Thesis Title Biodiversity and Beneficial Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Associated with Physic Nut (*Jatropha curcas* L.), a Potential Biofuel Plant in Thailand

Author Miss Supattra Charoenpakdee

Degree Doctor of Philosophy (Biodiversity and Ethanology)

Thesis Advisory Committee Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Chairperson

Prof. Dr. Bernard Dell Member

Assoc. Prof. Dr. Somporn Choonluchanon Member

ABSTRACT

This thesis explores biodiversity and the association of mycorrhizal fungi with the biofuel crop plant known as physic nut (*Jatropha curcas* L.).

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 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 ranged from 0.28 to 0.86 (average 0.64) 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.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Terminal restriction frangment 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 due to the proximity of physic nut stands to Chiang Mai University. Forty randomized samples of rhizosphere soil and root samples from physic nut were collected from six sites in April, 2008 and 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 (in full first time here as for T-RFLP) using three restriction enzymes (*Taq*I, *Hinf*I, and *Hsp*96). *Taq*I revealed the strongest differences 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 replicates. Corn (*Zea mays* L.), jobs tears (*Coix lacryma-jobi* L.), rice (*Oryza sativa* L.), and sorghum (*Sorghum bicolor* L.) 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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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.

From spore morphology, CMU05 was determined to belong to either *Entrophospora* or *Acaulospora* and CMU33 to *Scutellospora*. Fifty 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 the 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 Trees 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. Some AMF species significantly increased biomass of seedlings (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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

completely randomized factorial design consisting of of 4 spore densities (0, 50, 100, 200 spores per plant) x 4 phosphorus level (0, 50, 100, 200 mg P/kg of soil) x 4 replicates. It was found that 100 spores of *Scutellospora* sp. CMU33 togather with 100 mg P/kg of soil was optimum for improving the growth of physic nut seedlings in a greenhouse trial.

Overall, the research findings indicate that physic nut is heavily colonized by a small number of AMF in the field. However, the dependency of physic nut on AMF for survival, growth and oil production on marginal site in Thailand remains to be determined. Two AMF isolated in this Thesis are suitable candidate for understanding field trails in the future.

Key words: Arbuscular Mycorrhizal Fungi, biodiversity, *Jatropha curcas*, physic nut

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ความหลากทางชีวภาพและผลที่เป็นประโยชน์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาที่สัมพันธ์กับสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) พืชชีวพลังงานที่มีศักยภาพในประเทศไทย
ผู้เขียน	นางสาวสุพัตรา เจริญภักดี
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ความหลากหลายทางชีวภาพและชีววิทยาชาติพันธุ์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ.ดร. สายสมร ลำยอง	ประธานกรรมการ
	ศ.ดร.เบอร์นาร์ด เดล	กรรมการ
	รศ.ดร. สมพร ชุนห์ลือชานนท์	กรรมการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและผลที่เป็นประโยชน์ของราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาที่สัมพันธ์กับสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) พืชชีวพลังงานที่มีศักยภาพในประเทศไทย

สำรวจความหลากหลายทางชีวภาพของราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาที่สัมพันธ์กับสบู่ดำใน 6 จังหวัดภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ เลย ลำพูน ขอนแก่น และหนองคาย ในปี 2549-2550 เก็บตัวอย่างดินรอบรากและรากสบู่ดำ 10 แหล่ง นำมาตรวจหาสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาด้วยวิธีการร่อนเปียกและการหมุนเหวี่ยงโดยอาศัยความแตกต่างของระดับน้ำตาล จำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานของสปอร์พบราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซา 34 ชนิด อยู่ในจีนัส *Acaulospora* 17 สปีชีส์, *Gigaspora* 2 สปีชีส์, *Glomus* 10 สปีชีส์ และ *Scutellospora* 5 สปีชีส์ นอกจากนี้ยังศึกษาค่าดัชนีความหลากหลายทางชีวภาพพบตั้งแต่ 0.28-0.86 (เฉลี่ย 0.64) ความมากชนิดพบตั้งแต่ 3-11 (เฉลี่ย 6.2) และการติดเชื้อในราก พบในสบู่ดำที่มีอายุเพียง 3 เดือน ตั้งแต่ 38-94% งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาเข้าครอบครองรากสบู่ดำได้อย่างรวดเร็วและมีความความหลากหลายทางชีวภาพสูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ศึกษาเปรียบเทียบสังคมราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาในรากและดินบริเวณรอบรากสบู่ดำเป็นครั้งแรก โดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) นำรากและดินบริเวณรอบรากสบู่ดำจำนวน 40 ตัวอย่าง จาก 6 แหล่งในจังหวัดเชียงใหม่เป็นตัวแทนพื้นที่ทดสอบ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างในเดือนเมษายน 2551 จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์จำเพาะ (AM1-NS31 และ FLR3-FLR4) จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ *Taq*I, *Hinf*I และ *Hsp*96 ที่เหมาะสมสำหรับศึกษาสังคมของราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซา พบว่าเอนไซม์ *Taq*I สามารถแสดงแบบแผนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ดีที่สุด สังคมราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาในรากและดินบริเวณรอบรากสบู่ดำมีความหลากหลายและแตกต่างกันชัดเจน ทั้งในแหล่งเก็บตัวอย่างเดียวกันและระหว่างแหล่งเก็บตัวอย่าง ราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาบางชนิดในดินรอบรากสบู่ดำไม่สามารถพบได้ในรากสบู่ดำ

ค้นหาราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาที่อาศัยร่วมกับสบู่ดำได้ดี ทดสอบเดือนกรกฎาคม-กันยายน 2550 ในเรือนทดลอง ปลูกต้นกล้าสบู่ดำที่ปลอดเชื้อซึ่งใช้เป็นพืชอาศัยดักล่อราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาลงในดินรอบรากสบู่ดำที่เก็บจาก 10 แหล่งข้างต้นปริมาณ 500 กรัม จากนั้นใส่ดินผสมทรายที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 1.5 กิโลกรัม ในกระถางพลาสติก ดูแลเป็นเวลา 90 วัน พบราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซา 2 ชนิด ที่สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้มากจากเชียงใหม่แหล่งที่ 1 และเชียงใหม่แหล่งที่ 3 โดยให้ชื่อรหัส คือ CMU05 และ CMU33

ศึกษาพืชอาศัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสปอร์ของรา CMU05 และ CMU33 ทดลองแบบ factorial experiment in Completely Randomized Block design ในเรือนเพาะชำ คือ พืชอาศัย 4 ชนิด × ราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซา 3 ชนิด × กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ โดยนำต้นกล้าข้าวโพด (*Zea mays* L.), ลูกเดือย (*Coix lacryma-jobi* L.), ข้าว (*Oryza sativa* L.) และข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) ที่ปลอดเชื้อปลูกทดสอบร่วมกับเชื้อ CMU05 และ CMU33 อย่างละ 50 สปอร์บนกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว และเปรียบเทียบการเพิ่มสปอร์และการเจริญเติบโตกับชุดควบคุม คือ กระดาษกรองเปล่า นาน 120 วัน แล้วทำการตรวจสอบสปอร์ การเข้าสู่ราก น้ำหนักสดและเปียกของยอดและรากพืชอาศัย พบว่า CMU05 และ CMU33 สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชอาศัยทุกชนิดและเติบโตได้มากกว่าชุดควบคุม โดย CMU05 และ CMU33 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้ในข้าวและข้าวโพด การทดลองนี้พบว่า ข้าวฟ่างเป็นพืชอาศัยที่เหมาะสมที่สุดในการใช้เพิ่มปริมาณและเก็บรักษาสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาทั้ง 2 ชนิด

ศึกษาการบ่งชี้ชนิดของราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาในรากข้าวฟ่างและจากสปอร์ที่เพิ่มปริมาณได้ โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์ร่วมกับการใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล พบว่าลักษณะเส้นใยที่พบในรากไม่สามารถบ่งชี้ชนิดราได้ ส่วนลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

CMU05 ไม่สามารถบ่งชี้จีนัสได้ชัดเจนระหว่าง *Entrophospora* และ *Acaulospora* ส่วน CMU33 สามารถบ่งชี้จีนัสได้คือ *Scutellospora* แต่ไม่สามารถระบุชนิดได้ ดังนั้นจึงทำการบ่งชี้ชนิดต่อด้วยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล โดยสกัดดีเอ็นเอจากสปอร์ของ CMU05 และ CMU33 อย่างละ 50 สปอร์ ตัวอย่างราก 1 กรัม และดินบริเวณรอบราก 1 กรัม และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ NS31-AM1 และ FLR3-FLR4 ในบริเวณ SSU และ LSU rDNA ตามลำดับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สามารถใช้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CMU05 และ CMU33 ใน SSU และ LSU rDNA กับฐานข้อมูลทางพันธุกรรมใน GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน SSU และ LSU rDNA ของ CMU05 มีความคล้ายคลึงกับ *Entrophospora colombiana* ถึง 99% และ 91% ตามลำดับ และ CMU33 มีความคล้ายคลึงกับ *Scutellospora heterogama* ถึง 97% ของดีเอ็นเอทั้งสองส่วน จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของราทั้ง 2 ชนิดมาศึกษาเชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA 4.1 BETA พบว่า CMU05 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *E. colombiana* แต่มีวิวัฒนาการห่างไกลกัน ส่วน CMU33 มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *S. heterogama* มาก

ศึกษาผลของราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาต่อการเจริญของต้นกล้าสบู่ดำ เดือนมกราคม-มีนาคม 2551 ในเรือนทดลอง ใส่หัวเชื้อของราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซา 8 ชนิด อย่างละ 100 สปอร์ต่อกระถาง ปลูกร่วมกับต้นกล้าสบู่ดำ พบว่า หัวเชื้อทุกชนิดสามารถเพิ่มปริมาณชีวมวลของต้นกล้าสบู่ดำ (ความสูง, เส้นรอบวงลำต้น และน้ำหนักสด) ได้ชัดเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใส่เชื้อ และพบว่า *Scutellospora* sp. CMU33 เป็นราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าสบู่ดำในการทดลองนี้

ศึกษาการใช้ราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซาร่วมกับการให้ปุ๋ยฟอสฟอรัส เดือนเมษายน-มิถุนายน 2552 ในเรือนทดลอง ทำการทดลองแบบ factorial experiment in completely randomized design ของปริมาณสปอร์ต่อต้นต่อกระถาง 4 ระดับ (0, 50, 100, 200 สปอร์) × ความเข้มข้นของปุ๋ยฟอสฟอรัสต่อต้นต่อกระถาง 4 ระดับ (0, 50, 100, 200 mg P/kg ของดิน) × กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ นาน 3 เดือนพบว่าการใช้ราอาร์บัสคูลาร์มายคอร์ไรซา 100 สปอร์ ร่วมกับ 100 mg P/kg ของซูเปอร์ฟอสเฟต สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าสบู่ดำได้ดีที่สุด

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางชีวภาพ, สบู่ดำ, อาร์บัสคูลาร์มายคอไรซา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved