**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** ผลของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และแบคทีเรียเอนโดไฟต์ชนิดตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา

**ผู้เขียน** นางสาวอภิรยา เทพสุคนธ์

**ปริญญา** วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (พืชสวน)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

| | |
|---|---|
| รองศาสตราจารย์ ดร. โสระยา ร่วมรังษี | อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก |
| ศาสตราจารย์ ดร. ชิเกะยูคิ ทาจิมา | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| รองศาสตราจารย์ ดร. สมพร ชุนห์ลือชานนท์ | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| อาจารย์ ดร. อรวรรณ ฉัตรสีรุ้ง | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |

## บทคัดย่อ

การศึกษาผลของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ชนิดตรึงไนโตรเจนและการสร้างออกซินต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาการจำแนกเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และผลของเชื้อราต่อการเจริญเติบโตของต้นปทุมมาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดำเนินการโดยเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งปลูกปทุมมา จำนวน 5 แห่ง ได้แก่ อุทยานแห่งชาติป่าหินงาม อุทยานแห่งชาติไทรทอง จ.ชัยภูมิ กลุ่มเกษตรกร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ จำนวน 2 ราย และหน่วยฝึกยางครามของศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จากนั้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทางชีวโมเลกุลของเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่เก็บรวบรวมได้ นำเชื้อแต่ละชนิดมาปลูกร่วมกับต้นปทุมมานาน 3 เดือนในกระถางขนาด 3 นิ้ว สีดำ ใช้ทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุปลูก เพื่อศึกษาผลของเชื้อต่อการเจริญเติบโตของพืช ผลการทดลองพบว่า สามารถจัดจำแนกเชื้อที่อาศัยอยู่ร่วมกับปทุมมาได้ 3 ชนิด คือ เชื้อชนิดที่ 1 มีลักษณะสปอร์กลม สีน้ำตาลแดงเข้ม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125-250 ไมโครเมตร ผนังสปอร์ไม่ทำปฏิกิริยากับสารสะลาย Melzer's

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

reagent มีผนังสปอร์จำนวน 3 ชั้น และสามารถสร้างอาบัสคูล และเวสิเคิลในรากพืชได้ ชนิดที่ 2 มีลักษณะสปอร์กลม สีขาวใส มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125-250 ไมโครเมตร ผนังสปอร์ทำปฏิกิริยากับสารสะลาย Melzer's reagent มีผนังสปอร์จำนวน 3 ชั้น และสร้างเฉพาะอาบัสคูลในรากพืช และชนิดที่ 3 มีลักษณะสปอร์กลม สีขาวใส มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 45-125ไมโครเมตร ผนังสปอร์ไม่ทำปฏิกิริยากับสารสะลาย Melzer's reagent มีผนังสปอร์จำนวน 4 ชั้น และสามารถสร้างทั้งอาบัสคูล และเวสิเคิลได้ในรากพืช การปลูกเชื้อร่วมกับต้นปทุมมาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าต้นที่ได้รับการปลูกเชื้อ มีความสูงต้น พื้นที่ใบรวม เส้นผ่าศูนย์กลางของหัว น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของต้น และปริมาณธาตุฟอสฟอรัสมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ต้นที่ปลูกร่วมกับเชื้อชนิดที่ 3 ให้ผลการทดลองที่ดีกว่าต้นที่ปลูกร่วมกับเชื้อชนิดอื่น สำหรับการเข้าอยู่อาศัยภายในราก พบว่า เชื้อชนิดที่ 3 มีอัตราการเข้าอยู่อาศัยสูงที่สุด คือ ร้อยละ 40.77-70.65 รองลงมาได้แก่เชื้อชนิดที่ 2 และเชื้อชนิดที่ 1 ตามลำดับ การจำแนกเชื้อชนิดที่ 3 ทางชีวโมเลกุล โดยวิธี 18S rDNA sequence พบว่า เชื้อชนิดที่ 3 มีความใกล้เคียงกับ เชื้อ *Glomus claroideum* ประมาณร้อยละ 97

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ชนิดตรึงไนโตรเจน และสามารถสร้างฮอร์โมนไอเอเอ ต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา โดยเลือกเชื้อที่มีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ ECS203 และ ECS204 และเชื้อที่สามารถสร้างไอเอเอได้สูงที่สุด จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อ ECL101 และ ECS202 มาปลูกร่วมกับปทุมมาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ บันทึกประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และการสร้างปริมาณไอเอเอของเชื้อ เมื่อเก็บรักษาไว้ในกลีเซอลีน 40% ที่อุณหภูมิ -20 °C ลักษณะการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ โดยใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด จัดจำแนกเชื้อทางชีวโมเลกุล โดยวิธี 16S rDNA sequence ผลการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และสร้างไอเอเอของเชื้อก่อนเก็บรักษาสูงที่สุดเท่ากับ 1.55 nmol$C_2H_4$/$10^6$cells/hr และ 10.97 nl/µg protein ตามลำดับ ต่อมาหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าอัตราการตรึงไนโตรเจน และสร้างไอเอเอลดลงตามลำดับ การปลูกเชื้อให้กับปทุมมาทำให้พืชมีความสูง ปริมาณคลอโรฟิลล์ พื้นที่ใบรวม เส้นผ่าศูนย์กลางของหัว น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของต้น และปริมาณธาตุไนโตรเจนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยต้นที่ปลูกร่วมกับเชื้อ ECS203 มีความสูงต้นมากที่สุด คือ 25.5 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ ต้นที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปลูกร่วมกับเชื้อ ECS202 ส่วนลักษณะการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ พบว่าเชื้ออาศัยอยู่ระหว่างเซลล์ พบทั้งในราก หัว และก้านใบ ผลการจัดจำแนกเชื้อทางชีวโมเลกุลพบว่า เชื้อ ECL101และ ECS202 (HQ024490) มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Sphingomonas pseudosanguinis* ที่ 98.2% และ 99.2% ตามลำดับ ส่วนเชื้อ ECS203 (HQ024491) มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus drentensis* 99.4% และเชื้อ ECS204 (HQ024492) มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus methylotrophicus* 99.9%

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของการให้เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ร่วมกับการให้ปุ๋ย ต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วยสองปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 การไม่ให้ปุ๋ย และให้ปุ๋ย 7.5 กรัม/ต้น ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ การใส่เชื้อ 4 แบบ คือ 1) ไม่ให้เชื้อ 2) ให้เชื้อ AMF+ECS202, 3)ให้เชื้อ AMF+ECS203 และ 4)ให้เชื้อ AMF+ECS202+ ECS203 ผลการทดลองพบว่า การให้ปุ๋ยทำให้คุณภาพของต้น คุณภาพของดอก และคุณภาพของหัวใหม่ดีกว่าต้นที่ไม่ได้ให้ปุ๋ย ส่วนการให้ปุ๋ยร่วมกับการให้เชื้อ พบว่าต้นที่ได้รับการให้ปุ๋ย และให้เชื้อ AMF+ECS203 มีการเติบโตของต้น คุณภาพดอก และคุณภาพหัวใหม่ที่ดีกว่าการให้ปุ๋ยร่วมกับเชื้อชนิดอื่น รองลงมา ได้แก่ ต้นที่ได้รับการให้ปุ๋ย และให้เชื้อ AMF+ECS202 และต้นที่ได้รับการให้ปุ๋ย และให้เชื้อ AMF+ECS202+ECS203

**คำสำคัญ:** ปทุมมา เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอไรซา ธาตุอาหารพืช การสร้างไอเอเอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**Thesis Title** Effects of Arbuscular Mycorrhiza and Endophytic Diazotrophic Bacteria on Growth and Development of *Curcuma alismatifolia* Gagnep.

**Author** Ms. Apiraya Thepsukhon

**Degree** Doctor of Philosophy (Horticulture)

**Thesis Advisory Committee**

| | |
|---|---|
| Assoc.Prof. Dr. Soraya Ruamrungsri | Advisor |
| Prof. Dr. Shigeyuki Tajima | Co-advisor |
| Assoc. Prof. Dr. Somporn Choonluchanon | Co-advisor |
| Lect. Dr. Arawan Shatsrirung | Co-advisor |

## ABSTRACT

The effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and endophytic diazotrophic bacteria (EDB) on growth and development of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. were studied in three experiments as follow;

Experiment 1 studied the identification of AMF and their effects on growth promotion in *C. alismatifolia* Gagnep. plantlets derived from tissue culture. Soil sampling from rhizosphere of *C. alismatifolia* at five locations, i.e., Saithong National Park, Paa Hinngarm National Park, Chiayapoom province; San Sai district farmers' field and Yangkram Research Unit of H.M. the King's initiative center for flower and fruit propagation, Chiang Mai province was conducted. Morphology and molecular

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

study of collected AMF were carried out. Each AMF isolate was grown in sterilized sand with *C. alismatifolia* plantlets in three-inch black pot for three months to study the effects of AMF on growth and development of this plant. The results indicated that three characters of AMF spores from rhizosphere soil could be isolated. Isolate No. 1 had single and globose spore, the color was dark red brown and spore diameter was approximately 125-250 μm. The spore wall had no reaction with Melzer's reagent. Spore wall had three layers. This isolate could form both arbuscule and vesicle. Isolate No. 2 was also single and globose. Spore diameter was approximately 125-250 μm, similar to isolate No. 1. However, the color was light white. Melzer's staining reaction occurred in layers of this spore. Spore wall had three layers. The investigation of infection suggested that it could form only arbuscule. Isolate No. 3 was single and globose. The spore size varied from 45-125 μm and spore color was light white. This isolate had four layers of spore wall. Melzer's staining reaction was not present in layer of isolate No.3. The root infection of AMF with *C. alismatifolia* plantlet showed that the isolate No.3 could form both arbuscule and vesicle. The inoculated plants significantly increased in plant height, total leaf area, diameter of rhizome, fresh and dry weight of plant and P concentration when compared with control plants. The inoculated plant with isolate No. 3 gave higher result than the others. The percentage of infection of isolate No. 3 was at 40.77-70.65%, followed by isolate No. 2 and isolate No. 1, respectively. Isolate No. 3 was identified by18S rDNA sequence and it has 97% similarity to *Glomus claroideum*.

Experiment 2 was carried out to study the effects of EDB associated with $N_2$ fixation and IAA synthesis on growth and development of *C. alismatifolia* Gagnep. Two of the highest potential EDB for $N_2$ fixation, i.e., ECS203 and ECS204 and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

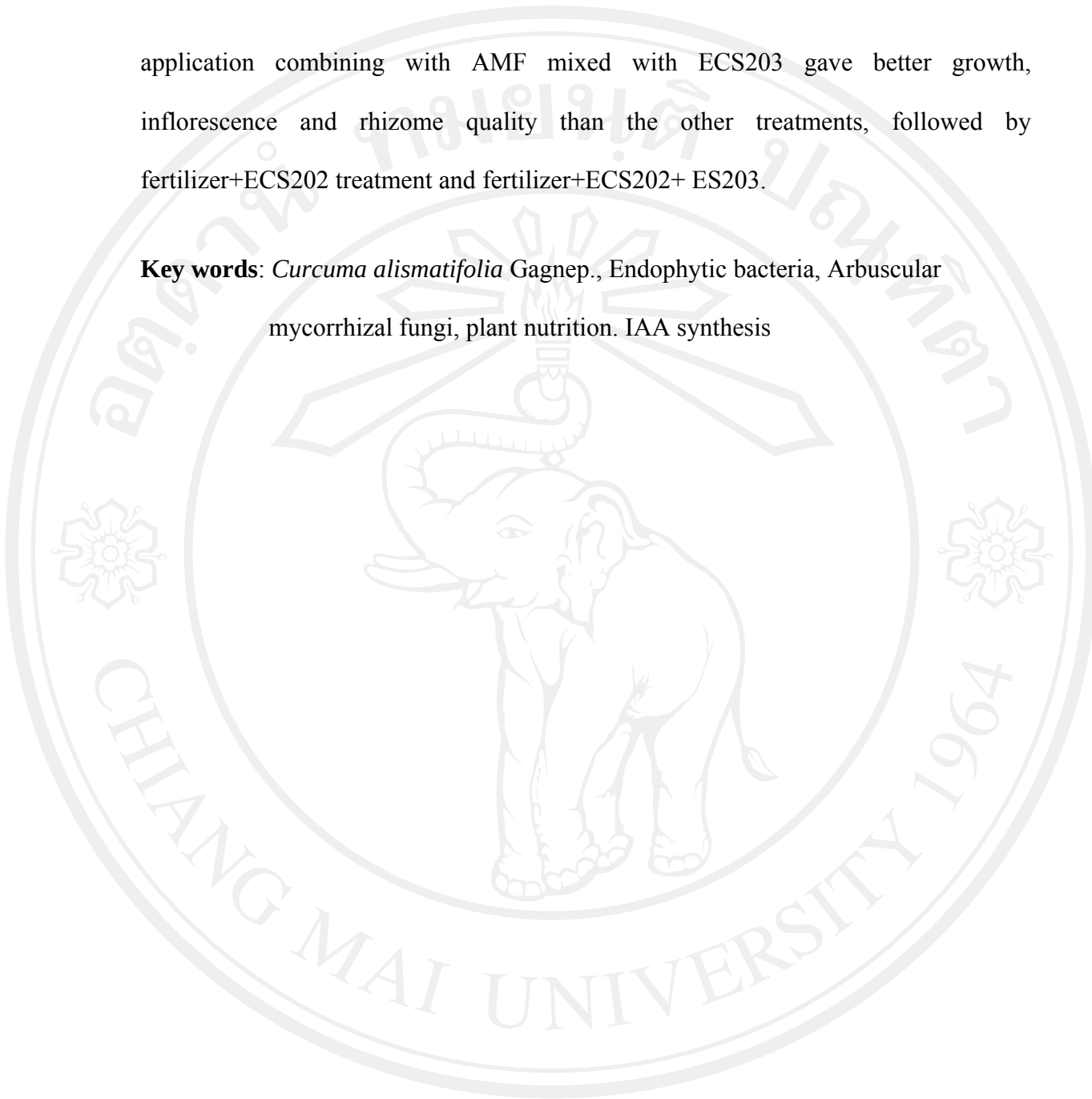
two of the highest potential EDB for IAA synthesis, i.e., ECL101 and ECS202 were selected. The $N_2$ fixation and IAA synthesis efficiency were recorded during the storage in 40% glycerol at -20 °C. The infection was observed by scanning electron microscopy (SEM) and the identification of EDB was made by molecular biology technique. The results showed that the efficiency of $N_2$ fixation rate and IAA synthesis were highest before storage and they decreased continuously during 3-month storage. The inoculated plants significantly increased in plant height, chlorophyll content, total leaf area, diameter of rhizome, fresh and dry weight of plant and N concentration when compared with control plants. The plants inoculated with ECS203 had the tallest plant height at 25.5 cm, followed by inoculated plants with ECS202. EDB could live in intercellular space of plant tissues in root, rhizome and leaf base. Identification by molecular biology technique revealed that ECL101 and ECS202 (HQ024490) isolates showed 98.2% and 99.2% similarity to *Sphingomonas pseudosanguinis*, respectively. ECS203 (HQ024491) showed 99.4% similarity to *Bacillus drentensis*. ECS204 (HQ024492) showed 99.9% similarity to *Bacillus methylotrophicus.*

Experiment 3 was carried out to study the effects of AMF mixed with/without EDB plus fertilizer application on growth of *C. alismatifolia* Gagnep. Plants were subjected to factorial experimental arrangement with two factors. The first factor was the two levels of fertilizer application, i.e., at 0.0 g/pot and 7.5 g/pot. The second factor was four types of microorganism application, i.e., 1) using only AMF, 2) adding with AMF+ECS203, 3) adding with AMF+ECS202 and 4) adding with AMF+ECS202+ECS203. The result indicated that fertilizer application gave the better growth, inflorescence and rhizome quality than the non-fertilizer treatment. Fertilizer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

application combining with AMF mixed with ECS203 gave better growth, inflorescence and rhizome quality than the other treatments, followed by fertilizer+ECS202 treatment and fertilizer+ECS202+ ES203.

**Key words**: *Curcuma alismatifolia* Gagnep., Endophytic bacteria, Arbuscular mycorrhizal fungi, plant nutrition. IAA synthesis



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved