Thesis Title Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Related to Indigenous Plants of Doi Suthep-Pui National Park and Their Potential Use as Inoculum on *Castanopsis acuminatissima*

Author Acting Sub Lt. Patipan Nandakwang

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Chairperson
Dr. Stephen Elliott	Member
Dr. Somchit Youpensuk	Member
Assoc. Prof. Dr. Neung Teaumroong	Member

ABSTRACT

Diversity of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and their associations were surveyed in indigenous plant species in the seasonally dry tropical forests of Doi Suthep-Pui National Park in northern Thailand. Twenty four tree species (19 families) selected for their potential to accelerate forest restoration, and 11 dominant herb species (5 families) were examined to determine the prevalence of AM colonization. The trees were examined at 3 sites: Forest Restoration Research Unit (FORRU)'s research tree nursery (FN), forest restoration plots (FR) and natural evergreen forest (NF). The herbs were examined at 2 sites: a degraded watershed (DW) and a forest

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

soil extraction area (FS). Representative rhizosphere soil samples were collected and AM spores present were counted and identified morphologically. Most plant species were intensively colonized with AM fungi except *Cyperus cyperoides*. Twenty four indigenous AM species were isolated and identified: 15 in the genus *Glomus*, 6 in *Acaulospora* and 3 in *Scutellospora*. *Glomus rubiforme* was the most common species. Spore densities in the rhizospheres of herbs at the DW and FS sites were 16 and 80 spores 100 g^{-1} soil, respectively, with species richness of AM fungi 6 and 8 species, respectively. The spore densities in the rhizospheres of trees at the FN, FR and NF sites were 48, 97 and 57 spores 100 g^{-1} soil, respectively, with species richness of AM fungi 17, 21 and 15 species, respectively. In the degraded area, reduced AM population and diversity were related with reduced plant diversity. In contrast, the forest restoration plots had the highest spore number and species richness of AM fungi.

Glomus mosseae was selected to confirm with molecular identification. DNA extracted from multiple spores (500 spores) of *G. mosseae* was successfully obtained by repeated freezing-heating cycles. AM fungal DNA extracted from multiple spores was contained with DNA contaminants. DNA extract could be directly used for one-step PCR technique. rDNA fragment (approximately 650 bp) amplified with primers: ITS4 and LETC1670, was consistence with expected size of *G. mosseae* rRNA genes (approximately 640 bp). However, sequences of rRNA genes analyzed by directly sequencing of purified PCR product did not match with *G. mosseae* sequences. Therefore, the techniques should be improved.

Castanopsis acuminatissima is one of many potential tree species planted to restore the tropical forest in northern Thailand. The effects of applying AM inoculum

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

together with phosphate fertilizer (KH_2PO_4), on the performance of *C. acuminatissima* seedlings in a P-deficient soil medium were studied under greenhouse conditions for 6 months. The pot experiment included 6 P-application rates (0 to 250 mg kg^{-1} medium), combined with 5 AM treatments (non-AM control, *A. elegans, G. etunicatum, G. mosseae* and mixed AM species). Sizes of seedlings were increased by AM inoculum and fertilizer. The highest plant was observed from the *G. etunicatum*-colonized plants with 250 mg kg^{-1} application (40.8 cm), whereas much lower plant height was significantly achieved with non-AM plants without P added (14.4 cm). The mycorrhizal effect on *C. acuminatissima* in previous experiments was also confirmed by growing seedlings in plastic bags filled with forest soil medium with or without slow-release fertilizer (375 mg kg^{-1} medium NPK 14-14-14) and combined with 5 AM treatments under nursery performance conditions for 6 months. Sizes of seedlings were significantly enhanced by fertilizer, but not by AM inoculum, except stem diameter was enhanced by both factors. The greatest plant height was found in non-AM plants with fertilization (14.5 cm), whereas lowest plant height was found for non-AM plants with no fertilizer added (10.9 cm). These results suggest that AM inoculum greatly enhanced sizes of *C. acuminatissima* seedlings in low P soil due to ability of AM fungi to establish a mycorrhizal symbiosis.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาที่สัมพันธ์กับพืชท้องถิ่นของอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุยและประโยชน์ของหัวเชื้อมายคอร์ไรซาที่มีต่อ *Castanopsis acuminatissima*
ผู้เขียน	ว่าที่ ร.ต. ปฏิพันธ์ นันทขว้าง
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. สายสมร ลำยอง ประธานกรรมการ ดร. สตีเฟน อิลเลียตต์ กรรมการ ดร. สมจิตร อยู่เป็นสุข กรรมการ รศ. ดร. หนึ่ง เตียอำรุง กรรมการ

บทคัดย่อ

ได้ทำการสำรวจความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาและความสัมพันธ์ของมายคอร์ไรซากับพืชท้องถิ่นในป่าเขตร้อนของอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุยทางภาคเหนือของประเทศไทย ตรวจหาการติดเชื้อของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาในไม้ยืนต้น 24 สปีชีส์ (19 แฟมิลี) ที่คัดเลือกจากความสามารถในการฟื้นฟูป่า และ พืชล้มลุก 11 สปีชีส์ (5 แฟมิลี) ซึ่งเป็นชนิดเด่นในพื้นที่ พื้นที่ศึกษาไม้ยืนต้นที่คัดเลือก 3 บริเวณ ได้แก่ เรือนเพาะชำกล้าไม้ของหน่วยวิจัยการฟื้นฟูป่า (FN) พื้นที่ฟื้นฟูป่า (FR) และ ป่าไม้ไม่ผลัดใบในธรรมชาติ (NF) ส่วนพื้นที่ศึกษาพืชล้มลุกชนิดเด่น 2 บริเวณ ได้แก่ พื้นที่ต้นน้ำที่ถูกทำลาย (DW) และ แหล่งดินจากป่าธรรมชาติ (FS) นำตัวอย่างดินรอบรากพืชมาตรวจนับสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาและบ่งบอกชนิดตามสัณฐานวิทยา จากการศึกษา พบว่า พืชส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา ยกเว้น *Cyperus cyperoides* พบ เชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา 24 สปีชีส์ ได้แก่ *Glomus* 15 สปีชีส์ *Acaulospora* 6 สปีชีส์ และ *Scutellospora* 3 สปีชีส์ ซึ่งสปีชีส์ที่พบได้โดยทั่วไป ได้แก่ *G. rubiforme* ความหนาแน่นของสปอร์รอบรากพืชล้มลุกในบริเวณ DW และ FS มีค่าเท่ากับ 16 และ 80 สปอร์ ต่อ ดิน 100 กรัม ตามลำดับ และพบจำนวนสปีชีส์ของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา 6 และ 8 สปีชีส์ ตามลำดับ ส่วนความหนาแน่นของสปอร์รอบรากไม้ยืน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต้นในบริเวณ FN, FR และ NF มีค่าเท่ากับ 48, 97 และ 57 สปอร์ ต่อ ดิน 100 กรัม ตามลำดับ และพบจำนวนสปีชีส์ของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา 17, 21 และ 15 สปีชีส์ ตามลำดับ การลดลงของประชากรและความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซามีความสัมพันธ์กับการลดลงของความหลากหลายของพรรณพืชในพื้นที่ที่ถูกทำลาย ในพื้นที่ป่าฟื้นฟูพบจำนวนสปอร์และจำนวนสปีชีส์ของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซามากที่สุด

ได้ทำการยืนยันชนิดของ *Glomus mosseae* โดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยา นำสปอร์ (จำนวน 500 สปอร์) ของ *G. mosseae* มาสกัด ดีเอนเอ โดยเทคนิคการทำซ้ำเหยือกแข็งสลับกับการละลาย พบว่า ดีเอนเอ ของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาที่สกัดได้จากสปอร์มีการปนเปื้อน แต่ ดีเอนเอ ที่สกัดได้สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงกับเทคนิคพีซีอาร์แบบขั้นตอนเดียว และการใช้ไพรเมอร์ ITS4 และ LETC1670 สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของไรโบโซมอล ดีเอนเอ ได้ (ประมาณ 650 คู่เบส) โดยมีขนาดตรงกับจีนของ ไรโบโซมอล อาร์เอนเอ ของ *G. mosseae* (ประมาณ 640 คู่เบส) แต่เมื่อนำ ไรโบโซมอล ดีเอนเอ ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ลำดับเบสโดยตรง พบว่า ผลของลำดับเบสที่ได้ไม่ตรงกับลำดับเบสของ *G. mosseae* ดังนั้น เทคนิคที่ใช้ควรต้องมีการปรับปรุง

ก่อเดือย (*Castanopsis acuminatissima*) เป็นไม้ยืนต้นชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการฟื้นฟูป่าเขตร้อนทางภาคเหนือของไทย ได้มีการศึกษาผลของการใช้หัวเชื้ออาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาร่วมกับการให้ปุ๋ยฟอสเฟต (KH_2PO_4) ต่อต้นกล้าก่อเดือยที่ปลูกในดินที่ขาดแคลนฟอสฟอรัสในสภาพเรือนกระจกเป็นเวลา 6 เดือน โดยการทดลองในกระถางประกอบด้วย 6 อัตราของการให้ปุ๋ยฟอสฟอรัส (0 ถึง 250 มก. ต่อ กก. ของวัสดุปลูก) ร่วมกับ 5 ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา (ชุดควบคุมไม่ใส่เชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา, ใส่เชื้อ *A. elegans*, *G. etunicatum*, *G. mosseae* และ เชื้อผสมของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา) พบว่า การใส่หัวเชื้ออาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาและการให้ปุ๋ยช่วยเพิ่มขนาดของต้นกล้า ความสูงของต้นกล้าก่อเดือยที่ใส่เชื้อ *G. etunicatum* ร่วมกับการให้ปุ๋ย 250 ม.ก. ต่อ ก.ก. ของวัสดุปลูก มีความสูงมากที่สุด (40.8 ซม.) ใน ขณะที่ พืชที่ไม่ใส่เชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาและไม่ให้ปุ๋ยมีความสูงน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (14.4 ซม.) ผลของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาที่มีต่อก่อเดือยได้นำมาทดสอบยืนยันอีกครั้งโดยปลูกต้นกล้าในถุงพลาสติกที่มีดินจากป่าเป็นวัสดุปลูก ร่วมกับการใส่หรือไม่ใส่ปุ๋ยชนิดละลายช้า (NPK 14-14-14) (375 ม.ก. ต่อ ก.ก. ของวัสดุปลูก) ร่วมกับ 5 ชุดการทดลองที่ใส่เชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา ในสภาพการปฏิบัติของเรือนเพาะชำ เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า ขนาดของต้นกล้าเป็นผลจากการให้ปุ๋ยแต่ไม่ขึ้นกับการใส่หัวเชื้ออาร์บัสคูลามายคอร์ไรซา ยกเว้นเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นเป็นผลจากทั้งสองปัจจัย พืชที่ไม่ใส่เชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไรซาแต่ให้ปุ๋ยมีความสูงมากที่สุด (14.5 ซม.) ในขณะที่พืชซึ่งไม่ใส่เชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาและไม่ให้ปุ๋ยมีความสูงน้อยที่สุด (10.9 ซม.) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การใส่หัวเชื้ออาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาช่วยส่งเสริมขนาดของต้นกล้าก่อเดือยซึ่งปลูกในดินที่มีฟอสฟอรัสต่ำ ซึ่งเป็นผลจากความสามารถของเชื้อราอาร์บัสคูลามายคอร์ไรซาในการสร้างความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันของมายคอร์ไรซา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved