkasem. 2003. Fallow enrichment with pada (*Macaranga denticulata* (Bl.) Muell. Arg.) trees in rotational shifting cultivation in northern Thailand. *Agroforestry Systems* 57: 79-86.
- Yimyam, N. 2006. Fallow regeneration and upland rice yield variation in a system of shifting cultivation with pada (*Macaranga denticulata* (Bl.) Muell. Arg.) as the fallow-enriching species in northern Thailand. Ph.D. thesis. Chiang Mai University, Thailand.
- Youpensuk, S. 2004. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in mildew mahang (*Macaranga denticulata* Muell. Arg.) and their effects on the host plant. Ph.D. thesis. Chiang Mai University, Thailand.
- Youpensuk, S., S. Lumyong, B. Dell, and B. Rerkasem. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of *Macaranga denticulata* Muell. Arg., and their effect on the host plant. *Agroforestry Systems* 60: 239-246.

เอกสารตีพิมพ์

Title:	The mycorrhizal status of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi of physic nut (<i>Jatropha curcas</i> L.) in Thailand
Authors:	Charoenpakdee S., Phosri C., Dell B. and Lumyong S.
Journal:	Mycosphere
Published :	Online
ISSN:	2077-701
Issue:	Volume 1
Page:	in press

The mycorrhizal status of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in Thailand

Charoenpakdee S^{1,2}, Phosri C², Dell B³ and Lumyong S^{1*}

¹Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200 Thailand

²Biology Program, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok 65000, Thailand

³Department of Plant Science, School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Western Australia, 6150 Australia

Charoenpakdee S, Cherdchai P, Dell B, Lumyong S (2010). The mycorrhizal status of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in Thailand. *Mycosphere* 1, 1–10.

The dependence of physic nut (*Jatropha curcas* L.) on beneficial soil fungi for growth promotion is less to know. Therefore, the spore density and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) associated with physic nut was assessed by extracting spores from physic nut plantations from 10 sites representing 6 provinces in Northern and North eastern of Thailand. Sixty hundred and ninety nine AMF spores were obtained using the wet sieving and sucrose gradient centrifugation methods. AMF colonization was also examined by staining root samples in trypan blue and observed under compound microscope. The following 34 morphospecies of AMF were identified: *Acaulospora* (16 species), *Entrophospora* (1 species), *Gigaspora* (2 species), *Glomus* (10 species) and *Scutellospora* (5 species). The diversity index ranged from 0.28 to 0.86 (average 0.64) and the species richness of AMF varied from 3 to 11 (average 6.2). Root colonization was exceeding 90% suggesting that physic nut is highly dependent on AMF.

Key words –ecology–species diversity–spore density–taxonomy

Article Information rest of article Times new roman 12 pt

Received 10 May 2010

Accepted

Published online

*Corresponding author: Saisamorn Lumyong – e-mail – scboi009@chiangmai.ac.th, ansupattra@gmail.com

Introduction

Physic nut (*Jatropha curcas* L.) is a multipurpose plant and is grown in many parts of the world for example Brazil, India, Mexico, Nicaragua and Thailand (Foidl et al. 1996, Heller 1996, Prueksakorn et al. 2006, David et al.

2009). It is a widely used species for traditional medicine, hedging fences and preventing soil erosion. The specie is originated from Central America. It belongs to the botanical family Euphorbiaceae, which has 300 genera and around 7,500 species. Most species

are tropical trees and shrubs which grow in the lower storey of forests. Many members of this family are known to be dependent on AMF, for example species of *Euphorbia*, *Glochidion*, *Hevea* and *Manihot* (Tawaraya et al. 2003, Zhao & Zhiwei 2007, Straker et al. 2010). Currently, physic nut is becoming an increasingly attractive plant for producing biofuels. Yield estimated currently for physic nut is 1,300 litre of oil per hectare behind oil palm but higher than rapeseed (Anonymous 2007). As diesel fuel prices continue to escalate, opportunities will open for a conversion from crude-oil into bio-diesel based fuel consumption. Several countries, domestic organizations and international have proposed greatly increasing the area under physic nut cultivation for oil production. It is therefore one of the most selected crops in commercial agriculture.

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are abundant and ubiquitous in almost all natural terrestrial communities and form obligate symbiotic associations with 80% of vascular plants (Harley & Smith 1983, Smith & Read 1997). It is apparent that these fungal symbionts became an integral component of plant communities in both natural and agricultural ecosystems. They play a vital role in sustaining plant diversity, increasing plant productivity and maintaining ecosystem processes by promoting plant fitness through a range of mechanisms including protecting the host from pathogens, improving soil structure, and enhancing water and nutrient uptake (Borkowska 2002, Jansa et al. 2002, Kapoor et al. 2004, Pasqualini et al. 2007). Several authors have documented that associations

between agronomic plants species and AMF are likely to increase the efficiency of fertilizer use and plant growth (Schreiner 2007, Tewari 2007, Porras-Soriano et al. 2009).

It has been reported that members of the plant family are highly dependent on AMF (Chen et al. 2005). However, there is limited knowledge of AMF status in the rhizosphere of physic nut. This study was undertaken to determine the diversity of AMF in physic nut plantings in Northern and North eastern of Thailand. We hypothesized that the mycorrhizal status and species richness differ from site to site. Furthermore, soil conditions and plantation age are likely to play a key role for determining species diversity on root tips of physic nut.

Methods

Sample collection

A total of 10 physic nut plantation sites in Chiang Rai (CR1, CR2), Chiang Mai (CM1, CM2, CM3 and CM4), Loei (LO1), Lumphun (LP1), Khon Kaen (KK1) and Nong Kai (NK1) province were selected as study site for AMF diversity (Table 1, Fig.1). Ninety five soil samples were collected from beneath physic nut in the planting row during October-December 2007. At each of the field sites, 4 soil core samples per tree were taken at a depth of 5-30 cm using a soil corer. Approximately 1 kg total of rhizosphere soil from each site was collected. Soil samples were carefully grounded, air dried and mixed into composite samples. Each composite sample representing one plot was a mixture of four soil core samples. The samples were kept in an ice-box and

transport by car to a laboratory. All soil samples were kept in a cold room and processed within one month. The analyses of soil samples included AMF spore isolation and enumeration, identification of species; and determination of the following chemical soil parameters: soil humidity (Lambe & Whitman 1969), pH by water extraction (Thomas 1996), organic matter using wet oxidation (Nelson & Sommers 1996), available phosphorus (P) using the Olsen method (Kuo 1996), extractable potassium (K) using the molybdenum blue method and stannous chloride as the reducing agent and ammonium acetate (NH_4OAc) as extractant (Helmer & Sparkers 1996, Helrich 1990), and total soil nitrogen (N) content using the Kjeldahl method (Bremner 1996). Soil nutrient analysis (Table 2) was conducted by the Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. Roots from each composite sample were removed from the soil by washing and fixed in 70% ethanol.

AMF spore isolation and identification

AMF spores occurring in the rhizosphere soil samples were extracted by wet sieving and sucrose density gradient centrifugation (Brundrett et al. 1996) methods. 100 g of each soil sample was suspended in 500 ml of water and stirred for 10 mins. Sieve sizes ranging from 250 μm , 106 μm and 45 μm , were used for spore collection. The spores retained on each sieve size were filtered onto filter paper and subsequently examined under a stereomicroscope (Olympus CX31) at a magnification of up to 400X and

identified based on spore morphology. Each spore morphotype was mounted in polyvinyl-lacto-glycerol (PVLG) and PVLG mixed with Meltzer's reagent in 1:1 (v/v) ratio (Morton 1988). Identification was based on current species descriptions and identification manuals (International Culture Collection of Vesicular and Arbuscular Endomycorrhizal Fungi [http://invam.caf.wvu.edu/Myc_Info/Taxonomy/species.htm]).

Spore density (SD) is the number of spores in 100 g soil. Relative abundance (RA) was defined as the percentage of spore numbers of a species divided by a total of spore observation (Dandan & Zhiwei 2007). The frequency isolation of each AMF species was calculated by the percentage of the number of the samples in which the species or genus observed per total samples. The dominant AMF species according to relative abundance ($\text{RA} > 6\%$) and spore density of in 100 g soil (spore density higher than 40 spores) and species richness were determined in each sampling site.

Mycorrhizal root colonization assessment

Roots fixed in 70% ethanol were cleared in 10% (w/v) KOH solution and autoclaved at 121°C and 15 lb/inch^2 for 15 minutes. Then, roots were washed with distilled water to remove KOH, stained with 0.05% trypan blue dye (C.I. 23850) and reautoclaved. Thirty stained roots (each about 1 cm in length) were assessed for colonization using the intercept method under a compound Olympus CX31 microscope (Brundrett et al. 1996).

เอกสารตีพิมพ์

Title:	Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in forest restoration area of Doi Suthep-Pui national park, northern Thailand
Authors:	Patipan Nandakwang, Stephen Elliott, Saisamorn Lumyong
Journal:	Journal of Microscopy Society of Thailand
Published :	Microscopy Society of Thailand
ISSN:	0857-5258
Issue:	Volume 22,2008
Page:	60-64

Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Forest Restoration Area of Doi Suthep-Pui National Park, Northern Thailand

Patipan Nandakwang^{1*}, Stephen Elliott² and Saisamorn Lumyong^{2*}

¹Applied Biology Programme, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanuloke, 65000, Thailand

²Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand

e-mail: patipan263@hotmail.com; scboi009@chiangmai.ac.th

Abstract

Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungal diversity was surveyed in the forest restoration area of Doi Suthep-Pui National Park, northern Thailand. Twenty four indigenous tree species, used for forest restoration in a degraded watershed area were examined. Rhizosphere soil samples were collected and AM spores were counted and identified morphologically. AM spores were found in the rhizosphere soils of all tree species. Twenty one AM species were identified: *Acaulospora* (6 species), *Glomus* (12 species) and *Scutellospora* (3 species). AM fungi belonging to the genera *Glomus* and *Acaulospora* were dominant. Abundant species present were *Acaulospora elegans*, *Glomus multicaule* and *Scutellospora pellucida*. These results showed that all 24 indigenous tree species were associated with AM fungi and some AM species had a broad host range.

Background

The tropical forests of Doi Suthep-Pui National Park are one of the most important watershed areas which composed of a number of indigenous tree species. Deforestation within the national park has had adverse consequences on biodiversity and environmental quality. One method of forest restoration, which involves planting mixtures of several indigenous tree species, has been used to counteract this problem (Goosem and Tucker, 1995; FORRU, 2006). Many indigenous species were selected and tested in the experimental plot, established in the north of national park (Elliott *et al.*, 2003). AM fungi are one of the beneficial soil microorganisms that play a crucial role in the mineral nutrition of forest trees (Koide and Mosse, 2004). Information on the capacity of indigenous tree species in association with AM fungi is very important to forest restoration. The purpose of this study was to obtain information on the diversity of AM fungi associated with indigenous tree species in the forest restoration plot.

Materials and Methods

Among the planted tree species in forest restoration plot, 24 potential indigenous species were selected for study. All tree species are reported to be multipurpose and suitable for acceleration of the forest regeneration. Rhizosphere soil samples (about 500 g) of each indigenous species were collected and stored at 4°C until analyzed. AM spores were extracted from 100 g air-dried soil samples by wet-sieving and 50% sucrose centrifugation (Brundrett *et al.*, 1996). Spores were recovered by filtering through a 53 µm sieve onto filter paper. The intact spores on filter

paper were counted under a stereomicroscope (Olympus SZ40). Spores were mounted on microscopic slides in polyvinyl lactic acid (PVA), with or without Melzer's reagent (Morton, 1988) and identified according to morphological characteristics of the originally published species descriptions under a light microscope (Olympus CH30). Light microscopic photographs were taken under an Olympus BX61.

Results and Discussion

The results of our study on the AM fungal diversity in the forest restoration area of Doi Suthep-Pui National Park showed that all 24 indigenous tree species are associated with AM fungi. Spores of AM fungi were found in the rhizosphere soils of all individual tree species. This reflects the mycotrophic nature of the plant species studied and the ability of AM fungi in soils to associate a wide range of host species. It has been reported that many tree species are highly associated with AM fungi (Janos, 1980; Onguene and Kuyper, 2001). Twenty one AM species were identified based on morphological characteristics of their spores according to published descriptions (Table 1). The diversity of AM species was varied among the different tree species (Table 2). Most of the isolated species belonged to the family *Glomaceae*, all of which were *Glomus* (12 species, 49.3%). Abundant species present was *G. multicaule* (14.2%) (figure 1). Six species were in the family *Acaulosporaceae*, all of which were in the genus *Acaulospora* (43.6%). Abundant species present was *A. elegans* (39.2%) (figure 2). Three species were members of the family

Gigasporaceae and belonged to the genus *Scutellospora* (7.1%). Abundant species present was *S. pellucida* (5.5%) (figure 3). Species in the genera *Archaeospora*, *Paraglomus*, *Entrophospora* and *Gigaspora* were not found. AM fungi belonged to the genera *Glomus* and *Acaulospora* were dominant. This fact must be related to their sporogenous characteristics, i.e. *Glomus* and *Acaulospora* species usually take a short time to produce small spores, compared with the large spores of *Gigaspora* and *Scutellospora* species in the same environment (Hepper, 1984; Bever *et al.*, 1996). *A. elegans*, *G. multicaule* and *S. pellucida* were the most commonly encountered species. This suggests that these species have a widespread and broad host range.

Conclusion

In the forest restoration area of Doi Suthep-Pui National Park, all surveyed indigenous tree species were associated with AM fungi. The AM fungal diversity in the plant rhizospheres was variable among the different tree species. Twenty one AM species were identified as 3 genera and 12 species of *Glomus*, 6 species of *Acaulospora* and 3 species of *Scutellospora*. *Glomus* and *Acaulospora* were the dominant genera. The present study obtains the information on the AM association of 24 potential indigenous trees used to restore tropical forest of Doi Suthep-Pui National Park.

Acknowledgment

This research was partially supported by Pibulsongkram Rajabhat University. We thank Mr. Cherdasak Kuarak and volunteers for helping collect the samples.

References

1. Bever JD, Morton JB, Antonovics J, Schultz PA. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *J. Ecol* 1996, 84: 71-82.
2. Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. *ACIAR Monograph* 32, *ACIAR, Canberra, Australia* 1996, pp: 374.
3. Elliott S, Navakitbumrung P, Kuarak C, Zangkum S, Anusarnsunthorn V, Blakesley D. Selecting framework tree species for restoring seasonally dry tropical forests in northern Thailand based on field performance. *For. Ecol. Manage* 2003, 184: 177-191.
4. FORRU. How to Plant a Forest: The Principles and Practice of Restoring Tropical Forests. *Forest Restoration Research Unit. 1st Edn., Biology Department, Science Faculty, Chiang Mai University, Thailand* 2006, pp: 200.
5. Goosem SP, Tucker NIJ. Repairing the Rainforest-Theory and Practice of Rainforest Re-establishment in North Queensland's Wet Tropics. *Wet Tropics Management Authority, Cairns* 1995, pp: 71.
6. Hepper CM. Isolation and Culture of VA Mycorrhizal (VAM) Fungi. In: *VA Mycorrhizae. Powell, C.L. and D.J. Bagyaraj (Eds.), CRC Press, Florida, USA* 1984, pp: 95-112.
7. Janos DP. Vesicular arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. *Ecology* 1980, 61: 151-162.
8. Koide RT, Mosse B. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 2004, 14: 145-163.
9. Morton JB. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 1988, 37: 267-324.
10. Onguene NA, Kuyper TW. Mycorrhizal associations in the rain forest of South Cameroon. *For. Ecol. Manage* 2001, 140: 277-287.

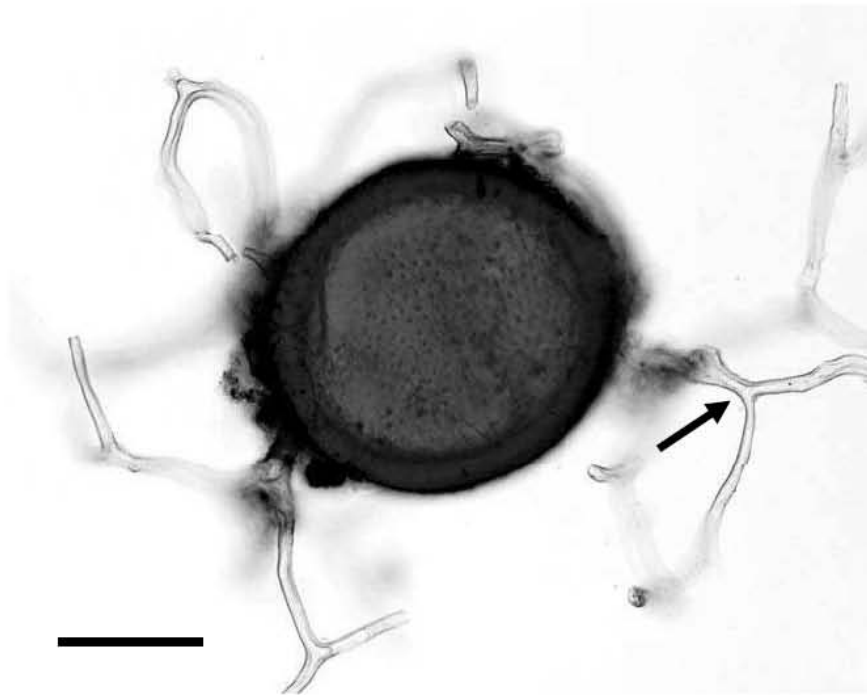


Fig. 1 *Glomus multicaulis*: Spore with multiple subtending hypha (arrow) and rounded projections on the surface, bar = 50 μ m.



Fig. 2 *Acaulospora elegans*: Cracked spore with sporiferous saccule (arrow) and crowded spines on the surface, bar = 50 μ m.

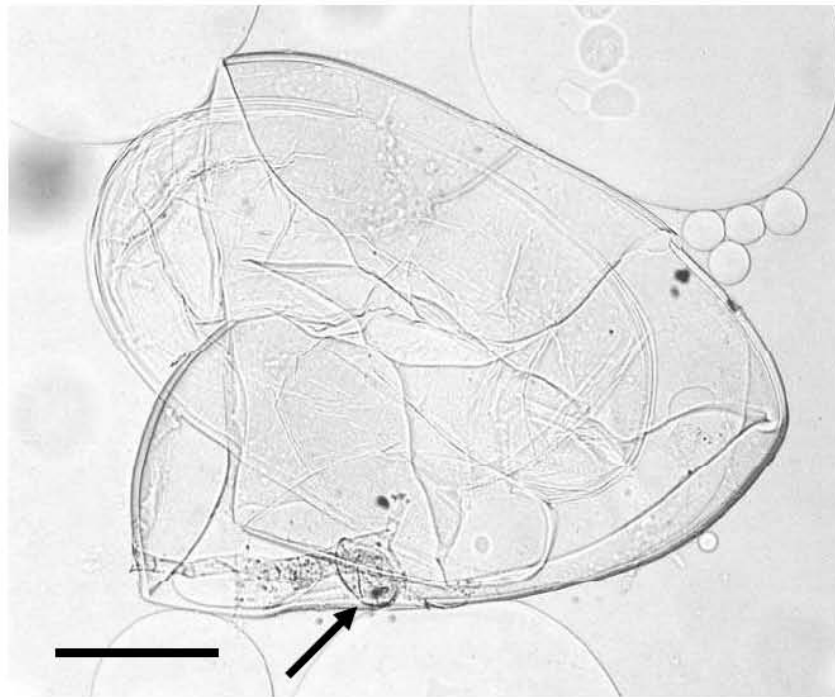


Fig. 3 *Scutellospora pellucida*: Cracked hyaline spore with hyaline bulbous subtending hypha, bar = 50 μ m.

Table 1 Diversity of AM fungi from the rhizosphere soils of 24 indigenous tree species in the forest restoration area of Doi Suthep-Pui National Park, northern Thailand.

Code of AM species	Genus	Species
<i>Acaulospora</i>		
1	<i>A. bireticulata</i>	Rothwell & Trappe
2	<i>A. elegans</i>	Trappe & Gerd.
3	<i>A. foveata</i>	Trappe & Janos
4	<i>A. laevis</i>	Gerd. & Trappe
5	<i>A. mellea</i>	Spain & Schenck
6	<i>A. scrobiculata</i>	Trappe
<i>Glomus</i>		
7	<i>G. aggregatum</i>	Schenck & Smith
8	<i>G. ambisporum</i>	Smith & Schenck
9	<i>G. clavisporum</i>	Trappe
10	<i>G. coremioides</i>	Berk. & Broome
11	<i>G. intraradices</i>	Schenck & Smith
12	<i>G. microaggregatum</i>	Koske, Gemma & Olexia
13	<i>G. microcarpus</i>	Iqbal & Bushra
14	<i>G. mosseae</i>	(Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe
15	<i>G. multicaule</i>	Gerd. & Bakshi
16	<i>G. rubiforme</i>	Gerd. & Trappe
17	<i>G. sinuosum</i>	Gerd. & Bakshi
18	<i>G. viscosum</i>	Nicol.
<i>Scutellospora</i>		
19	<i>S. gregaria</i>	(Schenck & Nicol.) Walker & Sanders
20	<i>S. heterogama</i>	Walker & Sanders
21	<i>S. pellucida</i>	(Nicol. & Schenck) Walker & Sanders

Table 2 Diversity of AM fungi found in the rhizospheres of 24 indigenous tree species in the forest restoration area of Doi Suthep-Pui National Park, northern Thailand.

Indigenous tree species	AM species*
<i>Acrocarpus fraxinifolius</i> Wight ex Arn. (Caesalpinoideae)	3, 4, 14, 15
<i>Balakata baccata</i> (Roxb.) Ess. (Euphorbiaceae)	12, 20
<i>Castanopsis acuminatissima</i> (Bl.) A. DC. (Fagaceae)	1, 15
<i>Erythrina subumbrans</i> (Hassk.) Merr. (Papilionoideae)	2, 7, 12, 19
<i>Ficus altissima</i> Bl. (Moraceae)	2, 6, 10
<i>Ficus benjamina</i> L. var. <i>benjamina</i> (Moraceae)	6, 19, 20
<i>Ficus glaberrima</i> Bl. var. <i>glaberrima</i> (Moraceae)	16
<i>Ficus hispida</i> L. f. var. <i>hispida</i> (Moraceae)	2, 5, 16, 17
<i>Ficus racemosa</i> L. var. <i>racemosa</i> (Moraceae)	2, 8, 14, 16, 18
<i>Ficus subulata</i> Bl. var. <i>subulata</i> (Moraceae)	2, 14, 16, 20
<i>Glochidion kerrii</i> Craib (Euphorbiaceae)	21
<i>Gmelina arborea</i> Roxb. (Verbenaceae)	2, 6, 13, 15
<i>Heynea trijuga</i> Roxb. ex Sims (Meliaceae)	2, 3, 8, 10, 20
 <i>Hovenia dulcis</i> Thunb. (Rhamnaceae)	 2, 7, 15
 <i>Macaranga denticulata</i> (Bl.) M.-A. (Euphorbiaceae)	 9, 10, 16, 20
<i>Machilus bombycina</i> King ex Hk.f. (Lauraceae)	2, 10, 16, 20
<i>Melia toosendan</i> Sieb. and Zuc. (Meliaceae)	2, 9, 20
<i>Michelia baillonii</i> Pierre (Magnoliaceae)	16, 17
<i>Nyssa javanica</i> (Bl.) Wang. (Nyssaceae)	6, 15, 20
<i>Prunus cerasoides</i> D. Don (Rosaceae)	7, 10, 13, 15, 16
<i>Rhus rhesoides</i> Craib (Anacardiaceae)	2, 6, 13, 16
<i>Sapindus rarak</i> DC. (Sapindaceae)	2, 20
<i>Sarcosperma arboreum</i> Bth. (Sapotaceae)	10, 11, 20
<i>Spondias axillaris</i> Roxb. (Anacardiaceae)	15

* Numbers in column refer to the codes of AM species in Table 1.

เอกสารตีพิมพ์

Title:	Shifting cultivation system and crop symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi
Authors:	Wongmo, J., Dell, B., Lumyong, S., Rerkasem, B.
Journal:	Chiang Mai Universtiy journal of natural sciences
Published :	Chiang Mai University
ISSN:	1685-1994
Issue:	Volume 7(2),2008
Page:	269-277

Shifting Cultivation System and Crop Symbiosis with Arbuscular Mycorrhizal Fungi

Jumnian Wongmo^{1*}, Bernard Dell³, Saisamorn Lumyong²
and Benjavan Rerkasem¹

¹Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

³School of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Sustainability, Environmental and Life Sciences, Murdoch University, Perth 6150, Australia

*Corresponding author: E-mail: g4668008@cmu.edu

ABSTRACT

*Farmers of the Karen ethnic group who live in Huai Tee Cha village, Mae Hong Son province in northern Thailand, still practice the rotational shifting cultivation or swidden agriculture system for food and some cash crops. This study investigated the association of upland rice (*Oryza sativa* cv. Bue Bang), other food crops [Job's tears (*Coix lachryma-jobi*), corn (*Zea mays*), sesame (*Sesamum indicum*) and sorghum (*Sorghum bicolor*)] and pada (*Macaranga denticulata*) with AM fungi in farmers' fields. Soils in the farmers' fields were mildly acidic to neutral (pH 5.2 to 7.0) and showed diversity in P status (6.8-271 mg kg⁻¹ soil, Bray II) but not in N (0.29-0.35% total N) or K (103-130 mg kg⁻¹). The roots of all plants investigated were colonized by AM fungi with upland rice and corn the most infected (≥ 90%), followed by Job's tears (75%), then sorghum (50%) and sesame (45%). Rhizosphere spore density ranged from 160 spores 100 g⁻¹ soil for pada and sorghum, to 120 for sesame and half of this in Job's tears, corn and upland rice.*

This study suggests that swidden crops in northern Thailand have a strong relationship with indigenous AM fungi.

Key words: Arbuscular mycorrhizal fungi, Shifting cultivation system, Swidden crops

INTRODUCTION

Karen is the largest of the minority groups living in the mountainous areas of northern Thailand. Karen farmers in Huai Tee Cha village, Sob Moei district, Mae Hong Son province, located at 19° 78' N, 93° 84' E, 700 MASL, manage fields ranging in altitude from 600 to 900 m with steep slopes (Rerkasem and Rerkasem, 1994). These people have lived in this neighborhood for more than 200 years. Crop

production in this area is generally referred to as rotational shifting cultivation. It involves clearing land for crop production by slashing and burning the forest. After one year of cropping, the field is left in fallow for several years, and then cleared and cropped again when the rotation cycle is completed. The Karen farmers at Huai Tee Cha village grow over 50 crops including upland rice (the major staple crop), maize, sorghum, sesame, cowpea, Job's tears, vegetables, some cash crops (passion fruit, coffee, chili, etc.) and other traditional crops in their swidden fields. Most soils in this region are reddish clay loams (Yimyam et al., 2003) and the climate is tropical monsoon with wet, cool and hot seasons. The shifting cultivation cycle at Huai Tee Cha village has been reduced from 10-15 to 7 years. In spite of this, farmers appear to have been able to maintain rice yields by managing their short fallow with *Macaranga denticulata* (local name is pada), one of the pioneer tree species in the area (Rerkasem et al., 2002; Yimyam et al., 2003). The successful management of this local fallow species by farmers is evident by the higher grain yield and grain N content in upland rice grown after dense pada stands (Yimyam et al., 2003). Pot trials have shown that pada is highly dependent on arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in Huai Tee Cha field soil (Youpensuk, 2004). However, it is unknown whether these AM fungi also directly benefit the food crops and other crops in the farmers' fields. This field study was undertaken to provide baseline data on AM fungi and crops in Huai Tee Cha fields.

MATERIALS AND METHODS

Soil properties, plant sampling and spore density

In the 2005 cropping year, at the end of the hot season, about 2 months after upland rice had been sown, when the crop was approximately 20 cm high, 34 soil samples (0-15 cm depth) were collected by randomly coring (4.5 cm diameter and 15 cm deep) 3 farmers' fields (Kayo, Takae and Murkur) for determining soil properties [pH (water, 1:1); Bray II phosphorus (Wanatabe and Olsen, 1962); Kjeldahl nitrogen (Jackson, 1967); and extractable potassium (1 M NH₄OAc, pH7)] and for spore density assessment. Fine root samples from the root zone of five common upland crops, grown after slashing and burning the forest [Job's tears (*Coix lachryma-jobi* L.), corn (*Zea mays* L.), sesame (*Sesamum indicum* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and upland rice cv. Bue Bang (*Oryza sativa* L.)] and seedlings of one fallow-enriching tree, pada (*Macaranga denticulata* (Bl.) Muell. Arg) were obtained by digging part of the root systems (15 cm depth; 10 cm from the base) of three plants species⁻¹ from each farmer's field. Roots and soils were transported to the laboratory for determining root colonization and examination of spore density. Youngest fully-expanded leaf (YFEL) samples of each crop were taken from the farmers' fields to the laboratory and were dried at 75°C for 48 hours and then analysed: N by the Kjeldahl method (Jackson, 1967); P by dry ashing followed by the molybdovanado phosphorus acid method (Murphy and Riley, 1962) and K by dry ashing and atomic absorption spectrophotometry.

Arbuscular mycorrhizal fungi assessment

a) Determination of arbuscular mycorrhizal colonization

The root system was separated from the soil, washed over a 106 μm mesh sieve, then subsampled. Roots in the subsample were cut into pieces 1-2 cm in length, cleared in 10% KOH at 121°C, rinsed with water on a sieve and stained with 0.05% trypan blue in lactoglycerol at 121°C (Brundrett et al., 1996). Thirty root pieces were taken at random from each sample, mounted on glass slides and AM colonization determined, using the gridline intersect method (McGonigle et al., 1990) under a compound Olympus microscope, model CX41RF.

b) Determination of arbuscular mycorrhizal spore density

Spores of AM fungi in 50 g soil were obtained by wet sieving through 710, 250, 106 and 53 μm mesh sieves. The 250, 106 and 53 μm fractions were centrifuged for 5 minutes at 2000 r min^{-1} to remove floating debris, the spores were resuspended in 50% sucrose with vigorous shaking and centrifuged for 1 minute at 2000 r min^{-1} . The spores were washed with water, transferred to filter paper with gridlines and counted under a stereomicroscope (Brundrett et al., 1996).

Effect of soil profile on spore density

Soil pits were dug at random locations at high, middle and low slope positions in Kayo fields. Soil samples were taken at 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40 and 40-50 cm depth and spores were obtained by wet sieving (see above).

Yield and crop use

Grain yield and crop use data were obtained from farmer interviews after they finished crop harvesting.

Data analysis

Data are presented as means and standard errors (S.E.), rice yield of each farmer was explored as standard deviation (S.D.).

RESULTS

Soil properties

Soil pH_{water} in the farmers' fields was mildly acidic to neutral, ranging from 5.2 to 7.0 and soils varied considerably in their Bray II P status, ranging from 6.8 to 271 mg kg^{-1} soil. There was a wide range in the soil P among farmers' fields: it ranged from 53.5-271.0, 6.8-65.3 and 12.4-27.8 mg kg^{-1} soil in the fields of Takae, Kayo and Murkur, respectively. By contrast, the levels of N and K laid within a narrow range, 0.29-0.35% for N and 103-130 mg kg^{-1} for K (Table 1).

Leaf nutrient concentrations

Leaf nitrogen (N) concentrations were 2.10 to 2.46 %, P concentrations were 0.18 to 0.33 % and K concentrations were 1.83 to 8.44 %. There was a narrow range in N concentration for all crops sampled whereas the P concentration was lower in

upland rice and pada (0.18, 0.20%) than in corn or Job's tears (0.33, 0.30%), respectively. Sesame and sorghum had intermediate foliar P concentrations. By contrast, corn and upland rice had higher K concentrations (6.74 and 8.44 %, respectively) than the other crop species (pada, Job's tears, sesame and sorghum: 2.08, 1.83, 3.05 and 2.08 %, respectively) (Figure 1).

Spore number with soil depth

Abundance of AM spores varied with depth with most concentrated in the 0-20 cm part of the profile. The highest spore density was at 5-10 cm [225 spores 100 g⁻¹ soil], followed by 0-5 and 15-20 cm [36 and 27 spores 100 g⁻¹ soil, respectively]. Spore numbers declined in soil deeper than 20 cm. Spore density differed with position in the landscape. Higher spore numbers occurred at the upper slope with 758 spores 100 g⁻¹ soil than at the middle and low slopes, 109 and 105 spores 100 g⁻¹ soil, respectively (Table 2).

Root colonization and spore density

The roots of all plants sampled were infected with AM fungi. The extent of root colonization was highest in upland rice, corn and pada (90-95%), followed by Job's tears (75%), then sorghum (50%) and was lowest in sesame (45%). Rhizosphere spore density was about 160 spores 100 g⁻¹ soil for pada and sorghum, 120 spores 100 g⁻¹ soil for sesame and half of this in Job's tears, corn and upland rice (Table 3).

Crop yield and usage

The dominant crop in the field area was upland rice and other swidden crops were sown as intercrop with rice in the main fields. Rice and sorghum were harvested at grain maturity and used for food and ceremonies. Some corn was harvested for eating at the green ear stage and the remainder harvested dry for animal feed. Seeds of Job's tears were collected for ornamental decoration of clothes. Job's tears and sorghum were also used for cooking by mixing with rice and for animal feed (Table 4). However, in this cropping year, the farmers left the sorghum in the field for birds as they believe that birds will eat sorghum in preference to eating rice. All farmers keep swidden crop seeds for growing the next crop. Rice yields from the fields of Kayo, Murkur and Takae were 555, 360 and 200 kg rai⁻¹ or 3.47, 2.25 and 1.25 ton ha⁻¹, respectively (Figure 2).

Table 1. Properties of the field soils at Huai Tee Cha village.

<i>Soil property^a</i>	
Texture	Sandy loam
pH (water)	5.2 – 7.0 (6.2)
Bray II P (mg kg ⁻¹)	6.8 – 271 (81.9)
N (%)	0.29 – 0.35 (0.31)
K (mg kg ⁻¹)	103 – 130 (122)

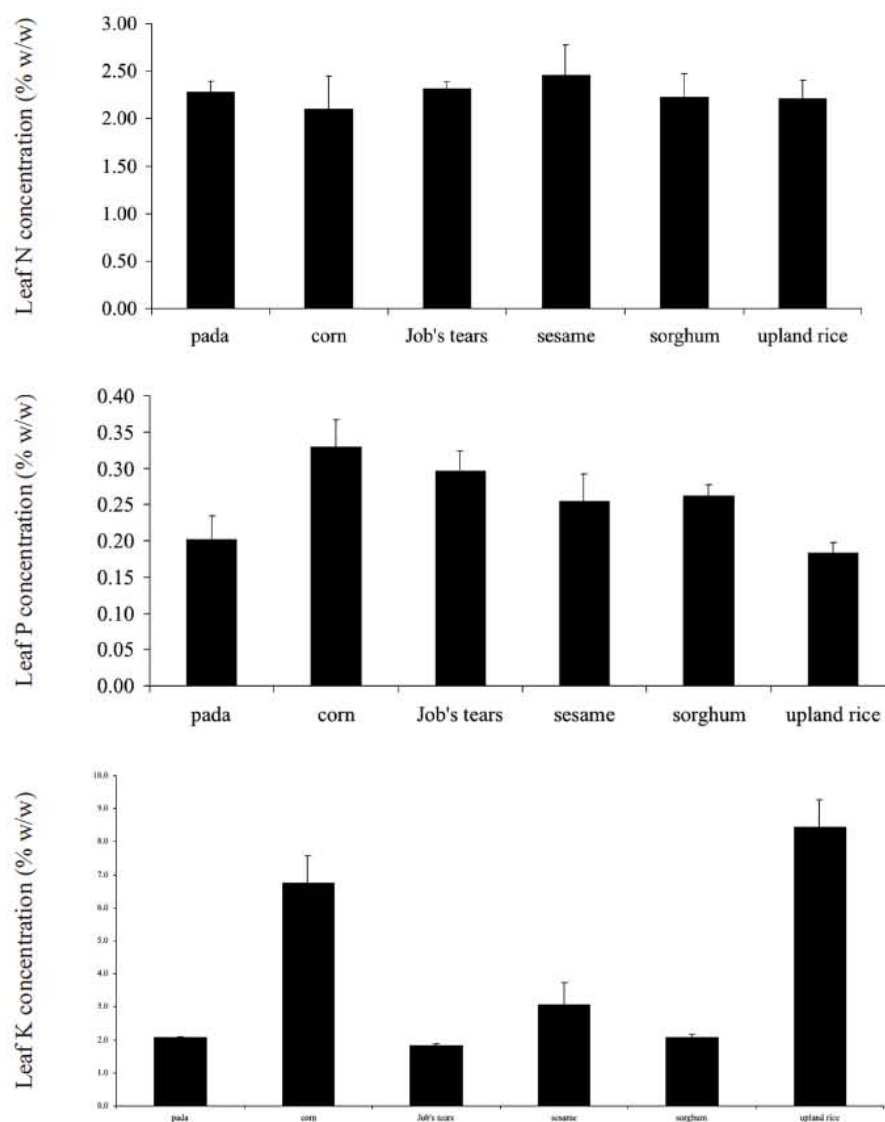
^a Values are the range with the mean in brackets**Figure 1.** Foliar nutrient concentrations (N, P, K) in pada and swidden crops at Huai Tee Cha fields (vertical bar above each column represents one S.E.).

Table 2. Spore density of AM fungi in three soil profiles in Huai Tee Cha fields.

Soil depth (cm)	Spore numbers 100 g ⁻¹ soil				
	Upper slope	Mid slope	Lower slope	Average	S.E.
0-5	30	24	54	36	9.1
5-10	650	17	9	225	212.4
10-15	10	10	14	11	1.4
15-20	46	15	19	27	9.7
20-30	15	9	4	9	3.1
30-40	1	18	4	8	5.2
40-50	5	16	1	8	4.4
Total spore	758	109	105		
CV	221	32	121		

Table 3. Root colonization by AM fungi and spore density of pada and five swidden crops in farmers' fields at Huai Tee Cha village.

Plant species	Root colonization (%)	Spore numbers 100 g ⁻¹ soil
Pada	95 ± 2.1	163.9 ± 49.0
Corn	90 ± 2.8	64.4 ± 12.6
Job's tears	75 ± 10.2	82.8 ± 13.9
Sesame	46 ± 14.5	122.2 ± 40.3
Sorghum	50 ± 8.1	151.7 ± 60.8
Upland rice	95 ± 1.8	63.9 ± 11.5

values are mean ± S.E.

Table 4. The use of swidden crop seed in Huai Tee Cha village.

Common name or local name	Scientific name	Main use			
		F1	F2	Or	SC
Job's tears	<i>Coix lachryma-jobi</i> L.	*	*	*	
Glutinous corn	<i>Zea mays</i> L.	*	*		
Sorghum	<i>Sorghum bicolor</i> L.	*	*		
Rice	<i>Oryza sativa</i> L.	*			*
White/black seed sesame	<i>Sesame indicum</i> L.	*			*

Sources: household interview in 2005 (after crop harvests)

F1=Food, F2=Animal feed, Or=Ornamental, SC=Spirit ceremony

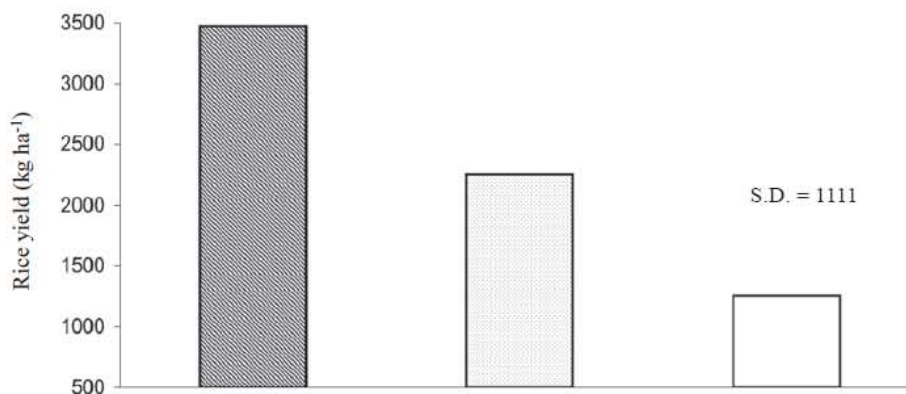


Figure 2. Rice yield (kg ha⁻¹) of Kayo, Murkur and Takae fields at Huai Tee Cha village in cropping year 2005.

DISCUSSION

Available soil P as measured in samples taken from Huai Tee Cha fields in 2005 were higher (average 81.9 mg kg⁻¹ soil) and wide-ranging (6.8-271 mg kg⁻¹ soil), compared to an earlier study of Yimyam et al., (2003) who reported 2-4 mg kg⁻¹ soil. Yimyam sampled fields before burning and 30 days after sowing rice in 2000. The differences in soil P measured in the two studies may be due to location or crop rotation. Because the fields are used once and then returned to forest succession, different fields were sampled in these two studies. The fields sampled by Yimyam were also more acidic than those used in the present study. The rice fields of Takae were located near a valley floor that is the lowest point of the village's land use area, so the source of high P accumulation in these fields may have resulted from leaching by rain from fields higher up. Another factor likely to influence the soil P reserves is the distribution of pada trees in the fields before the cropping period. Yimyam (2006) found that the distribution of pada between shifting cultivation fields varied greatly, in 2000 was mostly dense whereas in 2003 was sparse, so the distribution of pada may have been dense in 1998, resulting in very high soil fertilities.

The percentage root colonization by AM fungi was lowest in sorghum (50%) and highest in pada and upland rice (95%). In a previous study at the same village, Youpensuk et al., (2004) reported that 81% of the fine roots of pada were colonised by AM fungi, and the spore density in pada rhizosphere was four times more than what is found in this study. These differences can be attributed to sampling time and variation between mountain slopes (the fields were different in the two studies).

Upland rice yields varied among farmers' fields, Kayo had the higher rice yield compared to Murkur and Takae. Rice yield of Takae was lowest although this soil had high P levels. The farmers in Huai Tee Cha village grow both glutinous and non-glutinous rice, and use 3-5 varieties each, depending on the conditions

of the field and their preference. Rice yield of farmers was estimated for the total yield, and some of the difference between seed yield of each farmer may be due to differences in rice variety.

Another factor affecting yield may be weed control. The common practice for weed control is by hand, and is normally done three times during the entire cropping phase (Yimyam, 2006). Hence, farmers who are able to control weeds on time may achieve higher crop yield than farmers who have poorer weed control. Soil analysis revealed that the fields varied considerably in available phosphorus. It is not known whether the density of spores or the extent of root colonization by AM fungi varies with soil fertility within a field, and this is an area where further work is needed.

CONCLUSION

Although the addition of fertilizer P is probably a simple way for improving crop productivity on soils low in available P, most farmers in this area have severe poverty and have weak purchasing power to buy artificial fertilizers. Fortunately, the farmers in Huai Tee Cha village have tacit knowledge of using pada as a fallow-enriching tree species in their rotational shifting cultivation system as it helps benefit their crops. As this tree has high dependence on AM fungi and there is high diversity of AM fungi associated with its root system, it is possible that these fungi may also be contributing to nutrient uptake by the swidden crops, thus assisting farmers to increase their yields and decrease inorganic fertilizer inputs. This small field study has shown that swidden crops are also colonized by AM fungi. However, the dependence of swidden crops on AM fungi is yet to be determined.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the farmers at Huai Tee Cha village, Mae Hong Son province for access to their fields, for providing seeds of their swidden crops and for generously sharing their knowledge. Dr. Narit Yimyam of the Highland Coffee Research and Development Centre, Chiang Mai University, kindly facilitated work in the upland fields. Thanks also to Dr. Sittichai Lordkaew and Mrs. Kanjanaporn Lordkaew for plant and soil analysis and our colleagues at CMUPN*lab* for fruitful discussion. The authors acknowledge funding support from the Collaborative Crop Research Programme of the McKnight Foundation, Thailand Research Fund and the United Nations University for this research.

REFERENCES

- Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove, and N. Malajczuk. 1996. Working with mycorrhizas in forest and agriculture. ACIAR Monograph. Canberra, Australia.
- Jackson, H. 1967. Soil chemistry analysis. Prentice-Hall of India Private Limited. New Delhi.

- McGonigle, T.P., M.H. Miller, D.G. Evans, G.L. Fairchild, and J.A. Swan. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of root by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495-501.
- Murphy, J., and J.P. Riley. 1962. A modified single solution for determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31-36.
- Rerkasem, K., and B. Rerkasem. 1994. Shifting cultivation in Thailand: Its current situation and dynamics in the context of highland development. IIED Forest and Land Use Series No. 4. London: International Institute of Environment and Development.
- Rerkasem, K., N. Yimyam, C. Kosamphan, C. Thong-Ngam, and B. Rerkasem. 2002. Agrodiversity lessons in mountain land management. *Mountain Research Development* 22: 4-9.
- Wanatabe, F.S., and S.R. Olsen. 1962. Colorimetric determination of phosphorus in water extracts of soil. *Soil Science* 93: 183-188.
- Yimyam, N., K. Rerkasem, and B. Rerkasem. 2003. Fallow enrichment with pada (*Macaranga denticulata* (Bl.) Muell. Arg.) trees in rotational shifting cultivation in northern Thailand. *Agroforestry Systems* 57: 79-86.
- Yimyam, N. 2006. Fallow regeneration and upland rice yield variation in a system of shifting cultivation with pada (*Macaranga denticulata* (BL.) Muell. Arg) as the fallow-enriching species in northern Thailand. Ph.D. thesis. Chiang Mai University, Thailand.
- Youpensuk, S. 2004. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in mildew mahang (*Macaranga denticulata* Muell. Arg.) and their effects on the host plant. Ph.D. thesis. Chiang Mai University, Thailand.
- Youpensuk, S., S. Lumyong, B. Dell, and B. Rerkasem. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of *Macaranga denticulata* Muell. Arg., and their effect on the host plant. *Agroforestry Systems* 60: 239-246.

เอกสารตีพิมพ์

Title:	The mycorrhizal status of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi of physic nut (<i>Jatropha curcas</i> L.) in Thailand
Authors:	Charoenpakdee S., Phosri C., Dell B. and Lumyong S.
Journal:	Mycosphere
Published :	Online
ISSN:	2077-701
Issue:	Volume 1
Page:	in press

The mycorrhizal status of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in Thailand

Charoenpakdee S^{1,2}, Phosri C², Dell B³ and Lumyong S^{1*}

¹Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200 Thailand

²Biology Program, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok 65000, Thailand

³Department of Plant Science, School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Western Australia, 6150 Australia

Charoenpakdee S, Cherdchai P, Dell B, Lumyong S (2010). The mycorrhizal status of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in Thailand. *Mycosphere* 1, 1–10.

The dependence of physic nut (*Jatropha curcas* L.) on beneficial soil fungi for growth promotion is less to know. Therefore, the spore density and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) associated with physic nut was assessed by extracting spores from physic nut plantations from 10 sites representing 6 provinces in Northern and North eastern of Thailand. Sixty hundred and ninety nine AMF spores were obtained using the wet sieving and sucrose gradient centrifugation methods. AMF colonization was also examined by staining root samples in trypan blue and observed under compound microscope. The following 34 morphospecies of AMF were identified: *Acaulospora* (16 species), *Entrophospora* (1 species), *Gigaspora* (2 species), *Glomus* (10 species) and *Scutellospora* (5 species). The diversity index ranged from 0.28 to 0.86 (average 0.64) and the species richness of AMF varied from 3 to 11 (average 6.2). Root colonization was exceeding 90% suggesting that physic nut is highly dependent on AMF.

Key words –ecology–species diversity–spore density–taxonomy

Article Information rest of article Times new roman 12 pt

Received 10 May 2010

Accepted

Published online

*Corresponding author: Saisamorn Lumyong – e-mail – scboi009@chiangmai.ac.th, ansupattra@gmail.com

Introduction

Physic nut (*Jatropha curcas* L.) is a multipurpose plant and is grown in many parts of the world for example Brazil, India, Mexico, Nicaragua and Thailand (Foidl et al. 1996, Heller 1996, Prueksakorn et al. 2006, David et al.

2009). It is a widely used species for traditional medicine, hedging fences and preventing soil erosion. The specie is originated from Central America. It belongs to the botanical family Euphorbiaceae, which has 300 genera and around 7,500 species. Most species

are tropical trees and shrubs which grow in the lower storey of forests. Many members of this family are known to be dependent on AMF, for example species of *Euphorbia*, *Glochidion*, *Hevea* and *Manihot* (Tawaraya et al. 2003, Zhao & Zhiwei 2007, Straker et al. 2010). Currently, physic nut is becoming an increasingly attractive plant for producing biofuels. Yield estimated currently for physic nut is 1,300 litre of oil per hectare behind oil palm but higher than rapeseed (Anonymous 2007). As diesel fuel prices continue to escalate, opportunities will open for a conversion from crude-oil into bio-diesel based fuel consumption. Several countries, domestic organizations and international have proposed greatly increasing the area under physic nut cultivation for oil production. It is therefore one of the most selected crops in commercial agriculture.

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are abundant and ubiquitous in almost all natural terrestrial communities and form obligate symbiotic associations with 80% of vascular plants (Harley & Smith 1983, Smith & Read 1997). It is apparent that these fungal symbionts became an integral component of plant communities in both natural and agricultural ecosystems. They play a vital role in sustaining plant diversity, increasing plant productivity and maintaining ecosystem processes by promoting plant fitness through a range of mechanisms including protecting the host from pathogens, improving soil structure, and enhancing water and nutrient uptake (Borkowska 2002, Jansa et al. 2002, Kapoor et al. 2004, Pasqualini et al. 2007). Several authors have documented that associations

between agronomic plants species and AMF are likely to increase the efficiency of fertilizer use and plant growth (Schreiner 2007, Tewari 2007, Porras-Soriano et al. 2009).

It has been reported that members of the plant family are highly dependent on AMF (Chen et al. 2005). However, there is limited knowledge of AMF status in the rhizosphere of physic nut. This study was undertaken to determine the diversity of AMF in physic nut plantings in Northern and North eastern of Thailand. We hypothesized that the mycorrhizal status and species richness differ from site to site. Furthermore, soil conditions and plantation age are likely to play a key role for determining species diversity on root tips of physic nut.

Methods

Sample collection

A total of 10 physic nut plantation sites in Chiang Rai (CR1, CR2), Chiang Mai (CM1, CM2, CM3 and CM4), Loei (LO1), Lumphun (LP1), Khon Kaen (KK1) and Nong Kai (NK1) province were selected as study site for AMF diversity (Table 1, Fig.1). Ninety five soil samples were collected from beneath physic nut in the planting row during October-December 2007. At each of the field sites, 4 soil core samples per tree were taken at a depth of 5-30 cm using a soil corer. Approximately 1 kg total of rhizosphere soil from each site was collected. Soil samples were carefully grounded, air dried and mixed into composite samples. Each composite sample representing one plot was a mixture of four soil core samples. The samples were kept in an ice-box and

transport by car to a laboratory. All soil samples were kept in a cold room and processed within one month. The analyses of soil samples included AMF spore isolation and enumeration, identification of species; and determination of the following chemical soil parameters: soil humidity (Lambe & Whitman 1969), pH by water extraction (Thomas 1996), organic matter using wet oxidation (Nelson & Sommers 1996), available phosphorus (P) using the Olsen method (Kuo 1996), extractable potassium (K) using the molybdenum blue method and stannous chloride as the reducing agent and ammonium acetate (NH_4OAc) as extractant (Helmer & Sparkers 1996, Helrich 1990), and total soil nitrogen (N) content using the Kjeldahl method (Bremner 1996). Soil nutrient analysis (Table 2) was conducted by the Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. Roots from each composite sample were removed from the soil by washing and fixed in 70% ethanol.

AMF spore isolation and identification

AMF spores occurring in the rhizosphere soil samples were extracted by wet sieving and sucrose density gradient centrifugation (Brundrett et al. 1996) methods. 100 g of each soil sample was suspended in 500 ml of water and stirred for 10 mins. Sieve sizes ranging from 250 μm , 106 μm and 45 μm , were used for spore collection. The spores retained on each sieve size were filtered onto filter paper and subsequently examined under a stereomicroscope (Olympus CX31) at a magnification of up to 400X and

identified based on spore morphology. Each spore morphotype was mounted in polyvinyl-lacto-glycerol (PVLG) and PVLG mixed with Meltzer's reagent in 1:1 (v/v) ratio (Morton 1988). Identification was based on current species descriptions and identification manuals (International Culture Collection of Vesicular and Arbuscular Endomycorrhizal Fungi [http://invam.caf.wvu.edu/Myc_Info/Taxonomy/species.htm]).

Spore density (SD) is the number of spores in 100 g soil. Relative abundance (RA) was defined as the percentage of spore numbers of a species divided by a total of spore observation (Dandan & Zhiwei 2007). The frequency isolation of each AMF species was calculated by the percentage of the number of the samples in which the species or genus observed per total samples. The dominant AMF species according to relative abundance ($\text{RA} > 6\%$) and spore density of in 100 g soil (spore density higher than 40 spores) and species richness were determined in each sampling site.

Mycorrhizal root colonization assessment

Roots fixed in 70% ethanol were cleared in 10% (w/v) KOH solution and autoclaved at 121°C and 15 lb/inch^2 for 15 minutes. Then, roots were washed with distilled water to remove KOH, stained with 0.05% trypan blue dye (C.I. 23850) and reautoclaved. Thirty stained roots (each about 1 cm in length) were assessed for colonization using the intercept method under a compound Olympus CX31 microscope (Brundrett et al. 1996).

Diversity index and concentration of dominance

AMF diversity was evaluated using the Shannon-Weiner diversity index which has two main components, evenness and number of species (Shannon & Weiner 1963). The Shannon-Weiner index (H') was calculated according to the formula $H' = -\sum(n_i/N) \log_2(n_i/N)$, where n_i represents individuals of a species and N represents the total number of species. Concentration of dominance (C) was also measured by the Simpson's index

(Simpson 1949) using the formula $C = \sum(n_i/N)^2$, where n_i and N are the same as for Shannon-Weiner diversity index.

Statistical analysis

The percentage of infection was arc sin transformed prior analysis. One-way analysis of variance (ANOVA) was carried out for root colonization and spore density. Statistical analyses were performed with the Statistical Package for Social Sciences version 11.5 (SPSS Inc., Wacker Drive, Chicago, IL). All factors were analyzed at $\alpha = 0.05$.

Table 1 Geographic coordinates and number of soil sampling in each sites.

Geography	Site *									
	CR1	CR2	CM1	CM2	CM3	CM4	LO1	LP1	KK1	NK1
Latitude	E99°48'	E99°26'	E98°55'	E98°30'	E98°55'	E98°54'	E101°21'	E99°07'	E102°53'	E102°43'
Longitude	N19°54'	N19°52'	N18°45'	N18°09'	N18°45'	N18°44'	N17°27'	N18°34'	N16°23'	N17°51'
MSL**(m)	398	399	340	1,137	340	360	800	337	150	163
Sampling no.	5	10	10	10	10	10	10	10	10	10

*Chiang Rai site 1 (CR1), Chiang Rai site 2 (CR2), Chiang Mai site 1 (CM1), Chiang Mai site 2 (CM2), Chiang Mai site 3 (CM3), Chiang Mai site 4 (CM4), Loei (LO1), Lumphun (LP1), Khon Kean (KK1), and Nong Khai (NK1).

**MSL=Mean Sea Level



Fig.1. Ten sampling sites in 6 provinces of Thailand. (a) CR2: Chiang Rai site 2, (b) CM1: Chiang Mai site 1, (c) CM2: Chiang Mai site 2, (d) CM3: Chiang Mai site 3, (e) CM4: Chiang Mai site 4, (f) LP1: Lumphun, (g) CR1: Chiang Rai site 1, (h) KK1: Khon Kean, (i) LO1: Loei, (j) NK1: Nong Khai.

Results

Soil characteristics

Soil samples of each study site were pooled, mixed and determined for chemical properties (Table 2). Soil pH ranged from 5.3 and 8.0, OM 0.63-

7.22%, N 0.02-0.44%, P 11.5-175.5 ppm, K 22.2-1058.0 ppm and soil humidity 7-23% at different sites.

Table 2 Soil Characteristic of 10 physic nut plantations in Northern and North eastern of Thailand.

site	plantation age (year)	pH	H (%)	OM (%)	N (%)	P ppm	K ppm
CR1	>1	6.0	13.7	1.54	0.09	111.8 ^{VH}	158.0
CR2	5	5.3	17.0	7.22	0.44	121.4 ^{VH}	1058.0
CM1	<1	6.0	14.0	3.30	0.15	94.3 ^{VH}	198.5
CM2	10	6.0	18.7	6.94	0.26	150.5 ^{VH}	521.4
CM3	10	6.9	9.5	4.30	0.19	75.2 ^{VH}	204.0
CM4	10	5.9	23.0	2.42	0.07	19.8 ^M	171.0
LO1	4	5.9	13.8	2.68	0.15	147.4 ^{VH}	232.4
LP1	1	6.1	10.0	1.86	0.07	11.5 ^M	171.8
KK1	5	8.0	16.4	0.63	0.02	11.8 ^M	22.1
NK1	5	6.0	18.8	1.74	0.12	175.5 ^{VH}	746.3

Remark: According to Land Development Department, Thailand (Phosri et al. 2010); P<10ppm means Low (L), P ranging between 11 and 25ppm means Medium (M), P ranging between 26 and 45ppm means High (H), P>45ppm means Very High (VH).

AMF status

In total 699 AMF spores and sporocarps were derived using wet sieving and sucrose gradient centrifugation methods from 95 rhizosphere soil samples of physic nut. Spore density in the rhizosphere of physic nut ranged from 19 to 163 spores 100 g⁻¹ soil (mean 70.0±22.9 spores) (Table 3). Maximum spore density was observed in NK1 (163.0±1.5) and minimum in CM1 (66.0±4.9). There was a significant difference ($P < 0.05$) in spore density between 10 sites (Table 3).

Thirty four morphospecies of AMF were identified using spore characteristics. Species richness of AMF varied from 3 to 11 (average 6.1). In the present study we found 3 species from CR1, 4 species from CR1, 6 species from CM1, 7 species from CM2, 5 species from CM3, 11 species from CM4, 7 species from LO1, 6 species from LP1, 4 species from KK1 and 8 species from KK1 (Table 4). *Acaulospora* and *Glomus* occurred most frequently and overall, the most prevalent species. Among them 16 species were in the genus *Acaulospora*

and 10 species in *Glomus*. Only 5 species in *Scutellospora*, 2 species in *Gigaspora* and 1 species in

Entrophospora were found from 10 sampling sites (Table 4).

Table 3 spore density (SD), Shannon-Weiner index (H'), Simpson's index (D) and Root colonization by AMF of each sampling site.

Site	SD*	H'	D	Colonization (%)*
CR1	27±0.9a ²	0.43	0.61	37.7±5.9a ¹
CR2	45±1.4bc	0.28	0.32	85.8±1.3d
CM1	19±0.6a	0.75	0.86	66.0±4.9b
CM2	34±0.7ab	0.78	0.84	87.5±1.5d
CM3	150±2.0f	0.52	0.64	93.2±2.7e
CM4	86±1.8d	0.83	0.81	94.3±2.8e
LO1	112±0.6e	0.65	0.71	64.4±4.2b
LP1	42±0.6bc	0.68	0.77	76.5±5.5c
KK1	21±0.6a	0.30	0.35	77.3±8.7b
NK1	163±1.5f	0.60	0.69	66.4±5.4c

*The same letter in each column indicates that there is no significant difference at $\alpha = 0.05$

¹mean±SD, n = 30

²mean±SD, n = 2

Table 4 (cont.) Spore density (S) and relative abundances (RA) of AMF in each sample sites.

Code	Species	Sample site*																							
		CR1		CR2		CM1		CM2		CM3		CM4		LP1		LO1		KK1		NK1					
		S	RA	S	RA	S	RA	S	RA	S	RA	S	RA	S	RA	S	RA	S	RA	S	RA				
<i>Glomus</i>		15	55.5	0	0	5	26.3	14	41.2	6	4	3	3.5	22	52.4	3	2.7	19	90.5	3	1.8				
CMU17	<i>Glomus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2.7	2	9.5	-	-				
CMU18	<i>Glomus etunicatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1.8				
CMU19	<i>Glomus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	14.3	-	-	-	-	-	-				
CMU20	<i>Glomus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	38.1	-	-	-	-	-	-				
CMU21	<i>Glomus elaeosporum</i>	-	-	-	-	-	-	10	29.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
CMU22	<i>Glomus sinuatum</i>	-	-	-	-	5	26.3	4	11.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
CMU23	<i>Glomus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	80.9	-	-				
CMU24	<i>Glomus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-				
CMU25	<i>Glomus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	6	4.0	2	2.3	-	-	-	-	-	-	-	-				
CMU27	<i>Glomus fulvum</i>	15	55.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
<i>Gigaspora</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	51	34	2	2.3	0	0	51	45.5	0	0	0	0				
CMU28	<i>Gigaspora</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2.3	-	-	51	45.5	-	-	-	-				
CMU29	<i>Gigaspora rosea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	51	34.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
<i>Scutellospora</i>		7	25.9	0	0	6	31.6	7	20.6	0	0	7	8.1	10	23.8	0	0	0	0	4	2.4				
CMU30	<i>Scutellospora</i> sp.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4.7	-	-	-	-	-	-	-	-				
CMU31	<i>Scutellospora pellucida</i>	7	25.9	-	-	3	15.8	-	-	-	-	3	3.5	-	-	-	-	-	-	4	2.4				
CMU32	<i>Scutellospora</i> sp.02	-	-	-	-	-	-	7	20.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
CMU33	<i>Scutellospora heterogamia</i>	-	-	-	-	3	15.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
CMU34	<i>Scutellospora</i> sp.03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	23.8	-	-	-	-	-	-				
Total spore		27	100	45	100	19	100	34	100	150	100	86	100	42	100	112	100	21	100	163	100				
Species richness		3		4		6		7		5		11		7		6		4		8					

Herein *A. scrobiculata* was the most widely distributed species. It was found in 7 out of 10 sampling sites including CR1, CR2, CM1, CM2, CM3, CM4 and NK1 (70% IF) following by *A. excavata* which appeared in 5 sites including CM1, CM3, CM4, LO1 and LP1 (50% IF). Some species were only found in specific site (10% IF) for example *G. fulvum* in CR1, *Acaulospora* sp.02 and *Acaulospora* sp.03 in CR2, *G. clavisporum* and *Scutellospora* sp.02 in CM2, *E. colombiana* and *Gi. rosea* in CM3, *A. denticulate*, *Glomus* sp.05 and *Scutellospora* sp.01 in CM4, *Glomus* sp.01, *Glomus* sp.02 and *Scutellospora* sp.03 in LP1, *A. spinosa* in KK1, *Acaulospora* sp.01, *Acaulospora* sp.04 and *G. etunicatum* in NK1 (Table 4).

Based on spore density and relative abundance, 7 species were dominant (> 40 spores 100 g^{-1} soil, $RA \geq 6\%$): *A. dilatata* (51 spores, 7.3%), *A. excavata* (42 spores, 6%), *A. foveata* (74 spores, 10.6%), *A. lacunosa* (74 spores, 10.6%), *E. colombiana* (74 spores, 10.6%), *Gigaspora* sp.01 (53 spores, 7.6%) and *Gi. rosea* (51 spores, 7.3%) (Table 5). The morphological characteristics of some dominant AMF were illustrated in Fig. 2

Species diversity was calculated using 2 indices. Both of diversity indices ranged from 0.28 to 0.86 (average 0.64). Shannon–Weiner diversity index ranged from 0.28 to 0.83. The highest was presented in CM4 ($H' = 0.83$) and the lowest was occurred in CR2 ($H' = 0.28$). Similarly, Simpson's index ranged from 0.32 to 0.86 where the highest was shown in CM1 and the lowest was obtained in CR2 (Table 3). All samples of physic nut roots were colonized by AMF (Fig. 3a-d), the mean percentage of root length infection ranged from 38% in CR1 to 94% in CM4 ($P < 0.05$), and generally was exceedingly 60% (Table 3). Significant differences in percentage of root colonization occurred between sampling sites ($P < 0.05$). Physic nut appears to be readily colonized by AMF under a range of field conditions in acidic and calcareous soils, in low to moderate organic matter and in low to high available P (Table 2). A few months old seedlings were moderately colonized by AMF (66% root length in CM1).

Discussion

Member of plant species in the family Euphorbiaceae are known to form mycorrhizal symbioses (Tawaraya et al. 2003; Youpensuk et al. 2004; Zhao & Zhiwei 2007; Straker et al. 2010). In this study we reported for the first time the population density, composition of AM fungi and root colonisation in selected physic nut plantations in Thailand. AMF were presented in all the study sites both in physic nut roots and in soil with moderately to high level of colonisation regardless of plantation age. In contrast Narendra et al. (2009) observed higher colonisation in older plants in India. Nevertheless, this suggested that the plant is strongly mycorrhizal dependent.

The number of AMF species obtained in the present study (34 species) is similar to several reports in Thailand (Table 6). Weerawat (2003) identified 27 AMF species from *Acacia mangium* in the North and Northeastern part of Thailand whilst Nandakwamg et al. (2008) described 24 AMF species from indigenous forest trees in the North of Thailand. The numbers of AMF species in the present study were doubled the number of AMF species detected in continuous maize cropping in the central of Thailand where high P input was applied for long term fertilization (Nabhadaluang et al. 2005). However, several AMF species were observed from only a few sampling sites for example Youpensuk et al. (2004) reported 29 AMF species associated with *Macaranga denticulate* in an upland shifting agriculture with low P level in the North of Thailand. In the tropical rain forests of China, Zhao et al. (2003) identified 27 AMF species

Further Dandan & Zhiwei (2007) recorded 43 AMF morphospecies from the hot and dry valley of south west China. Further, Singh et al. (2008) detected a total of 51 AMF morphospecies associated with the rhizosphere of tea growing in natural and cultivated ecosites. In comparison, from our study 34 AMF species (average 3.4 AMF species per site) haboured in physic nut roots were obtained. This could be considered as low species richness.

Table 5 Identified AMF and their spore density (S), isolation frequency (IF) and relative abundances (RA) under physic nut rhizosphere (dominant species are written in bold).

Code	Species	S	IF	RA
CMU04	<i>Acaulospora colossica</i> P.A. Schultz, Bever & J.B. Morton	10	10	1.4
CMU08	<i>Acaulospora denticulate</i> Sieverd. & S. Toro	2	10	0.3
CMU09	<i>Acaulospora dilatata</i> J.B. Morton	51	20	7.3
CMU12	<i>Acaulospora excavate</i> Ingleby & C. Walker	42	50	6.0
CMU02	<i>Acaulospora foveata</i> Trappe & Janos	74	20	10.6
CMU14	<i>Acaulospora lacunosa</i> J.B. Morton	74	30	10.6
CMU16	<i>Acaulospora morrowiae</i> Spain & N.C. Schenck	19	20	2.7
CMU11	<i>Acaulospora nicolsonii</i> C. Walker, L.E. Reed & F.E. Sanders	6	30	0.9
CMU10	<i>Acaulospora rehmsii</i> Sieverd. & S. Toro	4	20	0.6
CMU06	<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe	29	70	4.1
CMU01	<i>Acaulospora spinosa</i> C. Walker & Trappe	1	10	0.1
CMU03	<i>Acaulospora tuberculata</i> Janos & Trappe	34	20	4.9
CMU07	<i>Acaulospora</i> sp.01	2	10	0.3
CMU13	<i>Acaulospora</i> sp.02	2	10	0.3
CMU15	<i>Acaulospora</i> sp.03	3	10	0.4
CMU26	<i>Acaulospora</i> sp.04	37	10	5.3
CMU05	<i>Entrophospora colombiana</i> Spain & N.C. Schenck	74	10	10.6
CMU29	<i>Gigaspora rosea</i> T.H. Nicolson & N.C. Schenck	51	10	7.3
CMU28	<i>Gigaspora</i> sp.01	53	20	7.6
CMU21	<i>Glomus claviforme</i> (Trappe) R.T. Almeida & N.C. Schenck	10	10	1.4
CMU18	<i>Glomus etunicatum</i> W.N. Becker & Gerd.	3	10	0.4
CMU27	<i>Glomus fulvum</i> (Berk. & Broome) Trappe & Gerd.	15	10	2.1
CMU22	<i>Glomus sinuosum</i> (Gerd. & B.K. Bakshi) R.T. Almeida & N.C. Schenck	9	20	1.3
CMU17	<i>Glomus</i> sp.01	5	20	0.7
CMU19	<i>Glomus</i> sp.02	6	10	0.9
CMU20	<i>Glomus</i> sp.03	16	10	2.3
CMU23	<i>Glomus</i> sp.04	17	10	2.4
CMU24	<i>Glomus</i> sp.05	1	10	0.1
CMU25	<i>Glomus</i> sp.06	8	20	1.1
CMU31	<i>Scutellospora pellucida</i> (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) C. Walker & F.E. Sanders	17	40	2.4
CMU30	<i>Scutellospora</i> sp.01	4	10	0.6
CMU32	<i>Scutellospora</i> sp.02	7	10	1.0
CMU33	<i>Scutellospora heterogama</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & F.E. Sanders	3	10	0.4
CMU34	<i>Scutellospora</i> sp.03	10	10	1.4
Total: AMF 34 species		699		100



Fig.2 Spore characteristics of the dominant AMF collected from physic nut rhizosphere under light (a-g) and scanning electron (h) microscopes. *Acaulospora foveata* (CMU02) [a], *Entrophospora colombiana* (CMU05) [b, h], *A. dilatata* (CMU09) [c], *A. lacunosa* (CMU14) [d], *Gigaspora rosea* (CMU29) [e], *Gigaspora* sp.01 (CMU28) [f], and *A. scrobiculata* (CMU06) [g] with Melzer's reagent. Bars: a, b, c, d, g = 38 μ m (40 $\times$); e, f = 150 μ m (10 $\times$); h = 50 μ m.

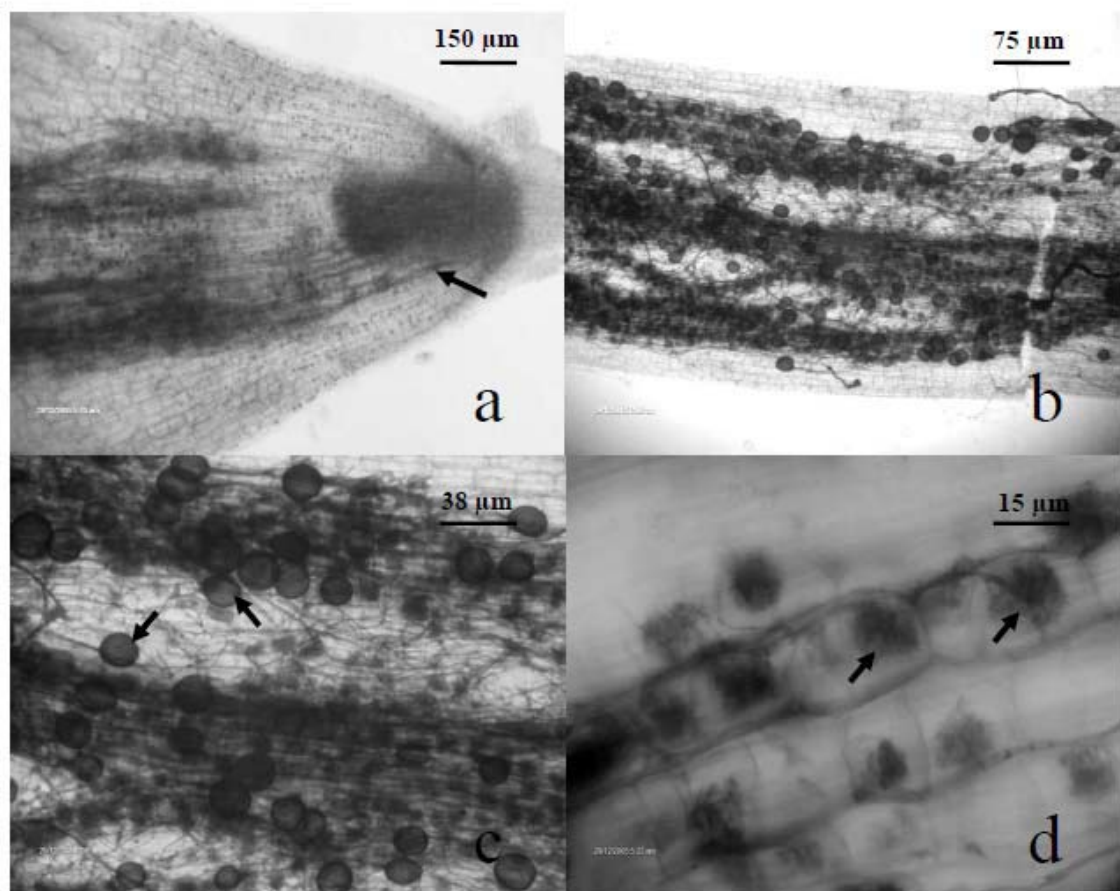


Fig.3. AMF colonization in physic nut roots collected from the field. (a) AMF structures near the root tip (arrow), (b) highly infected root, (c) vesicles (arrows), and (d) arbuscules (arrows).

Previous studies have shown that agricultural management practise for example tillage, quality and quantity of fertilizer applied, cropping systemes have a negative impact on the AMF association with temperate and tropical agronomic plant species (van der Heijden et al. 1998; Douds & Millner 1999; Cardoso & Kuyper 2006; Wang et al. 2009). Fertilization is one of an important abiotic factor influencing growth, colonisation, sporulation, composition and distribution of AM fungi (Johnson 1993; Egerton-Warburton & Allen 2000; Na Bhadalung et al. 2005; Zhang et al. 2006; Wang et al. 2009). In general high level of P fertilization applied negates the mycorrhizal effect in the field both infection of roots and sporulation by majority of AM fungi (Douds & Schenck 1990; Tang et al. 2001; Rubio et al. 2003; Alguacil et al. 2010). Several authors indicated that increasing P fertilization significantly reduced the species diversity of AM fungi and altered the species composition (Johnson 1993; Kahiluoto et al. 2001; Wang et al. 2009). Alguacil et al. (2010) clearly demonstrated that P fertilization affected AM fungi diversity and composition in a tropical savana forage system when different sources and high dose of P were applied. Apart from P content, high N content in soil can also influence the species composition of AM fungi and colonisation (Blanker et al. 2005, Treseder & Allen 2002, Wang et al. 2009). In our case most soil samplings contained from medium P to very high. Therefore this result could suggest that P content attribute to low species richness and diversity. However, other factors can also affect AMF diversity and

community structure such as vegetation type, host specificity between fungi and plants and temporal variation (Johnson et al. 1992; Barni & Siniscalco 2000; Boddington & Dodd 2000; Burrows & Pfleger 2002; Husband et al. 2002; Narendra et al. 2009). Gaidashova et al. (2009) demonstrated that AM fungi diversity varied considerably depending on other edapho-climatic conditions i.e. rain fall, soil texture and soil management practise. In addition large samples are likely to contain more AMF species which could result in a high species diversity including species richness, Shannon-Weiner index and Simpson's index (Barrow et al. 1997; Nandakwang et al. 2008). Therefore a greater sampling effort would be required to prove this.

The present study represented that *Acaulospora* was predominant genus in term of spore density and species diversity (Table 4). A similar finding was obtained from the rhizosphere soil under food crops planted into an upland swidden farm and in dry tropical forests in northern Thailand (Nandakwang 2008; Wangmo 2008). Members of *Acaulospora* have been identified mainly in low input farm, forest and grassland soils. They are considered as facultative symbionts and adapted to wide array of soil and host species, appearing in soil of widely different pH and nutrient availability (Sieverding 1991; Shepherd et al. 1996; Straker et al. 2010). Moreover, *Acaulospora* species are frequently associated with acidic soil (Abbott and Robson, 1991). Our study indicated that *A. scrobiculata* was frequently found in many sites. This is in agreement with several reports (Shepherd et al. 1996;

Jefwa et al. 2006; Straker et al. 2010). Therefore this may account for the appearance of *Acaulospora* species in many sites where our studied undertaken.

Glomus species are considered as cosmopolitan fungi in many ecosystems (Sýkorová et al. 2007). They has dominated in various habitats and dominate communities both in the cold or temperate and in the tropical region and subtropical vegetation. Members of them are usually occur in neutral and slightly alkaline soil (Mukerji et al. 2002) in particular *G. etunicatum* is a worldwide distributed species and can be found in many ecotypes (Becker & Gerdemann, 1977). In other reports from Thailand indicated that *Glomus* was prevalent AMF genus as in *Macaranga denticulate* (Youpensuk et al. 2004) and indigenous tree of North of Thailand (Nandakwang et al. 2008). Most of the soils in our study sites were acidic. Therefore this could explain our less frequent detection of *Glomus*. Moreover frequency of occurrence also varies drastically at the species level (Rubio et al. 2003). Eventhough *Glomus* has been found at almost all sites investigated but is found at lower frequencies.

Other genera seem to be less common in the present study, with only a few examples of species, such as *Entrophospora colombiana*, *Gigaspora rosea*, *Scutellospora pellucida* and *S. heterogama*. The results shown that the number of species in Gigasporaceae was less than other AMF. It may cause from the sampling soil posses a very fine grain as clay. Normally, *Gigaspora* species predominate in soil with sand content as dunes (Lee & Koske 1994). *Scutellospora* is ancestor of *Gigaspora*

(Walker 1992). Both *Gigaspora* and *Scutellospora* produce large spores and these require a longer period to develop than the small-spored species (Hepper 1984). It has been suggested that the latter are therefore more adaptive to changing environmental conditions (Stutz 1996). It also appears that *Scutellospora* might be a poor competitor in colonizing plant roots that the host plant favors fungi from Glomerales (Sýkorová et al. 2007). Moreover species in *Gigaspora* and *Scutellospora* were much more frequently associated with wild plants than with field crops (Gai et al. 2006).

Obviously physic nut was heavily colonized by AMF in all field locations studied. The ability of this crop to harbor AMF across a wide range of site conditions makes it a good potential crop for large scale plantations. To our knowledge the establishment of physic nut plantation in Thailand is often planted into degraded land that previously supports other crops or was forested. The degraded land resulted in erosion of top soils by rain and severe leaching of the soils. It can also result in loss of indigenous AMF that inhabited in the top soils. This means that the land has a limited capability to support growth of either indigenous or agronomic plants species without addition of considerably amount of fertilisers. One of our conclusions is that application of correct AMF inoculation could be benefit in the establishment of physic nut plantation on degraded land with poor and infertile soil and especially where benefit soil microorganisms are being lost from top soils.

Table 6 Comparison of AMF diversity in the current study with previous studies in Thailand.

Host plant	AMF genera*								Total AMF species
	A	Ar	E	Gi	G	Pg	S	U	
<i>M. denticulata</i> (Youpensuk et al. 2004)	6	1	-	2	17	1	2	-	29
<i>A. mangium</i> (Weravart 2003)	6	-	-	7	7	-	6	1	27
<i>Z. mays</i> (Nabhadalung et al. 2005)	2	-	2	-	9	-	1	2	16
Indigenous trees (Nandakwang et al. 2008)	6	-	-	-	15	-	3	-	24
<i>J. curcas</i> (current study)	16	-	1	2	10	-	5	-	34

*A = *Acaulospora*, Ar = *Archaeospora*, E = *Entrophospora*, Gi = *Gigaspora*, G = *Glomus*, Pg = *Paraglomus*, S = *Scutellospora*, and U = unknown

However, the fact that physic nut grows abundantly in the wild. The specie has never really been domesticated. There is certainly doubt for the conditions that best suitable for its growth. This could lead to unproductive agriculture. However, if we are discuss in moving to more sustainable practise, AMF inocula could have real potential to improve physic nut productivity in established plantation as evident from our study that physic nut is very responsive to mycorrhizas. For this reason, further research is required to identify effective AMF for physic nut in Thailand that can be used in inoculation program in order to restore AMF diversity in degraded land.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Thailand Research Fund: DBG4980004, Chiang Mai University Graduate School, the Higher Education Commission and the National Research University program, Thailand.

References

Abbott LK, Robson AD. 1991 - Factors influencing the occurrence of

vesicular-arbuscular mycorrhizas. Agriculture, Ecosystems and Environment 35, 121-150

Alguacil M del M, Lozano Z, Campoy MJ, Roldán A. 2010 - Phosphorus fertilisation management modifies the biodiversity of AM fungi in a tropical savanna forage system. Soil Biology and Biochemistry doi:10.1016/j.soilbio.2010.03.012

Anonymous. 2007 - The little shrub that could-maybe. Nature 449, 652-655

Barni E, Siniscalco C. 2000 - Vegetation dynamics and arbuscular mycorrhiza in old-field successions of the western Italian Alps. Mycorrhiza 10, 63-72

Barrow JR, Havstad KM, McCaslin BD. 1997 - Fungal root endophytes in four-wing saltbush, *Altiplex canescens*, on arid rangeland of southwestern USA. Arid Soil Research and Rehabilitation 11, 177-185

Becker WN, Gerdemann JW. 1977 - *Glomus etunicatus* sp. nov. Mycotaxon 6, 29-32

Blanke V, Renker C, Wagner M, Fillner K, Held M, Kuhn AJ, Buscot F. 2005 - Nitrogen supply affects arbuscular mycorrhizal colonization of *Artemisia vulgaris*

- in a phosphate-polluted field site. *New Phytologist* 166, 981-992
- Boddington CL, Dodd JC. 2000 - The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. I. Field studies in an Indonesian ultisol. *Plant and Soil* 218, 137-144
- Borkowska B. 2002 - Growth and photosynthetic activity of micropropagated strawberry plants inoculated with endomycorrhizal fungi (AMF) and grown under drought stress. *Acta physiologiae plantarum* 24, 365-370
- Bremner JM. 1996 - Nitrogen total. In: Sparks, DL (ed) *Methods of Soil Analysis Chemical Methods*, Part 3, Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin pp 1085-1021
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996 - *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. ACIAR Monograph. Canberra, Australia.
- Burrows RL, Pfeleger FL. 2002 - Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Canadian Journal of Botany* 80, 120-130
- Cardoso IM, Kuyper TW. 2006 - Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 116, 72-84
- Chen X, Tang J, Zhi G, Hu S. 2005 - Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under a sand culture experiment. *Chemosphere* 60, 665-671
- Dandan Z, Zhiwei Z. 2007 - Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the hot-dry valley of the Jinsha River, southwest China. *Applied Soil Ecology* 37, 118-128
- David ML, Joerg AP, Alberte B. 2009 - Modeling the land requirements and potential productivity of sugarcane and *Jatropha* in Brazil and India using the LPJmL dynamic global vegetation model. *Biomass and Bioenergy* 33, 1087-1095
- Douds DD Jr, Millner PD. 1999 - Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74, 77-93
- Douds DD Jr, Schenck NC. 1990 - Relationship of colonization and sporulation by VA mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrate contents. *New Phytologist* 116, 621-627
- Egerton-Warburton LM, Allen EB. 2000 - Shifts in arbuscular mycorrhizal communities along an anthropogenic nitrogen deposition gradient. *Ecological Applications* 10, 484-496
- Foidl N, Foidl G, Sanchez M, Mittelbach M, Hackel S. 1996 - *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biofuel in Nicaragua. *Bioresource Technology* 58, 77-82
- Gai JP, Christie P, Feng G, Li XL. 2006 - Twenty years of research on community composition and species distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in China: a review. *Mycorrhiza* 16, 229-239
- Gaidashova SV, van Asten PJA, Jefwa JM, Delvaux B, Declerck S. 2009 - Arbuscular mycorrhizal fungi in the East African Highland banana

- cropping systems as related to edapho-climatic conditions and management practices: case study of Rwanda. *Fungal Ecology* doi:10.1016/j.funeco.2009.09.002
- Harley JL, Smith SE. 1983 - Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London
- Heller J. 1996 - Physic Nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben / International Plant Genetics Resources Institute, Rome
- Helmer PA, Sparks DL. 1996 - Lithium, sodium, potassium, rubidium and cesium. In: Sparks DL (Ed) *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods, Part 3*. Soil Science Society of American and American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp 551-575
- Helrich K. 1990 - Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 2 Volumes. 15th edn. Arlington: AOAC.
- Hepper CM. 1984 - Isolation and culture of VA mycorrhizal (VAM) fungi. In: Powell CL, Bagyaraj DJ (Eds) *VA Mycorrhizae*. CRC Press, Florida, USA, pp 95-112
- Husband R, Herre EA, Young JPW. 2002 - Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonizing seedlings in a tropical forest. *FEMS Microbiology Ecology* 42, 131-136
- Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard E. 2002 - Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12, 225-234
- Jefwa JM, Sinclair R, Maghembe JA. 2006 - Diversity of glomale mycorrhizal fungi in maize/sesbania intercrop and maize monocrop systems in southern Malawi. *Agroforestry Systems* 67, 107-114
- Johnson NC. 1993. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecological Applications* 3, 749-757
- Johnson NC, Tilman D, Wedin D. 1992 - Plant and soil controls on mycorrhizal fungal communities. *Ecology* 73, 2034-2042
- Kahiluoto H, Ketoja E, Vestberg M, Saarela I. 2001 - Promotion of AM utilization through reduced P fertilization: 2. Field studies. *Plant and Soil* 231, 65-79
- Kapoor R, Giri B, Mukerji KG. 2004 - Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* Mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. *Bioresource Technology* 93, 307-311
- Kuo S. 1996 - Phosphorus. In: Sparks DL (Ed) *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods, Part 3*. Soil Science Society of American and American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp 869-921
- Lambe TW, Whitman RV. 1969 - *Soil Mechanics: Series in Soil Engineering*, 1st edition, John Wiley & Sons, Inc. USA
- Lee PJ, Koske RE. 1994 - *Gigaspora gigantea*: Seasonal, abundance and ageing of spores in a sand dune. *Mycological Research* 98, 453-457

- Morton JB. 1988 - Taxonomy of mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32, 267-324
- Mukerji KG, Manoharachary C, Chamola BP. 2002 - Techniques in mycorrhizal studies. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London
- Nabhadalung N, Suwanarit A, Dell B, Nopamornbodi O, Thamchaipenet A, Rungchuang J. 2005 - Effect of long-term NP-fertilization on abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi under a maize cropping system. *Plant and Soil* 270, 371-382
- Nandakwang P, Elliott S, Dell B, Teaumroong N, Lumyong S. 2008 - Arbuscular mycorrhizal status of indigenous tree species used to restore seasonally dry tropical forest in Northern Thailand. *Research Journal of Microbiology* 3, 51-61
- Narendra KS, Ashwani K, Satyawati S, Naik SN. 2009. Interaction of *Jatropha curcas* plantation with ecosystem. Proceedings of International Conference on Energy and Environment, Taj Chandigarh, India, 19-21 March, 2009
- Nelson DW, Sommers LE. 1996 - Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Sparks DL (Ed) *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods. Part3 Soil Science Society of American and American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin*, pp 961-1011
- Pasqualini D, Uhlmann A, Stürmer LS. 2007 - Arbuscular Mycorrhizal Fungal communities influence growth and phosphorus concentration of woody plants species from the Atlantic rain forest in South Brazil. *Forest Ecology and Management* 245, 148-155
- Phosri C, Rodriguez A, Sander IR, Jeffries P. 2010 - The role of mycorrhizas in more sustainable oil palm cultivation. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 135, 187-193
- Porras-Soriano A, Soriano-Martin ML, Porras-Piedra A, Azcon R. 2009 - Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. *Journal of Plant Physiology* 166, 1350-1359
- Prueksakorn K, Shabbir HG, Pomthong M, Sébastien B. 2006 - Energy analysis of *Jatropha* plantation systems for biodiesel production in Thailand, *Energy for Sustainable Development*, The 2nd Joint International Conference on Sustainable Energy and Environment (SEE 2006), 21-23 November 2006, Bangkok, Thailand
- Rubio R, Borie F, Schalhchi C, Castillo C, Azcón R. 2003 - Occurrence and effect of arbuscular mycorrhizal propagules in wheat as affected by the source and amount of phosphorus fertilizer and fungal inoculation. *Applied Soil Ecology* 23, 245-255
- Schreiner RP. 2007 - Effects of native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of 'Pinot noir' (*Vitis vinifera* L.) in two soils with

- contrasting levels of phosphorus. *Applied Soil Ecology* 36, 205-215
- Schreiner RP, Mihara KL. 2009 - The diversity of arbuscular mycorrhizal fungi amplified from grapevine roots (*Vitis vinifera* L.) in Oregon vineyards is seasonally stable and influenced by soil and vine age. *Mycologia* 101, 599-611
- Shannon CE, Weiner W. 1963 - The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press, Urbana, USA
- Shepherd KD, Jefwa J, Wilson J, Ndufa JK, Ingleby K, Mbuthu KW. 1996 - Infection potential of farm soils as mycorrhizal inocula for *Leucaena leucocephala*. *Biology and Fertility of Soils* 22, 16-21
- Sieverding E. 1991 - Vesicular-arbuscular mycorrhizal management in tropical agro systems. German Technical Co-operation (GZT). Eschborn, Germany p 52
- Simpson EH. 1949 - Measurement of diversity. *Nature* 163: 688
- Singh S, Pandey A, Chaurasia B, Palni LMS. 2008 - Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with the rhizosphere of tea growing in 'natural' and 'cultivated' ecosites. *Biology and Fertility of Soils* 44, 491-500
- Smith SE, Read DJ. 1997 - Mycorrhizal Symbiosis. Second Edition. Academic Press, London, UK.
- Straker CJ, Hilditch AJ, Rey MEC. 2010 - Arbuscular mycorrhizal fungi associated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *South African Journal of Botany* 76, 102-111
- Stutz JC, Morton JB. 1996 - Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems. *Canadian Journal of Botany* 74, 1883-1889
- Sýkorová Z, Ineichen K, Wiemken A, Redecker D. 2007 - The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in root from the field, from biat plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza* 18, 1-14
- Tang F, White JA, Charvat I. 2001 - The effect of phosphorus availability on arbuscular mycorrhizal colonization on *Typha angustifolia*. *Mycologia* 93, 1042-1047
- Tawaraya K, Takaya Y, Turjaman M, Tuah SJ, Limin SH, Tamai Y, Cha JY, Wagatsuma T, Osakid M. 2003 - Arbuscular mycorrhizal colonization of tree species grown in peat swamp forests of Central Kalimantan, Indonesia. *Forest Ecology and Management* 182, 381-386
- Tewari DN. 2007 - *Jatropha* and Biodiesel. Ocean Books Ltd, New Delhi
- Thomas GW. 1996 - Soil pH and soil acidity. In: J.M. Bigham (ed) *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods, Part 3 Soil Science Society of America Book Series No.5. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin*, pp 475-490
- Treseder KK, Allen MF. 2002 - Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: a model and field test. *New Phytologist* 155, 507-515

- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 1998 - Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 69-72
- Walker C. 1992 - Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomalea)- a possible way forward. *Agronomie* 12, 887-897
- Wang MY, Hu LB, Wang WH, Liu ST, Li M, Lui RJ. 2009 - Influence of Long-Term Fixed Fertilization on Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Pedosphere* 19, 663-672
- Weravart N. 2003 - Genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi infected *Acacia mangium* Willd. Ph.D. Thesis, Suranaree University, Nakornratchaseema, Thailand
- Wongmo J. 2008 - Influences of arbuscular mycorrhizal fungi on different food crops. Ph.D. Thesis, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
- Youpensuk S, Lumyong S, Dell B, Rerkasem B. 2004 - Arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of *Macaranga denticulata* Muell. Arg. and their effect on the host plant. *Agroforestry Systems* 60, 239-246
- Zhang XH, Zhu YG, Wang YS, Lin AJ, Chen BD, Zhang MQ 2006 - Effect of long-term fertilization on the diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in Northeast China. *Acta Ecologica Sinica/Shengtai Xuebao* (in Chinese). 26, 3081-3087
- Zhao D, Zhiwei Z. 2007 - Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the hot-dry valley of the Jinsha River, southwest China. *Applied Soil Ecology* 37, 118-128
- Zhao ZW, Wang GH, Yang L. 2003 - Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a tropical rainforest of Xishuangbanna, southwest China. *Fungal diversity* 13, 233-242