Thesis Title	Use of Soil Microbial Inoculation for Improving the Effectiveness of Vetiver Grass and the Effect on Natural Soil Microbial Ecology
Author	Ms. Chonnakarn Bhromsiri
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Ampan Bhromsiri Chairperson
	Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup Member
	Prof. Dr. Makoto Kimura Member
	Assoc. Prof. Dr. Sugunya Wongpornchai Member

ABSTRACT

The normal practice for cultivation of vetiver as a soil erosion control crop is transplanting bare root plants with 5 or 10 cm spacing. Under unfavorable soil and climate condition, the transplanted plants cannot satisfactorily survive. This study was therefore conducted in order to find out the methods for improving of establishment of vetiver hedgerow used for soil conservation. The conducted research consisted of three working steps. In the first step, plant growth-promoting rhizobacteria isolates (PGPR) obtained from different vetiver and different ecotypes rice cultivars were screened based on their activities on nitrogen fixation by acetylene reduction assay (ARA) and/or indole acetic acid (IAA) producing. From this step, 25 PGPR isolates having good abilities in terms of nitrogenase activity and/or IAA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

production. Furthermore, by the 16S rDNA sequencing the diversity of bacterial isolates from rice and vetiver rhizosphere soil was demonstrated and also verified that most selected isolates were affiliated in common PGPR species such as *Azospirillum, Bacillus, Klebsiella, Rhizobium*, *Serratia* and *Stenotrophomonas*.

In the second step, only selected 17 PGPR isolates were firstly tested with 2 vetiver ecotypes; Mae Hae and Songkhla by pot experiment. Two effective isolates showing the good performances in plant growth and nitrogen uptake were observed from this step. The suitable arbuscular mycorrhiza fungi (AMF) inoculum for improvement growth and nutrient uptake of vetiver were also screened by another pot experiment using Suratthani ecotype. Four AMF inocula provided good performances in plant growth, nutrient uptake and percentage of AMF root infection were observed. The effective 11 PGPR (8 isolates from the first step and 2 isolates from the second step) and 4 AMF were further tested of their performances in combination by the third pot trail using 3 vetiver ecotypes; Mae Hae, Suratthani and Songkhla. The divergent responses of vetiver ecotype to the different microbial inoculations were indicated in this pot trial. These findings not only showed the compatibility between plant-bacteria-AMF but also indicated the difficulties for determination of the exact effect of dual inoculations on vetiver plants. Nevertheless, based on the results of Mae Hae vetiver ecotype, which was further used in the field experiment, the six effective PGPR isolates and one compatible AMF inoculum could be observed and selected.

Finally, the field trial on highland area was conducted to obtain the appropriate cultivating method for soil conservation. Four microbial inoculation methods as followings; mixture of 6 effective PGPR isolates, single AMF inocula, a combination of the 6 PGPR isolates and AMF and uninoculated vetiver plants were

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

used. All vetiver seedlings were maintained in plastic bag for one month before transplanting into the field using four different plant spacings; 5, 10, 20 and 30 cm. The bare root transplantation was included as control treatment. Density gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of 16S and 18S rDNA were performed at 215 days after transplanting to observe microbial inoculation impact upon indigenous microbial community and survival of microbial inocula within vetiver rhizosphere soil. The results showed that spacing clearly affected the tiller numbers, hedgerow wide and circumference which the better results were achieved by the wide spacing. This influence should be the resulted from the environmental response of the plant and nearly independent from microbial effect. Furthermore, it was quite clear that microbial inoculation could provide a better improvement trend in vetiver growth performance than the practical bare root practice, including positive trends in the percentage of the numbers of high quality plant and hedgerow strength. It should be noticed also about strong enhancement in terms of plant height by AMF inoculation together with the wide spacing use in the first experimental period and providing this positive improvement trend to the plants until the experiment was finished by microbial inoculations. AMF inoculation was the best effective microbial treatment which the taller plants were mostly obtained. Its good performance was still observed when used in combination with a mixture of PGPR isolates. From all available field data obtained, the improvement trend by microbial inoculation could be examined throughout the long experimental period (especially in terms of plant height) even later the effect seemed to be decreased including the bacterial DGGE profiles, which showed quite similar patterns among seedling propagation methods and the absence of AMF inoculum band in all fungal DGGE patterns. All together the above described

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

results, it may assume that the phenomenon of reduced microbial inoculation effect might happen at the same time as the native became dominant. Furthermore, positive improvement effects of microbial inoculations which could be still observed throughout the experimental period, should be the remained influence that obtained from the first establishment or it was the indirect effect of indigenous microorganisms that was not significant. According to this experimental results, using microbial inoculation seemed to be environmental friendly approach and showed the possible potential to improve the vetiver hedgerow used in soil conservation program.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ดินเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของหญ้าแฝก และผลที่มีต่อนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ดินในธรรมชาติ

ผู้เขียน นางสาวชนกานต์ พรมศิริ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. อำพรรณ พรมศิริ	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์	กรรมการ
ศ. ดร. มาโคโต คิมูระ	กรรมการ
รศ. ดร. สุกัญญา วงศ์พรชัย	กรรมการ

บทคัดย่อ

วิธีการที่นิยมใช้ในการปลูกหญ้าแฝกเพื่อการป้องกันการพังทะลายของดิน คือการปลูกโดยใช้ต้นกล้าที่ถูกตัดรากให้สั้น (รากเปลือย) ด้วยระยะห่างระหว่างต้น 5 หรือ 10 ซม ภายใต้สภาพดินและภูมิอากาศที่ไม่เหมาะสมการปลูกหญ้าแฝกด้วยวิธีการดังกล่าวมักประสบปัญหาการมีอัตราการรอดตายที่ต่ำ ดังนั้นการทดลองนี้จึงเกิดขึ้นเพื่อมุ่งหาวิธีการปลูกที่จะช่วยส่งเสริมการพัฒนาของแถบหญ้าแฝกที่ใช้ในการอนุรักษ์ดิน การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนการปฏิบัติงาน 3 ขั้นตอนคือ ขั้นที่หนึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียดินที่มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth-promoting rhizobateria: PGPR) จากข้าวและหญ้าแฝกที่มีแหล่งกำเนิดต่างกัน โดยพิจารณาจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี acetylene reduction assay (ARA) และ/หรือ ความสามารถในการผลิต indole acetic acid (IAA) พบเชื้อ 25 ตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพที่ดีทั้งการตรึงไนโตรเจน และการสร้าง IAA ในปริมาณสูง หรือเชื้อที่มีคุณสมบัติเด่นอย่างใดอย่างหนึ่งด้านเดียว ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อดังกล่าว นอกจากจะแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในบริเวณ rhizosphere ของข้าวและหญ้าแฝก ยังเป็นการบ่งชี้ว่าเชื้อดังกล่าวเป็นแบคทีเรียในสปีชีส์ *Azospirillum Bacillus Klebsialla Rhizobium* และ *Stenotrophomonas* ซึ่งปกติแล้วมีคุณสมบัติในการเป็น PGPR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองขั้นที่สองเป็นการทดลองเพื่อทดสอบหาเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของหญ้าแฝกในกระถาง การทดสอบในกระถางครั้งที่หนึ่งเชื้อที่มีประสิทธิภาพจากการคัดเลือกขั้นตอนแรก 17 ตัวอย่างถูกใช้ในการทดสอบกับหญ้าแฝก 2 สายพันธุ์คือแม่แฮและสงขลา ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพดี 2 ตัวอย่าง สำหรับการทดลองกระถางครั้งที่สองเพื่อคัดเลือกหัวเชื้ออาร์ - บัสคูลลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhizal fungi: AMF) ที่เหมาะสมกับหญ้าแฝก ส่งเสริมการเจริญเติบโตและช่วยในการสะสมธาตุอาหาร โดยใช้หญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีในการทดสอบ พบหัวเชื้ออาร์บัสคูล่าไมคอร์ไรซ่า 4 ชนิดที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต ช่วยเพิ่มการสะสมธาตุอาหารแก่หญ้าแฝก และมีเปอร์เซนต์การเข้ารากที่สูง การทดลองในกระถางครั้งสุดท้ายเป็นการทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของหญ้าแฝกเมื่อถูกใช้ร่วมกันของตัวอย่างเชื้อ PGPR 11 ตัวอย่าง (ตัวอย่างเชื้อจากการทดลองครั้งแรก 8 ตัวอย่าง และจากการทดลองในกระถางครั้งแรก 2 ตัวอย่าง) และหัวเชื้อ AMF 4 ชนิด การทดลองนี้ใช้หญ้าแฝก 3 สายพันธุ์คือ แม่แฮ สุราษฎร์ธานี และสงขลา การตอบสนองที่แตกต่างกันของหญ้าแฝกสายพันธุ์ต่างกันต่อคู่เชื้อจุลินทรีย์แต่ละคู่ซึ่งพบในการทดลองนี้ นอกจากแสดงให้เห็นถึงความเข้ากันได้ระหว่างหญ้าแฝก เชื้อแบคทีเรีย และ AMF ยังชี้ให้เห็นถึงความยากในการประเมินประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตของหญ้าแฝกซึ่งได้รับจากการใช้เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกัน อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองกับหญ้าแฝกสายพันธุ์แม่แฮซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่จะถูกในแปลงทดลองในพื้นที่สูงในขั้นตอนต่อไป สามารถคัดเลือกเชื้อ PGPR 6 ตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพดี และหัวเชื้อ AMF หนึ่งชนิดที่เข้ากันได้กับเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว

การทดลองขั้นสุดท้ายเป็นการทดลองในแปลงทดลองในพื้นที่สูง เพื่อทดสอบหาวิธีการปลูกหญ้าแฝกที่มีประสิทธิภาพเหมาะสมกับการอนุรักษ์ดิน โดยใช้วิธีการปลูกซึ่งใส่เชื้อจุลินทรีย์ 4 แบบคือ การใส่เชื้อ PGPR ที่มีประสิทธิภาพ 6 ชนิดร่วมกัน การใส่หัวเชื้อ AMF การใส่หัวเชื้อ AMF ร่วมกับเชื้อ PGPR ผสมตามแบบวิธีแรก และการปลูกโดยไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ กล้าแฝกซึ่งได้รับการใส่เชื้อตามวิธีดังกล่าวข้างต้นจะถูกปลูกลงในถุงพลาสติกแล้วดูแลรักษาเป็นระยะเวลาหนึ่งเดือน ก่อนย้ายปลูกในแปลงทดลองด้วยระยะปลูกต่างกัน 4 ระยะคือ 5 10 20 และ 30 ซม ร่วมด้วยชุดควบคุมคือการปลูกด้วยการใช้กล้าหญ้าแฝกแบบรากเปลือย ตรวจสอบผลกระทบของการใช้เชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวต่อนิเวศน์วิทยาของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ และการดำรงอยู่ในดินของหัวเชื้อดังกล่าวที่ 215 วันหลังการย้ายปลูกด้วยด้วยวิธี density gradient gel electrophoresis (DGGE) ของ 16S และ 18S rDNA ผลจากแปลงทดลองชี้ให้เห็นว่า ระยะการปลูกส่งผลอย่างชัดเจนต่อจำนวนหน่อต่อกอ ความกว้างและเส้นรอบ วงของแถบหญ้าแฝก การปลูกด้วยระยะที่ห่างจะให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลดีมากกว่าโดยให้จำนวนหน่อต่อกอมากกว่าระยะถี่ อิทธิพลนี้น่าจะเป็นผลจากการตอบสนองของพืชต่อสิ่งแวดล้อม และไม่ค่อยมีความเกี่ยวข้องกับอิทธิพลที่ได้จากการใช้เชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้พบว่าการปลูกโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ช่วยส่งเสริมการเจริญของหญ้าแฝก เพิ่มเปอร์เซนต์จำนวนของหญ้าแฝกที่มีการเจริญเติบโตดีในช่วงต้นของการย้ายปลูก และเพิ่มความแข็งแรงของแถบหญ้าแฝกในตอนท้ายของการทดลองมากกว่าการปลูกโดยใช้รากเปลือยอย่างชัดเจน การปลูกโดยใช้ AMF ร่วมด้วยการใช้ระยะปลูกที่ห่างช่วยส่งเสริมความสูงของหญ้าแฝกอย่างชัดเจนในช่วงแรกของการทดลอง และอิทธิพลของการใช้เชื้อจุลินทรีย์ยังส่งผลไปในแนวทางที่ดีต่อความสูงอย่างต่อเนื่องไปจนเสร็จสิ้นการทดลอง การใช้เชื้อ AMF ให้ประสิทธิภาพสูงสุด หญ้าแฝกที่ปลูกโดยใช้เชื้อ AMF ส่วนมากมีลำต้นสูง นอกจากนี้ยังพบว่าการใส่เชื้อ AMF ยังคงให้ผลที่ดีต่อความสูงของหญ้าแฝก ถึงแม้ว่าจะถูกใช้ร่วมกับ PGPR เมื่อรวมผลที่ได้จากแปลงทดลองคือ การให้ผลดีต่อหญ้าแฝก (โดยเฉพาะในแง่ความสูง) ของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีต่อเนื่องไปจนเสร็จสิ้นการทดลอง ถึงแม้ว่าผลดังกล่าวมีแนวโน้มลดลงในช่วงหลังของการทดลอง และผลที่ได้จาก DGGE คือ รูปแบบแถบ 16S rDNA จากตัวอย่างดินที่ใช้วิธีการปลูกที่ต่างกันแต่มีรูปแบบการเรียงตัวของแถบใกล้เคียงกัน และการหายไปของแถบ 18S rDNA ของหัวเชื้อ AMF ที่สังเกตเห็นได้ในรูปแบบของแถบ 18S rDNA จากตัวอย่างดินทั้งหมด อาจพอประเมินได้ว่าการลดลงของอิทธิพลที่ได้จากการใส่เชื้อจุลินทรีย์ น่าจะเกิดขึ้นพร้อมกับการพัฒนาขึ้นเป็นกลุ่มหลักของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ดังนั้นผลทางบวกจากการใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่มีต่อหญ้าแฝกไปจนสิ้นการทดลอง น่าจะเป็นอิทธิพลจากเชื้อที่ได้รับสะสมมาในตอนต้นและเป็นพื้นฐานทำให้หญ้าแฝกมีการเจริญที่ดีไปจนสิ้นการทดลอง ในอีกแง่หนึ่งผลทางบวกดังกล่าวอาจจะเป็นผลทางอ้อมที่ได้รับจากเชื้อในธรรมชาติซึ่งไม่ค่อยมีอิทธิพลต่อหญ้าแฝกมากนัก ผลจากการทดลองนี้ประเมินได้ว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการปลูกแฝกค่อนข้างเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และแสดงให้เห็นถึงความมีศักยภาพในการส่งเสริมพัฒนาการของแถบหญ้าแฝกที่ใช้เพื่ออนุรักษ์ดิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved