

ทำการศึกษาโครงสร้างชุมชนของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากและดินรอบรากของสักและกฤษณาจากสวนป่าในประเทศไทย เพื่อให้เข้าใจว่าชุมชนของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ปรากฏในรากและดินรอบรากแปรผันตามชนิดของพืชอาศัยและแหล่งที่ศึกษาหรือไม่ โดยทำการแยกความแตกต่างของลำดับเบสของชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวน ด้วยวิธี Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) ร่วมกับการทำโคลน (clone libraries) พบว่าองค์ประกอบชุมชนของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในสักและกฤษณามีความคล้ายคลึงกัน พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมด 38 ชิ้นส่วน โดย 31 ชิ้นส่วนพบทั้งในสักและกฤษณา ชุมชนของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในตัวอย่างสักที่เก็บมาจากแหล่งต่างกัน มีความคล้ายคลึงเช่นเดียวกับในกฤษณา จำนวนชนิดของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่น้อยที่สุดโดยเฉลี่ยต่อตัวอย่างของรากและดินจากสักเท่ากับ 1.89 และ 2.55 ตามลำดับ และในกฤษณา เท่ากับ 2.85 และ 2.33 ตามลำดับ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมดบ่งบอกได้ว่าเป็นเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่อยู่ในตระกูล *Claroideoglomeraceae* *Diversisporaceae* *Gigasporaceae* และ *Glomeraceae* ตระกูลเด่นคือ ตระกูล *Glomeraceae* พบได้ในทุกแหล่งที่ศึกษา ความจำเพาะของชนิดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากและดินรอบรากไม่ได้รับผลกระทบจากชนิดของพืชอาศัยและแหล่งของตัวอย่าง (รากและดิน) แต่ได้รับผลกระทบจากแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

การทดลองเบื้องต้นถึงผลการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการส่งเสริมการเจริญของกฤษณาและสัก พบว่าต้นกล้าสักจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการตอบสนองการเจริญที่ดีต่อการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามากกว่าการไม่ปลูกเชื้อ ต้นกล้าสักที่ปลูกด้วยเชื้อ *Claroideoglossum etunicatum* PBT03 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ *C. etunicatum* NNT10, *Entrophospora colombiana* และต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อตามลำดับ ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนใบและความกว้างของใบระหว่างชุดการทดลอง ในส่วนของกฤษณาไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในด้านความสูง จำนวนใบและความกว้างของใบระหว่างต้นที่ได้รับการปลูกเชื้อและต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ ในการทดลองเพื่อยืนยันผล ต้นกล้าสักมีความสูงมากที่สุดเมื่อปลูกด้วยเชื้อ *C. etunicatum* PBT03 ตามด้วย *C. etunicatum* NNT10, *Funneliformis mosseae* RYA08, *E. colombiana* CMU05 และต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ตามลำดับ เมื่อทำการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในระบบปลอดเชื้อเป็นผลทำให้เกิดการสร้างเส้นใยใหม่ของเชื้อรา *G. intraradices* และ *F. mosseae* RYA08 จากเนื้อเยื่อรากแครอทตั้งต้น และการงอกของสปอร์ *C. etunicatum* NNT10 และ *C. etunicatum* PBT03 ส่วนต้นกล้าสักที่ปลูกเชื้อด้วย *F. mosseae* RYA08 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ *G. intraradices*, *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03 และต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ การปลูกเชื้อ *G. intraradices* มีผลต่อน้ำหนักสดของลำต้น แต่ให้ผลน้ำหนักแห้งของลำต้นเป็นรอง

จากเชื้อ *F. mosseae* RYA08 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในจำนวนใบและน้ำหนักสดของรากระหว่างต้นที่ได้รับและต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ทำการเพิ่มจำนวนสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03 และ *F. mosseae* RYA08 โดยใช้วัสดุปลูก (ดินผสมทรายฆ่าเชื้อเองหรือผสมในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตรโดยปริมาตร กับเม็ดอิฐดินเหนียว ขี้เถ้าแกลบ หรือเวอร์มิคูไลท์) และพืชอาศัย (ไมยราบไร้หนาม ข้าวฟ่าง หรือข้าวโพดหวาน) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอัตราการเข้าสู่รากและจำนวนสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละสายพันธุ์ ได้รับผลกระทบจากพืชอาศัยและวัสดุปลูก จำนวนสปอร์และอัตราการเข้าสู่รากโดยรวมมีปริมาณมากที่สุด เมื่อปลูกร่วมกับข้าวโพดหวาน (3,690 สปอร์/ 100 ซม³ และการเข้าราก 65%) และเมื่อใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุผสม (3,612 สปอร์/ 100 ซม³ และการเข้าราก 63%) ทำการประเมินประสิทธิภาพของปุ๋ยเศษซากใบไม้ที่หาได้ในท้องถิ่น ซึ่งใช้เป็นส่วนผสมของวัสดุปลูกในการเพิ่มจำนวนสปอร์แบบฟาร์มโดยใช้หัวเชื้อที่ได้จากการปลูกในการทดลองแรก ทำการเพิ่มจำนวนสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในแบบฟาร์มด้วย หอมหัวใหญ่ หูบาร์เฮีย ดาวเรืองฝรั่งเศส และข้าวโพดหวาน พบว่าข้าวโพดหวานปลูกในปุ๋ยเศษซากใบไม้ที่ผสมด้วยเวอร์มิคูไลท์ให้จำนวนสปอร์มากกว่าการใช้พืชอาศัยอื่น สำหรับการเพิ่มจำนวนสปอร์แบบปลอดเชื้อโดยใช้สปอร์ที่ทำให้งอกก่อนปลูกกับรากแครอทตัดแปลงพันธุกรรม พบว่าสปอร์ *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03, *F. mosseae* RYA08 และ *G. intraradices* งอกในอาหารทั้ง minimal medium (M) และ modified Strullu Romand (MSR) medium โดยพบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์มากในอาหาร MSR ซึ่งวัดจากความยาวของเส้นใยของแต่ละสปอร์ที่งอกและเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ จากการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของ *G. intraradices* มีมากกว่าสปอร์ชนิดอื่น เส้นใยของ *G. intraradices* และ *F. mosseae* แผ่กระจายไปโดยทั่วอาหารเพาะเลี้ยงในจานและสร้างสปอร์ใหม่ภายใน 14 และ 24 วัน ตามลำดับ หลังจากการปลูกเชื้อ *C. etunicatum* PBT03 และ *C. etunicatum* NNT10 สร้างเพียงเส้นใยแต่ไม่แผ่กระจายเส้นใยไปทั่วอาหารเพาะเลี้ยงและไม่สร้างสปอร์ภายในเวลา 5 เดือนหลังจากการปลูกเชื้อ

การทดลองด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) มีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามการเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกในต้นกล้าสักที่ได้รับการปลูกเชื้อ สกัดดีเอ็นเอจากรากสักอายุหนึ่งปีหลังการปลูกเชื้อ และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จำเพาะกับเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสองคู่คือ AML1-AML2 และ NS31-GC/AM1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากรากที่มีการเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสควบคู่กับ DGGE สองซ้ำ เพื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้ รูปแบบ DGGE

ไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างซ้ำของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบ
ใช้ไพรเมอร์สองคู่ การวิเคราะห์ DGGE ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไพรเมอร์ NS31-GC/AM1 ให้รูปแบบ
แถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 10–18% ของสารทำให้ผิดธรรมชาติ ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนจากสปอร์
อ้างอิงให้แถบ DGGE ที่คมชัดและเข้มอย่างเห็นได้ชัดในช่วง 10–12% ของสารทำให้ผิด
ธรรมชาติ แถบ DGGE ชนิดเด่นของรากผักที่ได้รับการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเป็นเวลา
หนึ่งปีก็พบในช่วงดังกล่าวเช่นกัน โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 2-3 แถบ รวมทั้งในรากผักที่
ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ แถบ DGGE จากสปอร์อ้างอิงและรากผักที่เคลื่อนที่มายังตำแหน่งเดียวกันจะถูก
เพิ่มจำนวนดีเอ็นเออีกครั้งและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HinfI และ Hsp92II เพื่อยืนยันชนิดเชื้อรา
อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แน่นอนในรากที่ได้รับการปลูกเชื้อ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารูปแบบ
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างของ
ชนิดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาซึ่งเคยปลูกเชื้อให้กับรากผักได้อย่างแน่นอน อย่างไรก็ตาม
รูปแบบดังกล่าวสามารถประมาณได้ว่าชนิดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่เป็นไปได้ในรากผักจาก
แต่ละชุดการทดลองมีแนวโน้มที่จะเป็น *C. etunicatum* เมื่อเปรียบเทียบจากรูปแบบ RFLP จากการ
ตัดด้วยสองเอนไซม์

คำสำคัญ กลูขมิ้น เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ชุมชน ความหลากหลาย การส่งเสริมการ
เจริญ การเพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อ การเพิ่มจำนวน สัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Application of Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Growth Enhancement of <i>Tectona grandis</i> Linn.f. and <i>Aquilaria crassna</i> Pierre ex Lec.	
Author	Ms. Amornrat Chaiyasen	
Degree	Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)	
Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Advisor
	Prof. Dr. J. Peter W. Young	Co-advisor
	Prof. Dr. Neung Teaumroong	Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Paiboolya Gavinlertvatana	Co-advisor

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungal diversity was assessed in 8 plantations of *Aquilaria crassna* and *Tectona grandis*, endangered tree species and quality timber, respectively. Microscopic analyses were used to assess root colonization percentage and number of AM fungal morphotypes in soil samples. Soil samples were analyzed for chemical properties and glomalin-related soil protein content. *Tectona grandis* roots had greater AM fungal colonization than *A. crassna* roots, 77–91% vs. 44–79% of root length, respectively. A total of 29 AM fungal morphotypes were found, representing four families *Glomeraceae* (46.82%), *Acaulosporaceae* (36.38%), *Claroideoglomeraceae* (10.70%), and *Gigasporaceae* (6.10%). The lowest colonization percentage in *A. crassna* was correlated with the lower soil pH in studied areas. AM fungus colonization of *T. grandis* roots was positively correlated with spore density and negatively correlated with easily extractable Bradford reactive soil proteins and soil organic carbon. A positive correlation was observed between AM fungal spore density and total and easily extractable Bradford reactive soil proteins in rhizosphere soils of *A. crassna*, while in *T. grandis* spore density decreased when soil organic carbon and easily extractable Bradford reactive soil proteins increased.

The study of arbuscular mycorrhizal (AM) fungus community structure in roots and rhizosphere soils of *A. crassna* and *T. grandis* from plantations in Thailand was investigated to understand whether AM fungal communities present in roots and rhizosphere soils vary with host plant species and study sites. Terminal restriction fragment length polymorphism complemented with clone libraries revealed that AM fungal community composition in *A. crassna* and *T. grandis* were similar. A total of 38 distinct terminal restriction fragments (TRFs) were found, 31 of which were shared between *A. crassna* and *T. grandis*. AM fungal communities in *T. grandis* samples from different sites were similar, as were those in *A. crassna*. The estimated average minimum numbers of AM fungal taxa per sample in roots and soils of *T. grandis* were at least 1.89 vs. 2.55, respectively, and those of *A. crassna* were at least 2.85 vs. 2.33 respectively. The TRFs were attributed to *Claroideoglomeraceae*, *Diversisporaceae*, *Gigasporaceae* and *Glomeraceae*. The *Glomeraceae* were found to be common in all study sites. Specific AM taxa in roots and soils of *T. grandis* and *A. crassna* were not affected by host plant species and sample source (root vs. soil) but affected by collecting site.

In preliminary experiment of AM fungal inoculation on growth enhancement of *A. crassna* and *T. grandis*, *T. grandis* plantlets had the best growth response to AM fungal spore inoculation than uninoculated plantlets. *Tectona grandis* plantlets inoculated with *Claroideoglomus etunicatum* PBT03 had highest height followed by *C. etunicatum* NNT10, *E. colombiana* and uninoculated plantlets, respectively. There were no significant differences in the number of leaf and width of leaf among the treatments. In *A. crassna*, there was no significant difference in height, number of leaf, and wideness of leaf between inoculated and uninoculated plantlets between treatments. In confirmation experiment, *T. grandis* plantlets had greatest height when inoculating with *C. etunicatum* PBT03 followed by *C. etunicatum* NNT10, *F. mosseae* RYA08, *E. colombiana* CMU05, and uninoculate control, respectively. The *in vitro* inoculation method resulted in the regrowth of AM fungal hyphae from initial inoculating root organ culture of *G. intraradices* and *F. mosseae* RYA08, and spore germination of *C. etunicatum* NNT10 and *C. etunicatum* PBT03. *Tectona grandis* plantlets inoculated with *F. mosseae* RYA08 had highest plant height follow by *G. intraradices*,

C. etunicatum NNT10, *C. etunicatum* PBT03, and uninoculated plant, respectively. Inoculation with *G. intraradices* was affected on shoot wet weight but gave low shoot dry weight inferior to *F. mosseae* RYA08. There was no significant difference of the number of leaves and root wet weight between inoculated and uninoculated plantlets.

AM fungal spores of *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03 and *F. mosseae* RYA08 were propagated using different culture materials (sterile sandy soil by itself or mixed 1:1 (v/v) with clay-brick granules, rice husk charcoal, or vermiculite) and host plants (*Mimosa invisa*, *Sorghum bicolor* or *Zea mays*). Results indicated that root colonization and number of spores of each AM fungus isolate were affected by host plant and substrate. Total AM fungal spores and percentage of root length colonized were highest when cultured with *Z. mays* (3,690 spores 100 cm⁻³ and 65% root length colonized) and when vermiculite was used as diluent (3,612 spores 100 cm⁻³ and 63% root length colonized). Inocula produced in the first experiment were used to evaluate the efficiency of locally-available leaf litter compost as a component of media for on-farm inoculum production. Subsequent on-farm production of mycorrhizal fungus was propagated with *Allium cepa*, *Paspalum notatum*, *Tagetes patula* and *Z. mays*. The results showed that spore production with *Z. mays* in leaf litter compost mixed with vermiculite was considerably higher than that with other host plants. For *in vitro* production, pre-germinated spore experiment showed germination of *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03, *F. mosseae* RYA08, and *G. intraradices* both on M and MSR medium. Germination percentages of most spore species tend to be higher in MSR medium measuring from hyphal length of individual germinated spore and percentage of spore germination. Germination percentage of *G. intraradices* was higher than those in other species. *Glomus intraradices* and *F. mosseae* RYA08 hyphae were spreaded throughout the Petri plates and produced new spores successfully after 14 and 24 days of inoculation, respectively. *Claroideoglomus etunicatum* PBT03 and *C. etunicatum* NNT10 were produced only hyphae but not spread throughout the media and no new spores were produced at 5 months after inoculation.

The denaturing gradient gel electrophoresis experiment (DGGE) was performed to investigate selected AM fungal spores colonization in inoculated *T. grandis* plantlets.

One year-old after AM fungal inoculation of *T. grandis* roots were used to extract DNA and nested amplified with AM fungal specific primers, AML1–AML2 and NS31–GC/AM1. Analysis of AM fungal colonized root by polymerase chain reaction–DGGE was performed in duplicate to check specificity of primers used in this experiment. No distinguishable difference in DGGE pattern was observed between two replicates of polymerase chain reaction (PCR) production after nested PCR. The DGGE analysis of the NS31–GC/AM1 primer products yielded banding patterns within the range of 10–18% denaturant. Amplified DNA from reference fungal spores yielded distinguishable dominant band with sharp and intense DGGE bands within the range of 10–12% denaturant. Dominant DGGE of one year-old AM fungal inoculated *T. grandis* roots were also showed in those denaturing gradient ranging from 2–3 bands even in uninoculated roots. The DGGE bands from reference spores and *T. grandis* roots which immigrated into the same denaturing gradient were reamplified and digested with restriction enzymes, HinfI and Hsp92II to confirm certain AM fungal species inside inoculated roots. The result showed that restriction fragment length polymorphism (RFLP) pattern could not identify the different of certain AM fungal species that have been inoculated into *T. grandis* roots. However, those patterns could estimate that the possible AM fungal species inside all roots from each treatment tend to be *C. etunicatum* when comparing RFLP patterns from both restriction enzyme digestions.

Key words: *Aquilaria crassna*, arbuscular mycorrhizal fungi, community, diversity, growth enhancement, *in vitro* culture, propagation, *Tectona grandis*