



ส ก ว
T R F

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพัฒนาไมคอร์ไรซาเพื่อเกษตรอินทรีย์

Development of Mycorrhizal for Sustainable Land Use

โดย ศาสตราจารย์ ดร.สายสมร ล้ายอง และคณะ

ตุลาคม 2552



สัญญาเลขที่ DBG4980004

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนามายคอร์ไรซาเพื่อเกษตรอินทรีย์

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

248946

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 สังกมของ 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 ที่เหมาะสมกับสบูดำ โดยใช้กล้าสบูดำซึ่งปลูกในดินฆ่าเชื้อ ช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม 2008 ทดสอบกับหัวเชื้อ AMF ท้องถิ่น 8 ชนิด จำนวน 100 สปอร์ ต่อ 1 กล้าสบูดำ และวัดค่าการเจริญเติบโต (ความสูงลำต้น, เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น, น้ำหนักสดของลำต้น) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการเร่งการเจริญของสบูดำสูงสุดคือ *Scutellospora* sp. CMU33

ผลของความหนาแน่นของสปอร์ต่อการเจริญของสบูดำ 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 ทำให้กล้าสบูดำมีการเจริญสูงสุดในสภาวะทดลอง

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 (Mycostar®) และชุดควบคุม ปริมาณสปอร์ที่พีชได้รับเริ่มต้น (50 และ 200 สปอร์) ให้ผลไม่แตกต่างกัน

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

ที่สุด ในขณะที่สามารถเพิ่มปริมาณสปอร์ *Ac. morrowiae* ได้ดีที่สุดในช่วงฟาง 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 ปะคะ (*Macaranga denticulata*) เพื่อหาเชื้อที่เหมาะสม พบว่า การติดเชื้อในรากสูง (60%-100%) ยกเว้นในข้าวไร้ ดินที่ใส่ฟอสฟอรัส 30 กก./เฮกเตอร์ มีปริมาณสปอร์น้อยกว่าในดินที่ใส่ 3 กก./เฮกเตอร์ จากการวิจัยนี้เชื้อราในสกุล *Acaulospora* เป็นชนิดเด่น แต่ทุกสกุลสามารถเพิ่มน้ำหนักยอดและรากของพืชทุกชนิดโดยเฉพาะเมื่อปลูกในดินที่มีฟอสฟอรัสต่ำ

พืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า

ทำการสำรวจความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซา และความสัมพันธ์ของ AMF กับพืชท้องถิ่นในป่าเขตร้อนของอุทยานแห่งชาติคอยสุเทพ-ปุย ทางภาคเหนือของประเทศไทย แยกสปอร์จากดินและจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะพื้นฐานวิทยา 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 เด่นจากพืชที่ใช้ปลูกป่า (*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 หญ้ารูซี่ และข้าวฟ่าง เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า พืชอาศัยทั้งหมด สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ของ AMF ทุกชนิดได้น้อย โดยข้าวฟ่างสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Glomus* sp., *Scutellospora* sp. และ Mycostar[®] ได้มากกว่าต้นเดือยและหญ้ารูซี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่เปอร์เซ็นต์การเข้ารากของเชื้อต่ำ

การเพิ่มจำนวนสปอร์ในวัสดุเก็บกัก ทดสอบโดยใช้เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 2 ชนิด ได้แก่ *Glomus etunicatum* และ *Scutellospora* sp. ใช้สปอร์ชนิดละ 50 สปอร์เป็นหัวเชื้อ สำหรับปลูกพืชอาศัย 2 ชนิด ได้แก่ เบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium*) และหญ้ากินนีสีม่วง (*Panicum maximum* TD58) ศึกษาเก็บวัสดุปลูก 3 ชนิด ได้แก่ พีทขี้เถ้า (2000 ml.), ดินผสมทรายในอัตราส่วน 1:1 ขี้เถ้า และดินผสมทรายและเพอร์ไลต์อัตราส่วน 1:0.5:0.5 ขี้เถ้า ทดลอง 3 เดือนจำนวน 12 ชุดการทดลอง การทดลองละ 4 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design พบว่าหญ้ากินนีสีม่วงที่ปลูกใน 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

248946

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*, *HinfI*, 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 “การพัฒนามายคอร์ไรซาเพื่อเกษตรอินทรีย์” มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูล่ามายคอร์ไรซา (AMF) ในพืชเป้าหมาย ซึ่งประกอบด้วย พืชที่ใช้สำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (สบู่ดำ), พืชเครื่องดื่ม (กาแฟ), พืชอาหาร (ข้าวไร่, ข้าวฟ่าง, ข้าวโพด, ลูกเดือย, ถั่วพุ่ม และปะดะ) และพืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอณูชีววิทยาในการบ่งบอกชนิดของเชื้อรา 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 มีลักษณะทางอณูชีววิทยาใกล้เคียงกับ *Scutellospora heterogama* ส่วนเชื้อที่สามารถเพิ่มการเจริญของกล้ากาแฟได้ดี 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 และหญ้ารัฐ พบว่า ข้าวฟ่างมีเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากมากที่สุด รองลงมาคือต้นเดือยและหญ้ารัฐ และดินที่ปลูกข้าวฟ่าง

ก็มีจำนวนสปอร์มากที่สุดรองลงมาคือดินเคียวและหญ้าธูซี่เช่นกัน ดังนั้นในพืชตระกูลหญ้าทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาทดสอบ ข้าวฟ่าง เป็นพืชอาศัยเพื่อเพิ่มปริมาณสปอร์ของ AMF ที่ดีที่สุด

พืชอาศัยที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณสปอร์ คือ ข้าวฟ่าง และข้าวโพด เมื่อทดสอบเปรียบเทียบกับ ข้าวไร้ ดินเคียว และดาวเรือง การใช้ดินผสมทรายและเพอร์ไลต์ในอัตราส่วน 2:1:1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุที่มีศักยภาพสูงกว่าในการเก็บกักสปอร์ของ *G. etunicatum* เมื่อเปรียบเทียบกับ พีทฆ่าเชื้อ 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 – สบู่ดำ	13
พืชเครื่องคั้น – กาแฟ	19
พืชอาหาร ธัญพืช และถั่วกินเมล็ด	22
พืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า	23
การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสปอร์ AMF และการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการเก็บกักสปอร์ AMF	25
ผลการวิจัย	
พืชที่ใช้ผลิต biofuel – สบู่ดำ	27
พืชเครื่องคั้น – กาแฟ	40
พืชอาหาร ธัญพืช และถั่วกินเมล็ด	50
พืชท้องถิ่นที่ใช้ในการปลูกป่า	53
การคัดเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสปอร์ AMF และการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการเก็บกักสปอร์ AMF	62
สรุปผลการวิจัย	65
เอกสารอ้างอิง	68

	หน้า
ผลสัมฤทธิ์	77
ภาคผนวก	80