ACKNOWLEDGEMENTS

First and formost I would like to offer my greatfullnest and respection to efficient secretarial things and Buddha for their blessing to me for coming to study master in Chiang Mai University, Thailand.

I would like to regard my deep appreciation and heartly affection to Associate Professor Dr. Dumnern Karladee, my academic advisor as well as the chairperson of the thesis committee for his since, invaluable guidance and insights helped to me during study period reach the end.

I would like to express my heartfelt thanks and profound gratitude to Assistance Prof. Dr. Ampan Bhromsiri, my Co-Advisor for her kindness, excellent advice, constant encouragement, valuable comments and support to this fruitful paper to me for the entire experimentation when I conducted my research in her lab and grown DT 84 soybean variety from Cambodia under Chiang Mai condition using pot trial and this thesis may never have been written without her and her daughter proper advice and valuable assistance so many ways that for which I am deeply indebted and respect to her and her daughter.

I wish to record my grateful thanks and appreciation to the Assoc. Prof. Sakda Jongkaewwattana Ph.D., Asst. Prof. Song Chao Insomphun, Asst. Prof. Dr. Wipa Homhaul, Asst. Prof. Dr. Phattharathanit Srichomthong, Professor Dr. Chuckree Senthong Ph.D. (UF), Prof. Dr. Benjavan Rerkasem, Prof. Dr. Sansanee Jamjod, Assoc. Prof. Thanom Klodpeng, Dr. Maneechat Nikornpun, Dr. Chanakan Prom-u-thai, Dr. Tunya Kunta, academic and administrative staff of the Department of Plant

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Science and Natural Resources and fellow students for sharing their knowledge, experience, kindness and friendship to international students came to study and research in Chiang Mai University.

I would like to convey my special thanks to the Director of International Affairs and official, Director of the Graduate School Programme and official; and Ms. Sureerat Potipim, TICA's Program Officer for theirs kindness cooperation and friendship which always render to me.

I would like to extend my thanks to the Director of Central laboratory in Chiang Mai University, official and students especially Mrs. Nidda Chovachad, Miss. Vassana Viroonrat, Miss. Supranee Jeemoon (Kai), Miss. Korranat Naveerat and Miss. Rumpaipan Kanyamoon who are working in Agronomy laboratory for their kindness and helped my work in laboratory for isolates root nodule bacteria and plant analysis that shared an idea and gave moral support to me.

I am especially indebted to Mr. Nuth Sokhom chief of Kbal Koh station, Mr. Kou Nakry, Mr. Earng Chhailim who are working at Department of Agronomy in Kampong Cham Province, and the farmers of Chamkaar Andong Village, Chief of Chamkaar Andong Commune and Chief of Chamkaar Leu district at Kampong Cham province for their providing me valuable information on their practices and their kind cooperation and gave information during the field survey.

Special thanks also go to my adopted brother Mr. Lim Keth Darath and his family and also his labour for their kindness, support and helped from the very beginning of my study and my work during field study.

Great thanks go to my best friends Solida Keam, Minea Mao, Virek Tep, Tuy Seng, Meng Eang Oeur, Ouk Chan Molly, Live To, Srey Vy, Vesna Khy, Aun,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Makara, Pomara, Bona Ty, Sokanha Sreng, Dina, Mara, Romaney, Solady, Kheng, Sophorn, Sopheap Lim, sister Sokhary and sister Ly for continuously encouragement me during my academic studies. I want to give my recognition and thank you all.

Very many thanks also go to friendly classmates and Cambodian friends, particularly Mr. Sieng Layheng, layhuot, Khin Myat Soe, Fee, Khamala, Singty, Vilaphone, Karno, Chantha, Somountha, Siphat, Popeou, Dyna, Vireak, Sokhom, Sokha Lo, Sophear Eat, Shion, Prem Chap, Pytou Kethya Kheng, Peou Chan Sopheakny, Rattana Chheng Huy, Chhunny, Vireak Mey (Eak or Rat), Pov, Sotheara, Dychen Metta, Seyang, leumang, Sokha Sor, Kuong Tann, Naliss Sam, and others for sharing friendship and a social environment during my stay in Chiang Mai.

I owe a debt of thanks to my uncle Bunroeun Ouk, his wife Kim Buth Ouk, his daughter Bopha Sun Ouk and Somaly Deborah Ouk; and my uncle Yary and his family, my aunt Mao and her family, my uncle Roth and his family, my uncle Seda and his family, my uncle Seth and his family who assisted me in many ways to enable me to succeed at this level of study.

I am greatful acknowledgements and wish to thank Royal Government of Thailand, especially Thailand International Development Cooperation Agency (TICA) awarded fellowship to me come to study in Chiang Mai University.

I would like to express my sincere gratitude and profound appreciation to Excellency Dr. Chan Sarun Minister of Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF), Excellency It Nody Under Secretary of State of MAFF, Excellency Koum Saron, Ex-Director General of MAFF, Excellency San Vanty, Under Secretary of State of MAFF, Excellency Lor Reasmey Secretary General of MAFF, Dr. Sen Sovann Deputy Secretary General of MAFF, Mr. Tout Saravuth Ex-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Director of Department of International Cooperation (DIC) of MAFF, Dr. Meas Pyseth, Director of DIC of MAFF, Mr. Sam Nouv Deputy of Fisheries Administration, Dr. U Sirita Deputy Director of DIC of MAFF, Mrs. Oung Heng Deputy Director of Department of Administrative Affairs of MAFF, Mr. Sao Chesda Deputy Director of Horticulture and Farm Unites of MAFF and Mrs. So Srey Mom for providing me the opportunity of pursuing of M.S degree. And also thanks to Mr. Nhean Choch, Mr. Chhin Sengho, Mr. Koh Chhino, Mrs. Nging Soneath, Mrs. Near Sichan, Mrs. Sin Kolmonny and Ms. Narethdanina for their kindness and continuously encouragement me my study in Chiang Mai University, Thailand.

I would like to express my deepest gratitude to the human resource development policy of the Royal Government of Cambodia to have Samdech Akka Moha Sena Padei Techo **HUN SEN** Prime Minister of the kingdom of Cambodia.

Most of all, special deeply appreciation are extended to my beloved mother Tip Ouk, my elder sister Damy Cheach, my elder brother Damith Cheach and my mothers' relative at Kean Svay for their kindness, support, completely encouragement and understanding which are source inspiration ably let me to complete the graduate study. Especially, I dedicate this thesis to my pity lovely father Thaveyro Cheach (1975-1976).

Finally my special thanks again to Associate Professor Dr. Dumnern Karladee and Assistance Prof. Dr. Ampan Bhromsiri for their kindness helpful and giving me knowledge. I always keep their kindness action in my mind and also wish them and their family prosperity and always full of happiness.

Monyda Cheach

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Compatibility of Endophytic Actinomycetes with Different Soybean Root Nodule Bacteria Collected from Thailand and Cambodia

Author Miss. Monyda Cheach

Degree Master of Science (Agriculture) in Agronomy

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Dumnern Karladee Chairperson

Asst. Prof. Dr. Ampan Bhromsiri Member

ABSTRACT

The compatibility of endophytic actinomycetes and different soybean root nodule bacteria collected from Thailand and Cambodia with DT 84 recommended Cambodian soybean variety was studied by pot experiment. The compatibility between the tested microorganism and soybean plant was evaluated by considering of the effects of inoculation on growth, yield, nodulation and N_2 fixation of soybean. The experimental design was randomized complete block with 12 treatments and 5 replications. The treatments consisted of uninoculated control, four single inoculated treatments of Cambodian root nodule bacterial isolates namely CD_2P, CL_4HK7, CL_3B1 and CD_1YD8, one single inoculated of Th7, Thai bradyrhizobial strain (Th7), one single inoculation of the selected endophytic actinomycetes (EA) and five dual inoculated treatments with EA and each of root nodule bacteria mentioned above (EA + CD_2P, EA + CL_4HK7, EA + CL_3B1, EA + CD_1YD8 and EA + Th7). The tested Cambodian root nodule bacterial isolates were collected from root nodules of local

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

soybean plants cultivated at four selected sites in Chamkaar Andong (CD) and Chamkaar Leu (CL) villages in Kampong Cham province, Cambodia. According to the characteristic of colonies grown on yeast mannitol agar with brom thymol blue dye, all Cambodian root nodule bacterial isolates were acid forming bacteria. Prior to pot testing, these native Cambodian root nodule bacterial isolates were screened for their effectiveness under controlled room condition. From the previous information, the selected EA was identified as *Streptomyces sp.* and this EA isolate could infect Thai soybean host. Sterile soil by autoclaving was used for cultivation of DT 84 soybean plants for all treatments under open field using tap water for irrigation. N_2 fixation of soybean was evaluated by analysis of the relative indices of root bleeding sap at $R_{3.5}$ stage. Each microbial inoculation was done at seed sowing at the rate of 10^6 cfu/seed. It was found that at V_6 stage, single inoculation of CD_2P and CL_4HK7 could improve significantly nodule, root and shoot dry weight of DT 84 soybean plants while CL_3B1 and CD_1YD8 showed their beneficial effects on nodule dry weight only compared to uninoculated control. Single inoculation of Th7 did not have any effects on all studied parameters except the one on root dry weight. Significant improvement of shoot, root and N uptake of shoot by single inoculation of EA were also found at this growth stage. Among dual inoculated treatments, only EA + CD_2P showed significant synergistic effects on root and shoot dry weight compared to single inoculated treatments. At $R_{3.5}$ stage, root, shoot and nodule dry weight, amount and percentage of seasonal fixed N of DT 84 soybean increased significantly by single inoculation of all tested microorganisms compared to uninoculated control. Though significant differences among the Cambodian root nodule bacterial isolates were not found for their effects on shoot, root, nodule dry weight and shoot N uptake

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

at $R_{3.5}$ stage but CD_1YD8 was better than CD_2P for N_2 fixing ability ($P < 0.05$). Th7 bradyrhizobial strain was significantly less effective than CD_1YD8 for N_2 fixing ability. When single inoculated treatments were compared with coinoculated ones, it was found that EA + CD_1YD8 showed depressive effects on amount and percentage of seasonal fixed N while EA + CD_2P had synergistic effects on root dry weight and total plant dry weight. The synergistic effects of EA + Th7 on percentage of seasonal fixed N was also observed. Regarding to the effect on seed yield, CD_1YD8 was the best among the tested root nodule bacteria, while Th7 and CL_4HK7 were not effective to increase significantly seed yield over uninoculated control. Single inoculated of EA had significant effect to increase significantly seed yield of soybean also compared to uninoculated control and this treatment did not differ significantly from the tested root nodule bacteria except CD_1YD8. Significant depressive effect of EA + CD_1YD8 on numbers of pods per plant and seed yield of soybean was also observed while EA + Th7 and EA + CL_4HK7 showed synergistic effects.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความเข้ากันได้ระหว่างเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทกับเชื้อแบคทีเรียปม รากถั่วเหลืองที่แตกต่างกันซึ่งได้จากประเทศไทยและประเทศกัมพูชา

ผู้เขียน นางสาว โมนิดา ชิค

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) พืชไร่

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ดำเนิน กาละดี ประธานกรรมการ

ผศ.ดร. อำพรรณ พรมศิริ กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาความเข้ากันได้ระหว่างเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทกับเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วเหลืองที่แตกต่างกันซึ่งได้จากประเทศไทยและประเทศกัมพูชากับถั่วเหลืองพันธุ์ DT 84 ซึ่งเป็นพันธุ์แนะนำของประเทศกัมพูชา โดยใช้การทดลองในกระถางในการประเมินความเข้ากันได้ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษากับถั่วเหลือง พิจารณาจากการเจริญเติบโต การเกิดปม ผลผลิต และการตรึงไนโตรเจนของต้นพืชที่ได้รับการคลุกเชื้อ ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ในซ้ำ โดยมีกรรมวิธีการทดลอง 12 กรรมวิธี และมี 5 ซ้ำ กรรมวิธีมีดังนี้ กรรมวิธีควบคุมซึ่งไม่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ กรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วเหลืองอย่างเดียวจำนวน 5 กรรมวิธีได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้เชื้อ CD_2P CL_4HK7 CL_3B1 CD_1YD8 และ Th7 ตามลำดับ กรรมวิธีที่ใช้เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนไมซีท (EA) ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วอย่างเดียว กรรมวิธีที่ใช้เชื้อ EA ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียที่กล่าวมาแล้วจำนวน 5 กรรมวิธีได้แก่ EA + CD_2P EA + CL_4HK7 EA + CL_3B1 EA + CD_1YD8 และ EA + Th7 สำหรับเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

CD_2P CL_4HK7 CL_3B1 **และ** CD_1YD8 **เป็นเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วเหลืองที่แยกได้จากปมรากถั่วเหลืองพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกในพื้นที่ปลูกถั่วเหลือง** 4 **แห่งในหมู่บ้านจัมกาอันดง** (CD) **และจัมกาเลอร์** (CL) **จังหวัดกัมพงจามประเทศกัมพูชา จากลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ซึ่งเลี้ยงในอาหารวุ้นที่มียีสต์และแมนนิทอลเป็นองค์ประกอบและใส่สีบรอมไทมอลบลู เชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วเหลืองที่สามารถสร้างกรดก่อนการใช้ในการทดลองในกระถางเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วจากประเทศกัมพูชาเหล่านี้ได้ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพภายใต้การทดสอบในห้องควบคุมสภาพ**

แวดล้อม สำหรับเชื้อ EA เป็นเชื้อที่มีรายงานว่าเป็นเชื้อ *Streptomyces* sp. และเป็นเชื้อที่สามารถอาศัยอยู่ในถั่วเหลือง ดินที่ใช้ปลูกถั่วเหลืองเป็นดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งด้วยไอน้ำภายใต้ความดันสูง ปลูกถั่วในสภาพกลางแจ้งและให้น้ำแก่ถั่วที่ปลูกด้วยน้ำประปา ประเมินการตรึงไนโตรเจนของต้นถั่วตลอดฤดูปลูกจากค่าดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ของน้ำเลี้ยงจากตอรากที่ระยะ $R_{3.5}$ ใส่เชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละกรรมวิธีในระยะหยอดเมล็ดในอัตรา 10^6 cfu ต่อเมล็ด ผลการทดลองพบว่า ที่ระยะV_6 การใช้เชื้อ CD_2P และ CL_4HK7 อย่างเดียวสามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของปมรากถั่วและส่วนเหนือดินของถั่วเหลืองพันธุ์ DT84 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนเชื้อ CL_3B1 และ CD_1YD8 ให้ผลดีเฉพาะการเพิ่มน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดินเท่านั้น การใช้เชื้อ Th7 อย่างเดียวไม่มีผลต่อข้อมูลทุกข้อมูลที่ได้ศึกษาอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นน้ำหนักแห้งของรากซึ่งเพิ่มขึ้น การใช้เชื้อ EA ก็ให้ผลดีในแง่ของการเพิ่มน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดินและราก ตลอดจนการสะสมไนโตรเจนของส่วนเหนือดินที่ระยะ V_6 ส่วนกรรมวิธีที่ใช้เชื้อร่วมกันพบว่ามีเฉพาะกรรมวิธีที่ใช้ EA + CD_2P ที่ให้ผลดีมากกว่าการใช้เชื้อเดี่ยวอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระยะ $R_{3.5}$ น้ำหนักแห้งของรากส่วนเหนือดินและปม ปริมาณและเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงตลอดฤดูปลูกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อเปรียบเทียบผลของการใช้จุลินทรีย์เดี่ยวแต่ละกรรมวิธีกับกรรมวิธีควบคุม พบว่าถึงแม้กรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วจากประเทศกัมพูชาทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติในแง่ของผลที่มีต่อน้ำหนักของส่วนเหนือดิน ราก และปมตลอดจนการสะสมไนโตรเจนของส่วนเหนือดินที่ระยะ $R_{3.5}$ แต่เชื้อ CD_1YD8 มีประสิทธิภาพดีกว่าเชื้อ CD_2P ในแง่ของความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ($P<0.05$) ส่วนเชื้อ Th7 ก็มีประสิทธิภาพน้อยกว่า CD_1YD8 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกรรมวิธีที่ใช้เชื้อร่วมกันกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อเชิงเดี่ยว พบว่ากรรมวิธีที่ใช้ EA ร่วมกับ CD_1YD8 ให้ผลในเชิงถดถอยในแง่ของผลที่มีต่อปริมาณและเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงตลอดฤดูปลูก ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้ EA ร่วมกับ CD_2P มีผลในเชิงส่งเสริมในแง่ของผลที่มีต่อน้ำหนักแห้งของรากและ น้ำหนักแห้งทั้งหมดของต้นพืช ส่วนการใช้เชื้อ EA ร่วมกับ Th7 ก็มีผลในเชิงส่งเสริมด้วยเช่นกันในแง่ของผลที่มีต่อเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงตลอดฤดูปลูก เมื่อพิจารณาถึงผลผลิตเมล็ด พบว่าในระหว่างกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วอย่างเดียวการใช้ CD_1YD8 ให้ผลดีที่สุดในการเพิ่มผลผลิตเมล็ด ในขณะที่การใช้ Th7 และ CL_4HK7 ไม่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตเมล็ดให้สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่กรรมวิธีนี้ก็ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปมรากถั่วอย่างเดียวทุกกรรมวิธีในทางสถิติ ยกเว้นกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ CD_1YD8 ในกรณีของการใช้เชื้อร่วมกัน พบว่ากรรมวิธีที่ใช้ EA ร่วมกับ CD_1YD8 มีผลในเชิงถดถอยในแง่ของผลที่มีต่อจำนวนฝักต่อต้นและผลผลิตเมล็ด ในขณะที่การใช้ EA ร่วมกับ Th7 และ EA ร่วมกับ CL_4HK7 ให้ผลในเชิงส่งเสริมเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อเดี่ยว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved