

นิพนธ์ต้นฉบับ

การเพิ่มการเติบโตของกล้าไม้ต้นวงศ์ถั่วบางชนิดโดยใช้ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

Growth Promotion of Some Fabaceous Tree Seedlings With an Inoculated of Arbuscular Mycorrhizal Fungi

เพ็ญพิชชา ชูสง่า

ธารรัตน์ แก้วกระจ่าง*

อุทัยวรรณ แสงวนิช

Penpitcha Choosa-nga

Tharnrat Kaewgrajang*

Uthaiwan Sangwanit

คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Faculty of Forestry, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding Author, E-mail: ffortrk@ku.ac.th

รับต้นฉบับ 29 พฤษภาคม 2560

รับลงพิมพ์ 29 มิถุนายน 2560

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on the growth of Fabaceous seedlings, including *Dalbergia cochinchinensis*, *Pterocarpus macrocarpus* and *Xylocarpus xylocarpa*. *Acaulospora* sp.1 and Unknown sp.2 were isolated from soils, which were collected from plantations of those three Fabaceous tree species. For producing fungal inocula, spores of the two AMF were inoculated on maize seedlings for three months. After that, the seedlings of *D. cochinchinensis*, *P. macrocarpus* and *X. xylocarpa* were inoculated using one of four inoculation methods; (1) 50 spores of *Acaulospora* sp.1, (2) 50 spores of Unknown sp.2, (3) 25 spores of *Acaulospora* sp.1 and Unknown sp.2 or (4) non-inoculated control. The results revealed that AMF colonized in 7-month-old inoculated seedlings were 13-55%. Additionally, the inoculation method with *Acaulospora* sp.1 showed the highest colonization. The inoculated seedlings with significantly different inoculations had higher in relative growth rate (RGR) of height and total dry weight than the control seedlings ($P<0.05$). The inoculation method with either 50 spores of *Acaulospora* sp.1 or 25 spores of *Acaulospora* sp.1 + Unknown sp.2 could improve RGR of seedlings and can be applied to produce good quality of the seedlings.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza, Inoculum, growth, *D. cochinchinensis*, *P. macrocarpus*, *X. xylocarpa*

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเติบโตของกล้าไม้ต้นวงศ์ถั่ว ได้แก่ พะยูง ประดู่ป่า และแดง โดยนำ *Acaulospora* sp.1 และ Unknown sp.2 ซึ่งแยกสปอร์มาจากดินแปลงปลูกไม้วงศ์ถั่วทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว หลังจากนั้นสปอร์ของราทั้ง 2 ชนิดไปปลูกเชื้อ (inoculate) ในกล้าข้าวโพดเพื่อผลิตเป็นหัวเชื้อเป็นเวลา 3 เดือน แล้วจึงนำหัวเชื้อไปปลูกเชื้อให้แก่กล้าไม้พะยูง ประดู่ป่า และแดง ด้วยวิธีการปลูกเชื้อ 4 วิธี ได้แก่ (1) ปลูกเชื้อ *Acaulospora* sp.1 50 สปอร์, (2) ปลูกเชื้อ Unknown sp.2 50 สปอร์ (3) ปลูกเชื้อ *Acaulospora* sp.1 + Unknown sp.2 ชนิดละ 25 สปอร์ และ (4) ไม่ปลูกเชื้อ (control) ผลการศึกษาพบว่าหลังจากปลูกเชื้อให้แก่กล้าไม้อายุ 7 เดือน กล้าไม้มีร้อยละการเข้าอยู่อาศัยของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ร้อยละ 13-55 ซึ่งการปลูกเชื้อด้วย *Acaulospora* sp.1 ทำให้กล้าไม้มีร้อยละการเข้าอยู่อาศัยของรามากที่สุด กล้าไม้ที่ปลูกเชื้อวิธีใดก็ตาม มีการเติบโตสัมพันธ์ด้านความสูงและน้ำหนักแห้งมากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งการปลูกเชื้อด้วย *Acaulospora* sp.1 50 สปอร์ และ *Acaulospora* sp.1 + Unknown sp.2 ชนิดละ 25 สปอร์ สามารถทำให้กล้าไม้มีการเติบโตสัมพันธ์ด้านความสูงและน้ำหนักแห้งมากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยทั้งสองวิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มการเติบโตให้กับกล้าไม้ได้โดยไม่แตกต่างกัน

คำสำคัญ: อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา หัวเชื้อ การเติบโต พะยูง ประดู่ป่าแดง

คำนำ

ไม้ต้นวงศ์ถั่ว (Fabaceous tree) หลายชนิดมีเนื้อไม้ที่มีลวดลายและสีสนสวยงาม อาทิ เช่น พะยูง ประดู่แดง ชิงชัน เป็นต้น โดยทั่วไปไม้ต้นวงศ์ถั่วนิยมนำมาทำเฟอร์นิเจอร์ เครื่องกลึงแกะสลัก เครื่องดนตรี และเครื่องใช้ไม้สอยต่างๆ นับได้ว่าไม้ต้นวงศ์ถั่วเป็นพันธุ์ไม้ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ไม้ต้นวงศ์ถั่วมีจำนวนลดลงจากป่าธรรมชาติอย่างรวดเร็วเนื่องจากถูกลักลอบตัดเพื่อส่งออกไปยังต่างประเทศ ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องจึงส่งเสริมการผลิตกล้าไม้และปลูกสร้างสวนป่าเพื่ออนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมไม้และนำไปปลูกทดแทนในพื้นที่ป่าเสื่อมโทรม แต่พบปัญหากล้าไม้ดังกล่าวมีการเติบโตค่อนข้างช้า และมีอัตราการรอดตายต่ำ (สำนักส่งเสริมการปลูกป่า, 2557)

ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhiza) เป็นความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiotic association) ระหว่างรากับรากพืช โดยราช่วยเพิ่มประสิทธิภาพให้รากพืชมีการดูดซึมน้ำและแร่ธาตุอาหารได้ดีขึ้น ในขณะที่ราจะอาศัยในรากและได้รับอาหารจากพืชเพื่อใช้ในการเติบโตของราเอง

(Brundrett *et al.*, 1996) ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสามารถช่วยให้พืชมีความทนทานและเติบโตได้ดีภายใต้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะแห้งแล้ง สภาพดินเค็ม นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันโรคพืชที่จะเข้าทำลายในระบบรากพืช (Smith and Read, 2008) ด้วยประโยชน์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเช่นนี้จึงถูกนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้เพิ่มคุณภาพของกล้าไม้ให้มีการเติบโตและสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี

อย่างไรก็ตามการนำราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา มาประยุกต์ใช้ในงานทางด้านไม้ป่าของประเทศไทยยังมีอยู่น้อยมาก มีไม้ป่าบางชนิดที่มีการศึกษาความหลากหลายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ได้แก่ กระถินณรงค์ เลียน พะยูง ยูคาลิปตัส มะค่าโมง (ณัฐวรานนท์, 2530) สัก (กิตติมา, 2541) กระถินเทพา (วีรวัด, 2546) และกฤษณา (Chaiyasen *et al.*, 2014) แม้ว่าไม้ต้นวงศ์ถั่วหลายชนิดนั้นเคยมีรายงานความสัมพันธ์แบบอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแล้ว แต่ยังไม่มีการนำมาประยุกต์ใช้อย่างจริงจัง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเติบโตของกล้าไม้วงศ์ถั่วบางชนิดในเรือนเพาะชำ โดยผลการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์

กับการพัฒนาการผลิตกล้าไม้ต้นวงศ์ถั่วให้มีคุณภาพดี มีการเติบโตและทนแล้งได้เหมาะสมสำหรับนำไปปลูกในพื้นที่ป่าเสื่อมโทรมต่อไป

อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างดินและแยกสปอร์ในดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบๆ ราก (rhizosphere) บริเวณแปลงปลูกและดินถุงชำกล้าไม้ของไม้วงศ์ถั่ว 3 ชนิด ได้แก่ แปลงปลูกพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) ประดู่ป่า (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz) และแดง (*Xylocarpus xylocarpa* Taub.) จากสถานีวนวัฒนวิจัยสระแกราช อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดนครราชสีมา ดินที่ได้มาแยกสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในดิน ด้วยวิธี modified wet sieving method ตามหนังสือของ Brundrett *et al.* (1996) และ Sucrose centrifugation ของ Daniels and Skipper (1982) ทำโดยสุ่มตัวอย่างดินน้ำหนัก 4 กรัมในแต่ละตัวอย่าง นำมาล้างผ่านน้ำประปาบนตะแกรงที่มีรูขนาด 150, 75 และ 45 ไมโครเมตร วางซ้อนกันตามลำดับ ล้างดินจนสีของน้ำที่ไหลผ่านตะแกรงไม่เป็นสีของดิน จากนั้นนำดินที่ได้แต่ละตะแกรง ใส่ลงในหลอด centrifuge ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้มีน้ำหนักเท่ากัน แล้วนำหลอด centrifuge ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดแล้วจึงเทของเหลวส่วนด้านบนทิ้ง นำหลอด centrifuge มาเติมสารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 50 ปรับปริมาตรให้เท่ากันทุกหลอด centrifuge แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา รินของเหลวด้านบนที่มีสปอร์ของราบนกระดาษกรอง ทำการล้างสปอร์ของราผ่านน้ำปริมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นเทสปอร์ลงบนแผ่นกระดาษกรองที่วางลงบนจานเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานสปอร์ของรา ภายใต้กล้อง Stereo Microscope

2. การศึกษาลักษณะทางลักษณะทางสัณฐานของสปอร์

นำสปอร์ที่ได้จากข้อ 1 วางบนสไลด์ ที่หยดด้วย Glycerol แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำมาศึกษา

ลักษณะรูปร่างภายนอกและภายในของสปอร์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Compound microscopic ซึ่งลักษณะที่พิจารณาได้แก่ สีของสปอร์ ขนาดของสปอร์ ลักษณะรูปร่างสปอร์ ลักษณะผิวสปอร์ ชั้นผนังของสปอร์ เป็นต้น ทำการจำแนกชนิดราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาตามรูปวิธาน (Key) ของ Schenck and Perez (1988); Monton and Benny (1990); Brundrett (1996); West Virginia University (2017) ทำการถ่ายรูปลักษณะสำคัญต่างๆ ของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ่ายภาพที่กำลังขยายแตกต่างกัน โดยราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการศึกษาครั้งนี้มี 2 ชนิด คือ *Acaulospora* sp.1 และ Unknown sp.2 ซึ่งทั้งสองชนิดนี้เป็นชนิดที่พบว่ามีความหนาแน่นของสปอร์ในดินแปลงปลูกไม้พะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) ประดู่ป่า (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz) และแดง (*Xylocarpus xylocarpa* Taub.) เป็นจำนวนมากโดยพบว่ามีความหนาแน่น 6 และ 49 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม ซึ่งลักษณะของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีลักษณะดังต่อไปนี้

Acaulospora sp.1 ไม่พบการสร้าง sporocarp สร้าง azygospore เดี่ยวๆ ในดิน สปอร์มีรูปร่างกลม (globose) ขนาดเล็ก ไม่มีก้าน สีส้มทอง ผิวสปอร์เป็นปุ่มนูนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47.22 (-66.78) X 49.62 (-67.76) ไมโครเมตร ผนังสปอร์มี 1 กลุ่มมีความหนาโดยรวม 5.78-6.34 ไมโครเมตร ประกอบด้วย 3 โดยชั้นที่ 1 ผนังชั้นนอกสุด สีน้ำตาลปนเหลือง ถึงน้ำตาลเข้ม ขอบผิวสปอร์เป็นปุ่มนูน หนา 1.10-1.75 ไมโครเมตร ถัดมาผนังชั้นที่ 2 สีเหลืองปนส้ม หนา 3.29-3.50 ไมโครเมตร และผนังชั้นที่ 3 เป็นผนังชั้นในสุด ผนังสปอร์ชั้นนี้มีสีทองสว่างโดดเด่นจากผนังสปอร์ชั้นอื่นๆ หนา 0.87-1.19 ไมโครเมตร ผนังสปอร์ทั้ง 3 ชั้นทำปฏิกิริยากับ Melzer's reagent แล้วเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล (Figure 1) สำหรับ Unknown sp.2 ไม่พบการสร้าง sporocarp สร้างสปอร์เดี่ยวๆ ในดิน สปอร์มีรูปร่างกลม (globose) กึ่งกลม (subglobose) สีดำปนน้ำตาล ถึงสีดำ ผิวสปอร์เรียบ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 63.08

(-122.56) × 70.04 (-129.66) ไมโครเมตร ผนังสปอร์มีความหนาโดยรวม 2.34-3.18 ไมโครเมตร ผนังสปอร์มี 1 กลุ่ม ประกอบด้วย 2 ชั้น ชั้นที่ 1 เป็นชั้นนอกสุด สีดำปนเทาหนา 1.17-1.85 ไมโครเมตร ผนังชั้นที่ 2 เป็นผนังชั้นด้านใน มีสีใส หนา 1.17-1.33 ไมโครเมตร (Figure 2)

3. การเพิ่มปริมาณสปอร์ราเพื่อผลิตเป็นหัวเชื้อ

นำดินบริเวณพื้นที่เสื่อมโทรมรกร้างจากสถานีวิจัยวนวัฒนวิทยาสะแกราช อำเภอน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา มาแยกเศษซากพืชต่างๆ ออก บดให้มีขนาดเล็กลง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาผสมกับทรายอบฆ่าด้วยวิธีเดียวกัน โดยผสมในอัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร นำส่วนผสมของดินและทรายบรรจุลงในกระถางพลาสติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 นิ้ว หลังจากนั้นใช้ forceps คีบสปอร์ของราชนิดเดียวกัน (*Acaulospora* sp.1 หรือ Unknown sp.2) ที่มีลักษณะสมบูรณ์แต่งตั้งสีใสแวววาว ชนิดละ 50 สปอร์วางบนกระดาดกรองที่

ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ทำการชุดหลุมเล็กๆ บริเวณใกล้โคนกล้าข้าวโพดอายุ 7 วัน แล้วทำการปลูกเชื้อให้แก่ข้าวโพด โดยใช้กระบอกลิดน้ำจืดน้ำให้สปอร์บนกระดาดกรองตกใกล้กับรากข้าวโพด หลังจากนั้นรดน้ำและดูแลกล้าข้าวโพดเป็นระยะเวลา 90 วัน จะได้หัวเชื้อของราสำหรับทดลองต่อไป

4. การเตรียมกล้าไม้

ชนิดของไม้วงศ์ถั่วที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ พะยูง ประดู่ป่า และแดง นำเมล็ดไม้แต่ละชนิดที่ขลิบเปลือกเมล็ดแล้วไปแช่น้ำนาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดไปวางในจานเลี้ยงเชื้อที่รองก้นจานด้วยกระดาษทิชชูเปียก นาน 2-3 วัน จากนั้นจึงคัดเลือกเมล็ดที่มีรากงอกไปเพาะในกระบะทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ แล้วรดน้ำทุกวันเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการคัดเลือกกล้าไม้ที่แข็งแรงและมีความสูงสม่ำเสมอสำหรับใช้ในการทดสอบการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

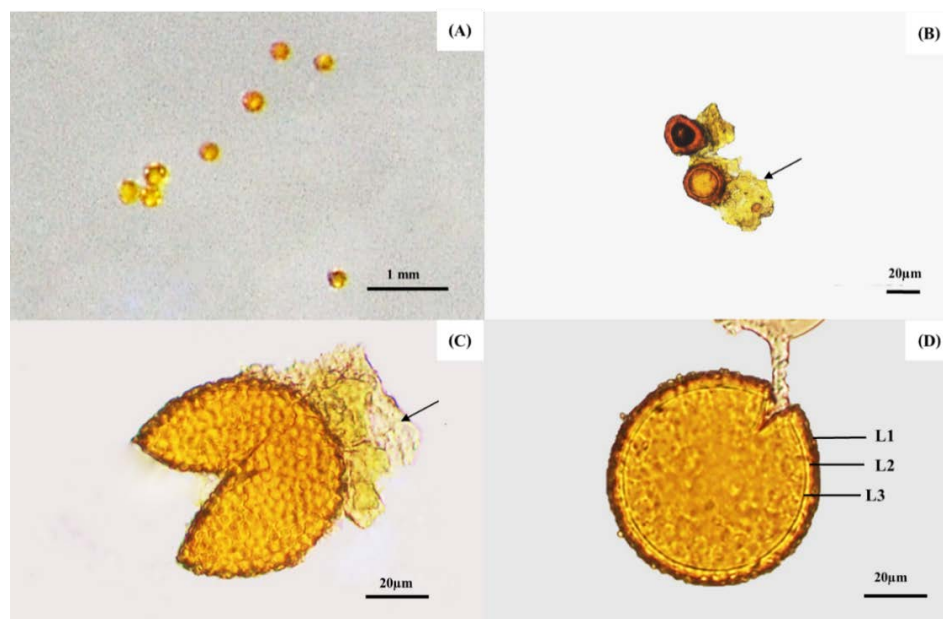


Figure 1 Spores characteristic of *Acaulospora* sp.1 (A) orange-yellow spores, (B) spore formed laterally on saccule (arrow), (C) crushed spores with collapsed saccule (arrow) and coarse warts (verrucose) on outer wall surface, (D) crushed spores with three walls (Layer 1 of spore wall=L1, Layer 2 of spore wall=L2, Layer 3 of spore wall=L3)

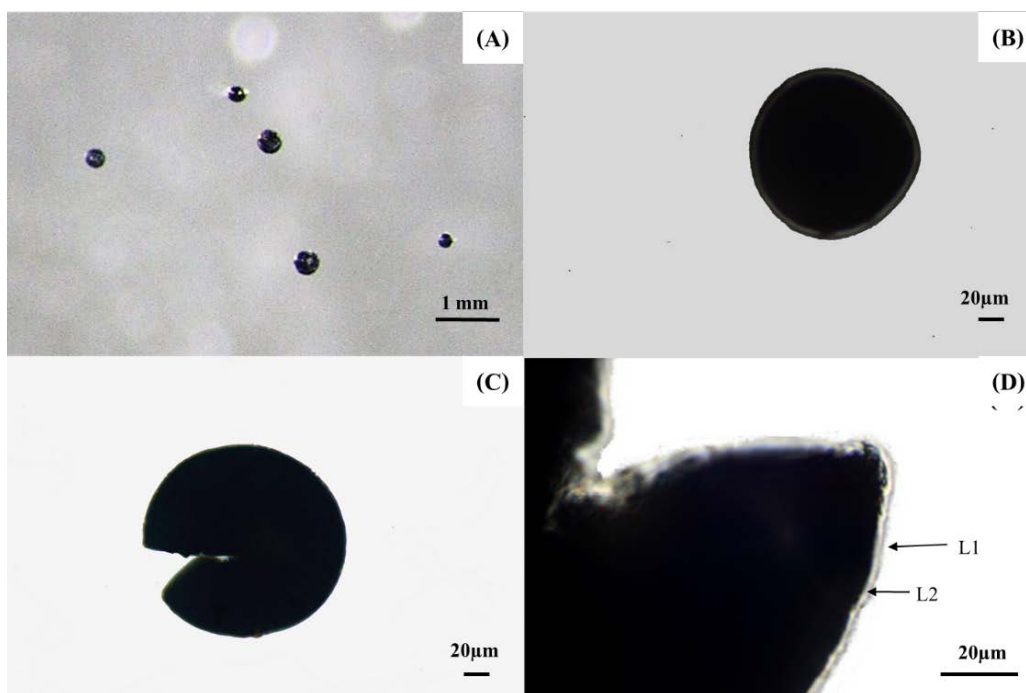


Figure 2 Spores characteristic of Unknown sp.2(A, B) black and globose spores, (C) crushed spores and smooth outer wall surface, (D) crushed spores with two layers (Layer 1 of spore wall=L1, Layer 2 of spore wall=L2)

5. การวางแผนการทดลองและการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแก่กล้าไม้

ในการศึกษาครั้งนี้วางแผนการทดลองแบบ 4x3 Factorial in Completely Randomized Design โดยมีปัจจัย 2 ปัจจัย กล่าวคือ ปัจจัยที่ 1 คือ วิธีการปลูกเชื้อมี 4 วิธี คือ 1) ปลูกเชื้อด้วยสปอร์ *Acaulospora* sp.1 จำนวน 50 สปอร์ 2) ปลูกเชื้อด้วยสปอร์ Unknown sp.2 จำนวน 50 สปอร์ 3) ปลูกเชื้อด้วยสปอร์ *Acaulospora* sp.1 และ Unknown sp.2 ชนิดละ 25 สปอร์ และ 4) ไม่ปลูกเชื้อ (control) ปัจจัยที่ 2 คือ ชนิดของกล้าไม้ต้นวงศ์ถั่ว 3 ชนิด ได้แก่ พะยูง ประดู่ป่า และแดง โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 5 ซ้ำ รวมเป็น 20 ต้นต่อชนิดไม้

การปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้แก่กล้าไม้ทำโดยขุดหลุมขนาดเล็กบริเวณกลางกระถางที่ใส่วัสดุปลูก ซึ่งมีส่วนผสมของ ทราย: พีทมอส (Peat moss): เวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) ในอัตราส่วน 1:2:7 ตามลำดับ (ธารรัตน์ และคณะ, 2558) โดยทรายและ

พีทมอสถูกนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทั้งไ้จนกระทั่งมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้ว จากนั้นนำมาผสมกับเวอร์มิคูไลท์ ในอัตราส่วนดังกล่าวแล้ว นำวัสดุปลูกไปบรรจุลงในกระถางพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว

จากนั้นทำการย้ายกล้าไม้มาปลูกในหลุม โดยเริ่มจากการขุดหลุมเล็กๆ ตรงกลางกระถาง แล้วนำกล้าไม้ย้ายไปปลูกตรงกลางหลุม พร้อมกับนำสปอร์ราแต่ละชนิดที่วางบนกระดาษกรองไปไว้ใกล้บริเวณรากของกล้าไม้ที่สุด แล้วใช้กระบอกลดน้ำให้สปอร์ที่อยู่บนกระดาษตกลงในหลุมใกล้กับราก หลังจากนั้นกลบดินบริเวณโคนต้นแล้วรดด้วยน้ำคั้น นำกล้าไม้ไปวางบนโต๊ะสูงจากพื้นดินประมาณ 50 เซนติเมตร ในเรือนเพาะชำกล้าไม้ดูแลและรดน้ำด้วยน้ำกรอง วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น ครั้งละ 40 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 เดือน

6. การวัดการเติบโตของกล้าไม้

วัดความสูงและเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก โดยวัดครั้งแรกเมื่อเริ่มทำการการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้แก่กล้าไม้และวัดอีกครั้งเมื่อกล้าไม้มีอายุครบ 7 เดือน จากนั้นนำกล้าไม้ออกจากกระถางและใช้กรรไกรตัดกิ่งตัดแยกส่วนเหนือดินออกจากส่วนรากทำความสะอาดเศษวัสดุปลูกที่ติดมากับส่วนรากด้วยน้ำประปา จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักสดและน้ำหนักไม้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ แล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งและคำนวณหาการเติบโตสัมพัทธ์ (relative growth rate, RGR) ด้านต่างๆ ได้แก่ ความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก และน้ำหนักแห้งรวมของกล้าไม้ โดยมีการคำนวณตามสูตรของ Chiariello *et al.* (1989) และ Hunt (1990)

$$RGR = (LnW2 - LnW1) / (t2 - t1)$$

เมื่อ RGR = ค่าเฉลี่ยของ relative growth rate ในช่วง t1-t2

Ln = natural logarithm

W2 = ความสูง หรือเส้นผ่านศูนย์กลาง หรือน้ำหนักแห้งรวมเดือนสุดท้าย (เซนติเมตร)

W1 = ความสูง หรือเส้นผ่านศูนย์กลาง หรือน้ำหนักแห้งรวมเดือนแรก (เซนติเมตร)

t2 = ค่ากำหนดช่วงเวลาเดือนสุดท้ายหรือจุดสิ้นสุดช่วงเวลาที่ทำการศึกษา

t1 = ค่ากำหนดช่วงเวลาเดือนแรกหรือจุดเริ่มต้นช่วงเวลาที่ทำการศึกษา

หลังจากนั้นนำส่วนเหนือดินที่ผ่านการอบแห้งแล้วส่งไปวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม โดยไนโตรเจนและโพแทสเซียมใช้วิธีการ dry combustion method ของ Jackson (1965) และฟอสฟอรัสใช้วิธีการ Bray II method (Bray and Kurtz, 1945)

7. การตรวจหาเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

เมื่อกล้าไม้อายุ 7 เดือน สุ่มเก็บตัวอย่างรากของกล้าไม้แต่ละชนิด จำนวน 30 ปลายราก รากละ 1 เซนติเมตรล้างให้สะอาดนำไปย้อมสีตามวิธีของ Gemma and Koske (1988) โดยนำรากต้มใน potassium hydroxide (KOH) ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำรากล้างน้ำ 2 ครั้ง แล้วนำไปต้มในกรดไฮดรอกลิก (HCl) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างน้ำ 2 ครั้ง และแช่ใน acidic glycerin solution ที่ใส่สี trypan blue ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที จากนั้นประเมินการเข้าอยู่อาศัยของรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของราในรากตามวิธีของ Trouvelet *et al.* (1987) โดยการตรวจดูเส้นใย อาร์บัสคูล (arbuscule) และเวสิเคิล (vesicle) ภายในราก ตามสูตร

$$\%M = (95n5 + 40n4 + 30n3 + 5n2 + n1) / N$$

เมื่อ %M = เปอร์เซ็นต์ความหนาแน่นของการเข้าอยู่อาศัยในราก

N = จำนวนชิ้นรากทั้งหมด

n5, n4, ..., n1 = จำนวนชิ้นรากที่ตรวจพบการเข้าอยู่อาศัยที่ระดับ 5, 4, ..., 1 ตามลำดับ

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลการเติบโตสัมพัทธ์ด้านต่างๆ ได้แก่ ความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก และน้ำหนักแห้งรวม รวมทั้งปริมาณธาตุอาหารในกล้าไม้และเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ Two-way ANOVA ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ค่าทางสถิติสำเร็จรูป SPSS แล้วนำค่าเฉลี่ยไปเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละทรีทเมนต์ โดยใช้ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลและวิจารณ์

1. การเติบโตสัมพัทธ์ (Relative growth rate) ทางด้านความสูงและด้านเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก

หลังจากนำค่าการเติบโตสัมพัทธ์ด้านความสูงและด้านเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอรากไปวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ Two-way ANOVA (Table 1) พบว่าวิธีการปลูกเชื้อที่แตกต่างกัน 4 วิธี ทำให้การเติบโตทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.341$) แต่การเติบโตสัมพัทธ์ทางด้านความสูงของกล้าไม้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.046$) และเมื่อนำค่าเฉลี่ยการเติบโตไปเปรียบเทียบด้วย Duncan's Multiple-Range Test (Table 2) พบว่ากล้าไม้ที่ปลูกเชื้อด้วย *Acaulospora* sp.1 และ *Acaulospora* sp.1 + Unknown sp.2 มีความสูงมากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่วิธีการปลูกเชื้อทั้งสองวิธีนี้ไม่ทำให้กล้าไม้มีความสูงแตกต่างจากการปลูกเชื้อด้วย Unknown sp.2 (Table 2)

ชนิดของกล้าไม้ที่ต่างกันมีการเติบโตสัมพัทธ์ทางด้านความสูงและเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.027$, $P < 0.001$ ตามลำดับ) โดยพบว่ากล้าไม้แดงมีการเติบโตทางด้านความสูงมากกว่ากล้าไม้สองชนิด ในขณะที่การเติบโตสัมพัทธ์ทางด้านเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอรากของกล้าไม้ประดู่ป่านั้นมากกว่ากล้าไม้พะยูนและแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3) ไม่พบปฏิสัมพันธ์เกิดขึ้นระหว่างวิธีการปลูกเชื้อและชนิดกล้าไม้ที่มีผลต่อความสูงที่เพิ่มขึ้น

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่ากล้าไม้ที่มีการปลูกเชื้อด้วยสปอร์ของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีการเติบโตสัมพัทธ์ทางด้านความสูงมากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากรอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาช่วยในการเพิ่มปริมาณคุณน้ำและแร่ธาตุอาหารให้แก่กล้าไม้ ส่งผลให้กล้าไม้มีการเติบโตได้ดี (Smith and Read, 2008) สอดคล้องกับการศึกษาของ กิตติมา (2541) และ Ptasad

et al. (2012) พบว่าพืชที่มีรอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่นั้นมีการเติบโตทางความสูงมากกว่าพืชที่ไม่มีการปลูกเชื้อ

2. น้ำหนักแห้งสัมพัทธ์ของกล้าไม้

ทำการชั่งน้ำหนักแห้งของกล้าไม้ และสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งรวมกับผลคูณของเส้นผ่านศูนย์กลางคอรากยกกำลังสองกับความสูงของกล้าไม้พะยูน ประดู่ป่า และแดงอายุ 1 เดือน คือ $y = 0.7693x^{0.9652}$ ($r^2 = 0.6052$), $y = 1.0383x^{0.7650}$ ($r^2 = 0.7073$), $y = 1.2633x^{0.7308}$ ($r^2 = 0.8211$) ตามลำดับ ใช้สมการดังกล่าวหาน้ำหนักแห้งรวมของกล้าไม้ในแต่ละชนิดที่อายุ 1 เดือน แล้วคำนวณหาน้ำหนักแห้งสัมพัทธ์ของกล้าไม้และนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ Two-way ANOVA (Table 1) ซึ่งพบว่าวิธีการปลูกเชื้อที่แตกต่างกัน 4 วิธี ทำให้น้ำหนักแห้งสัมพัทธ์ของกล้าไม้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.001$) ซึ่งเมื่อนำน้ำหนักแห้งสัมพัทธ์ของกล้าไม้แต่ละทรีทเมนต์มาเปรียบเทียบกับ Duncan's new multiple range test (Table 2) พบว่าการปลูกเชื้อด้วย *Acaulospora* sp.1, Unknown sp. 2 และ *Acaulospora* sp.1 + Unknown sp. 2 ส่งผลให้กล้าไม้มีน้ำหนักแห้งสัมพัทธ์มากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การปลูกเชื้อทั้ง 3 วิธีนี้ทำให้กล้าไม้มีน้ำหนักแห้งสัมพัทธ์แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2) โดยผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ กิตติมา (2541), Oseni *et al.* (2010) และ Seema and Garampalli (2015) ซึ่งพบว่า น้ำหนักแห้งของกล้าไม้ที่มีการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีน้ำหนักแห้งมากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อ

ชนิดของกล้าไม้ที่ต่างกันมีน้ำหนักแห้งรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) โดยพบว่ากล้าไม้พะยูนมีน้ำหนักแห้งรวมสัมพัทธ์มากกว่ากล้าไม้สองชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และกล้าไม้แดงมีน้ำหนักแห้งรวมสัมพัทธ์น้อยที่สุด ดังแสดงใน Table 3

3. ปริมาณธาตุอาหารในต้นกล้าไม้วงศ์ถั่ว

เมื่อนำส่วนเหนือดินของกล้าไปวิเคราะห์แร่ธาตุอาหาร ในโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม ในกล้าไม้อายุ 7 เดือน นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยใช้ Two-way ANOVA (Table 1) พบว่าวิธีการปลูกเชื้อที่แตกต่างกัน 4 วิธี (Table 2) ทำให้ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม ของกล้าไม้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.877$, $P = 0.148$, $P = 0.334$) แต่อย่างไรก็ตามพบว่ากล้าไม้ที่มีการปลูกเชื้อด้วยสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีปริมาณแร่ธาตุอาหารฟอสฟอรัสสูงกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อ สำหรับชนิดของกล้าไม้ที่ต่างกันนั้นมีปริมาณ

แร่ธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.02$, $P = 0.01$, $P = 0.001$ ตามลำดับ) โดยพบว่า กล้าไม้พะยูงมีปริมาณธาตุไนโตรเจนมากกว่ากล้าไม้แดงและประดู่ป่า ในขณะที่ประดู่ป่านั้นมีปริมาณธาตุฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมมากกว่ากล้าไม้ทั้งสองชนิดดังกล่าว (Table 3) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบร้อยละการเข้าอยู่อาศัยของราในรากของกล้าไม้ทั้ง 3 ชนิดนี้ พบว่ารากของประดู่ป่ามีการเข้าอาศัยของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามากที่สุดด้วย ซึ่งราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่อาศัยในรากนั้นอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของรากในการดูดซับปริมาณฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม

Table 1 ANOVA (F - and P -values) of the effect of plant species and inoculation method on growth parameters and mycorrhization.

Variable	Plant Species		Inoculum		Plant species x Inoculum	
	F	P	F	P	F	P
Mycorrhization	3.533	0.038	52.221	0.001	1.073	0.395
RGR of height	3.909	0.027	2.886	0.046	0.178	0.981
RGR of diameter at root collar	152.647	0.001	1.145	0.341	0.357	0.902
RGR of total dry weight	100.393	0.001	6.290	0.010	2.189	0.064
Nitrogen concentration	4.312	0.020	0.227	0.877	0.315	0.926
Phosphorus concentration	5.120	0.010	1.881	0.148	0.504	0.802
Potassium concentration	27.466	0.001	1.167	0.334	1.023	0.424

Table 2 Relative growth rate (RGR) of height, diameter, total dry weight and nutrient concentration of 7 month-old seedlings inoculated in different inoculation treatments.

Variable	Inoculation method			
	Control	<i>Acaulospora</i> sp.1	Unknown	<i>Acaulospora</i> sp.1 + Unknown sp.2
RGR of height	0.063±0.01 ^b	0.085±0.01 ^a	0.078±0.01 ^{ab}	0.082±0.01 ^a
RGR of diameter	0.100±0.01 ^{ns}	0.110±0.01 ^{ns}	0.099±0.01 ^{ns}	0.107±0.01 ^{ns}
RGR of total dry weight	0.203±0.01 ^b	0.247±0.01 ^a	0.234±0.01 ^a	0.231±0.01 ^a
N	1.59±0.16 ^{ns}	1.50±0.17 ^{ns}	1.55±0.16 ^{ns}	1.64±0.16 ^{ns}
P	0.14±0.03 ^{ns}	0.21±0.03 ^{ns}	0.35±0.03 ^{ns}	0.19±0.03 ^{ns}
K	1.76±0.17 ^{ns}	2.14±0.18 ^{ns}	1.94±0.17 ^{ns}	1.71±0.19 ^{ns}

Notes: ** The same letter in each row were not significantly different (Duncan's Multiple-Range Test, $P < 0.05$)

ns = non-significant different

Table 3 Relative growth rate (RGR) of height, diameter, total dry weight and nutrient concentration of 7 month-old seedlings inoculated in different plant species.

Variable	Plant Species		
	<i>D. cochinchinensis</i>	<i>P. macrocarpus</i>	<i>X. xylocarpa</i>
RGR of height	0.082±0.005 ^{ab}	0.065±0.005 ^b	0.083±0.005 ^a
RGR of diameter	0.104±0.004 ^b	0.155±0.004 ^a	0.053±0.004 ^c
RGR of total dry weight	0.293±0.009 ^a	0.261±0.007 ^b	0.147±0.007 ^c
N	1.92±0.158 ^a	1.32±0.131 ^b	1.57±0.135 ^{ab}
P	0.16±0.300 ^b	0.25±0.240 ^a	0.15±0.250 ^b
K	1.36±0.172 ^b	2.72±0.143 ^a	1.40±0.147 ^b

Notes: ** The same letter in each row were not significantly different (Duncan's Multiple-Range Test, $P < 0.05$)

4. ร้อยละการเข้าอยู่อาศัยของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในกล้าไม้วงศ์ถั่ว

เมื่อกล้าไม้พะยูน ประดู่ป่าและแดงมีอายุครบ 7 เดือน ได้สุ่มรากพืชเพื่อตรวจดูการเข้าอาศัยของราในรากของกล้าไม้ พบว่าทุกทริทเมนต์มีการเข้าอาศัยของราในรากกล้าไม้มีร้อยละการเข้าอยู่อาศัยในราก ร้อยละ 13-55 เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ Two-way ANOVA พบว่ากล้าไม้ทั้ง 3 ชนิดที่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการต่างกัน 4 วิธี มีร้อยละการเข้าอาศัยของราในรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.001$) ซึ่งเมื่อนำร้อยละการเข้าอาศัยของราในรากของกล้าไม้แต่ละทริทเมนต์มาเปรียบเทียบด้วย Duncan's new multiple range test พบว่าการปลูกเชื้อ *Acaulospora* sp.1 เพียงชนิดเดียวมี

ร้อยละการเข้าอาศัยของราในรากของกล้าไม้มากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีร้อยละการเข้าอาศัยของราแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับการปลูกเชื้อด้วย *Acaulospora* sp.1 + Unknown sp.2 และ Unknown sp.2 (Figure 3A) สำหรับชนิดของกล้าไม้ที่ต่างกันมีผลทำให้ร้อยละการเข้าอยู่อาศัยของราในรากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.038$) โดยพบว่ากล้าไม้ประดู่ป่ามีร้อยละการเข้าอยู่อาศัยของรา (ร้อยละ 45) ในรากสูงกว่ากล้าไม้พะยูน (ร้อยละ 35) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในรากของกล้าไม้ประดู่ป่ามีค่าร้อยละการเข้าอาศัยของราไม่แตกต่างจากรากของกล้าไม้แดง (Figure 3B)

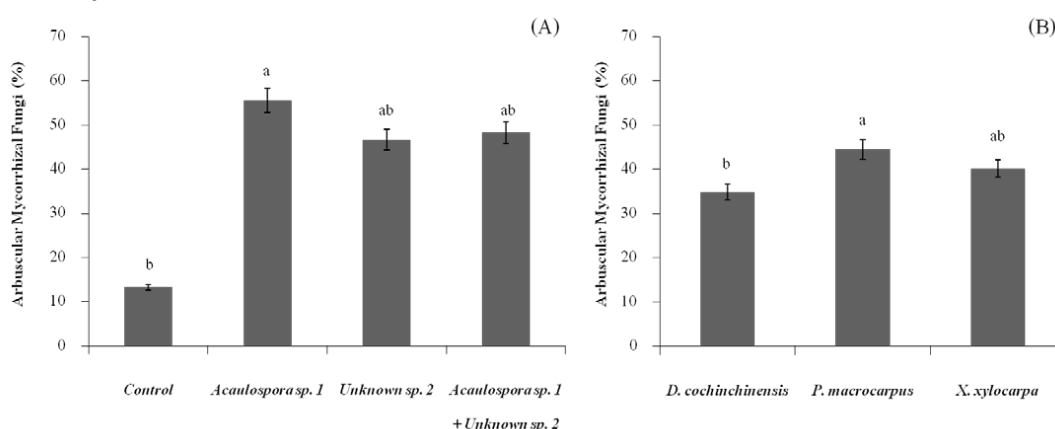


Figure 3 Percentage of mycorrhization of 7 month-old seedlings inoculated in different inoculation treatments (A) and different plant species (B); vertical lines on bars show standard deviations, the same letter on bars are not significantly different (Duncan's Multiple-Range Test, $P < 0.05$)

สรุป

กล้าไม้วงศ์ถั่วทั้ง 3 ชนิด มีร้อยละการเข้าอยู่อาศัยของราร้อยละ 13-55 โดยพบว่าการปลูกเชื้อด้วย *Acaulospora* sp.1 ทำให้กล้าไม้มีร้อยละการเข้าอาศัยของรามากที่สุด กล้าไม้ที่ปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีการเติบโตสัมพันธ์ด้านความสูง และน้ำหนักแห้งมากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อ (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งวิธีการปลูกเชื้อด้วย *Acaulospora* sp.1 และ *Acaulospora* sp.1 + Unknown sp.2 ทำให้กล้าไม้มีการเติบโตสัมพันธ์ด้านความสูงและน้ำหนักแห้งมากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มการเติบโตให้กับกล้าไม้ได้ทั้งสองวิธีโดยให้ผลไม่ต่างกัน แม้ว่าการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาส่งผลให้กล้าไม้มีปริมาณธาตุอาหารของกล้าไม้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่ากล้าไม้ที่มีการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีการดูดซับแร่ธาตุฟอสฟอรัสมากกว่ากล้าไม้ที่ไม่ปลูกเชื้อประมาณ 1-1.5 เท่า

คำนิยาม

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปี 2557-2558 (ร.ม. 14.57)

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิตติมารามัญญะ. 2541. ความหลากหลายชนิดราเวสทิคูลาร์-อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาของสักและผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของกล้าสัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณัฐวรานนท์ สวณราชทรัพย์. 2530. ชนิดและผลของเชื้อราเวสทิคูลาอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้บางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธารรัตน์ แก้วกระจ่าง, บารมี สกลรักษ์, อุทัยวรรณ แสงวนิช และเจษฎา วงศ์พรหม. 2558. การตอบสนองด้านการเติบโตของกล้าไม้พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) ต่อการปลูกเชื้อเห็ดเผาะแห้ง, น. 66-74. ใน การประชุมการป่าไม้ประจำปี พ.ศ. 2558. คณะวนศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วีรวัตร นามานุศาสตร์. 2546. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในกระถินเทพา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สำนักส่งเสริมการปลูกป่า. 2557. การส่งเสริมการปลูกป่า. กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ.

Bray, R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of total organic and available form of phosphorus in soil. **Soil Science** 59: 39-45.

Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, G. Grove and N. Malajczuk. 1996. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. ACIAR Monograph 32. ACIAR, Canberra.

Chaiyasen, A., J. Peter, W. Young, T. Neung, G. Pailboolya and S. Lumyong. 2014. Characterization of arbuscular mycorrhizal fungus communities of *Aquilaria crassna* and *Tectona grandis* roots and soils in Thailand plantations. **PLOS ONE**. 9 (11): 1-8.

Chiariello, N.R., H.A. Mooney and K. Williams. 1989. Growth, carbon allocation and cost of plant tissues, pp. 327-365. In R.W. Pearcy., J. Ehleringer., H.A. Mooney and P.W. Rundel., eds. **Plant Physiological Ecology: Field Method and Instrumentation**. Chapman and Hall, London.

Daniels, B.A. and H.D. Skipper. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of

- propagules from soil, pp. 29-36. In N.C. Schenck., eds. **Methods and Principle of Mycorrhizal Research**. American Phytopathological. USA.
- Gemma, J.K. and R.E. Koske. 1988. Pre-infection interactions between roots and the mycorrhizal fungus *Gigaspora gigantea*: chemotropism of germ tubes and root growth response. **Transaction of the British Mycological Society** 91: 123-132.
- Hunt, R. 1990. **Basic Growth Analysis: Plant Growth Analysis for Beginners**. Unwin Hyman, London.
- Jackson, M.L. 1965. **Soil Chemical Analysis-Advance Course**. Department of Soils, University of Wisconsin, USA.
- Morton, J.B. and G.L. Benny. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomeceae*. **Mycotaxon** 37: 471-491.
- Oseni, T.O., N.S. Shongwe and M.T. Masarirambi. 2010. Effect of arbuscular mycorrhiza (AM) inoculation on the performance of tomato nursery seedlings in vermiculite. **International Journal of Agriculture and Biology** 12: 789-792.
- Ptasad, K., A. Aggarwal, K. Yadav and A. Tanwar. 2012. Impact of different levels of superphosphate using arbuscular mycorrhizal fungi and *Pseudomonas fluorescens* on *Chrysanthemum indicum* L. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 12 (3): 451-462.
- Schenck, N. C. and Y. Perez. 1988. Manual for the Identification of VM mycorrhiza fungi. International Culture Collection of VA Mycorrhizal fungi (INVAM), Folida.
- Seema, H. S. and R. H. Gerampalli. 2015. Effect of Arbuscular Mycorrhizal fungi on growth and biomass enhancement in *Piper longum* L. (Piperaceae). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 4 (1): 11-18.
- Smith, E.S. and D. Read. 2008. **Mineral nutrition, toxic element accumulation and water relations of arbuscular mycorrhizal plants. Mycorrhizal Symbiosis**. Academic Press, London.
- Trouvelet, A., S. Gianinaazzi and V. Gianinaazzi-Pearson. 1987. Screening of VAM fungi for phosphates tolerance under simulated field conditions, pp. 39. In D.M. Sylvia, L.L. Hung and J.H. Graham., eds. **Mycorrhizae in the Next Decade: Practical Applications and Research Priorities**. University of Florida, America.
- West Virginia University. 2017. **FLOURISHING FUNGI**. Available Source: <https://invam.wvu.edu/>, May 26, 2017.