



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)

ปริญญา

ปฐพีวิทยา

สาขา

ปฐพีวิทยา

ภาควิชา

เรื่อง บทบาทของแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมต่อการเจริญเติบโตและ
การสร้างสารสำคัญของพืช

Role of Rhizobacteria of Citronella Grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt)
on Yield and Bioactive Ingredient of Plant

นามผู้วิจัย นางสาวพิชามณัฐ อินตะโม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศวพร ศุภผล, ประ.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์เบญญา มะโนชัย, ประ.ด.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุเทพ ทองแพ, วท.ด.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ _____ เดือน _____ พ.ศ. _____

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

บทบาทของแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมต่อการเจริญเติบโต
และการสร้างสารสำคัญของพืช

Role of Rhizobacteria of Citronella Grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt)
on Yield and Bioactive Ingredient of Plant

โดย

นางสาวพิชามณัฐ อินตะโม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พืชมานุษย์ อินตะโม 2554: บทบาทของแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารสำคัญของพืช ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา) สาขาปฐพีวิทยา ภาควิชาปฐพีวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุพร สุขผล, ประ.ด. 139 หน้า

ปัจจุบันกระแสสังคมให้ความสำคัญกับการบริโภคและใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์พืชและสมุนไพรจากการผลิตในระบบเกษตรอินทรีย์ ด้วยความสำคัญดังกล่าวจึงเป็นที่มาของการคัดแยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากบริเวณรากตะไคร้หอม เพื่อนำมาใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยศึกษาความหลากหลายของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและการคัดแยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของพืชวงศ์ Gramineae ผลการศึกษาวิจัยพบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ส่งเสริมให้ตะไคร้หอมมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้สูง โครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุ 8 เดือน มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณอินทรีย์วัตถุ และปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ ส่งเสริมให้มีสาร citronellol ในปริมาณสูง จากการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ 26, 9, 31 และ 10 ไอโซเลตตามลำดับ การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต และการผลิตฮอร์โมนออกซิน พบว่าแบคทีเรียรหัส Rh9 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 5.30 ไมโครโมลเอทิลีนต่อชั่วโมง แบคทีเรียรหัส Rh55 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้สูงสุดเท่ากับ 0.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียรหัส Rh54 มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซินได้สูงสุดเท่ากับ 5.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการระบุชนิดแบคทีเรียรหัส Rh9, Rh55 และ Rh54 คือ *Bacillus* sp. PS2, *Curtobacterium citreum* รหัส LCR23 และ *Klebsiella* sp. ICB572 สำหรับผลการประเมินศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชวงศ์ Gramineae ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการเติมแบคทีเรียเดี่ยวและการเติมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) 6 ดำรับการทดลอง จำนวน 4 ซ้ำ ใช้เนื้อเยื่อหญ้าแฝกกลุ่ม (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) เป็นพืชทดสอบด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าดำรับการทดลองที่เติมแบคทีเรียเดี่ยว และการเติมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน ส่งผลให้ความยาวส่วนยอดและส่วนราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งทั้งส่วนยอดและส่วนรากของเนื้อเยื่อหญ้าแฝกกลุ่ม มีการตอบสนองทางด้านการเจริญเติบโตที่ดีแตกต่างจากดำรับควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย และดำรับควบคุมที่เติมแบคทีเรียที่ไม่มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืช (*E. coli* DH5 α) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Pichamon Intamo 2011: Role of Rhizobacteria of Citronella Grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) on Yield and Bioactive Ingredient of Plant. Master of Science (Soil Science), Major Field: Soil Science, Department of Soil Science. Thesis Advisor: Assistant Professor Savaporn Supaphol, Ph.D. 139 pages.

Health food was a growing niche in the food industry. Currently, the demand for organic vegetable and herbal product regularly exceeds supply. Therefore, the need to isolate and select superior, naturally occurring rhizosphere bacteria, which enhances plant growth, is of considerable interest. The objectives of this research are to study bacterial community structure and isolation bacteria from rhizosphere of Citronella grass at the age of 2, 4, 6 and 8 months. Rhizosphere bacteria from Citronella grass were tested for their efficiency to enhance growth of order Gramineae plantlet. The rhizobacterial community structure of Citronella grass at the age of 6 months shows positive correlation with available phosphorus and total nitrogen. Those factors are enhanced oil yield. At the age of 8 months, the rhizobacterial community structure shows positive correlation with organic matter content and extractable potassium. Those factors are enhanced citronellol compound. Seventy six plant growth promoting rhizobacteria were isolated from Citronella grass the age of 2, 4, 6 and 8 months were 26, 9, 31 and 10 isolates, respectively. They were tested for their efficacy to nitrogen fixing, phosphate solubilizing and indole acetic acid (IAA) production. The efficiency of strain Rh9 fixed maximum nitrogen (5.3 umol hr^{-1}), strain Rh55 solubilized maximum phosphate (0.56 ug ml^{-1}) and strain Rh54 produced maximum IAA (5.21 ug ml^{-1}). In addition, strain Rh9, Rh55 and Rh54 were identified by 16S rRNA gene analysis. Three strain were represented as follow, *Bacillus* sp. PS2, *Curtobacterium citreum* strain LCR23 and *Klebsiella* sp. ICB572. Potential for enhancement of plant growth of order Gramineae plantlet under tissue cultured condition. Inoculated with *Bacillus* sp. PS2, *Curtobacterium citreum* strain LCR23, *Klebsiella* sp. ICB572 and co-inoculated. The experiment was a completely randomized design (CRD) with 4 replicates (6 treatments). One tissue-cultured vetiver plantlet (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). The results indicate that a remarkable increase in shoot and root length, fresh weight and dry weight were recorded due to single and co-inoculation. The overall growth performance of inoculated plant growth promoting was significantly increased compared to control (un-inoculated and *E. coli* DH5 α).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สวพร ศุภผล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่อบรมให้ความรู้ ให้โอกาส และแนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณ ดร.เบญญา มะโนชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยดูแลให้คำปรึกษาและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณ ศ.ดร.สุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา ประธานการสอบและ ดร.พิทยากร ลิ้มทอง ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาตรวจ แก้ไข และให้คำปรึกษา จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาปรัชญาวิทยาทุกท่าน ที่ให้ความรู้ทั้งศาสตร์และศิลป์ ขอบคุณดร. Jeong Hwa Hong ดร.สมปอง หมั่นแจ้ง และคุณประดิษฐ์ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำที่ดี

ขอขอบคุณพี่เอ๋ม และพี่อ๊อฟ ที่ให้คำแนะนำให้การดูแลเอาใจใส่อย่างดี อยู่เคียงข้างเวลาเจอปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ขอบคุณเพื่อนๆ ที่รัก มะแตง เอ้ กุ๊กไก่ จู๊ป สุ โย เกษรา และกานต์ ที่คอยเตือนสติ ให้กำลังใจ อยู่เคียงข้างกันเสมอมา และขอบคุณพี่เจ๊ียบ พี่กวาง พี่ทราย พี่รุจ น้องพร และน้องเบนซ์ ที่ให้การช่วยเหลือทั้งแรงกายแรงใจ

ขอกราบขอบพระคุณคุณปู่ คุณย่า คุณพ่อ คุณแม่ คุณอา น้องชายที่น่ารักทั้ง 2 คน พี่สาวตลอดจนญาติพี่น้องทุกคน ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษาแนะนำ และให้การสนับสนุนทางการศึกษา คอยอยู่เคียงข้างข้าพเจ้าเสมอมา จนสามารถทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้สำเร็จลุล่วงอย่างที่ตั้งใจ

พิชามณัฐ อินตะโม

เมษายน 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	27
อุปกรณ์	27
วิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	48
สรุปและข้อเสนอแนะ	95
สรุป	95
ข้อเสนอแนะ	97
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	98
ภาคผนวก	110
ภาคผนวก ก สูตรอาหารคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ และสูตรอาหารมาตรฐาน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	111
ภาคผนวก ข ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอมและ ร้อยละของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จาก ตะไคร้หอม	120
ภาคผนวก ค ความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม อายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน	124
ภาคผนวก ง การใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม อายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหน่อยาแฝกกลุ่ม	129
ภาคผนวก จ ค่าพิสัยการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของดิน	132
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	139

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณจุลินทรีย์ดินบริเวณรากข้าวสาลี (<i>Triticum aestivum</i> L.)	5
2	แบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนที่คัดแยกได้จากบริเวณรากพืชชนิดต่างๆ	9
3	แบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้จากบริเวณรากพืชชนิดต่างๆ	10
4	แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซินที่คัดแยกได้จากบริเวณรากพืชชนิดต่างๆ	11
5	สารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยจากพันธุ์ <i>Cymbopogon nardus</i> L. และพันธุ์ <i>Cymbopogon winterianus</i> J.	18
6	สมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของดินพื้นที่ผลิตตะไคร้หอม บริเวณหมู่บ้านดงบัง ต.ดงจีเหือก จ.ปราจีนบุรี	49
7	จำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน โดยใช้อาหารที่มีความจำเพาะต่อกิจกรรมของแบคทีเรีย	64
8	การจัดกลุ่มและระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีประโยชน์บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน	77
 ตารางผนวกที่		
ก1	ส่วนประกอบของอาหาร nutrient agar (NA)	112
ก2	ส่วนประกอบของอาหาร N-free medium	113
ก3	ส่วนประกอบของอาหาร Pikovskaya's medium	114
ก4	องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS)	115

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก5 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog คัดแปลงไม่เติมไนโตรเจน	116
ก6 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog คัดแปลงเติมฟอสเฟตในรูปละลายยาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	117
ก7 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog คัดแปลงไม่เติมฮอร์โมนออกซิน	118
ก8 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog คัดแปลงไม่เติมไนโตรเจน เติมฟอสเฟตในรูปละลายยาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ และไม่เติมฮอร์โมนออกซิน	119
ข1 น้ำหนักสดในส่วนใบของตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน	121
ข2 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ด้วยวิธี microwave extraction (ME)	122
ข3 ปริมาณ citronellal, geraniol และ citronellol ในตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน	123
ค1 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต และการผลิตฮอร์โมนออกซิน จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน	125
ง1 ความยาวส่วนยอดและส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม จากการเติมแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืช	130
ง2 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งส่วนยอดและส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม จากการเติมแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืช	131

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
จ1	ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยา	133
จ2	ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (ร้อยละ)	134
จ3	ค่าการนำไฟฟ้าของดิน electric conductivity (EC)	135
จ4	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ)	136
จ5	ปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ (extracable K) (NH_4OAc)	137
จ6	ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) (Bray II)	138

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	บริเวณรากพืช (rhizosphere) และ โครงสร้างของรากพืช	6
2	โครงสร้างขนขนาดเล็ก(microhairs) (A) การกระจายของขนขนาดเล็ก ที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อถาวร abaxial epidermis ของใบพืช (B)	14
3	กระบวนการสังเคราะห์สารประกอบกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes และ tetraterpenes) จากหน่วยย่อยของไอโซพรีน (isoprene) 2 หน่วย	16
4	กระบวนการสังเคราะห์สารสำคัญหลัก 3 ชนิด (citronellal, geraniol และ citronellol) ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม	17
5	โครงสร้างองค์ประกอบหลักของสารสำคัญ 3 ชนิด ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม citronellal (A), geraniol (B) และ citronellol (C)	18
6	บริเวณที่ 1 แปลงตะไคร้หอมบริเวณทิศเหนือของหมู่บ้านดงบัง ตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน (A) บริเวณที่ 2 แปลงตะไคร้หอมบริเวณทิศตะวันออกของหมู่บ้านดงบัง ตะไคร้หอมอายุ 4 เดือน (B) บริเวณที่ 3 แปลงตะไคร้หอมบริเวณทิศใต้ของหมู่บ้านดงบัง ตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน (C) และตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน (D)	29
7	ตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอมที่ทำการศึกษา	30
8	เครื่องสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยใช้วิธีไมโครเวฟ (microwave extraction: ME)	31
9	เครื่อง gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) รุ่น GCMS-QP2010	32
10	น้ำหนักสดของใบตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	ร้อยละโดยน้ำหนัก (w/w) ของปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ด้วยวิธี microwave extraction (ME)	51
12	เปรียบเทียบร้อยละของปริมาณ citronellal ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน	53
13	เปรียบเทียบร้อยละของปริมาณ geraniol ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน	54
14	เปรียบเทียบร้อยละของปริมาณ citronellol ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน	54
15	สารพันธุกรรม (DNA) ที่สกัดจากตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอม ช่องตัวอย่าง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) ช่องตัวอย่าง A-E คือ ตัวอย่างสารพันธุกรรมของแบคทีเรียที่สกัดจากบริเวณรากตะไคร้หอม	56
16	การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ จากตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอม ชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 220 bp ช่องตัวอย่าง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) ช่องตัวอย่าง A-I คือ ตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอม ช่องตัวอย่าง J คือ Negative หรือ น้ำ	57
17	ลักษณะรูปแบบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ช่องตัวอย่าง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) ช่องตัวอย่าง 1-3 คือ ตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน ช่องตัวอย่าง 4-8 คือ ตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 4 เดือน ช่องตัวอย่าง 9-13 คือ ตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน ช่องตัวอย่าง 14-18 คือ ตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2 (●), 4 (●), 6 (●) และ 8 (●) เดือน วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for windows โดยวิธี principle component analysis (PCA)	59
19	ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอม อายุ 2 (●), 4 (●), 6 (●) และ 8 (●) เดือน ร่วมกับปัจจัยทางด้านพืชและดิน วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for windows โดยวิธี canonical correspondence analysis (CCA)	61
20	ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียจากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน	66
21	ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียจากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน	67
22	ความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซินของแบคทีเรียจากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน	68
23	จำนวนและกิจกรรมของแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน (A), 4 เดือน (B), 6 เดือน (C) และ 8 เดือน (D)	70
24	ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ จากตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรากตะไคร้หอม ชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 1,500 bp M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) และ Rh (1, 5, 14, 20, 15, 24, 51, 54 และ 55) คือ รหัสแบคทีเรีย	71
25	ตัวอย่างรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hae</i> III ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) และ Rh (1, 5, 14, 20, 15, 24, 51, 54, 55 และ 67) คือ รหัสแบคทีเรีย	72

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	ตัวอย่างรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hha</i> I ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) และ Rh (1, 5, 14, 20, 15, 24, 51, 54, 55, 67 และ 65) คือ รหัสแบคทีเรีย	72
27	ร้อยละของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ทั้งหมด 23 ชนิด	73
28	เปรียบเทียบร้อยละของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน	80
29	เปรียบเทียบร้อยละของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 4 เดือน	80
30	เปรียบเทียบร้อยละของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน	81
31	เปรียบเทียบร้อยละของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน	81
32	การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม T1 ดำรับควบคุมใส่น้ำมาเชื้อ (A), T2 ดำรับควบคุม (<i>E. coli</i> DH5 α) (B), T3 เดิม <i>Bacillus</i> sp. PS2 (C), T4 เดิม <i>Curtobacterium citreum</i> strain LCR23 (D), T5 เดิม <i>Klebsiella</i> sp. ICB572 (E) และ T6 เดิม <i>Bacillus</i> sp. PS2, <i>Curtobacterium citreum</i> strain LCR23 และ <i>Klebsiella</i> sp. ICB572 (F)	82
33	ความยาวเฉลี่ยส่วนยอดของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม จากการศึกษาด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ	85
34	ความยาวเฉลี่ยส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม จากการศึกษาด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ	86

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
35	น้ำหนักสดส่วนยอดของเนื้อเยื่อหุ้มเฝากลุ่ม จากการศึกษาด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ	88
36	น้ำหนักสดส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มเฝากลุ่ม จากการศึกษาด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ	89
37	น้ำหนักแห้งส่วนยอดของเนื้อเยื่อหุ้มเฝากลุ่ม จากการศึกษาด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ	91
38	น้ำหนักแห้งส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มเฝากลุ่ม จากการศึกษาด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ	92

บทบาทของแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมต่อการเจริญเติบโต และการสร้างสารสำคัญของพืช

Role of Rhizobacteria of Citronella Grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) on Yield and Bioactive Ingredient of Plant

คำนำ

ปัจจุบันกระแสนิยมผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพเพิ่มมากขึ้น สมุนไพรเป็นทางเลือกหนึ่งในการตอบสนองความต้องการดังกล่าว ประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตพืชสมุนไพรได้หลากหลายชนิด ตะไคร้หอมเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีแหล่งผลิตกระจายอยู่ทั่วประเทศ เช่น จังหวัดปราจีนบุรี สระแก้ว กาญจนบุรี อุบลราชธานี นครราชสีมา เชียงใหม่ ราชบุรี และชลบุรี ตะไคร้หอมเป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านอุตสาหกรรม ยารักษาโรค และประโยชน์ทางการเกษตร

จากความหลากหลายของการนำมาใช้ประโยชน์ ประเทศไทยมีความต้องการผลผลิตตะไคร้หอมปีละ 15 ตัน แต่ผลผลิตในประเทศยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค จึงมีการนำเข้าจากประเทศอังกฤษและประเทศฝรั่งเศส (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) ดังนั้นการพัฒนาคุณภาพและผลผลิตของตะไคร้หอมจึงมีความสำคัญ และจำเป็นสำหรับประเทศไทยเพื่อการพึ่งพาตนเองในระยะยาว ปัจจุบันศักยภาพทางด้านการผลิตตะไคร้หอมยังมีข้อจำกัด เนื่องจากคุณภาพผลผลิตยังอยู่ในระดับต่ำและไม่มีความสม่ำเสมอของสารสำคัญ จึงจำเป็นต้องเพิ่มผลผลิตต่อไร่ให้สูงขึ้น เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยในปริมาณมาก และมีคุณภาพดี แนวทางในการพัฒนาศักยภาพการผลิตสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การคัดเลือกพันธุ์ที่ดี การกำหนดพื้นที่ปลูก ระยะเวลาปลูกที่เหมาะสม ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว รวมถึงการคัดเลือกแบคทีเรียบริเวณรากพืชที่มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารสำคัญของพืช ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มทั้งปริมาณและคุณภาพของผลผลิตตะไคร้หอมให้สูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Banchio *et al.* (2008) พบว่าการเติมแบคทีเรีย *Bacillus megatherium* ร่วมกับปุ๋ยเคมีร้อยละ 50 ส่งผลให้ anetol สารสำคัญของยี่หระฝรั่งมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งพบว่า *Bacillus subtilis* GB03 มีบทบาทเป็นแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต กระตุ้นการสร้างน้ำมันหอมระเหย และส่งผล

ให้ terpineol สารสำคัญในกระเพรา (*Ocimum basilicum*) มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน (Kaymak *et al.*, 2008)

ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นในการคัดแยกแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอม ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซิน รวมทั้งการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงสุดในแต่ละด้าน เพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชวงศ์ Gramineae จากความได้เปรียบของประเทศไทยในด้านความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตทั้งพืช และจุลินทรีย์ที่มีอยู่สูง จึงน่าสนใจที่จะทำการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์จากบริเวณรากพืช เพื่อนำจุลินทรีย์ดังกล่าวมาใช้ในการผลิตพืชสมุนไพรในระบบเกษตรอินทรีย์ให้เกิดประโยชน์อย่างคุ้มค่าและยั่งยืนต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ซึ่งมีปริมาณสารสำคัญแตกต่างกัน
2. เพื่อคัดแยก ระบุชนิด และทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่มีประโยชน์บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ซึ่งมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืช
3. เพื่อศึกษาผลการใช้แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซิน ที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม ต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหน่กล้าแฟกุ่ม ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ

การตรวจเอกสาร

1. จุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืช

บริเวณรากพืช (rhizosphere) หมายถึง บริเวณของดินที่ติดกับรากพืช มีชนิด ปริมาณ และ กิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน แตกต่างจากบริเวณโดยรอบ (คณะกรรมการจัดทำพจนานุกรมปลูกพืชวิทยา, 2551) เนื่องจากบริเวณดังกล่าวจะมีสารที่รากพืชขับออกมา เป็นตัวกำหนดอาณาเขตบริเวณราก สารดังกล่าวจะถูกขับออกไปได้กว้างเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของดิน (soil type) ความชื้นในดิน (soil moisture) ค่า pH ของดิน (soil pH) อุณหภูมิของดิน (soil temperature) อายุของพืช (plant age) และสภาพการเจริญเติบโตของพืช สารขับจากรากมีคุณสมบัติเป็นสาร คัดเลือก (selective) การเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในทางปฐพีวิทยาสารที่ขับจากรากพืชมี บทบาทสำคัญหลายประการ เช่น การเกิดคีเลต (chelation) การละลายได้ของธาตุอาหารพืช การเกิด เม็ดดิน (soil aggregation) ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของดิน ดังนั้นสารขับจากรากพืชจึงเป็น ตัวการสำคัญในการกำหนดบทบาทของรากต่อสภาพแวดล้อม (ศุภมาส, 2529)

จุลินทรีย์บริเวณรากพืช (rhizosphere microbes) ได้รับอิทธิพลจากรากพืชโดยตรง บริเวณ รากพืช แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 คือ บริเวณ endorhizosphere ได้แก่ บริเวณชั้นเมือกที่พืชผลิต ขึ้น (plant mucilage) บริเวณผิวรากในชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อรากรวมถึงรากขนอ่อน และส่วน ของ cortex สำหรับส่วนที่ 2 คือ บริเวณ ectorhizosphere ได้แก่ ส่วนของบริเวณผิวรากพืชที่สัมผัส กับบริเวณที่มีสารขับจากรากพืชไปถึง การเจริญของจุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืชนั้น จะได้รับอาหาร จากบริเวณรากพืช เนื่องจากรากพืชจะหลั่งสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ ออกมาเช่น กรดอะมิโน (amino acid) น้ำตาล (sugar) เอนไซม์ (enzyme) วิตามิน (vitamin) กรดอินทรีย์ (organic acid) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) รวมถึงเซลล์พืชที่ตาย บริเวณที่มีการขับสารดังกล่าวจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต ของจุลินทรีย์บริเวณรากพืช รวมถึงส่งเสริมให้โครงสร้างของประชากร ชนิด ปริมาณ และความ หลากหลายของจุลินทรีย์มีสูง จากหลักการนี้จึงได้มีการศึกษาวิจัยการวิเคราะห์โครงสร้างประชากร และความหลากหลายของจุลินทรีย์ธรรมชาติ (Griffiths *et al.*, 1999) จากการรายงานของ Lynch and Whipps (1990) และ Bowen and Rovira (1991) พบว่าในธรรมชาติพืชแต่ละชนิด จะขับสารจาก รากพืชที่มีความจำเพาะเจาะจง ส่งผลให้มีชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ดินบริเวณรากแตกต่างกัน อีกทั้งการจัดการดินก็มีผลต่อความจำเพาะเจาะจงในการเข้าอาศัยของแบคทีเรียบริเวณรากเช่นกัน

1.1 อิทธิพลของบริเวณรากพืชที่มีต่อจุลินทรีย์ดิน (rhizosphere effect)

อิทธิพลของบริเวณรากพืช คือ อิทธิพลซึ่งรากพืชเอื้อประโยชน์ให้แก่จุลินทรีย์บางชนิด เจริญอยู่ได้ หรือเจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่น หรือส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด ซึ่งการยับยั้งดังกล่าวเกิดขึ้นโดยการสร้างสารยับยั้งจากจุลินทรีย์บางชนิด (สุกมาศ, 2529)

บริเวณรากพืชมีอิทธิพลต่อจุลินทรีย์ดิน และพบว่าแบคทีเรียมีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงมากกว่า เชื้อรา โปรโตซัว หรือ สาหร่าย จากการศึกษากของ Rouatt *et al.* (1960) พบว่า บริเวณรากต้นข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) มีการเข้าอาศัยอยู่ของแบคทีเรียมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณจุลินทรีย์ดินบริเวณรากข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.)

จุลินทรีย์ดิน	ปริมาณบริเวณรากพืช (CFU g ⁻¹ Soil)
Bacteria	1.2 x 10 ⁹
Fungi	1.2 x 10 ⁶
Protozoa	2.4 x 10 ³
Ammonifiers	5.0 x 10 ⁸
Denitrifiers	1.3 x 10 ⁸

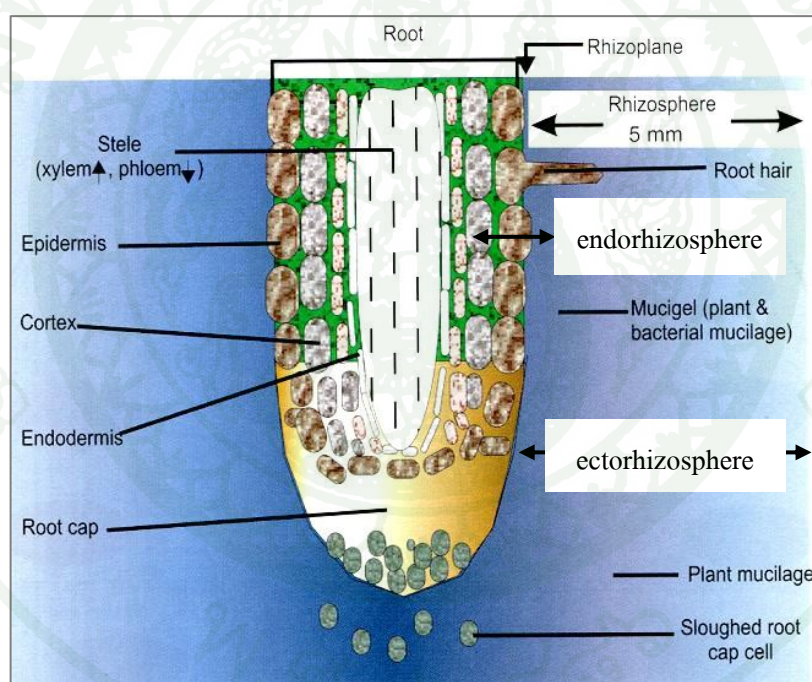
หมายเหตุ CFU: colony forming unit

ที่มา: Rouatt *et al.* (1960)

แบคทีเรียที่พบบริเวณรากพืชมีมากมายหลายชนิด ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacteria*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Serratia* และ *Pseudomonas* (Glick, 1995; Kloppe *et al.*, 1989) ปริมาณของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีอยู่มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ ชนิดของพืช สมบัติของดิน ภูมิอากาศ และการเกษตรกรรม อีกทั้งจุลินทรีย์บริเวณรากพืชมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และมีประสิทธิภาพในขบวนการดังกล่าวมากกว่าจุลินทรีย์ที่อยู่นอกบริเวณรากพืช

1.2 อิทธิพลของจุลินทรีย์บริเวณรากพืชที่มีต่อพืช (influence of the microflora)

รากพืชเป็นอวัยวะที่สำคัญของพืชมีบทบาทหน้าที่ในการดูดน้ำและธาตุอาหารไปเลี้ยงต้นพืช ช่วยให้พืชมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้เป็นปกติ รากพืชมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน ดังแสดงในภาพที่ 1 ประกอบด้วยรากขนอ่อน (root hair) epidermis เนื้อเยื่อเจริญ (root apical meristem) และหมวกราก (root cap) ซึ่งทำหน้าที่ปกคลุมราก ช่วยป้องกันอันตรายให้กับเนื้อเยื่อส่วนปลายสุดของรากที่กำลังแบ่งตัว และช่วยในการซ่อนไซของรากลงไปในดิน นอกจากนี้ยังทำหน้าที่สร้างเมือกที่เรียกว่า mucigel (ลิลลี่ และคณะ, 2549) และสร้างสารขับจากรากพืช (root exudate) ซึ่งสารดังกล่าวมีอิทธิพลต่อสภาพแวดล้อมบริเวณรากรวมทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ดิน (สุกมาศ, 2529)



ภาพที่ 1 บริเวณรากพืช (rhizosphere) และ โครงสร้างของรากพืช

ที่มา: คัดแปลงจาก Maier *et al.* (2000)

จุลินทรีย์ที่ได้รับการกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโต หรือมีกิจกรรมสูงในบริเวณรากพืช นั้น ส่วนใหญ่จะมีบทบาทส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืชนั้นๆ (สมศักดิ์, 2528) โดยจุลินทรีย์บริเวณ

รากพืชจะสร้างสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น สร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโต ทำให้โครงสร้างของดินดีขึ้น แปรสภาพธาตุอาหารพืชจากสารอินทรีย์ให้อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ซึ่งเป็นรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของจุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืช

วิทยา (2526) ได้กล่าวว่า ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อปริมาณของจุลินทรีย์ดินที่อาศัยอยู่ในบริเวณรากพืชนั้น มีดังนี้

1.3.1 ความใกล้ชิดกับราก ถ้าดินอยู่ใกล้กับรากพืชมากเท่าใด พบว่าปริมาณและกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินจะเพิ่มมากขึ้น

1.3.2 ความลึกของดิน พบว่าปริมาณของแบคทีเรีย เชื้อรา และสาหร่าย จะลดน้อยลงเมื่อความลึกของดินเพิ่มมากขึ้น

1.3.3 ชนิดของพืช พืชแต่ละชนิดจะมีลักษณะแตกต่างกัน ดังนั้นในบริเวณรากพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณของจุลินทรีย์ดินแตกต่างกันออกไป ปริมาณของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน เป็นผลมาจากลักษณะการแผ่กระจายของรากพืช องค์ประกอบของเนื้อเยื่อ รวมทั้งสารที่รากพืชขับออกมา

1.3.4 อายุของพืช มีอิทธิพลต่อจุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืช กล่าวคือ เมื่อพืชอายุน้อย จุลินทรีย์จะได้ประโยชน์จากสารที่พืชขับออกมามากกว่าที่จะได้ประโยชน์จากเนื้อเยื่อพืชที่ตายหรือเน่าสลาย แต่เมื่อพืชมีอายุมากขึ้นเนื้อเยื่อและคราบราก จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงชนิด และปริมาณของจุลินทรีย์ดินบริเวณราก อย่างไรก็ตามในระยะที่พืชแก่ และใกล้จะตาย รากพืชจะเริ่มแห้งและตาย คาร์โบไฮเดรตที่เป็นประโยชน์ต่อจุลินทรีย์จะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้ปริมาณของจุลินทรีย์ดินบริเวณรอบรากพืชมีปริมาณลดลง

1.3.5 สารอินทรีย์ มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของกลุ่มจุลินทรีย์ดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินที่ไม่มีการปลูกพืช แต่จะมีอิทธิพลน้อยมากต่อชนิด และปริมาณของจุลินทรีย์บริเวณรากพืช

1.4 จุลินทรีย์ดินต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

จุลินทรีย์ดินที่มีบทบาทต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ส่วนใหญ่พบว่าเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช หรือที่เรียกว่า plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) พบว่าแบคทีเรียบริเวณรากพืช ร้อยละ 2-5 เป็นแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Antoun and Prevost, 2005)

แบคทีเรียบริเวณรากพืชที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช มีรูปแบบในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 2 ทาง คือ การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางตรง (direct) เช่น การตรึงไนโตรเจน การเพิ่มปริมาณธาตุอาหารในรูปที่เป็นประโยชน์แก่พืช การสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant hormone) และการส่งเสริมการเจริญเติบโตทางอ้อม (indirect) โดยการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแก่พืช เช่น สร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) และการสร้างสารซีเดอร์โฟร์ (siderophore) (Vessey, 2003)

1.4.1 กลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตทางตรง

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น ช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ด การส่งเสริมการเจริญเติบโตทั้งส่วนยอดและราก การเพิ่มผลผลิตแก่พืช แบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชมีกลไกช่วยตรึงไนโตรเจนจากอากาศ เปลี่ยนรูปธาตุอาหารบริเวณรากพืชให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น การเปลี่ยนรูปของฟอสฟอรัสจากรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ (available) การผลิตฮอร์โมนพืช เช่น ออกซิน (auxin), ไซโตไคนิน (cytokinins), จิบเบอเรลลิน (gibberellins), เอทิลีน (ethylene) และ แอบซิซิก แอซิด (abscisic acid) ซึ่งพืชจะตอบสนองต่อฮอร์โมนพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน (Glick, 1995)

แบคทีเรียบริเวณรากที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนส่วนใหญ่ ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* และ *Clostridium* (Ozturk et al., 2003)

Azlin et al. (2005) ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากบริเวณรากปาล์มน้ำมัน (oil palm) แบคทีเรียที่คัดแยกได้ คือ *Paenibacillus durus*, *Paenibacillus polymysa*, *Azospirillum lipoferum*, *Herbaspirillum seropedicae* และ *Acetobacter diazotrophicus* มีอัตราการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 7.0×10^{-12} - 1.0×10^{-8} ไมโครโมลต่อชั่วโมง

นอกจากนี้ Saad and Yasser (2009) รายงานว่าแบคทีเรีย *Azospirillum brasilense* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแก่ข้าวสาลี สอดคล้องกับ Bhaskara and Charyulu (2005) พบว่าแบคทีเรีย *Azospirillum brasilense* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแก่ธัญพืช นอกจากนี้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนที่คัดแยกได้จากบริเวณรากพืชพบได้อีกหลายชนิด (Vessey, 2003) ดังแสดงในตาราง 2

ตารางที่ 2 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนที่คัดแยกได้จากบริเวณรากพืชชนิดต่างๆ

พืช	แบคทีเรีย
ข้าว	<i>Azospirillum</i> sp.
ข้าวโพด	<i>Azospirillum</i> sp. และ <i>Azotobacter</i> sp.
ข้าวสาลี	<i>Azospirillum</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp. และ <i>Bacillus polymyxa</i>

ที่มา: คัดแปลงจาก Vessey (2003)

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่สำคัญสำหรับพืช รongมาจากไนโตรเจน ซึ่งฟอสฟอรัสมีข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์ เนื่องจากฟอสฟอรัสในดินส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมด (Glass, 1986) การละลายฟอสเฟตโดยแบคทีเรียบริเวณรากพืชมีกลไกการเปลี่ยนรูปของฟอสเฟตจากรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถใช้ประโยชน์ได้ โดยแบคทีเรียจะผลิตกรดอินทรีย์มวลโมเลกุลต่ำออกมา มีผลในการเข้าทำลายโครงสร้าง และเปลี่ยนรูปของฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Hoberg *et al.*, 2005) แบคทีเรียที่พบว่ามีสามารถในการละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้จากบริเวณรากพืชชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตที่สกัดแยกได้จากบริเวณรากพืชชนิดต่างๆ

พืช	แบคทีเรีย
ข้าวบาร์เลย์	<i>Bacillus</i> sp.
ข้าวสาลี	<i>Azotobacter choococcum</i> , <i>Bacillus circulans</i> และ <i>Cladosporium herbarum</i>
ถั่วเขียว	<i>Bacillus</i> sp.
ถั่วลิสง	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> และ <i>Pseudomonas putida</i>
กะหล่ำ	<i>Xanthomonas maltophilai</i>
มะเขือเทศ	<i>Enterobacter agglomerans</i>
แรดิช	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> และ <i>Rhizobium</i> sp.
ราสเบอร์รี่	<i>Bacillus</i> sp.
แอปเปิ้ล	<i>Bacillus</i> sp.

ที่มา: คัดแปลงจาก Vessey (2003)

แบคทีเรียบริเวณรากพืชที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน (indole-3-acetic acid: IAA) พบว่าร้อยละ 80 ของแบคทีเรียบริเวณรากพืชสามารถผลิตฮอร์โมนออกซิน (Bhavdish *et al.*, 2003) จากการศึกษาในยุคแรกพบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* และ *Xanthomonas* และต่อมาพบการรายงานว่แบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium tumefaciens* และ *Pseudomonas syringae* สามารถผลิตฮอร์โมนออกซินได้เช่นกัน

Baudoin *et al.* (2010) พบว่าแบคทีเรีย *Azospillium brasilense* ที่สกัดแยกได้จากบริเวณรากข้าวสาลี มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน นอกจากนี้พบว่า *Streptomyces olivaceoviridis*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces rochei* และ *Streptomyces* spp. ที่สกัดแยกได้จากบริเวณรากมะเขือเทศ ก็มีความสามารถในการยืดยาวของราก และเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ด

มะเขือเทศ เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซินของแบคทีเรียดังกล่าว (Tokala *et al.*, 2002; El-Tarabily, 2008)

Khamna *et al.* (2010) ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน จากบริเวณรากพืชสมุนไพร 14 ชนิด พบว่าแบคทีเรีย *Streptomyces viridis* strain CMU-H009 ที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้แกง (lemongrass) มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซินสูงที่สุด ได้ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซินที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรากพืชอีกหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซินที่คัดแยกได้จากบริเวณรากพืชชนิดต่างๆ

พืช	แบคทีเรีย
ข้าว	<i>Aeromonas eronii</i> และ <i>Enterobacter cloacae</i>
ข้าวสาลี	<i>Azospirillum brasilense</i>
ผักกาดหอม	<i>Agrobacterium</i> sp., <i>Alcaligenes piechaudii</i> และ <i>Comamonas acidovorans</i>
แรดิช	<i>Bradyrhizobium</i> sp. และ <i>Rhizobium leguminosarum</i>
อ้อย	<i>Enterobacter</i> sp.

ที่มา: ดัดแปลงจาก Vessey (2003)

1.4.2 กลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตทางอ้อม (indirect)

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรีย PGPR พบว่ามีกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตทางอ้อม โดยการลดหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นโทษต่อพืช ลดหรือยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยตรง หรือการเข้าไปยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชทำให้รากพืชผิดปกติ (Kloepper, 1992)

2. ตะไคร้หอม (Citronella grass)

2.1 ชื่อและพันธุ์

ตะไคร้หอมเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ Gramineae พันธุ์ที่นิยมปลูกมากเพื่อการผลิตน้ำมันหอมระเหย มีอยู่ 2 ชนิด คือ พันธุ์ *Cymbopogon nardus* Linn. ส่วนชื่อท้องถิ่นมีหลายชื่อ เช่น จะโคมะบุด ตะไคร้มะบุด (ภาคเหนือ) หรือตะไคร้แดง (นครศรีธรรมราช) และอีกชนิดคือพันธุ์ *Cymbopogon winterianus* Jowitt ปลูกมากบริเวณเกาะชวา มีชื่อพื้นเมืองว่า Mahapengiri ซึ่งต่อมาได้กระจายออกไปหลายแห่ง เช่น เกาะไต้หวัน เกาะไฮติ (Cobley and Steek, 1976) และตะไคร้หอมชนิดนี้ปลูกมากในประเทศไทย (อรนุช, 2530)

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ตะไคร้หอมเป็นพืชล้มลุก อายุประมาณ 6-8 ปี เป็นพืชที่มีกลิ่นหอม เจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ หรือแตกเหง้าเป็นกอคล้ายตะไคร้บ้าน มีลำต้นขึ้นจากเหง้าสั้น รูปทรงกระบอก ผิวเรียบเกลี้ยง ส่วนเหนือดินสูงประมาณ 250 เซนติเมตร ใบเป็นใบเดี่ยวมีขนาดใหญ่และบางกว่า ตะไคร้บ้าน ใบเป็นรูปแถบเรียวยาว ขนาดกว้าง 1.5-2.6 เซนติเมตร ยาว 60-115 เซนติเมตร ปลายใบเรียวแหลม ขอบใบหยักถี่และคมแข็ง ผิวใบสาก นวล ไม่มีขน โคนใบด้านในใกล้ลิ้นใบมีขน ปลายใบยาวโน้มลง กาบใบเรียงซ้อนกันแน่น มีสีเขียวแกมเหลืองหรือสีเขียวแกมแดง ผิวเรียบ มีขนที่ปลาย จะออกดอกในฤดูหนาว ดอกออกเป็นช่อยาวขนาดใหญ่ มีลักษณะช่อแบบแยก แขนงขนาดใหญ่ยาวประมาณ 100 เซนติเมตร แกนก้านช่อยาวโค้งหักไปหักมา ช่อดอกย่อยมีทั้งแบบกระจ่และแบบเชิงลด ดอกสมบูรณ์เพศ กาบด่างมี 2 หยัก สีใส รยางค์แข็งยาว (ถ้ามีรยางค์) ไม่มีกาบบนกลีบเกล็ดมี 2 กลีบ เกสรเพศผู้ มี 3 อัน เกสรเพศเมีย ก้านเกสรมี 2 อัน ยอดเกสรมีขนยาวนุ่ม มีช่อดอกแบบเชิงลด ก้านดอกย่อยรูปรี เป็นดอกเพศผู้หรือดอกเป็นหมัน รูปราง และขนาดของกาบช่อ

ย่อยข้างล่าง มีเส้น 7-9 เส้น กาบช่อย่อยข้างล่างและข้างบนมีขนาดเท่ากัน มีเส้น 3 เส้น ดอกย่อยจริง จะมีเกสรตัวผู้ 1 เกสรตัวเมีย ยาว 0.3 เซนติเมตร สีใส ล้อมเกสรเพศผู้ 3 อัน และกลีบเกสรตัวเมีย 2 กลีบ ผลแบบผลแห้งติดเมล็ด รูปทรงกระบอกถึงกึ่งกลม และมีขี้วัวที่ฐาน (ก่องกานดา, 2540)

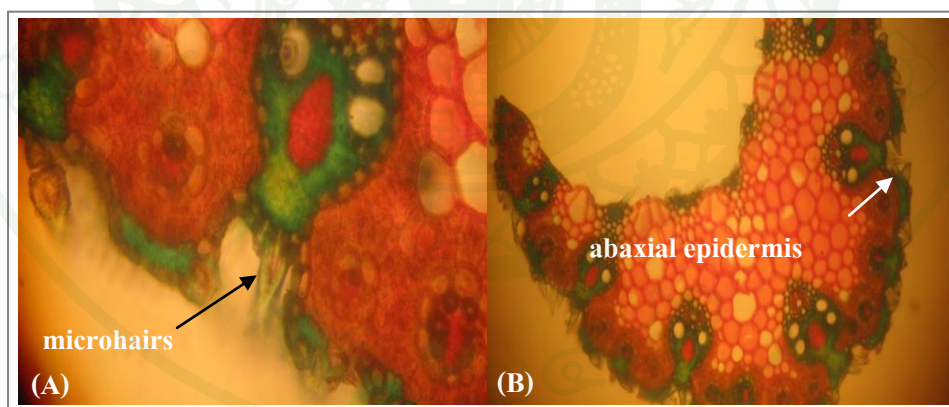
2.3 การเกษตรกรรม

ตะไคร้หอมเป็นพืชข้ามปีที่มีรากฝอยมาก สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนหรือร้อนชื้น ในบริเวณที่มีน้ำฝนประมาณ 2,000-2,500 มิลลิเมตรต่อปี และสามารถพบบนพื้นที่สูงได้ตั้งแต่ 600-1,500 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล ดินที่เหมาะสมต่อการปลูกตะไคร้หอม ได้แก่ ดินร่วนปนทราย มีปริมาณอินทรีย์วัตถุสูง เป็นดินที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของตะไคร้หอมมากที่สุด ส่วนดินเหนียวจัดหรือทรายจัด จะทำให้ตะไคร้หอมเจริญเติบโตช้า ค่า pH ของดินควรเป็นกลางถึงกรดอ่อนคือ 6-7 ตะไคร้หอมเป็นพืชที่ชอบแสงแดดจัด ซึ่งจะช่วยทำให้ตะไคร้หอมเจริญเติบโตเร็ว และส่งผลต่อปริมาณการสร้างน้ำมันหอมระเหย การปลูกตะไคร้หอมทำการเตรียมแปลงโดยการไถตากดินก่อนปลูกประมาณ 7 วัน เพื่อกำจัดวัชพืช โรค และแมลงในดินตามด้วยการไถพรวนเพื่อย่อยดินและยกร่อง โดยมีระยะห่างระหว่างต้น และระหว่างแถว 1.5x1.5 เมตร และขุดหลุมขนาด กว้างxยาวxลึก ประมาณ 15x15x15 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำส่วนท่อนพันธุ์ที่ตัดแต่งให้มีข้ออยู่ประมาณ 2-3 ข้อ มีกาบใบหุ้มข้ออยู่ 4-5 ใบ แล้วตัดปลายใบออก นำต้นพันธุ์ที่เตรียมไว้ลงปลูก หลุมละประมาณ 1-2 ต้น โดยปักให้เอียง 45 องศา หลังจากปลูกประมาณ 20-50 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 21-0-0 และ 16-20-0 และเมื่อตะไคร้หอมเริ่มจะมีการแตกกอในช่วงตั้งแต่ 120-150 วัน อัตราการใช้ปุ๋ยขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดิน การให้น้ำอย่างสม่ำเสมอทำให้ตะไคร้หอมแตกกอเร็วขึ้น และสามารถให้ผลผลิตได้ตลอดปี และตลอดระยะเวลาในการเจริญเติบโต ตะไคร้หอมเป็นพืชที่ทนต่อโรค แมลง และทนแล้งได้ดี ซึ่งง่ายต่อการดูแล สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้หลังจากปลูกประมาณ 6-8 เดือน มีอายุการให้ผลผลิตยาวประมาณ 5-6 ปี แต่ปริมาณการให้น้ำมันหอมระเหยสูงสุดอยู่ในปีที่ 2 หรือ 3 เท่านั้น หลังจากนั้นปริมาณน้ำมันหอมระเหยจะลดลง การปลูกใหม่จึงควรดำเนินการปลูกในปีที่ 3 หรือ 4 การเก็บเกี่ยวจะตัดส่วนใบเหนือพื้นดิน 25-30 เซนติเมตร เพื่อให้ต้นที่เหลือสามารถแตกใบใหม่ได้เร็วขึ้น การเก็บเกี่ยวแต่ละครั้งควรเว้นระยะห่างประมาณ 3 เดือน สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ปีละ 2-3 ครั้ง (วัชร, 2542)

2.4 น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม

น้ำมันหอมระเหย (volatile oil) เป็นสารอินทรีย์ที่พืชสังเคราะห์ขึ้น มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว พืชสร้างน้ำมันหอมระเหยไว้ในเซลล์พิเศษ พวงเซลล์ ต่อมน้ำหรือท่อภายในพืช น้ำมันหอมระเหยเกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมระดับทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นแต่ไม่ได้ทำหน้าที่โดยตรงต่อการเจริญเติบโตของพืช เป็นสารที่พบในพืชบางวงศ์ บางสกุลหรือบางชนิด และพบปริมาณเพียงเล็กน้อย (ลิลลี่ และคณะ, 2549) สารตั้งต้นในการผลิตน้ำมันหอมระเหย ได้จากปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมระดับปฐมภูมิ (primary metabolite) แต่อาจแตกต่างกันที่เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาของการผลิตน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด (Ramanchandra and Ravishankar, 2002)

พืชที่สามารถผลิตน้ำมันหอมระเหยจะสังเคราะห์ จัดเก็บ และปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด วงศ์ หรือสกุล จากการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสรีรวิทยาของพืช เช่น จากโครงสร้างของใบ ราก กลีบดอก ผล ลำต้น และขนใบ สำหรับตะไคร้หอม เป็นพืชที่สร้างน้ำมันหอมระเหยจากขนขนาดเล็ก (microhairs) ที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อผิว abaxial epidermis ของใบ (Iruthayathas and Herath, 1982) ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างขนขนาดเล็ก (microhairs) (A) การกระจายของขนขนาดเล็กที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อผิว abaxial epidermis ของใบพืช (B)

ที่มา: คัดแปลงจาก Iruthayathas and Herath (1982)

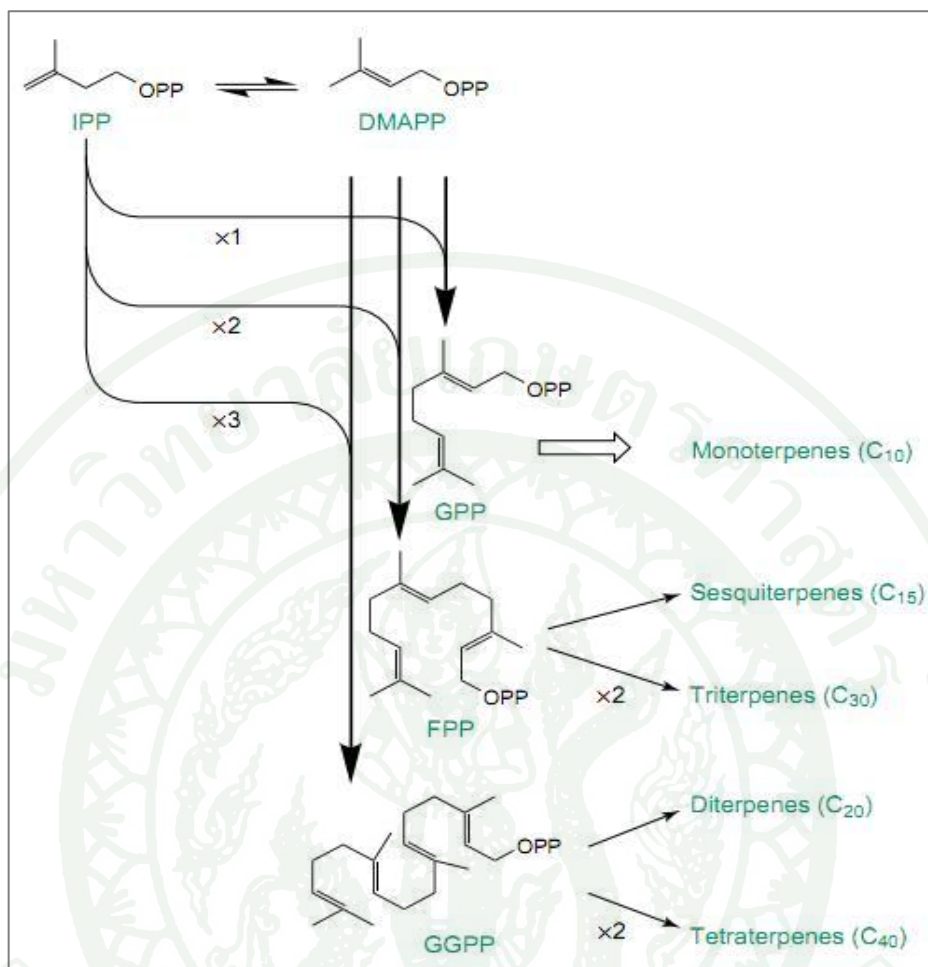
2.4.1 กระบวนการสร้างน้ำมันหอมระเหยทางชีวเคมี

โดยทั่วไปการสร้างน้ำมันหอมระเหยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลัก จากความแตกต่างของสารตั้งต้นของปฏิกิริยา และกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน (นิธิยา, 2545; Sangwan *et al.*, 2001) ได้แก่

(1) สารประกอบกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoids)

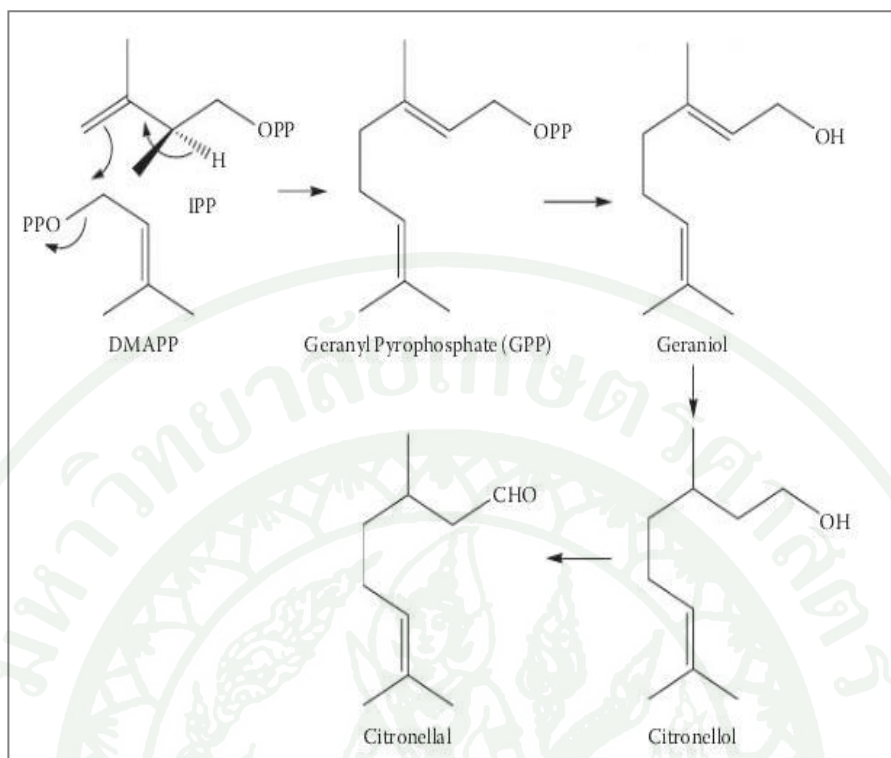
สารประกอบกลุ่มเทอร์พีนอยด์ เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างทั้งเป็นเส้นตรง และวงแหวน ประกอบด้วยหน่วยย่อยของไอโซพรีน (isoprene) ตั้งแต่ 2 หน่วยขึ้นไป เรียกว่า เทอร์พรีนไฮโดรคาร์บอน (terpene hydrocarbon) หน่วยย่อยของไอโซพรีน ที่สำคัญสำหรับเป็นตั้งต้นในการสังเคราะห์สารประกอบกลุ่มเทอร์พีนอยด์ คือ ไอโซพรีนไพโรฟอสเฟต (isoprene pyrophosphate: IPP) และไดเมทิลอัลลิลไพโรฟอสเฟต (dimethylallyl pyrophosphate: DMAPP) สารประกอบในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ terpenoid derivative โดยเกิดผ่าน acetate-mevalonic acid pathway สารประกอบในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ที่ได้ คือ monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes และ tetraterpenes ซึ่งมีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก 10, 15, 20, 30 และ 40 อะตอม ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3

สารสำคัญของตะไคร้หอมเป็นกลุ่มย่อยของสารประกอบเทอร์พีนอยด์ monoterpenes มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก 10 อะตอม สารสำคัญหลัก 3 ชนิด ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม คือ citronellal, geraniol และ citronellol สารสำคัญดังกล่าวเกิดจากกระบวนการ terpenoid derivative ซึ่งมีหน่วยของไอโซพรีนไพโรฟอสเฟต และไดเมทิลอัลลิลไพโรฟอสเฟต เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาที่สำคัญ หน่วยย่อยของไอโซพรีนทั้ง 2 ชนิด รวมเป็น เจอรานิลไพโรฟอสเฟต สามารถสังเคราะห์เป็น citronellal, geraniol และ citronellol ดังแสดงในภาพที่ 4 สำหรับสารทั้ง 3 ชนิด เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบโครงสร้างหลัก citronellal มีแอลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบหลัก (aldehyde volatile oils) geraniol และ citronellol มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบหลัก (alcohol volatile oils) ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์สารประกอบกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes และ tetraterpenes) จากหน่วยย่อยของไอโซพรีน (isoprene) 2 หน่วย

ที่มา: Sangwan *et al.* (2001)



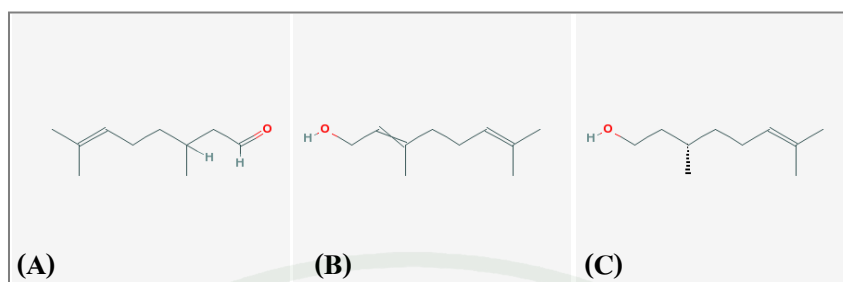
ภาพที่ 4 กระบวนการสังเคราะห์สารสำคัญหลัก 3 ชนิด (citronellal, geraniol และ citronellol) ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม

ที่มา: Sangwan *et al.* (2001)

(2) สารประกอบกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids)

สารประกอบในกลุ่มนี้เกิดผ่าน shikimic acid-phenylpropanoid route พบกระบวนการดังกล่าวในพืชชั้นสูงหลายชนิด สารตั้งต้นที่สำคัญของปฏิกิริยานี้ ได้แก่ สารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน (amino acid) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) และ ไทโรซีน (tyrosine)

น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมมีสารสำคัญหลัก 3 ชนิด คือ citronellal, geraniol และ citronellol (Quintans-Junior *et al.*, 2008) สารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยจากพันธุ์ *C. nardus* L. และพันธุ์ *C. winterianus* J. มีปริมาณแตกต่างกัน พบว่าพันธุ์ *C. winterianus* J. มีปริมาณ citronellal, geraniol และ citronellol สูงกว่าพันธุ์ *C. nardus* L. ดังแสดงในตารางที่ 5



ภาพที่ 5 โครงสร้างองค์ประกอบหลักของสารสำคัญ 3 ชนิด ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม citronellal (A), geraniol (B) และ citronellol (C)

ที่มา: Quintans-Junior *et al.* (2008)

ตารางที่ 5 สารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยจากพันธุ์ *Cymbopogon nardus* L. และพันธุ์ *Cymbopogon winterianus* J.

ชนิดของสารสำคัญ	ปริมาณเฉลี่ย (ร้อยละ)	
	<i>C. nardus</i> L.	<i>C. winterianus</i> J.
1. Limonene	9.7	1.3
2. Methyl neptanone	0.2	Trace
3. Citronellal	5.2	32.7
4. Citronyl acetate	1.9	3.0
5. Menthol	Trace	-
6. l-borneol	6.6	Trace
7. Citronellol, geranyl acetate	8.4	15.9
8. Geraniol	18.0	23.9
9. Methyl euginol	1.7	Trace
10. Methyliso-euqunol; euginol	7.2	2.3
11. Geranyl formate	4.2	2.5
12. Trans-ocinene	1.8	-

ที่มา: วินัย (2540)

2.4.2 มาตรฐานของน้ำมันหอมระเหย

ประเทศผู้ผลิตสารหอม (aromatic substance) ที่สำคัญได้แก่ กลุ่มประเทศในเอเชีย บราซิล จีน อินเดีย และอินเดียน สำหรับประเทศในทวีปยุโรป สหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น เป็นตลาดน้ำมันหอมระเหยที่ใหญ่ที่สุดในโลก และพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม มีการนำเข้าสู่ประเทศในกลุ่มยุโรปสูงที่สุด (สิริลักษณ์, 2545)

การกำหนดมาตรฐานน้ำมันหอมระเหยของพืชสมุนไพร เนื่องจากปัจจุบันได้มีการนำพืชสมุนไพรบางชนิดมากลั่นน้ำมันหอมระเหย และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ด้านอาหาร อุตสาหกรรมเคมี และด้านเภสัชกรรม ดังนั้นเพื่อเป็นแนวทางในการผลิตน้ำมันหอมระเหยให้มีคุณภาพดี และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรม จึงมีการกำหนดมาตรฐานของน้ำมันหอมระเหย โดยคณะกรรมการวิชาการคณะ 861 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำมันหอมระเหยได้กำหนดมาตรฐานแล้ว 7 เรื่อง ดังนี้

(1) มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำมันไพล (Phlai Oil) มาตรฐานเลขที่ มอก.1679-2441

(2) มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำมันดอกกานพลู (Clove Bud Oil) มาตรฐานเลขที่ มอก.1680-2441

(3) มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำมันตะไคร้ (Lamongrass Oil) มาตรฐานเลขที่ มอก.1681-2441

(4) มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำมันตะไคร้หอม (Citronella Oil) มาตรฐานเลขที่ มอก.1682-2441

(5) มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำมันผิวมะกรูด (Makrut Peel Oil) มาตรฐานเลขที่ มอก.2078-2444

(6) มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำมันใบมะกรูด (Makrut Leaf Oil) มาตรฐานเลขที่ มอก.2079-2444

(7) มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำมันโหระพา (Basil Oil Thai type)
มาตรฐานเลขที่ มอก.2079-2444

มาตรฐานข้างต้นกำหนดขึ้นโดยผู้แทนจากหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้อง และใช้ข้อมูลการศึกษาวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย องค์การเกษตรกรรม กรมวิชาการเกษตร กรมวิทยาศาสตร์บริการ และบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด เป็นแนวทางกำหนดมาตรฐานน้ำมันหอมระเหยแต่ละเรื่องล้วนมีขอบข่ายกำหนดคุณภาพไว้ประกอบด้วย บทนิยามชื่อทางพฤกษศาสตร์ คุณลักษณะที่ต้องการ ซึ่งครอบคลุมตั้งแต่ลักษณะทั่วไปที่ต้องเป็นของเหลวใส ระบุสีที่ปรากฏปราศจากตะกอนและแขวนลอย ไม่มีการแยกชั้นของน้ำมัน โดยมีกลิ่นเฉพาะตัว และกำหนดคุณลักษณะทางฟิสิกส์ เช่นการละลายในเอทานอล ความหนาแน่นสัมพัทธ์ ออปติคอลโรเทชัน ดัชนีหักเห เป็นต้น ตลอดจนกำหนดองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรต่างๆ มีคุณภาพดีเหมาะสมกับการนำไปใช้ โดยทั้งหมดนี้ต้องมีค่าตามเกณฑ์กำหนดในมาตรฐาน (สิริลักษณ์, 2545)

2.5 การใช้ประโยชน์จากตะไคร้หอม

2.5.1 การใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

ตะไคร้หอมเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่มีน้ำมันหอมระเหย ทั้งส่วนของใบและลำต้น มีสรรพคุณทางยา ดับไข้แก้ริดสีดวงในปาก (ปากแฉกระแหง เป็นแผลในปาก) สตรีมีครรภ์รับประทาน ทำให้แท้ง บีบรัดมดลูก ขับลมในลำไส้ แก้แน่นท้อง (ก่องกานดา, 2540)

2.5.2 การใช้ประโยชน์ทางการเกษตร

น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมมีคุณสมบัติป้องกันตัวเต็มวัยและสามารถฆ่าไข่ของด้วงถั่วเขียว (*Callosobruchus maculatus*) ซึ่งเป็นแมลงในโรงเก็บเข้าทำลายเมล็ดถั่วเขียวที่เก็บ โดยใช้ citronellal ความเข้มข้นร้อยละ 5 ตั้งทิ้งไว้ในโรงเก็บเมล็ดเป็นเวลา 3 ชั่วโมงสามารถออกฤทธิ์ไล่ตัวเต็มวัยและไข่ของด้วงถั่วเขียวได้ (Raja and William, 2008) จากการทดลองของ Abramson *et al.* (2006) พบว่าสามารถใช้สารสกัดจากตะไคร้หอมยับยั้งเชื้อที่เข้าทำลายต้นยี่ห่วยฝรั่งได้ โดยใช้ citronellal เข้มข้นร้อยละ 1.0 ฉีดพ่นยี่ห่วยฝรั่ง และมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และการผลิต aflatoxin พบว่า citronellal ซึ่ง

เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และสามารถยับยั้งการผลิต aflatoxin โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 นอกจากนี้ สุนทรีย์ และคณะ (2547) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากตะไคร้หอมเพื่อควบคุม *Zoothamnium* sp. ในกึ่งกลาดำระยะ PL15 พบว่าสารสกัดตะไคร้หอมที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี soxhlet มีประสิทธิภาพในการกำจัด *Zoothamnium* sp. ให้หมดภายใน 24 ชั่วโมง

2.6 การปลูกตะไคร้หอมในประเทศไทย

ตะไคร้หอมที่นำมาสกัดน้ำมันหอมระเหย มีแหล่งกำเนิดมาจากประเทศศรีลังกาและอินโดนีเซีย ปัจจุบันมีการกระจายปลูกตะไคร้หอมทั่วประเทศไทย เช่น จังหวัดสระแก้ว กาญจนบุรี อุบลราชธานี นครราชสีมา เชียงใหม่ ราชบุรี และชลบุรี โดยเฉพาะ จังหวัดสระแก้ว เกษตรกรสามารถผลิตตะไคร้หอมได้ ประมาณ 5,700-6,000 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งพันธุ์ที่เกษตรกรไทยนิยมปลูกคือพันธุ์ *C. winterianus* J. เนื่องจากมีช่อดอกที่โน้มต่ำลง ต่างจากพันธุ์ *C. nardus* L. ที่มีช่อดอกตรงและสั้น อีกทั้งยังพบว่าพันธุ์ *C. winterianus* J. มีลำต้นและใบที่ยาวกว่า มีกลิ่นแรง และนอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยที่ได้มีคุณภาพดีกว่าพันธุ์ *C. nardus* L. โดยนิยมปลูกตะไคร้หอมประมาณเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550)

2.7 การตลาดของตะไคร้หอม

ความต้องการผลผลิตตะไคร้หอมในประเทศไทย พบว่ามีความต้องการปีละ 15 ตัน โดยผลผลิตสดร้อยละ 75 มีการจำหน่ายไปสู่กลุ่มแม่บ้านและโรงพยาบาล เพื่อนำไปสกัดน้ำมันหอมระเหย แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร เช่น ยากันยุงและแมลง สารแต่งกลิ่นผสมในเครื่องสำอาง ยารักษาโรค และอื่นๆ ผลผลิตที่เหลืออีกร้อยละ 25 จะจำหน่ายเข้าสู่โรงงานแปรรูปโดยตรง อย่างไรก็ตามผลผลิตในประเทศไทยยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค จึงมีการนำเข้าจากประเทศอังกฤษและฝรั่งเศส สำหรับสัดส่วนทางการตลาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากตะไคร้หอมในประเทศไทย ร้อยละ 97 จำหน่ายแก่ผู้บริโภคภายในประเทศ และอีกร้อยละ 3 ส่งออกจำหน่ายไปยังตลาดต่างประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550)

3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียบริเวณรากพืชต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโต และการสร้างสารสำคัญของพืช

Azlin *et al.* (2005) ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์บริเวณรากและจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในรากของปาล์มน้ำมัน มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรึงไนโตรเจนแก่ปาล์มน้ำมัน และนำแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์มาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อลดต้นทุนการผลิตจากการใช้ปุ๋ยเคมี โดยการแยกเชื้อบนอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน N-free ATCC และนำมาทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยใช้เทคนิค acetylene reduction assay (ARA) ทำให้ทราบทั้งปริมาณและความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ จากการทดลองสามารถคัดแยกแบคทีเรียบริเวณรากและภายในรากปาล์มน้ำมันได้ทั้งหมด 29 ไอโซเลต ซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหาร N-free ATCC ซึ่งจำแนกได้คือ *Paenibacillus durus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Azospirillum lipoferum*, *Herbaspirillum seropedicae* และ *Acetobacter diazotrophicus* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศอยู่ระหว่าง 7.0×10^{-12} - 1.0×10^{-8} โมลเอทิลีนต่อชั่วโมง

Kang *et al.* (2007) ศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR พบว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืช (symbiosis) และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช มีบทบาทในการยับยั้ง และลดการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการช่วยลดอัตราการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชในพริกไทย (*Capsicum annum* L.) ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มอัตราการอยู่รอด และช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตพริกไทยได้ โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียจากลำต้นของพริกไทยที่มีความสมบูรณ์ในเมืองชุงชอง (Chungcheong) และกียองซัง (Gyeongsang) ประเทศเกาหลี สามารถคัดแยกแบคทีเรียจากลำต้นของพริกไทยได้ทั้งหมด 150 ไอโซเลต และพิจารณาเลือกแบคทีเรียที่เป็น endophytic พบจำนวน 23 ไอโซเลต ใช้เป็นตัวแทนของแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากพริกไทย การจำแนกใช้คุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ พบ *Ochrobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Janthinobacterium*, *Ralstonia*, *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Sporosarcina*, *Acidovorax* และ *Brevundimonas* ซึ่งแบคทีเรียที่เป็น endophytic คือแบคทีเรียรหัส PS4 และ PS27 เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวสามารถอาศัยอยู่ร่วมกับต้นพริกไทย โดยมีปริมาณ 10^6 และ 10^7 เซลล์ต่อเนื้อเยื่อพืชหนึ่งกรัมตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ พบว่าแบคทีเรียรหัส PS4 และ PS27 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas rhodesiae* และ *Pantoea ananatis* ตามลำดับ ดังนั้นจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำแบคทีเรีย 2 ชนิด ไปพัฒนาเพื่อประโยชน์ในด้าน

การส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของพริกไทย อีกทั้งแบคทีเรียรหัส PS4 และ PS27 สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักรากของพริกไทยสูงขึ้นร้อยละ 73 และ 41.5 ตามลำดับ นอกจากนี้แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคคือ *Xanthomonas axonopodis* pv. *l* ได้อีกด้วย

Mahfouz and Sharaf-Eldin (2007) ทำการศึกษาการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม PGPR เพื่อจะนำมาประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพจากจุลินทรีย์ร่วมกับการใช้ปุ๋ยเคมีที่มีธาตุไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) เป็นองค์ประกอบ เพื่อช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตและสารสำคัญของยี่ห่อฝรั่ง โดยแบคทีเรียที่นำมาใช้คือ *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum liboferum* และ *Bacillus megatherium* การทดลองแบ่งดำเนินการทดลองเป็น 6 ดำเนินการทดลอง คือ ดำเนินการทดลองที่ 1) เติม *Azotobacter chroococcum* ร่วมกับปุ๋ยเคมี NPK ร้อยละ 50 ดำเนินการทดลองที่ 2) เติม *Azospirillum liboferum* ร่วมกับปุ๋ยเคมี NPK ร้อยละ 50 ดำเนินการทดลองที่ 3) เติม *Bacillus megatherium* ร่วมกับปุ๋ยเคมี NPK ร้อยละ 50 ดำเนินการทดลองที่ 4) เติมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดร่วมกับปุ๋ยเคมี NPK ร้อยละ 50 ดำเนินการทดลองที่ 5) ไม่เติมแบคทีเรียร่วมกับปุ๋ยเคมี NPK ร้อยละ 50 และดำเนินการทดลองที่ 6) ไม่เติมแบคทีเรียร่วมกับปุ๋ยเคมี NPK ร้อยละ 100 ผลการศึกษาพบว่า การเจริญเติบโตทางด้านความสูง จำนวนกิ่ง น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น น้ำหนักผลของยี่ห่อฝรั่ง รวมถึงวัดปริมาณของน้ำมันหอมระเหย พบว่าดำเนินการทดลองเติมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดร่วมกับปุ๋ยเคมี NPK ร้อยละ 50 ให้ผลการทดสอบด้านการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงที่สุด ส่วนดำเนินการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียร่วมกับปุ๋ยเคมี NPK ร้อยละ 50 ให้ผลต่ำที่สุด ทั้งการด้านการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมันหอมระเหย จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในน้ำมันหอมระเหยของยี่ห่อฝรั่ง พบว่าการเติมแบคทีเรีย *Bacillus megatherium* ร่วมกับปุ๋ยเคมี NPK ร้อยละ 50 สามารถให้ anetol ซึ่งเป็นสารสำคัญของยี่ห่อฝรั่ง ที่นำไปใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตยารักษาโรคมีปริมาณสูงกว่าดำเนินการทดลองอื่นๆ

Beneduzi et al. (2008) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacilli* โดยการคัดแยกแบคทีเรียจากบริเวณรากของข้าว และดินนอกบริเวณเขตราก ทั้งหมด 7 พื้นที่ ในประเทศบราซิล แยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 296 ไอโซเลต หลังจากนั้นจึงนำมาทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรีย *Bacilli* ทั้งหมด 296 ไอโซเลต ที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่ข้าว โดยการคัดแยกแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อกิจกรรมต่างๆ ของแบคทีเรีย *Bacilli* พบว่าแบคทีเรีย *Bacilli* มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมน ออกซิน ความสามารถในการละลายฟอสเฟต และความสามารถในการผลิต siderophore จากการ

ทดสอบพบว่าแบคทีเรียรหัส 94 และ 148 สามารถผลิตฮอร์โมนออกซิน โดยอัตราการผลิตฮอร์โมนออกซิน คือ 0.1 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งการผลิตฮอร์โมนออกซิน จะเกิดหลังจากการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 72 และ 124 ชั่วโมงตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียรหัส 22 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต และรหัส 32 สามารถผลิต siderophore ผลจากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย *Bacilli* บริเวณรากข้าว โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ พบว่าชนิดของแบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือ *Paenibacillus* และ *Bacillus* ข้อมูลดังกล่าวพบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ มีบทบาทส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงส่งผลให้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อดังกล่าวเพื่อนำมาใช้เพิ่มผลผลิตข้าวในประเทศบราซิล

Ahmad *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษากิจกรรมต่างๆ ของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่อย่างอิสระบริเวณรากพืชและปมรากพืช เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ทำการศึกษาริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกันของ Aligarh UP ประเทศอินเดีย จากการคัดแยกแบคทีเรียบริเวณรากพืชทั้งหมด 7 ชนิดคือ (มัสตาด ข้าวสาลี อ้อย หัวหอม กระหล่ำปลี กระหล่ำดอก และถั่วเขียว) รวมทั้งบริเวณปมรากถั่วเขียวสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 72 ไอโซเลต หลังจากตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากพืช คือ แบคทีเรียสกุล *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* และ *Mesorhizobium* แยกได้จากปมถั่วเขียว หลังจากการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืชของแบคทีเรียที่ได้ทั้ง 4 สกุล พบว่ามากกว่าร้อยละ 80 ของแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* รหัส ATZ₃, ATZ₁₃ และ ATZ₂₃ *Pseudomonas* รหัส PS₅ และ *Mesorhizobium* สามารถผลิตฮอร์โมนออกซินได้ร้อยละ 20 และแบคทีเรียสกุล *Bacillus* รหัส B₁ สามารถผลิตฮอร์โมนออกซิน ได้เช่นกัน จากการทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต พบว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้สูงสุดคือ ร้อยละ 80 รองลงมาคือ *Azotobacter*, *Pseudomonas* และ *Mesorhizobium* สามารถละลายฟอสเฟตได้ร้อยละ 74.47, 55.56 และ 16.67 ตามลำดับ สำหรับความสามารถในการผลิต siderophore รวมถึงความสามารถในการต้านทานเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแก่พืชนั้น พบว่าทุกไอโซเลตยกเว้น *Mesorhizobium* สามารถสร้าง siderophore และสามารถต้านทานเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแก่พืช เช่น *Aspergillus*, *Fusarium* และ *Rhizoctonia bataticola* ได้ร้อยละ 10-12.7 และมีความสามารถในการผลิต hydrogen cyanide (HCN) พบว่าแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* และ *Bacillus* สามารถผลิต HCN ได้ร้อยละ 88.8 และ 50 ตามลำดับ จากการทดสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากบริเวณรากพืชและปมรากพืชหลายชนิด พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สกุล สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตพืชได้

Kaymak *et al.* (2008) ศึกษาการใช้ประโยชน์ของจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่คัดแยกได้จากบริเวณรากพืชเพื่อส่งเสริมการสร้างรากของสะระแหน่ (*Mentha piperita* L.) ที่ทำการปักชำ โดยการนำกิ่งของสะระแหน่ที่จะนำไปปักชำจุ่มในสารละลายที่มีการเติมแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR มีความเข้มข้นของแบคทีเรียต่อน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 10^{-9} เซลล์ต่อมิลลิเมตร ดังนี้ *Agrobacterium rubi* (รหัส A16) *Burkholderia gladii* (รหัส BA7) *Pseudomonas putida* (รหัส BA8) *Bacillus subtilis* (รหัส OSU142) และ *Bacillus mefatorium* (รหัส M3) ทำการจุ่มสารละลายของแบคทีเรียแต่ละชนิดเป็นเวลา 45 นาที ก่อนจะนำไปชำบนวัสดุปลูกที่เตรียมไว้ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการวัดร้อยละการงอกของราก ความยาวราก และน้ำหนักแห้งของราก เปรียบเทียบผลการทดลองกับดำรับควบคุมที่มีการจุ่มกิ่งของสะระแหน่ในสารละลายที่ไม่เติมแบคทีเรียก่อนการปักชำ พบว่าการจุ่มกิ่งสะระแหน่ลงในสารละลายที่มีการเติมแบคทีเรียรหัส A16, M3 และ BA8 มีร้อยละการงอกของรากสูงสุด โดยพบอัตราการงอกร้อยละ 89.28, 88.64 และ 87.52 ตามลำดับ และดำรับควบคุมมีอัตราการงอกของรากต่ำที่สุดคือ 78.14 การวัดความยาวรากพบว่าการจุ่มกิ่งสะระแหน่ลงในสารละลายที่มีแบคทีเรียรหัส BA7, A16 และ M3 มีความยาวของรากมากกว่าดำรับการทดลองอื่นๆ และน้ำหนักแห้งของรากที่มีน้ำหนักสูงสุดคือ ดำรับที่จุ่มในสารละลายที่เติมแบคทีเรียรหัส M3 จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียรหัส M3 มีความสามารถในการส่งเสริมการงอกราก การยืดยาวของราก และเพิ่มปริมาณน้ำหนักแห้งของรากสะระแหน่ได้ดีที่สุด จากสมบัติดังกล่าวสามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียรหัส M3 เพื่อช่วยในการเพิ่มปริมาณรากของกิ่งปักชำได้

Biari *et al.* (2008) ศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโต และการส่งเสริมความสามารถในการดูดใช้ธาตุอาหารของข้าวโพด (*Zea mays* L.) โดยการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR โดยเลือกศึกษาแบคทีเรียสกุล *Azospirillum* และ *Azotobacter* วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แบคทีเรียสกุล *Azospirillum* ที่นำมาทดสอบคือ *Azospirillum* sp. รหัส 21 *Azospirillum lipoferum* รหัส DMS 1691 และ *Azospirillum brasilense* รหัส DMS 1690 ส่วนแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* ที่นำมาทดสอบคือ *Azotobacter* sp. รหัส 5 และ *Azotobacter chroococcum* รหัส DMS 2286 พบว่าดำรับการทดลองที่เติมแบคทีเรียดังกล่าวมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากสามารถเพิ่มความสูง น้ำหนักแห้งของส่วนยอด เมล็ด และฝัก รวมทั้งจำนวนเมล็ดของข้าวโพด อีกทั้งผลทางด้านความสามารถในการส่งเสริมการดูดใช้ธาตุอาหารของข้าวโพด พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณการดูดใช้ N, P, K, Fe, Mn, Zn และ Cu อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR เช่น แบคทีเรียสกุล *Azospirillum* และ *Azotobacter* ช่วยส่งเสริมทางด้านการเพิ่มผลผลิตและการดูดใช้ธาตุอาหารของข้าวโพด

Ashrafuzzaman *et al.* (2009) ทำการทดลองโดยใช้แบคทีเรียในกลุ่ม PGPR เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำมาทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีและการใช้กำจัดศัตรูพืชในนาข้าว โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรากข้าว ใน 3 พื้นที่ สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต พื้นที่ที่ 1 สามารถคัดแยกได้ 5 ไอโซเลต คือ แบคทีเรียรหัส PGB1, PGB2, PGB3, PGB4 และ PGB5 พื้นที่ที่ 2 สามารถคัดแยกได้ 3 ไอโซเลต คือ แบคทีเรียรหัส PGT1, PGT2 และ PGT3 และพื้นที่ที่ 3 สามารถคัดแยกได้ 2 ไอโซเลต คือ แบคทีเรียรหัส PGG1 และ PGG2 นำแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต มาทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยการนำมาคลุกกับเมล็ดข้าวก่อนการเพาะกล้า ผลการศึกษาทางด้านการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว พบว่า แบคทีเรียรหัส PGB4, PGT1, PGT2, PGT3, PGG1 และ PGG2 มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตฮอร์โมนออกซิน และแบคทีเรียรหัส PGT3 ส่งเสริมการละลายฟอสเฟต สำหรับการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นพบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตช่วยส่งเสริมการเพิ่มน้ำหนักแห้งของส่วนยอดและราก ความสูง และความยาวของราก โดยเฉพาะแบคทีเรียรหัส PGB4 และ PGG2 จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียรหัส PGB4 และ PGG2 สามารถนำมาใช้ในการเพาะกล้าของข้าว เนื่องจากมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของเมล็ดรวมทั้งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตฮอร์โมนออกซิน และสามารถใช้แบคทีเรียรหัส PGT3 ในการส่งเสริมการละลายฟอสเฟตเพื่อช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินแก่ข้าว ช่วยให้ข้าวเจริญเติบโตได้ดี และมีผลผลิตที่เพิ่มสูงขึ้นได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ขวดเก็บตัวอย่าง
2. ถังพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างดิน
3. ถังเก็บความเย็น
4. อุปกรณ์การเก็บดิน ได้แก่ พลั่วมือ และอุปกรณ์ภาคสนาม
5. จานสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์
6. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร
7. ขวดบรรจุ (vial) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
8. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
9. กล้องจุลทรรศน์
10. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น IPP-200 (MEMMERT, Germany)
11. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker incubator) รุ่น LM-530-2 (MRC, Israel)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น 3-18K (Sortorius, UK)
13. เครื่อง DNA thermal cycle (Techne, UK)
14. เครื่อง mini gel system รุ่น Mupid-exU (ADVANCE, Japan)
15. เครื่อง denaturing gradient gel electrophoresis (BioRad, USA)
16. เครื่อง gel document (BioRad, USA)
17. ตู้ laminar flow รุ่น HRN (HARUNA, Japan)
18. เครื่องสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยเครื่องไมโครเวฟ
19. เครื่อง gas chromatography (GC) รุ่น GC-14B (SHIMADZU, UK)
20. เครื่อง gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) รุ่น GCMS-QP2010 (SHIMADZU, UK)

วิธีการ

1. การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ที่มีปริมาณสารสำคัญแตกต่างกัน

1.1 การเก็บตัวอย่างดินและพืช

การเก็บตัวอย่างดินและตะไคร้หอม *C. winterianus* J. อายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน สุ่มเก็บตัวอย่างดินและตะไคร้หอมในพื้นที่แปลงปลูกตะไคร้หอม บริเวณบ้านดงบัง ต.ดงขี้เหล็ก จ.ปราจีนบุรี ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินและตะไคร้หอม จำนวน 3 บริเวณ บริเวณที่ 1 อยู่ทางทิศเหนือของหมู่บ้านดงบัง ตะไคร้หอมมีอายุ 6 เดือน บริเวณที่ 2 อยู่ทางทิศตะวันออกของหมู่บ้านดงบัง ตะไคร้หอมมีอายุ 4 เดือน และบริเวณที่ 3 อยู่ทางทิศใต้ของหมู่บ้านดงบัง ตะไคร้หอมมีอายุ 2 และ 8 เดือน ดังแสดงในภาพที่ 6 โดยเก็บตัวอย่างดินและตะไคร้หอมที่อายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน จำนวน 5 จุดต่อหนึ่งอายุพืช ก่อนการเก็บตัวอย่างดินและตะไคร้หอมจะสวมถุงมือ แล้วใช้ช้อนปลูกเกลี่ยให้พื้นที่บริเวณรอบกอดตะไคร้หอมให้ดินเรียบเสมอกัน จากนั้นใช้ช้อนปลูกขุดดินบริเวณดังกล่าวลึก 0-15 เซนติเมตร จนกระทั่งพบรากของตะไคร้หอม ทำการเก็บดินในส่วนที่เกาะอยู่กับรากของตะไคร้หอม ดังแสดงในภาพที่ 7 การเก็บตัวอย่างดินแยกเก็บดินออกเป็น 2 ส่วน คือ 1) การเก็บตัวอย่างดินเพื่อการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของดิน ทำการเก็บตัวอย่างดิน 5 จุดในแต่ละบริเวณ จากนั้นนำตัวอย่างดิน 5 จุด มารวมเป็น 1 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนของดินในแต่ละบริเวณ 2) การเก็บตัวอย่างดินเพื่อการศึกษาทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล ทำการเก็บดินบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน จำนวน 5 จุด ในแต่ละอายุพืช เก็บใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง แช่ไว้ในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็ง ก่อนเก็บตัวอย่างดินในแต่ละบริเวณจะล้างช้อนปลูกด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 และน้ำสะอาด เช็ดให้แห้ง เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ระหว่างตัวอย่าง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาโครงสร้างประชากรของแบคทีเรีย รวมทั้งการคัดแยกแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์จากตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอมดังกล่าว ในส่วนของตะไคร้หอม ทำการขุดตะไคร้หอมทั้งกอ จำนวน 5 จุดในแต่ละอายุพืช เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันหอมระเหย และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ต่อไป



ภาพที่ 6 บริเวณที่ 1 แปลงตะไคร้หอมบริเวณทิศเหนือของหมู่บ้านดงบัง ตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน
 (A) บริเวณที่ 2 แปลงตะไคร้หอมบริเวณทิศตะวันออกของหมู่บ้านดงบัง ตะไคร้หอมอายุ 4 เดือน (B) บริเวณที่ 3 แปลงตะไคร้หอมบริเวณทิศใต้ของหมู่บ้านดงบัง ตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน (C) และตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน (D)



ภาพที่ 7 ตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอมที่ทำการศึกษา

1.2 วิเคราะห์ตัวอย่างพืช

1.2.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมโดยใช้วิธีไมโครเวฟ (microwave extraction: ME)

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม สกัดจากส่วนของใบตะไคร้หอม ทำการเตรียมตัวอย่างใบตะไคร้หอม โดยขั้นตอนแรกนำมาล้างทำความสะอาดแล้วตากให้แห้ง ซึ่งตัวอย่างใบตะไคร้หอม 300 กรัม บดด้วยเครื่องบดให้ละเอียด บรรจุลงในภาชนะบรรจุสารสกัด แล้วเติมน้ำ 600 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปสกัดด้วยเครื่องสกัดไมโครเวฟ ดังแสดงในภาพที่ 8 โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 800 วัตต์ เป็นระยะเวลา 50 นาที สารสกัดที่ได้จะอยู่ภายในภาชนะรองรับ นำมาตั้งทิ้งไว้เพื่อการแยกชั้นระหว่างน้ำและน้ำมันหอมระเหย โดยน้ำมันหอมระเหยจะลอยอยู่ชั้นบน ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนของน้ำมันหอมระเหยอย่างเบามือ ซึ่งน้ำหนักของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้บันทึกผล หลังจากนั้นทำการเก็บน้ำมันหอมระเหยในขวดแก้วสีชาปิดฝาให้สนิท เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญต่อไป ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมจำนวน 5 ซ้ำในแต่ละอายุพืช (รุ่งฤดี, 2550)



ภาพที่ 8 เครื่องสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยใช้วิธีไมโครเวฟ (microwave extraction: ME)

ที่มา: รุ่งฤดี (2550)

1.2.2 การวิเคราะห์สารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมด้วยวิธี gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)

วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญหลัก 3 ชนิด (citronellal, geraniol และ citronellol) ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมด้วยวิธี gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) รุ่น GCMS-QP2010 ดังแสดงในภาพที่ 9 โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารสำคัญทั้ง 3 ชนิด กับสารมาตรฐาน citronellal, geraniol และ citronellol ตามลำดับ (Sigma-Aldrich) โดยใช้เครื่อง GC/MS สภาวะของเครื่อง กำหนด injector เป็นแบบ split 1:50 แยกสารละลายโดยใช้ capillary column DB-5MS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของคอลัมน์ 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.10 ไมโครเมตร ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพา ความเร็วของก๊าซฮีเลียม 30 เซนติเมตรต่อวินาที อุณหภูมิเครื่องตรวจวัด 200 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ injector port 220 องศาเซลเซียส เริ่มต้น 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4.5 นาที อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ต่อนาที จนกระทั่ง

อุณหภูมิสุดท้ายเป็น 220 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ใช้ตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย 0.1 ไมโครลิตร (Cassel and Vagas, 2006)



ภาพที่ 9 เครื่อง gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) รุ่น GCMS-QP2010

1.3 วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและทางกายภาพบางประการของดินในพื้นที่ปลูกตะไคร้หอม

ทำการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของดินบางประการ ในพื้นที่ปลูกตะไคร้หอมทั้ง 3 บริเวณ โดยนำตัวอย่างดินมาตากให้แห้งในที่ร่ม จากนั้นบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร และ 0.5 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพ ดังนี้

1.3.1 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดิน ได้แก่

วิเคราะห์ค่า pH ด้วย pH meter โดยชั่งตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ใส่ในปิกรอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ปริมาณ 20 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร อัตราส่วน ดิน:น้ำ เท่ากับ 1:1 คนตัวอย่างดินด้วยแท่งแก้ว 5-10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน 30 นาที วัดด้วยเครื่องวัด pH meter บันทึกผล (Peech, 1965)

วิเคราะห์ปริมาณร้อยละของอินทรียวัตถุในดิน (OM) โดยวิธี Walkley-Black titration (Walkley and Black, 1934) เป็นการทำปฏิกิริยา wet oxidation โดยใช้ตัวอย่างดินที่บดละเอียดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร สูตรการคำนวณ คือ

$$\text{ร้อยละ organic carbon} = \frac{(\text{me K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 - \text{me FeSO}_4) \times 0.003 \times 100 \times 1.33}{\text{Weight of sample in gram}}$$

$$\text{ร้อยละอินทรียวัตถุ} = \text{ร้อยละ organic carbon} \times 1.72$$

วิเคราะห์ค่าการนำไฟฟ้า (EC) โดยวัดสภาพการนำไฟฟ้าของสารสกัดอิ่มตัวของดิน (saturation extract) วัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง electrical conductivity bridge (Richards, 1954)

1.3.2 วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารที่สำคัญ (N, P และ K)

วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) โดยวิธี Kjeldahl method (ทศนีย์ และ จงรักษ์, 2542) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ digestion และ distillation

digestion คือ การย่อยตัวอย่างดินที่บดละเอียดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ที่อุณหภูมิ 320 องศาเซลเซียส

distillation เป็นขั้นตอนการกลั่นสารละลายที่ได้จากการย่อยและดักจับไนโตรเจนด้วย H_3BO_3 indicator

$$\text{ร้อยละ N} = \frac{\text{ml HCl used (sample-blank titration)} \times \text{normality ของ HCl} \times 1.4}{\text{Weight of soil sample (grams)}}$$

วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available phosphorus) โดยวิธี สก๊อต Bray II (Bray and Kurtzk, 1945) สกัดดินตัวอย่างด้วยสารละลาย Bray II จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 2 แล้วนำสารละลายไปวัดปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร

วิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ (extractable potassium) นำตัวอย่างดินมาสกัดด้วยสารละลาย NH_4OAc เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 2 วิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer (AAS) (Pratt, 1965)

1.3.3 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของดิน ได้แก่

การวิเคราะห์การกระจายของอนุภาคดิน (soil particle size distribution) โดยวิธี pipette method (Kilmer and Alexander, 1949) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์นำมาแจกแจงกลุ่มของเนื้อดิน (soil textural class) โดยการเปรียบเทียบกับชั้นเนื้อดินตามเกณฑ์ของกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา (USDA textural class) (Soil Survey Division Staff, 1993)

1.4 การศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากโดยเทคนิคทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล

การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากของตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ศึกษาโดยใช้เทคนิคทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล เพื่อศึกษาความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอม (species data) ด้วยเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) จากความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่ได้จากเทคนิค DGGE นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่นำมาศึกษา คือ ปัจจัยทั้งในส่วนของพืชและดิน ปัจจัยทางด้านพืชได้แก่ ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอม ปริมาณสารสำคัญ 3 ชนิด (citronellal, geraniol และ citronellol) และปัจจัยทางด้านดินได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ค่าการนำไฟฟ้า และค่า pH ของดิน โดยโปรแกรม Canoco for windows ด้วยวิธี canonical correspondence analysis (CCA) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมในช่วงอายุต่างๆ ร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่นำมาศึกษา (environmental data) ทำให้ทราบถึงกลุ่มแบคทีเรียที่มีลักษณะเด่น (dominant) ซึ่งคาดว่าจะแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

1.4.1 การสกัด nucleic acid จากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอม มาสกัดดีเอ็นเอ และไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธีของ (Zhou *et al.*, 1996) โดยเริ่มสกัดด้วยการผสมตัวอย่างดิน 0.1 กรัม กับ soil-extraction buffer (50mM Tris-HCl buffer [pH 8.0] และ 100 mM EDTA) 500 ไมโครลิตร ด้วย sterile pastle ใน microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม soil-extraction buffer เพิ่มอีก 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทส่วนสารละลายใสทิ้ง นำ soil-extraction buffer ปริมาตร 380 ไมโครลิตร ผสมลงในส่วนตะกอนที่เหลือ และเติมเอนไซม์ lysozyme เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อย่อยผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ จากนั้นเติมเอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วผสมด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตามด้วย 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร RNase 5 ไมโครลิตร ผสมด้วย vortex แล้วปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่แข็ง (freeze) ที่อุณหภูมิประมาณ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาละลาย (thaw) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แล้วทำการ freeze และ thaw อีกครั้งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนสารละลายใสไว้แล้วผสมด้วย 1/3 volume ของ 5M potassium acetate บ่มต่อในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนสารละลายใสผสมด้วย 1/10 volume ของ 3M sodium acetate และ equal volume ของ isopropanol นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ล้างตะกอนด้วย ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนสารละลายใสทิ้ง และปล่อยให้ส่วนที่เหลือ (DNA) แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วละลายดีเอ็นเอ ที่ได้ด้วย TE buffer 360 ไมโครลิตร และผสมด้วย 5M NaCl 60 ไมโครลิตร และ CTAB/0.7M NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 45 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นผสมด้วย equal volume ของ chloroform นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายใสไว้แล้วทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายใสที่ได้ผสมด้วย equal volume ของ phenol/chloroform นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายใสที่ได้ผสมด้วยด้วย equal volume ของ isopropanol และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ล้างตะกอนด้วย ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายใส่ทิ้ง และปล่อยให้ส่วนตะกอนดีเอ็นเอ แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ละลายดีเอ็นเอ ที่ได้ด้วย TE buffer 20 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.4.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ

ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากข้างต้นเป็นต้นแบบปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ด้วย universal primer ที่มีความจำเพาะกับช่วง V3 region ของชิ้นส่วนยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (Medlin *et al.*, 1998) ประกอบไปด้วย forward primer 338f (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') ซึ่งมี GC-clamp และ reverse primer 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (Muyzer *et al.*, 1993) โดยเพื่อให้ได้ปริมาณสุดท้ายของสารผสมเท่ากับ 30 ไมโครลิตร ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (50 นาโนกรัม), 10x PCR buffer (Bioscience; Taiwan) 3 ไมโครลิตร, 10 μ M deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) mixture 2.5 ไมโครลิตร (Bioscience; Taiwan), 10 μ M 338f และ 518r อย่างละ 0.75 ไมโครลิตร และ *Taq* polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (Bioscience; Taiwan) 1.5 ไมโครลิตร ผสมลงในหลอด microtube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ที่ initiation denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที denaturing 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบและตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (Technique; UK)

1.4.3 การตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ในสารละลาย 1.0x TAE buffer (Sambrook *et al.*, 1989) โดยเตรียม agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ที่ผ่านการหลอมจนกระทั่ง agarose gel หลอมเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งให้เย็นนำมาเทใส่ใน gel tray และเสียบ gel comb ทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 45 นาที หรือจนกระทั่งเจลแข็งตัว หลังจากนั้นดึง gel comb ออก นำ agarose gel ไปวางในเครื่อง electrophoresis ที่มี 1.0x TAE buffer อยู่ ผสม 6x loading dye และผลิตภัณฑ์ PCR ในอัตราส่วน 1:4 บนแผ่นพาราฟิล์มด้วยไมโครปิเปต นำผสมที่ได้หยอดใส่หลุม agarose gel แต่ละหลุม และหยอด marker (Tridye 100 bp; NEB Biolab) ลงในหลุมแรกและหลุมสุดท้ายเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นทำการปล่อย

กระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที เสร็จแล้วนำเจลแช่ ethidium bromide เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยแช่ในน้ำหรือ 1.0x TAE buffer เป็นเวลา 10 นาที และตรวจสอบเจลภายใต้แสง ultraviolet พร้อมถ่ายรูปเก็บไว้

1.4.4 การทำ denature gradient gel electrophoresis (DGGE) เพื่อศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย

การศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมด้วยเทคนิค DGGE ใช้วิธีการของ (Supaphol *et al.*, 2005) โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้นร้อยละ 10 หนา 0.75 มิลลิเมตร ใน 1x TAE buffer (0.04M Tris base+0.02M sodium acetate+1.0mM EDTA และปรับ pH 7.4) DGGE มีความแตกต่างของ denaturant คือ urea-formamide gradient ตั้งแต่ความเข้มข้นร้อยละ 40-60 (สารละลาย urea-formamide ความเข้มข้นร้อยละ 100 ได้จาก formamide ความเข้มข้นร้อยละ 40 (vol/vol) และ urea เข้มข้น 7.0 M) ใช้ผลิตภัณฑ์ PCR หยดลงไปในเจล หลุมละ 20 ไมโครลิตร แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า ที่มีศักย์ไฟฟ้า 200 โวลต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมสีด้วย SYBR Green I nucleic acid gel stain ที่เจือจาง 1:10,000 จากนั้นนำเจลมาแช่ในสารละลาย 1x TAE buffer เพื่อล้างสีส่วนเกิน เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำเจลมาส่องด้วย SYBR Green gel stain photographic filter

1.4.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมด้วยโปรแกรม Canoco for Windows ด้วยวิธี principle component analysis (PCA) และ canonical correspondence analysis (CCA)

ทำการเลือกแถบดีเอ็นเอ จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่ได้จาก DGGE โดยนำภาพเจล ซึ่งได้มาจากการทำ electrophoresis วิเคราะห์ค่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม Qaulity One จากนั้นนำค่าความเข้มของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาหาความสัมพันธ์ระหว่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แสดงถึงโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย ร่วมกับปัจจัยที่ทำการศึกษา วิเคราะห์โดยโปรแกรม Canoco for windows ด้วยวิธี PCA และ CCA เพื่อทราบถึงความสัมพันธ์ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย รวมทั้งการพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียกับปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม

2. การทดลองที่ 2 เพื่อคัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีประโยชน์บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ซึ่งมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืช

2.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ (selective media) ต่อความสามารถของแบคทีเรีย

ชั่งดิน 1 กรัม ใส่ในสารละลาย NaCl เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 9 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ได้สารละลายดิน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นทำการเจือจางสารละลายดินด้วยวิธี dilution plate count (Bensen, 2005) โดยนำสารละลายดินดังกล่าวเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 และ 10^6 ตามลำดับ แล้วนำมา spread plate บนอาหารแข็งที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (N-free medium) และแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต (Pikovskaya's medium) ดังนี้

2.1.1 การคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน

นำสารละลายดินเจือจางที่มีความเข้มข้น 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 และ 10^6 ตามลำดับ นำมา spread plate บนอาหารแข็ง N-free medium (Xie *et al.*, 2003) จากนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 วัน สังเกตการตรึงไนโตรเจนจากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน หลังจากนั้นทำการแยกแบคทีเรียที่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินให้บริสุทธิ์ ในสภาพปลอดเชื้อ ทำได้โดยใช้วิธี cross streak plate บนอาหาร N-free medium ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าเชื้อจะเจริญเติบโต เก็บแบคทีเรียที่ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเอียง (slant) ของ nutrient agar (NA) เพื่อใช้เป็นเชื้อต้นแบบในการศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

2.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน

นำสารละลายดินเจือจางที่มีความเข้มข้น 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 และ 10^6 ตามลำดับ นำมา spread plate บนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium ที่มี $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ เป็นองค์ประกอบหลัก จากนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-7 วัน สังเกตการละลาย

ฟอสเฟตจากวงใสรอบโคโลนี (clear zone) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดขึ้น (Freitas *et al.*, 1997) หลังจากนั้นทำการแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ในสภาพปลอดเชื้อ ทำได้โดยใช้วิธี cross streak plate บนอาหาร Pikovskaya's medium ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มไว้ในอุณหภูมิห้อง จนกว่าเชื้อจะเจริญเติบโต เก็บแบคทีเรียที่ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยง เพื่อใช้เป็นเชื้อต้นแบบในการศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

หลังจากการคัดแยกแบคทีเรียจากบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุแตกต่างกัน ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อกิจกรรมของแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ N-free medium และ Pikovskaya's medium นำแบคทีเรียที่เก็บไว้จากอาหารเลี้ยง มาทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยวิธี acetylene reduction assay (ARA) ความสามารถในการละลายฟอสเฟตทดสอบในอาหารเหลว Pikovskaya's medium ที่มี $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ เป็นองค์ประกอบหลัก และความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน ด้วยวิธี calorimetric ($\text{FeCl}_3\text{-HClO}_4$) ดังนี้

2.2 ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

2.2.1 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

นำเชื้อเดี่ยวที่คัดแยกได้มาทดสอบอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA โดยการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว N-free medium เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นล้างตะกอนเซลล์ด้วย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นเจือจางด้วย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ให้มีค่าความขุ่น (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 แล้วจึงดูดเซลล์แบคทีเรียใส่ลงในอาหารเหลว N-free medium ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 45.5 มิลลิตร ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงทำการวัดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเอนไซม์ไนโตรจิเนส (nitrogenase) โดยการแทนที่บรรยากาศส่วนที่เป็นช่องว่างในขวดรูปชมพู่ที่ทำการเลี้ยงแบคทีเรีย ด้วยก๊าซ acetylene (C_2H_2) ร้อยละ 10 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงดูดก๊าซนำไปวัดความเข้มข้นของก๊าซ ethylene (C_2H_4) ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นด้วยเครื่อง GC (Azlin *et al.*, 2005)

2.2.2 ความสามารถในการละลายฟอสเฟต

นำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้มาทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium ที่มี $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ เป็นองค์ประกอบหลัก โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไว้บริเวณตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่ตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ตรวจสอบการละลายฟอสเฟต โดยการวัดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) ที่เกิดขึ้น (Freitas *et al.*, 1997) และทำการทดสอบการละลายฟอสเฟตในรูป $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Pikovskaya's medium ที่มี $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ เป็นองค์ประกอบหลัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้โดยใช้วิธีของ Sperberg (Sperberg, 1958)

2.2.3 ความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน

นำเชื้อเดี่ยวที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบอัตราการผลิตฮอร์โมนออกซิน ด้วยวิธี calorimetric ($\text{FeCl}_3\text{-HClO}_4$) โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ร่วมกับการเติม 5 mM L-tryptophane ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายใส 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย Salkowsky's reagent (FeCl_3 ความเข้มข้น 0.01M ใน HClO_4 ความเข้มข้นร้อยละ 35) (Gordon and Weber, 1950) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับสีโดยเทียบจากสารละลายมาตรฐานของ indole-3-acetic acid (IAA) วัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (Yamin *et al.*, 2009)

2.3 การจัดกลุ่มและระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ด้วยเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP)

การจำแนกกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม โดยการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย จากชิ้นส่วนยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต ด้วยเทคนิค RFLP โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hae* III และ *Hha* I ดังนี้

2.3.1 การสกัด nucleic acid จากตัวอย่างของเซลล์แบคทีเรีย

ทำการสกัด nucleic acid จากตัวอย่างของเซลล์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทุกไอโซเลต ด้วยวิธี boiling โดยนำตัวอย่างแบคทีเรีย 1 โคโลนี ต่อ milli Q water 20 ไมโครลิตร ใส่ใน microtube นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนเพื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR

2.3.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ โดยใช้เทคนิค PCR ด้วย universal primer ที่มีความจำเพาะใช้ universal primer ที่มีลำดับเบสดังนี้ forward primer AF1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') และ reverse primer 1541R (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') ตามลำดับ โดยเพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายของผสมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จึงใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer 5 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ 1.5 ไมโครลิตร, 10x dNTPs mixture 1 ไมโครลิตร, 10 mM, AF1 และ 1541R อย่างละ 1 ไมโครลิตร และ Taq polymerase 1.5 ไมโครลิตรผสมลงในหลอด microtube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ทำที่ initiation denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturing 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบและตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (Techne, UK)

2.3.3 การตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ PCR

ทำการตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ในสารละลาย 1.0x TAE buffer (Sambrook *et al.*, 1989) โดยเตรียม agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ที่ผ่านการหลอมจนกระทั่ง agarose gel หลอมเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งให้เย็นนำมาเทใส่ใน gel tray และเสียบ gel comb ทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 45 นาที หรือจนกระทั่งเจลแข็งตัว หลังจากนั้นดึง gel comb ออก นำ agarose gel ไปวางในเครื่อง electrophoresis ที่มี 1.0x TAE buffer อยู่ ผสม 6x loading dye และผลิตภัณฑ์ PCR ในอัตราส่วน 1:4 บนแผ่นพาราฟิล์มด้วยไมโครปิเปต แล้วนำผสมที่ได้ไปหยอดใส่หลุม agarose gel แต่ละหลุม และหยอด marker ลงในหลุม

แรกและหลุมสุดท้ายเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นทำการปล่อยกระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์เป็นเวลา 30-40 นาที เสร็จแล้วนำเจลไปแช่ ethidium bromide เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยแช่ในน้ำหรือ 1.0x TAE buffer เป็นเวลา 10 นาที และตรวจสอบเจลภายใต้แสง ultraviolet พร้อมถ่ายรูปเก็บไว้

2.3.4 การทำ restriction fragment length polymorphism (RFLP) เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างตัวอย่างชนิดเอ็นเอของแบคทีเรียที่แยกได้

การทำ RFLP เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างตัวอย่างชนิดเอ็นเอ ในแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต โดยอาศัยการทำงานเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hae* III และ *Hha* I ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีลำดับเบสจำเพาะ 4 คู่เบส มีจุดตัดระหว่าง G-C ทำให้สามารถจำแนกรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ถูกตัดได้ง่าย มีขั้นตอนคือ เตรียม pre-mixture เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10.0 ไมโครลิตรต่อหลอด จากการผสมน้ำกลั่นมาเชื้อ 3.56 ไมโครลิตร และ 10x M buffer 0.65 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ *Hae* III เข้มข้น 9.0 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.44 ไมโครลิตรต่อหลอด และผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปต และเติมผลิตภัณฑ์ PCR จาก stock ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร ลงในหลอด ปิดฝา นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และการตัดด้วยเอนไซม์ *Hha* I มีขั้นตอนคือ เตรียม pre-mixture เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 4.8 ไมโครลิตรต่อหลอด ทำการผสมน้ำกลั่นมาเชื้อ 2.8 ไมโครลิตร 10x NEB buffer 1.0 ไมโครลิตร BSA 1.0 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ *Hha* I เข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตรต่อหลอด และผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปต หลังจากนั้นเติมผลิตภัณฑ์ PCR จาก stock ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร ลงในหลอด ปิดฝาและนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำผสมที่ได้มาหลอดละ 4 ไมโครลิตร ผสมกับ pre-mixture ที่เตรียมจากการผสมน้ำกลั่นมาเชื้อ และ 10x K buffer ในสัดส่วน 1.4:0.6 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมบนกระดาษพาราฟิล์ม เพื่อตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis เข้มข้นร้อยละ 2.5 ใน 1.0x TAE buffer โดยเปิดเครื่อง electrophoresis ด้วยความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 45-60 นาที หรือจนกระทั่งสีของ bromophenolblue (BPB) เคลื่อนมาถึงปลายอีกด้านหนึ่งของเจล จากนั้นนำเจลมาย้อมสีด้วย ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น และนำมาส่องภายใต้แสง ultraviolet พร้อมทั้งบันทึกภาพ ภาพเจลที่ได้จะปรากฏรูปแบบแถบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต ถ้าปรากฏแถบของขนาดดีเอ็นเอ ที่มีรูปแบบที่เหมือนกันแสดงว่าเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน ซึ่งสามารถนำต้นแบบของผลิตภัณฑ์ PCR หลอดใดหลอดหนึ่ง และ

ต้นแบบของหลอดอื่นๆ ที่มีรูปแบบแตกต่างกันไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรียต่อไป

2.3.5 การหาลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย

นำลำดับเบสของดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอวิเคราะห์ที่ Macrogen Ltd. ประเทศเกาหลี ซึ่งใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automated sequencer) รุ่น ABI3730XL ในการวิเคราะห์ จากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ในฐานข้อมูลของ national center for biotechnology information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม basic local alignment search tools (BLASTN) จากเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอม จากการศึกษาวិชาญครั้งนี้ accession number ของแบคทีเรียที่พบคือ JN016592-JN016603, JN016605-JN016607 และ JN016610-JN016617

3. การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมน ออกซิน ที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม ต่อการเจริญเติบโตของพืชในระดับห้องปฏิบัติการ ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการทดลองที่ 2 การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมน ออกซินได้สูงสุด นำมาเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มเพื่อนำไปศึกษาผลของการใช้แบคทีเรีย ตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซินต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหน่อยาแฝก ลุ่ม ในระดับห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design: CRD) ประกอบด้วย 6 ดำรับการทดลอง ดำรับการทดลองละ 4 ซ้ำ ดังนี้

ดำรับการทดลองที่ 1 ดำรับควบคุมใส่น้ำมาเชื้อ ไม่มีการเติมแบคทีเรีย

ดำรับการทดลองที่ 2 ดำรับควบคุมที่มีการเติมแบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5 α (ไม่พบรายงานว่ามียาพิษต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช)

ดำรับการทดลองที่ 3 เติมแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนซึ่งแยกมาจากบริเวณรากตะไคร้หอม

ดำรับการทดลองที่ 4 เติมแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตซึ่งแยกมาจากบริเวณรากตะไคร้หอม

ดำรับการทดลองที่ 5 เติมแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน ซึ่งแยกมาจากบริเวณรากตะไคร้หอม

ดำรับการทดลองที่ 6 เติบโตที่เรียกว่าต้นที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ร่วมกับแบคทีเรียที่เรียกว่าต้นที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต และแบคทีเรียที่เรียกว่าต้นที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน ซึ่งแยกมาจากบริเวณรากตะไคร้หอม

3.2 การเตรียมตัวอย่างพืชทดสอบ

พืชทดสอบได้แก่ เนื้อเยื่อเหง้าแฟลกุ่ม การเลือกใช้เหง้าแฟลกุ่มในการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากตะไคร้หอมและเหง้าแฟลกุ่ม เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Gramineae พืชทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะพิเศษ จากการจัดกลุ่มตามอนุกรมวิธานของพืชวงศ์ Gramineae พบว่าตะไคร้หอมและเหง้าแฟลกุ่ม เป็นพืชที่ผลิตน้ำมันหอมระเหยได้เช่นเดียวกัน (Claton and Renvoize, 1986) ดังนั้นในการศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซิน ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมจึงเลือกใช้เหง้าแฟลกุ่มเป็นพืชทดสอบในครั้งนี้ โดยการนำเนื้อเยื่อเหง้าแฟลกุ่ม (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) พันธุ์สุราษฎร์ธานี จากกรมพัฒนาที่ดิน ที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็ง Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) ทำการเลือกขนาดของเนื้อเยื่อเหง้าแฟลกุ่มที่นำมาทดสอบให้มีขนาดใกล้เคียงกัน มีความยาวส่วนยอดประมาณ 2.5 เซนติเมตร และมีจำนวนราก 2-3 เส้น บันทึกความยาวของยอดและรากทุกต้นก่อนทำการทดสอบ หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อเหง้าแฟลกุ่มมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง และทำการย้ายเนื้อเยื่อเหง้าแฟลกุ่มลงหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุอาหาร MS สูตรดัดแปลง ตามแต่ละดำรับการทดลอง ดังนี้

สูตรที่ 1 สูตรอาหาร MS มาตรฐานที่มีไนโตรเจน ฟอสเฟตที่ละลายยาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ และฮอร์โมนในกลูเมอออกซิน เพื่อนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับดำรับควบคุม (ดำรับการทดลองที่ 1 และดำรับการทดลองที่ 2)

สูตรที่ 2 สูตรอาหาร MS มาตรฐานไม่เติมสารเคมีที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เพื่อนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับดำรับทดสอบ (ดำรับการทดลองที่ 3)

สูตรที่ 3 สูตรอาหาร MS มาตรฐานเติมฟอสเฟตในรูปละลายยาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ เพื่อนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับดำรับทดสอบ (ดำรับการทดลองที่ 4)

สูตรที่ 4 สูตรอาหาร MS มาตรฐานไม่เติมฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน เพื่อนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับดำรับทดสอบ (ดำรับการทดลองที่ 5)

สูตรที่ 5 สูตรอาหาร MS มาตรฐานไม่เติมสารเคมีที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เติมฟอสเฟตในรูปละลายยาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ และไม่เติมฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน เพื่อนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับดำรับทดสอบ (ดำรับการทดลองที่ 6)

3.3 การเตรียมแบคทีเรียและการบ่มเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากบริเวณรากตะไคร้หอม เป็นแบคทีเรียตัวแทนทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชแตกต่างกัน คือ มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซิน การเตรียมแบคทีเรียทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ทำได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ในอาหารเหลว NB แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายของแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม 1 มิลลิลิตร มาวัดความขุ่น ให้มีค่าความขุ่น (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 และนำสารละลายของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มปั่นล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง และหลังจากนั้นทำการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารละลายของแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเชื้อสู่เนื้อเยื่อหน่อยาแฝงกลุ่มที่บรรจุอยู่ในอาหารเหลว MS สูตรต่างๆ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตามแต่ละดำรับการทดลอง (Baset-Mia *et al.*, 2010)

3.4 การเก็บและการวิเคราะห์ข้อมูล

เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตเมื่อพืชอายุ 15 วัน โดยการเก็บตัวอย่างนี้จะแบ่งเป็น 3 ส่วน ดังนี้ ความยาวของส่วนยอดและส่วนราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งทั้งส่วนยอดและส่วนราก

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) หากข้อมูลแสดงความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงทำการเปรียบเทียบหาความแตกต่างโดยใช้ Duncan's new multiple range test (DMRT)



ผลและวิจารณ์

1. การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากของตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ที่มีปริมาณสารสำคัญแตกต่างกัน

1.1 สมบัติทางประชากรของดินบริเวณรากตะไคร้หอม

ผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพบางประการของดินบริเวณแปลงปลูก ตะไคร้หอม ของหมู่บ้านดงบัง ต.ดงขี้เหล็ก จ.ปราจีนบุรี พบว่าเนื้อดินในพื้นที่ปลูกตะไคร้หอมทั้ง 3 บริเวณ เป็นดินร่วนปนทราย (sandy loam) ค่า pH ของดินบริเวณที่ 1 และ 2 เท่ากับ 6.1 และ 6.4 เป็นกรดเล็กน้อย และบริเวณที่ 3 เท่ากับ 5.2 เป็นกรดจัด ค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ 0.05, 0.06 และ 0.06 ตามลำดับ อยู่ในระดับต่ำมาก ปริมาณร้อยละของอินทรีย์วัตถุเท่ากับ 1.88, 1.68 และ 2.24 ตามลำดับ อยู่ในระดับปานกลาง ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 0.07, 0.07 และ 0.06 ตามลำดับ อยู่ในระดับต่ำมาก ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เท่ากับ 252.5, 242.5 และ 152.5 ตามลำดับ อยู่ในระดับสูงมาก และปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ของบริเวณที่ 1 และ 2 เท่ากับ 46.06 และ 40.98 อยู่ในระดับต่ำ และบริเวณที่ 3 เท่ากับ 131.7 อยู่ในระดับสูงมาก จากผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดิน พบว่าปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ของดินทั้ง 3 บริเวณ อยู่ในระดับสูงมาก เนื่องจากประวัติการใช้พื้นที่พบว่าการเติมมูลไก่ และมูลค่างควบรวมกับการปลูกตะไคร้หอม จึงทำให้มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ตกค้างในดินปริมาณสูง และผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของดินบริเวณรากตะไคร้หอมทั้ง 3 บริเวณ นำไปใช้เป็นข้อมูลในวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุแตกต่างกันร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของดินพื้นที่ผลิตตะไคร้หอม บริเวณหมู่บ้าน
ดงบัง ต.ดงจีเหือก จ.ปราจีนบุรี

สมบัติของดิน	ค่าวิเคราะห์		
	บริเวณที่ 1	บริเวณที่ 2	บริเวณที่ 3
เนื้อดิน ^{1/}	sandy loam	sandy loam	sandy loam
อนุภาคขนาดทราย (%)	69.0	72.80	69.22
อนุภาคขนาดทรายแป้ง (%)	19.94	16.95	17.25
อนุภาคขนาดดินเหนียว (%)	11.06	10.25	13.53
pH ^{2/}	6.1	6.4	5.2
สภาพการนำไฟฟ้า (EC) ^{3/} (dS m ⁻¹)	0.05	0.06	0.06
อินทรีย์วัตถุในดิน ^{4/} (%)	1.88	1.68	2.24
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ^{5/} (g N kg ⁻¹)	0.07	0.07	0.06
ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ^{6/} (mg P kg ⁻¹)	252.5	242.5	152.5
ปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ ^{7/} (mg K kg ⁻¹)	46.06	40.98	131.70

หมายเหตุ ^{1/}Pipette method (Kilmer and Alexander, 1949)

^{2/}pH meter (soil:water; 1:1) (Peech, 1965)

^{3/}Electric conductometer (Richards, 1954)

^{4/}Walkley and Black method (Walkley and Black, 1934)

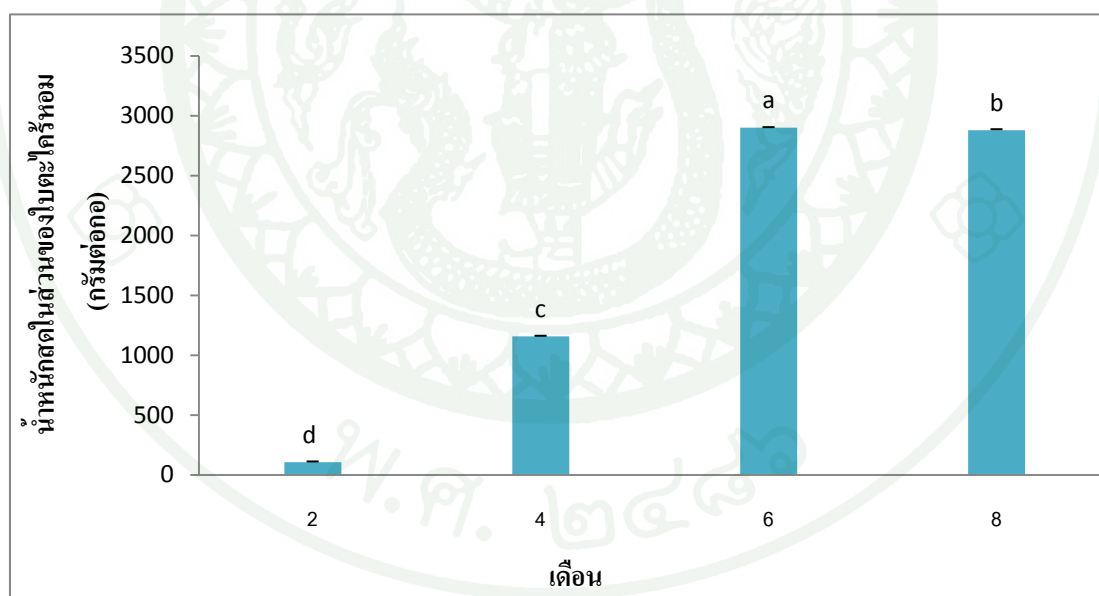
^{5/}Kjeldahl method (ทัศนีย์ และ จงรักษ์, 2542)

^{6/}Bray II method (Bray and Kurtz, 1945)

^{7/}Extracted with NH₄OAc pH 7.0 (Pratt, 1965)

1.2 ปริมาณน้ำหนักรากในส่วนของใบตะไคร้หอม

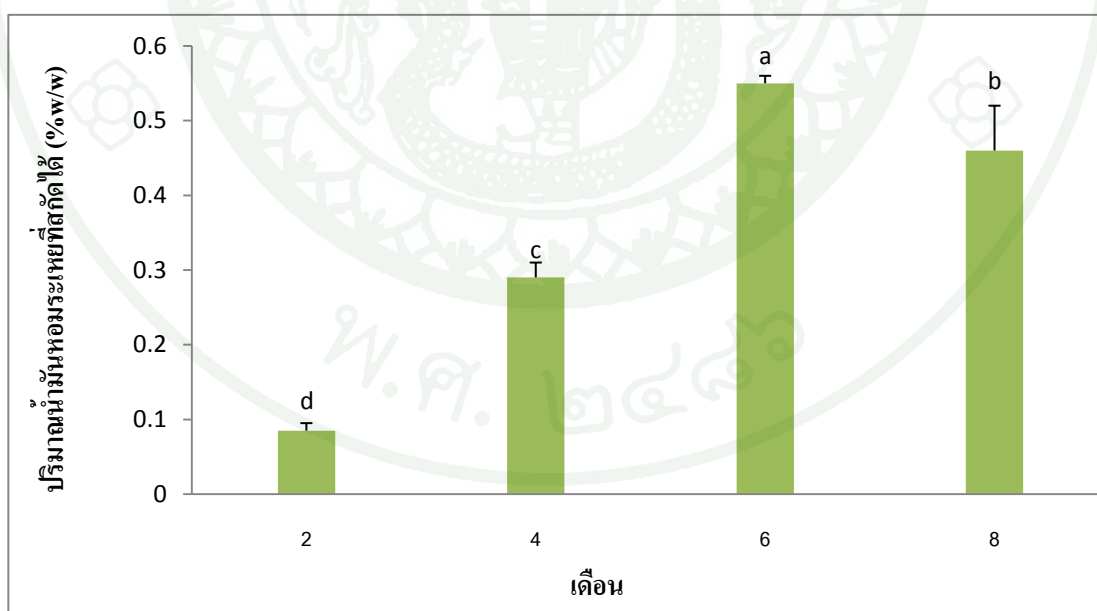
วิเคราะห์น้ำหนักรากในส่วนของใบตะไคร้หอมในแต่ละช่วงอายุ พบว่าตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน มีน้ำหนักรากของใบเฉลี่ย 108 ± 2.73 , $1,159 \pm 1.41$, $2,900 \pm 3.53$ และ $2,880 \pm 5.98$ กรัมตามลำดับ การพิจารณาปริมาณน้ำหนักรากของใบในแต่ละช่วงอายุของตะไคร้หอมพบว่า ตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน มีน้ำหนักรากของใบสูงสุด มีความแตกต่างทางสถิติกับปริมาณน้ำหนักรากของใบตะไคร้หอมอายุ 2, 4 และ 8 เดือน อีกทั้งพบว่าน้ำหนักรากของใบตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน มีความแตกต่างจากตะไคร้หอมอายุ 2 และ 4 เดือน และน้ำหนักรากของใบตะไคร้หอมอายุ 4 เดือน มีความแตกต่างจากตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังภาพ 10 และตารางผนวกที่ ข1 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรปี 2550 พบว่าตะไคร้หอมอายุ 5-6 เดือน เป็นช่วงที่ตะไคร้หอมมีการเจริญเติบโตมากที่สุด แรกกอเฉลี่ยสูงสุดประมาณ 22 ต้นต่อต้นพันธุ์ 1 ต้น จึงส่งผลให้ตะไคร้หอมมีจำนวนใบและน้ำหนักรากของใบสูง



ภาพที่ 10 น้ำหนักรากของใบตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน

1.3 การวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอม

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมด้วยวิธี ME ซึ่งสกัดจากส่วนของใบตะไคร้หอม พบว่าปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ร้อยละโดยน้ำหนักสด (w/w) เท่ากับ 0.55 ± 0.01 , 0.46 ± 0.06 , 0.29 ± 0.02 และ 0.08 ± 0.01 ตามลำดับ การพิจารณาความแตกต่างทางสถิติของปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอมในแต่ละช่วงอายุ พบว่าตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยสกัดได้สูงสุด แตกต่างจากตะไคร้หอมอายุ 2, 4 และ 8 เดือน อีกทั้งพบว่าปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงกว่าตะไคร้หอมอายุ 2 และ 4 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 11 และ ตารางภาคผนวกที่ ข2 จากผลการทดลองพบว่าปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกับระยะการเจริญเติบโตของพืช (Weiss, 1997) ถึงแม้ว่าพืชนั้นจะปลูกในพื้นที่เดียวกัน แต่มีอายุที่แตกต่างกัน ส่งผลให้มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้แตกต่างกัน ดังปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมที่อายุ 2 และ 8 เดือน ซึ่งปลูกในพื้นที่เดียวกัน แต่มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพที่ 11 ร้อยละโดยน้ำหนัก (w/w) ของปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ด้วยวิธี microwave extraction (ME)

1.4 ปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้

ปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม 3 ชนิด คือ citronellal, geraniol และ citronellol ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน

1.4.1 ปริมาณ citronellal

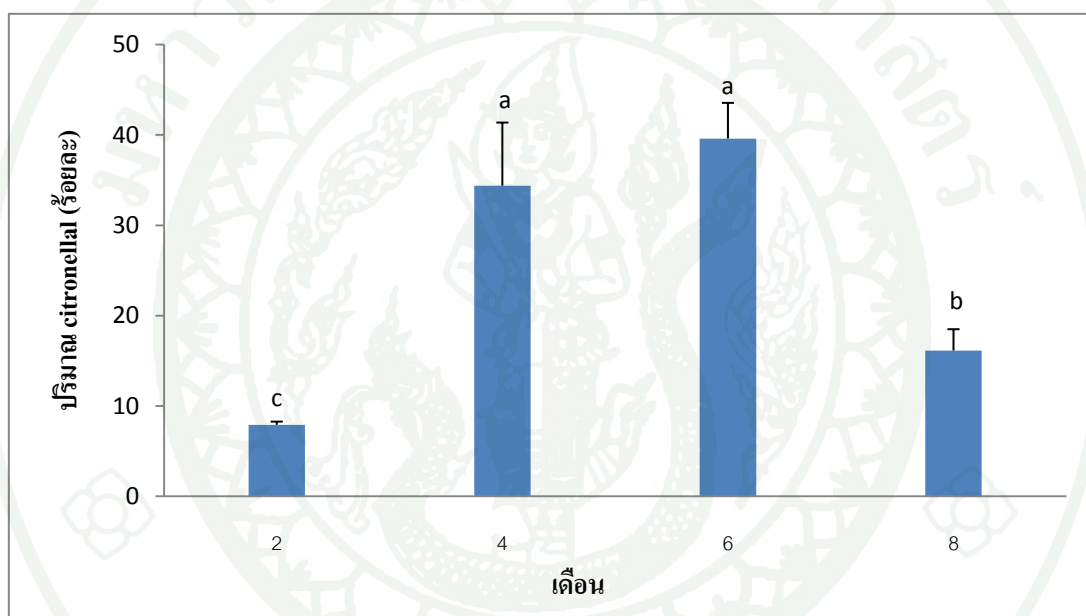
จากการวิเคราะห์ปริมาณ citronellal ในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน พบปริมาณ citronellal เฉลี่ยร้อยละ 7.91, 34.38, 39.6 และ 16.14 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณ citronellal ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมในแต่ละช่วงอายุ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน มีปริมาณ citronellal สูงสุด มีความแตกต่างกับปริมาณ citronellal ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 2 และ 8 เดือน และปริมาณ citronellal ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน มีปริมาณ citronellal สูงกว่าในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 12 และตารางผนวกที่ ข3

1.4.2 ปริมาณ geraniol

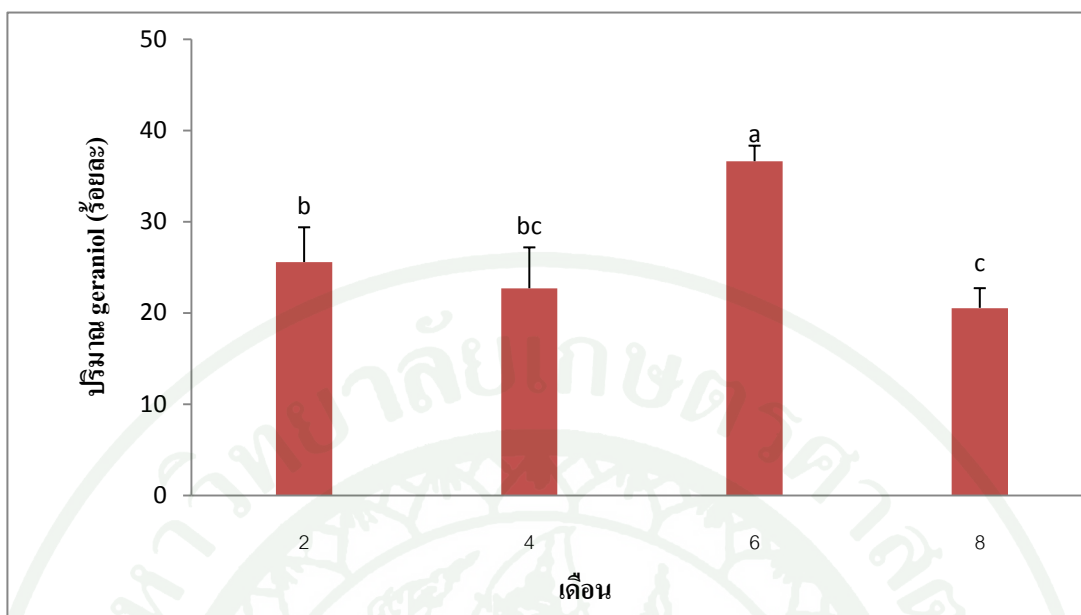
จากการวิเคราะห์ปริมาณ geraniol ในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน พบปริมาณ geraniol เฉลี่ยร้อยละ 25.57, 22.69, 36.62 และ 20.54 ตามลำดับ ซึ่งจากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่าปริมาณ geraniol ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน มีปริมาณ geraniol สูงสุด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ geraniol ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 2, 4 และ 8 เดือน อย่างไรก็ตามปริมาณ geraniol ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน มีความแตกต่างกับปริมาณ geraniol ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมที่อายุ 8 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 13 และตารางผนวกที่ ข3

1.4.3 ปริมาณ citronellol

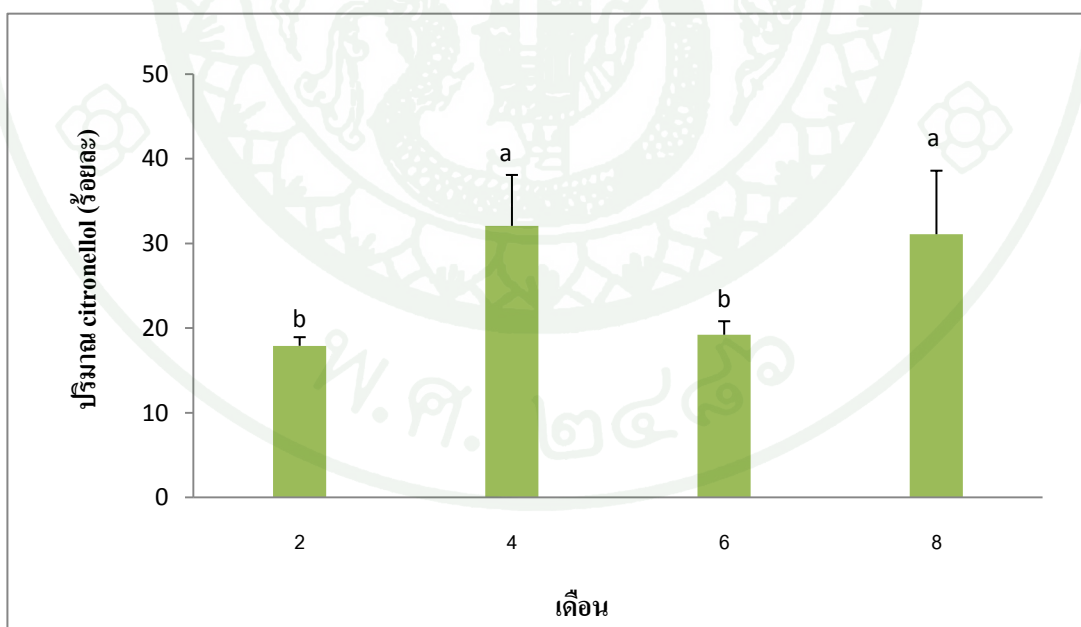
จากการวิเคราะห์ปริมาณ citronellol ในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน พบปริมาณ citronellol เฉลี่ยร้อยละ 17.91, 32.08, 19.21 และ 31.09 ตามลำดับ ซึ่งจากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่าปริมาณ citronellol ในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอมอายุ 4 และ 8 เดือน มีปริมาณสูงกว่าปริมาณ citronellol ในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากตะไคร้หอมอายุ 2 และ 6 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 14 และตารางผนวกที่ ข3



ภาพที่ 12 เปรียบเทียบร้อยละของปริมาณ citronellal ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบร้อยละของปริมาณ geraniol ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน



ภาพที่ 14 เปรียบเทียบร้อยละของปริมาณ citronellol ในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญหลัก 3 ชนิด ในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จาก ตะไคร้หอมที่มีอายุแตกต่างกัน พบว่าปริมาณสารสำคัญทั้ง 3 ชนิด มีความผันแปรในแต่ละช่วงอายุ การเจริญเติบโตของตะไคร้หอม จากการรายงานของ Sarma (2002) พบว่า geraniol เกิดปฏิกิริยา dehydrogenate เปลี่ยนเป็น citronellol จากนั้นเกิดปฏิกิริยา oxidize เปลี่ยนเป็น citronellal และอีกทางหนึ่ง citronellol เกิดปฏิกิริยา reduce เปลี่ยนเป็น citronellal นอกจากนี้ citronellol สามารถเกิดปฏิกิริยา hydrogenate เปลี่ยนเป็น geraniol สารสำคัญทั้ง 3 ชนิด ของน้ำมันหอมระเหยจาก ตะไคร้หอม สามารถเปลี่ยนแปลงตามปฏิกิริยาดังกล่าว ซึ่งปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาดังกล่าว คือระยะเวลาการเก็บเกี่ยวและฤดูการเก็บเกี่ยวเป็นสำคัญ

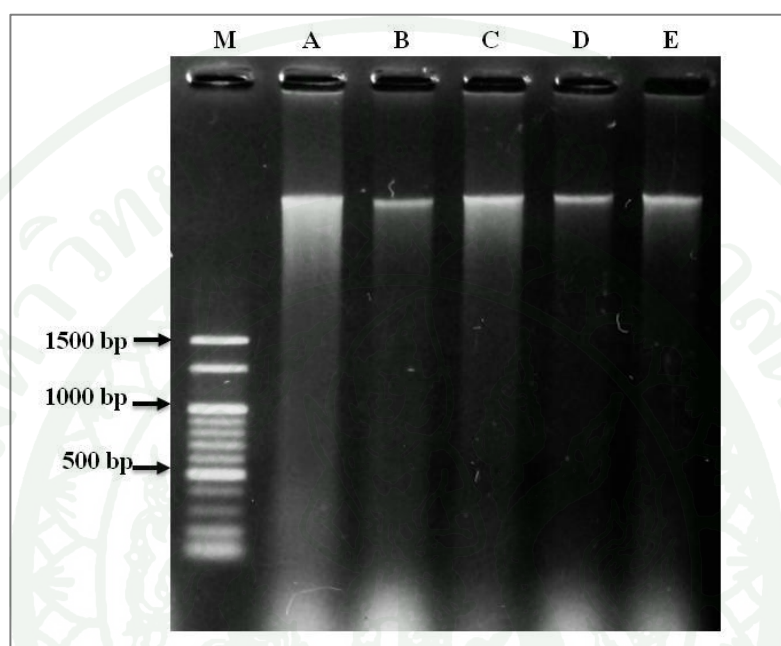
จากผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดิน รวมทั้งผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันหอมระเหย และปริมาณสารสำคัญของตะไคร้หอมในแต่ละช่วงอายุเป็นข้อมูลทางสิ่งแวดล้อม เพื่อนำมาหาความสัมพันธ์กับโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอม

1.5 การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ด้วยเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE)

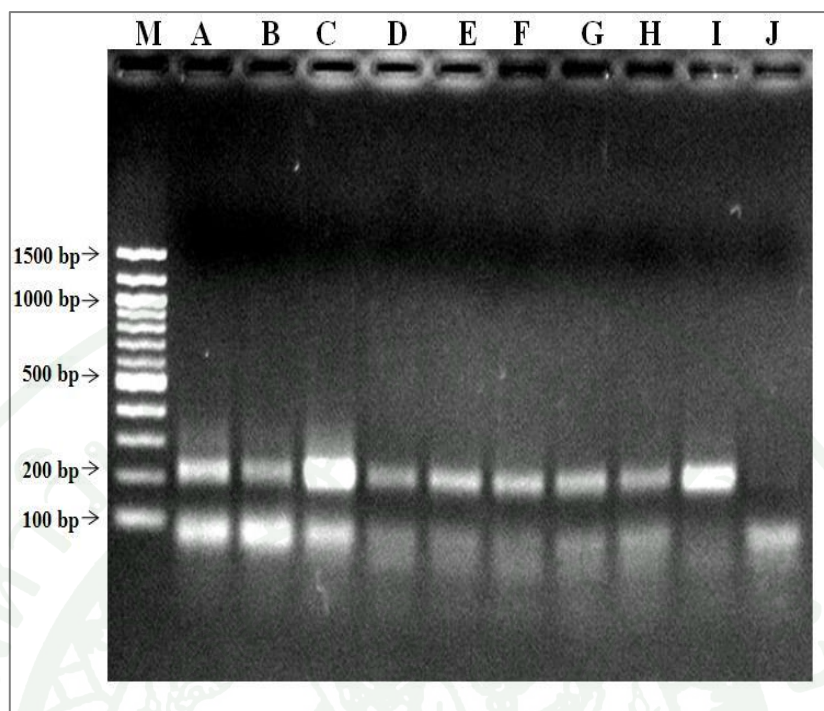
1.5.1 โครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอม

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมในแต่ละช่วงอายุ ใช้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่มีขนาดประมาณ 10,000 bp ดังแสดงในภาพที่ 15 และทำการเพิ่มปริมาณยีนในตำแหน่ง 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ โดยวิธี PCR ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 220 bp ดังแสดงในภาพที่ 16 และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียด้วยเทคนิค DGGE จากรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค DGGE เมื่อทำการเปรียบเทียบกับบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน พบว่าจำนวนแถบของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ปรากฏในบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2 และ 4 เดือน ไม่มีความแตกต่างกัน แต่พบว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้นในบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน และค่อยๆ ลดลงเมื่อตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน ดังแสดงในภาพที่ 17 โดยรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏแสดงถึงความหลากหลายของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมในแต่ละช่วงอายุ จากการวิเคราะห์จำนวนแถบของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ที่เพิ่มขึ้นเมื่อตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน แสดงถึงความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียที่เพิ่ม ดังนั้นอายุของพืชส่งผลต่อปริมาณและความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียบริเวณราก สอดคล้องกับการรายงานของ วิทยา (2526)

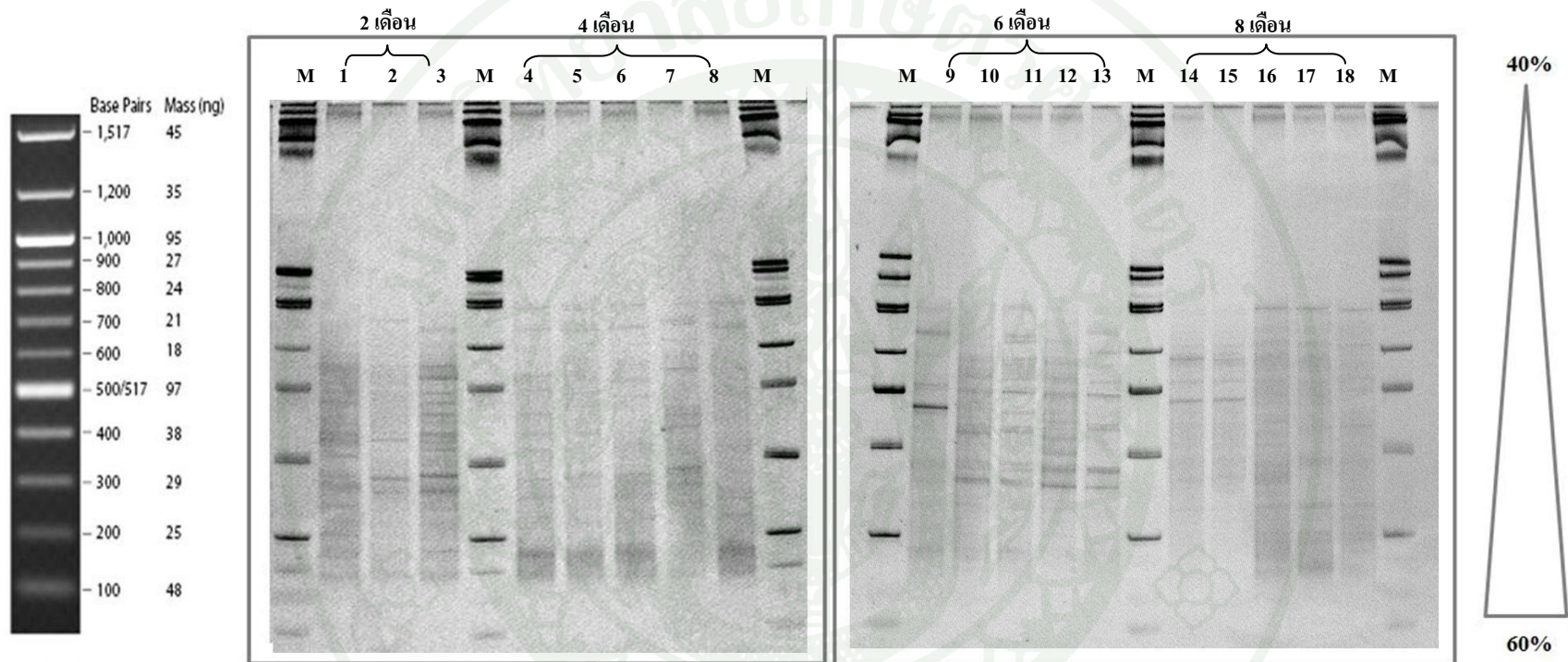
รายงานว่ายอายุของพืช มีอิทธิพลต่อจุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืช เมื่อพืชอายุน้อยจุลินทรีย์จะได้ประโยชน์จากสารขับจากรากพืชมากกว่าที่ได้จะประโยชน์จากเนื้อเยื่อพืชที่ตายหรือเน่าสลาย แต่เมื่อพืชมีอายุมากขึ้นเนื้อเยื่อและคราบราก จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงชนิด และปริมาณของจุลินทรีย์ดินบริเวณราก



ภาพที่ 15 สารพันธุกรรม (DNA) ที่สกัดจากตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอม
ช่องตัวอย่าง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab)
ช่องตัวอย่าง A-E คือ ตัวอย่างสารพันธุกรรมของแบคทีเรียที่สกัดจาก
บริเวณรากตะไคร้หอม



ภาพที่ 16 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ จากตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอม ชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 220 bp
 ช่องตัวอย่าง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab)
 ช่องตัวอย่าง A-I คือ ตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอม
 ช่องตัวอย่าง J คือ Negative หรือ น้ำ



ภาพที่ 17 ลักษณะรูปแบบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน

ช่องตัวอย่าง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab)

ช่องตัวอย่าง 1-3 คือ ตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน

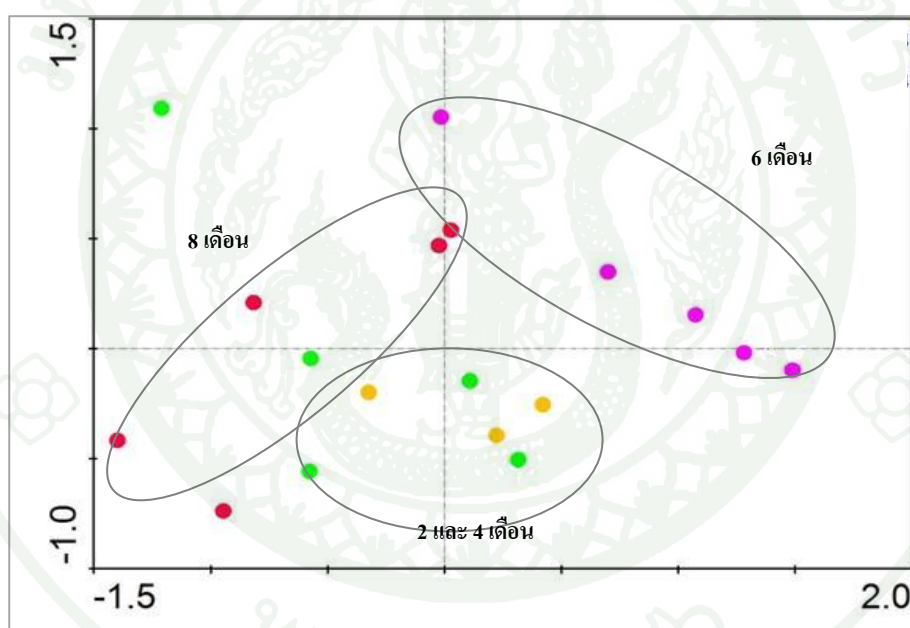
ช่องตัวอย่าง 4-8 คือ ตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 4 เดือน

ช่องตัวอย่าง 9-13 คือ ตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน

ช่องตัวอย่าง 14-18 คือ ตัวอย่างดินบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน

1.5.2 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมที่มีอายุต่างกัน ร่วมกับการปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Canoco for windows ด้วยวิธี principle component analysis (PCA) และวิธี canonical correspondence analysis (CCA)

จากรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค DGGE นำเจล DGGE มาวิเคราะห์ข้อมูลซึ่งจะแปลงเป็นค่าความเข้มข้นของแถบยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ปรากฏบนเจล DGGE หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA และ CCA โดย 1 ช่องตัวอย่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏจากเจล DGGE แทนด้วยสัญลักษณ์ 1 จุด บนกราฟของ PCA และ CCA นอกจากนี้จำนวนแถบยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ปรากฏในแต่ละช่องตัวอย่างแทนแบคทีเรีย 1 ชนิด



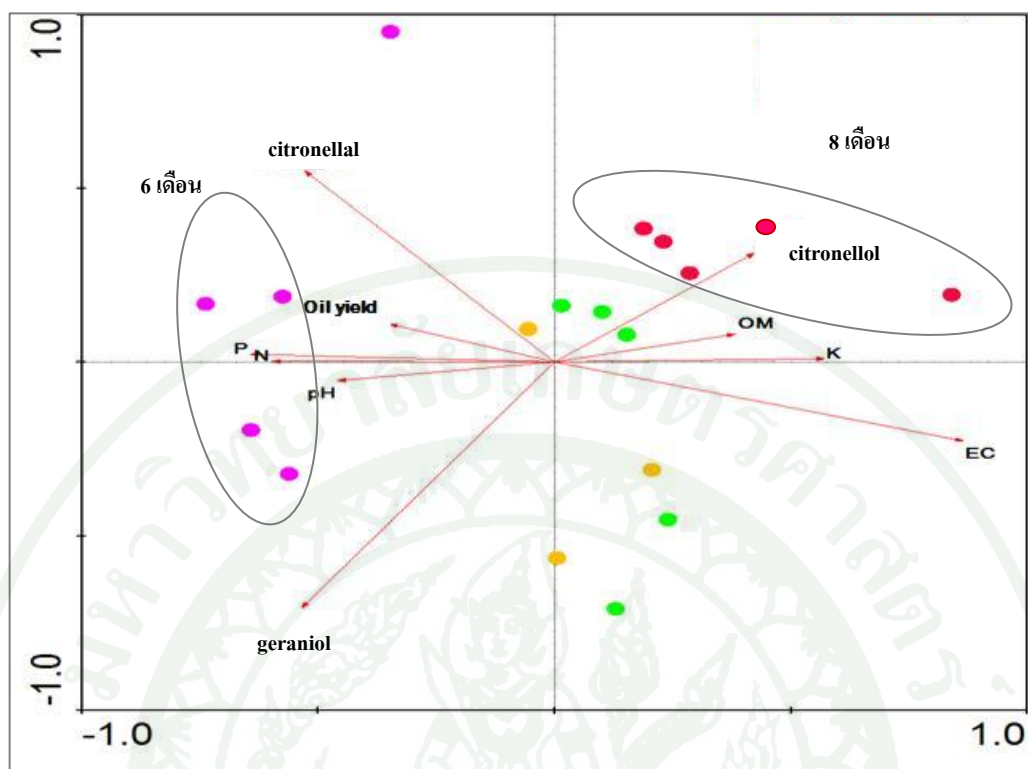
ภาพที่ 18 ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2 (●), 4 (●), 6 (●) และ 8 (●) เดือน วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for windows โดยวิธี principle component analysis (PCA)

ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA พบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน (วงกลมสีชมพู) แยกออกจากกลุ่มประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุ 2 (วงกลมสีส้ม), 4 (วงกลมสีเขียว) และ 8 เดือน (วงกลมสีแดง) อีกทั้งยังพบว่าประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุ 2 และ 4 เดือน แยกออกจากกลุ่มประชากรแบคทีเรียบริเวณ

รากตะไคร้หอมที่อายุ 8 เดือนด้วย การกระจายตัวของกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่แตกต่างกัน เนื่องจากปริมาณสารขับจากรากพืช (Grayston *et al.*, 2001) ดังแสดงในภาพที่ 18

และจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี CCA ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างประชากรของแบคทีเรีย และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม โดยใช้ฐานข้อมูลในการวิเคราะห์ 2 ประเภท คือ ข้อมูลชนิดของแบคทีเรียที่พบในพื้นที่ และข้อมูลปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ซึ่งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมในการทดลองประกอบไปด้วย ข้อมูลพืชและดิน ด้านพืชได้แก่ ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอม ปริมาณสารสำคัญ 3 ชนิด (citronellal, geraniol และ citronellol) และปัจจัยทางด้านดินได้แก่ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ค่าการนำไฟฟ้า และค่า pH ของดิน

จากภาพที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมที่มีช่วงอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ร่วมกับปัจจัยสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ ปริมาณสารสำคัญ 3 ชนิด (citronellal, geraniol และ citronellol) และสมบัติทางเคมีของดิน ด้วยวิธี CCA ประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน (วงกลมสีส้ม) ประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 4 เดือน (วงกลมสีเขียว) ประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน (วงกลมสีชมพู) และประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน (วงกลมสีแดง) จากสัญลักษณ์ที่แสดงทิศทาง คือปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมเป็นตัวบ่งชี้ความสัมพันธ์ร่วมกับลักษณะของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย ถ้าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียไปในทิศทางเดียวกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม หมายถึงมีความสัมพันธ์เชิงบวกแต่ถ้าอยู่ในทิศทางตรงกันข้ามกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม หมายถึงมีความสัมพันธ์เชิงลบกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม จากการวิเคราะห์พบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม คือ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด



ภาพที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2 (●), 4 (●), 6 (●) และ 8 (●) เดือน ร่วมกับปัจจัยทางด้านพืชและดิน วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for windows โดยวิธี canonical correspondence analysis (CCA)

พบว่าปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมดังกล่าวมีผลต่อการสร้างสารสำคัญในตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน คือส่งเสริมให้ตะไคร้หอมมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มีปริมาณสูง เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่พืชจำเป็นต้องการเจริญเติบโต โดยพบว่าฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบสำคัญของ ATP, ADP, AMP, sugar phosphate, นิวคลีโอไทด์ ฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ และ phosphorylated organic acid ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารพืช ที่พืชมักเกิดการขาดได้ง่าย เนื่องจากฟอสฟอรัสจะถูกตรึงให้อยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ จากการรายงานของ Rudresh *et al.* (2005) พบว่าการเติมแบคทีเรีย *Rhizobium* ช่วยส่งเสริมการละลายฟอสเฟตให้พืชสามารถดูดใช้ได้ และสะสมในเนื้อเยื่อพืช El-Komy (2005) พบว่าการเติม *Azospirillum lipoferum* และ *Bacillus megaterium* ช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสแก่ข้าวสาลี และการเติม *Bradyrhizobium* sp. ร่วมกับวัสดุอินทรีย์ที่มีฟอสเฟตตกค้างปริมาณสูง ในการปลูก (*Majorana hortensis* L.) ซึ่งเป็นสมุนไพรเครื่องเทศชนิดหนึ่ง พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเปลี่ยนอินทรีย์ฟอสเฟตให้อยู่ในรูปอนินทรีย์ฟอสเฟต พืชสามารถดูดใช้ได้จึงส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตสูงกว่า

คำรับควบคุม อีกทั้งยังพบว่าปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชดังกล่าวมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นด้วย (El-Ghandour *et al.*, 2009)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่าปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดในตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน อีกปัจจัยหนึ่ง คือ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด เนื่องจากไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่สำคัญของพืช พืชต้องการธาตุอาหารในการเจริญเติบโตและพัฒนา เพื่อให้กิจกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีพเป็นไปด้วยดี ธาตุอาหารพืชมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืชทั้งในด้านเป็นแหล่งให้พลังงาน ควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ในเซลล์ และการสร้างเซลล์ ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของกรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ คลอโรฟิลล์ อัลคาลอยด์ โคเอนไซม์ ATP, ADP และ AMP ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและองค์ประกอบทางเคมีของพืช เมื่อพืชได้รับไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสมถึงระดับที่เพียงพอต่อความต้องการของพืชแต่ละชนิด ส่งผลให้พืชสามารถใช้ประโยชน์จากไนโตรเจนรูปแอมโมเนียอัตราสูงขึ้น จึงเพิ่มปริมาณโปรตีน การเจริญของใบ ครรชนีพื้นที่ใบ และการสังเคราะห์แสงสุทธิของพืช (ยงยุทธ, 2543) ในพืชที่ให้น้ำมันหอมระเหยพบว่าการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนส่งผลต่อปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ เนื่องจากพืชมีปริมาณชีวมวลต่อพื้นที่ปลูกสูงขึ้น (Sangwan *et al.*, 2001) ซึ่งตะไคร้หอมเป็นพืชที่มีน้ำมันหอมระเหยอยู่ในส่วนของใบ จึงเป็นพืชที่มีความต้องการไนโตรเจนปริมาณสูง (Dutta and Dutta 1976; Singh *et al.*, 1980; Bommegowda *et al.*, 1981) การเติมแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนให้แก่พืช ทำให้พืชมีการเจริญเติบโต และสร้างมวลชีวภาพ แตกต่างจากการคำรับควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ แสดงให้เห็นว่าแหล่งธาตุไนโตรเจนที่พืชใช้ในการเจริญเติบโต และพัฒนามวลชีวภาพส่วนหนึ่งนั้น ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับพืชชนิดนั้นๆ (Rao *et al.*, 1983)

สำหรับความสัมพันธ์ของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุ 8 เดือน มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม พบว่าปริมาณอินทรีย์วัตถุ และปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ ส่งเสริมให้ตะไคร้หอมมี citronalol ในปริมาณสูง

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ด้วยเทคนิค DGGE (ดังแสดงในภาพที่ 17) พบว่าบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุ 6 เดือน มีความหลากหลายของการเข้าอาศัยอยู่ของแบคทีเรียบริเวณรากสูง สอดคล้องกับปริมาณน้ำหนักรากในส่วนช่อดอกและปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ที่พบ

ปริมาณสูงในอายุดังกล่าว ซึ่งมีข้อสันนิษฐานว่าแบคทีเรียที่เข้าอาศัยบริเวณรากตะไคร้หอมดังกล่าว มีความสามารถในการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น การละลายฟอสเฟต การตรึงไนโตรเจน ตลอดจนการสังเคราะห์สารเร่งการเจริญเติบโตบางชนิดให้แก่รากตะไคร้หอม จึงทำการคัดแยก ระบุชนิด และศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืชของแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าว

2. การทดลองที่ 2 คัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีประโยชน์บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ซึ่งมีบทบาทต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

2.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียด้วยอาหารที่มีความจำเพาะ

การคัดแยกแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมที่มีช่วงอายุแตกต่างกัน โดยใช้อาหารที่มีความจำเพาะต่อกิจกรรมของแบคทีเรีย คือ อาหาร N-free medium เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และอาหาร Pikovskaya's medium เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต จากการคัดแยกด้วยอาหารที่มีความจำเพาะ 2 ชนิด ข้างต้น สามารถคัดแยกแบคทีเรียจากบริเวณรากตะไคร้หอมทุกช่วงอายุได้ทั้งหมด 76 ไอโซเลต พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และละลายฟอสเฟตจำนวน 58 และ 18 ไอโซเลตตามลำดับ เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตามช่วงอายุที่แตกต่างกันของตะไคร้หอมพบว่าในตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลต มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และละลายฟอสเฟต จำนวน 20 และ 6 ไอโซเลตตามลำดับ บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 4 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลต มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และละลายฟอสเฟต จำนวน 7 และ 2 ไอโซเลตตามลำดับ บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 31 ไอโซเลต มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และละลายฟอสเฟต จำนวน 23 และ 8 ไอโซเลตตามลำดับ และบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และละลายฟอสเฟต จำนวน 8 และ 2 ไอโซเลตตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน
โดยใช้อาหารที่มีความจำเพาะต่อกิจกรรมของแบคทีเรีย

อายุพืช (เดือน)	แบคทีเรียทั้งหมด (ไอโซเลต)	แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (ไอโซเลต)	แบคทีเรียละลายฟอสเฟต (ไอโซเลต)
2	26	20	6
4	9	7	2
6	31	23	8
8	10	8	2

2.2 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของพืชที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน

2.2.1 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมทุกช่วงอายุทั้งหมด 76 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด 58 ไอโซเลต คัดแยกได้จากดินบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน จำนวน 20, 7, 23 และ 8 ไอโซเลต ตามลำดับ นำมาวัดอัตราการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี ARA (Azlin *et al.*, 2005) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 58 ไอโซเลต มีอัตราการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 0.004-5.30 ไมโครโมลเอทธิลีนต่อชั่วโมง และจากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าแบคทีเรียรหัส Rh9 ซึ่งคัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 4 เดือน มีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงสุดเท่ากับ 5.30 ไมโครโมลเอทธิลีนต่อชั่วโมง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแบคทีเรียรหัสอื่นๆ ดังแสดงในภาพที่ 20 และตารางผนวกที่ ก1

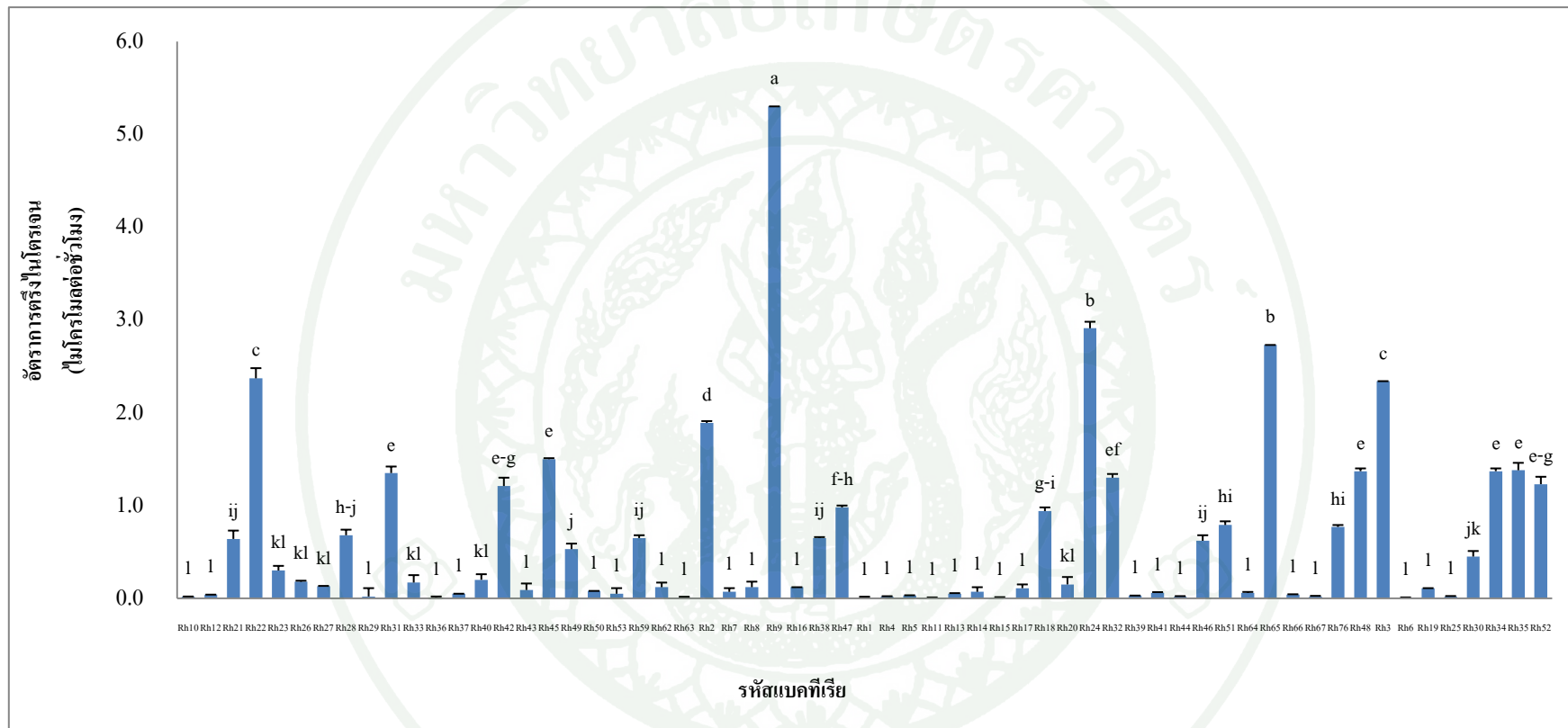
2.2.2 ความสามารถในการละลายฟอสเฟต

การทดสอบการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรากตะไคร้หอมด้วยอาหาร Pikovskaya's medium ที่เติม $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Sperberg, 1958) จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลต ซึ่งคัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน จำนวน 6, 2, 8 และ 2 ไอโซเลตตามลำดับ มีขนาดวงใส ที่วัดได้หลังจากบ่มเชื้อนาน 7 วัน มีขนาด

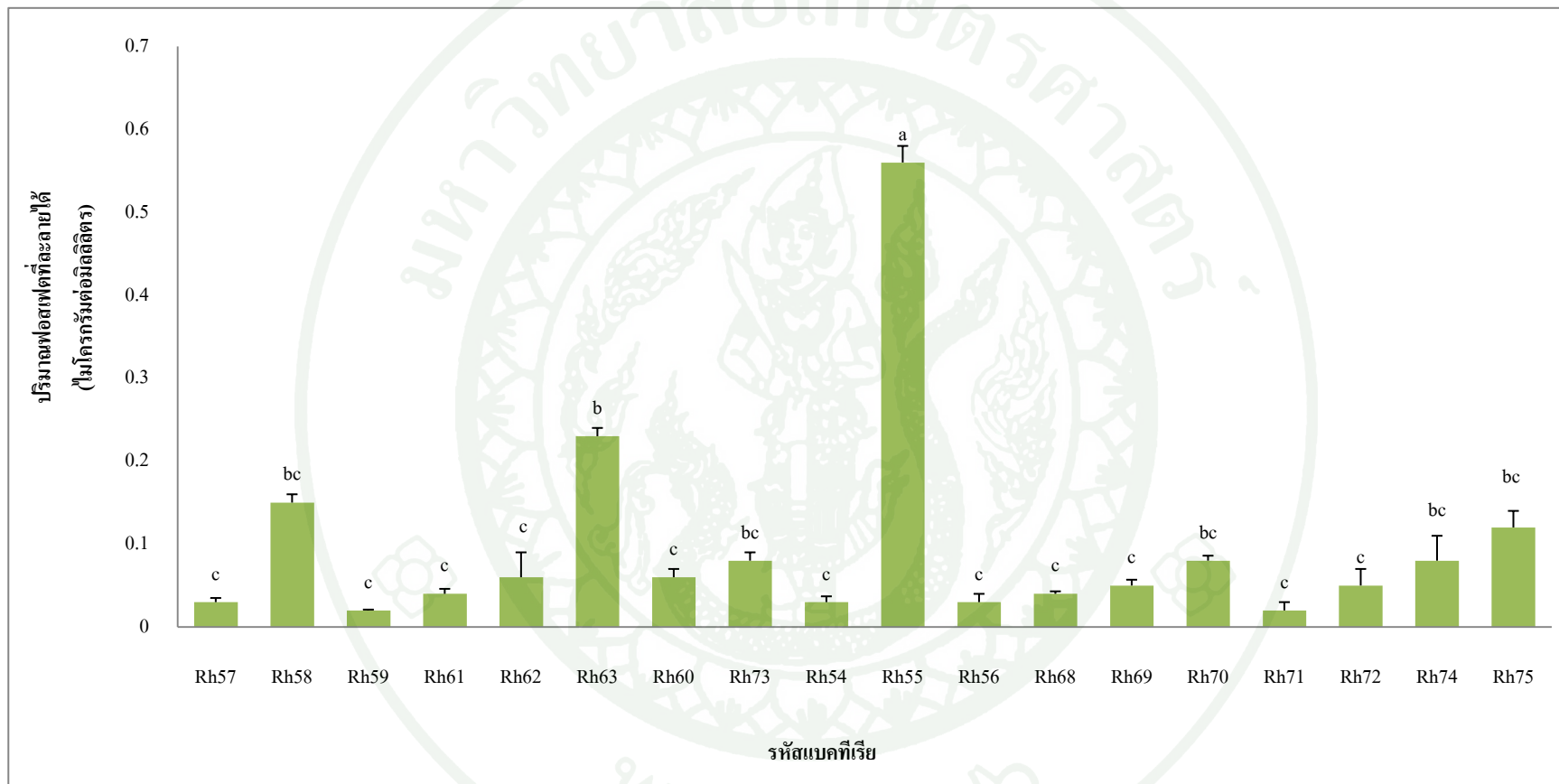
0.05-0.70 เซนติเมตร และนำมาทดสอบการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว Pikovskaya's medium ที่เติม $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ แบคทีเรียสามารถละลายฟอสเฟตในรูป $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ และปลดปล่อยอินทรีย์ฟอสเฟตได้ 0.05-0.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าแบคทีเรียรหัส Rh55 ซึ่งคัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตสูงสุด มีขนาดวงใสกว้าง 0.70 เซนติเมตร และพบปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้เท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับแบคทีเรียรหัสอื่นๆ ดังแสดงในภาพที่ 21 และตารางผนวกที่ ค1

2.2.3 ความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน

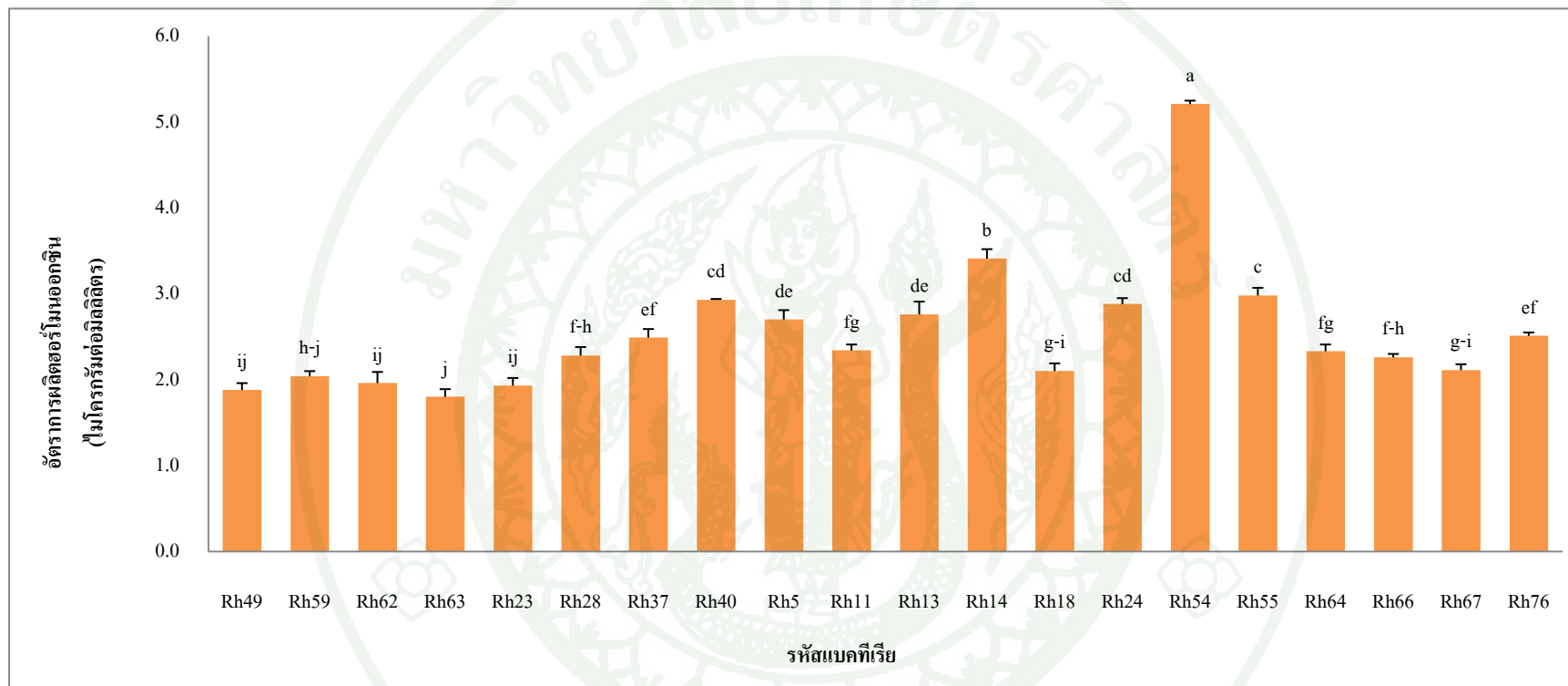
การวัดอัตราการผลิตฮอร์โมนออกซิน ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมทั้งหมด 76 ไอโซเลต ด้วยวิธี Calorimetric ($\text{FeCl}_3 - \text{HClO}_4$) พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน ทั้งหมด 20 ไอโซเลต คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2 และ 6 เดือน จำนวน 8 และ 12 ไอโซเลต ตามลำดับ แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน ได้แตกต่างกัน พบว่าแบคทีเรียทั้งหมด 20 ไอโซเลต ผลิตฮอร์โมนออกซินอยู่ในช่วง 1.81-5.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าแบคทีเรียรหัส Rh54 ซึ่งคัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน เท่ากับ 5.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับแบคทีเรียรหัสอื่นๆ ดังแสดงในภาพที่ 22 และตารางผนวกที่ ค1



ภาพที่ 20 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียจากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน

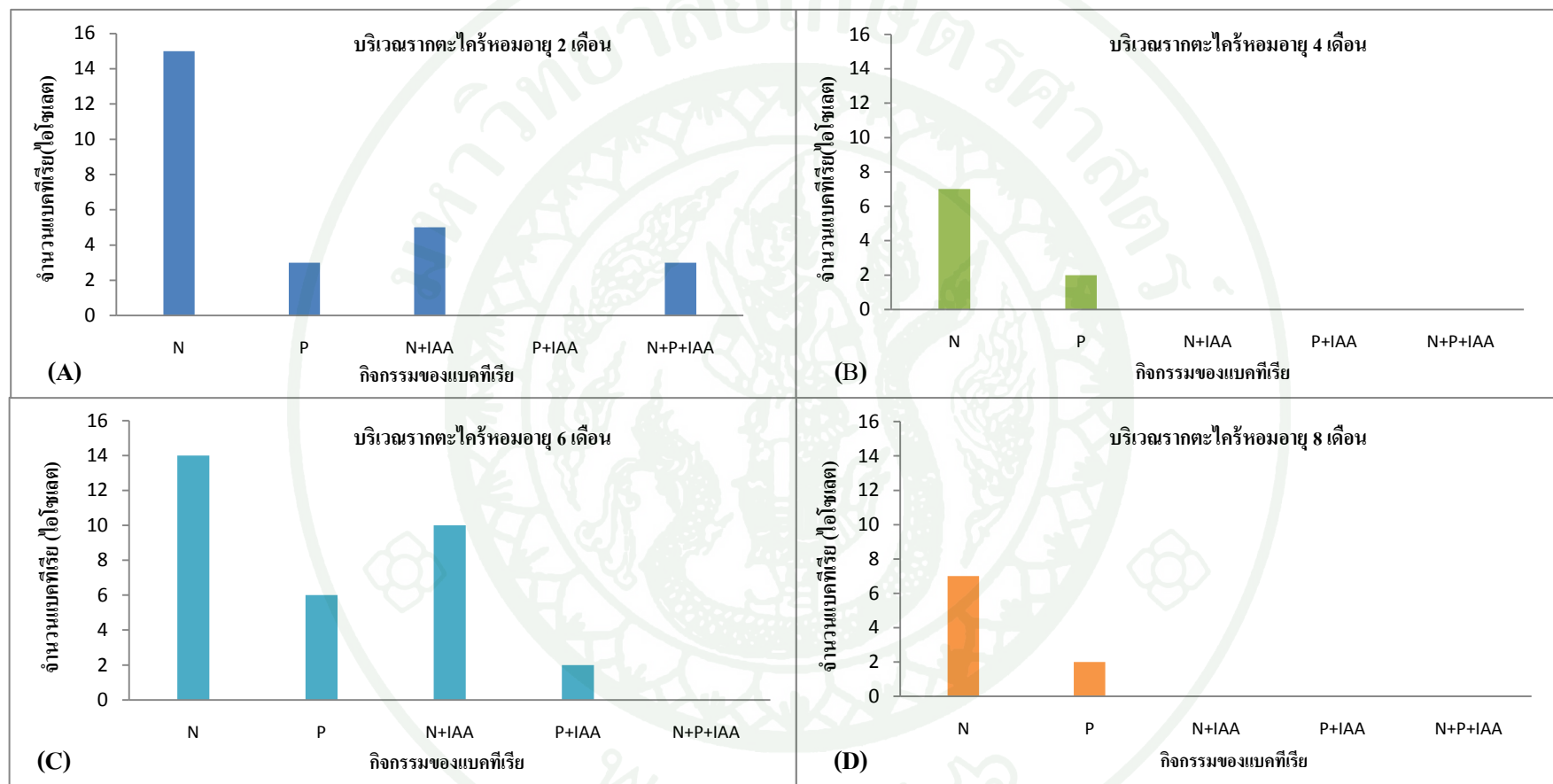


ภาพที่ 21 ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียจากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน



ภาพที่ 22 ความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซินของแบคทีเรียจากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน

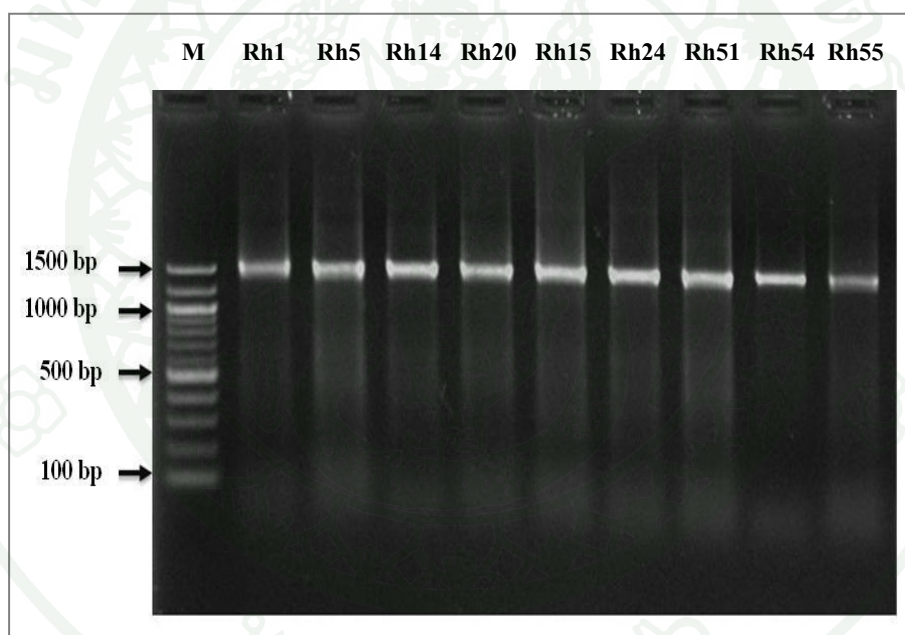
จากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน พบว่าแบคทีเรียบางไอโซเลตมีความสามารถหลายด้าน เช่น มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนร่วมกับผลิตฮอร์โมนออกซิน มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตร่วมกับผลิตฮอร์โมนออกซิน และมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซิน ในตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลต พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน 15 ไอโซเลต มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต 3 ไอโซเลต แบคทีเรียที่มีความสามารถทั้งการตรึงไนโตรเจนและการผลิตฮอร์โมนออกซิน 5 ไอโซเลต และมีความสามารถทั้งการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซิน 3 ไอโซเลต ในตะไคร้หอมอายุ 4 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลต พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน 7 ไอโซเลต และมีความสามารถในการละลายฟอสเฟต 2 ไอโซเลต ในตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 32 ไอโซเลต พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน 14 ไอโซเลต มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต 6 ไอโซเลต แบคทีเรียที่มีความสามารถทั้งการตรึงไนโตรเจน และการผลิตฮอร์โมนออกซิน 10 ไอโซเลต และมีความสามารถในการละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซิน 2 ไอโซเลต และในตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลต พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน 7 ไอโซเลต และมีความสามารถในการละลายฟอสเฟต 2 ไอโซเลต ดังแสดงในภาพที่



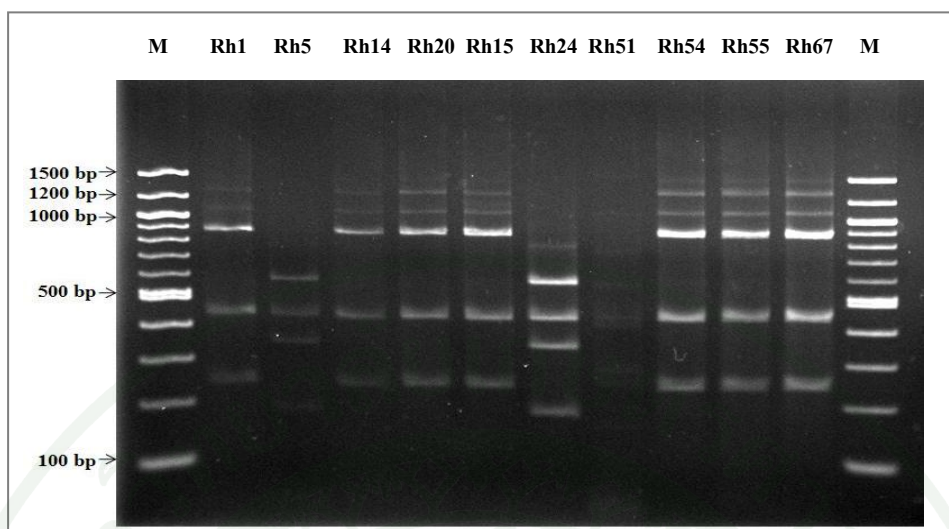
ภาพที่ 23 จำนวนและกิจกรรมของแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน (A), 4 เดือน (B), 6 เดือน (C) และ 8 เดือน (D)

2.3 การเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมทั้งหมด ด้วยเทคนิค RFLP

จากการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมทั้งหมด 76 ไอโซเลต ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III และ *Hha* I โดยการสกัดดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียด้วยวิธี boiling เพื่อนำดีเอ็นเอเป็นต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาด 1,500 bp ดังแสดงในภาพที่ 24 จากรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่ได้จากเทคนิค RFLP ดังแสดงในภาพที่ 25-26 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hae* III และ *Hha* I พบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้งหมด 42 รูปแบบ สามารถจัดกลุ่มของแบคทีเรีย ได้ 23 กลุ่ม



ภาพที่ 24 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ จากตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรากตะไคร้หอม ชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 1,500 bp M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) และ Rh (1, 5, 14, 20, 15, 24, 51, 54 และ 55) คือ รหัสแบคทีเรีย



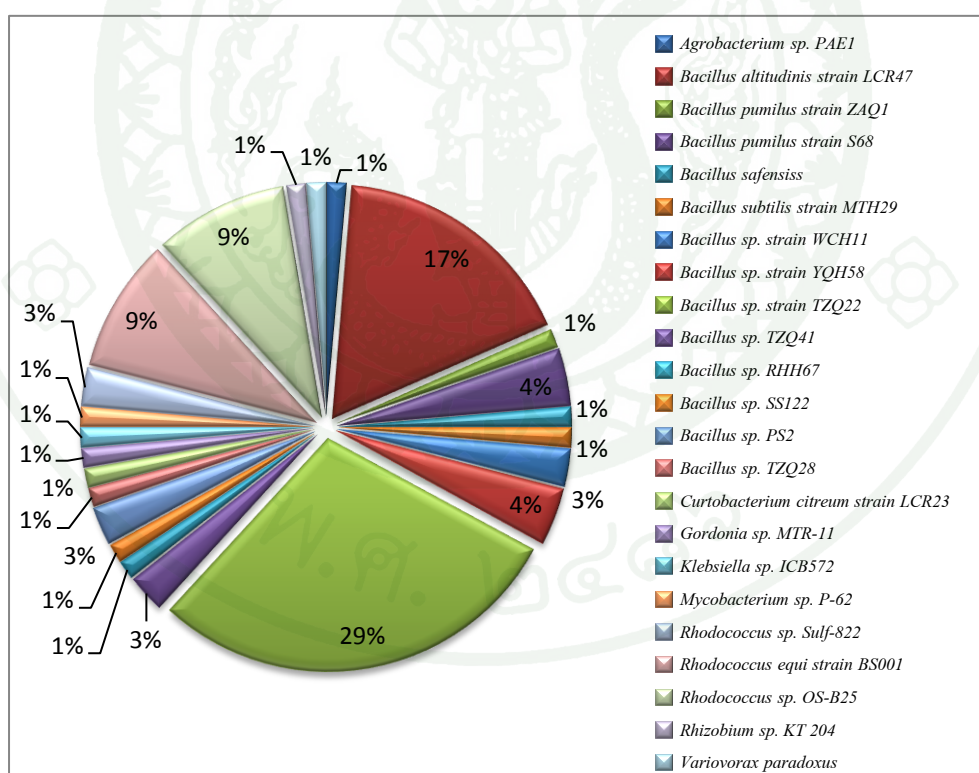
ภาพที่ 25 ตัวอย่างรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณราก ตะไคร้หอม M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) และ Rh (1, 5, 14, 20, 15, 24, 51, 54, 55 และ 67) คือ รหัสแบคทีเรีย



ภาพที่ 26 ตัวอย่างรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณราก ตะไคร้หอม M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) และ Rh (1, 5, 14, 20, 15, 24, 51, 54, 55, 67 และ 65) คือ รหัสแบคทีเรีย

2.4 การระบุชนิดของแบคทีเรีย

เมื่อนำรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด (*Hae* III และ *Hha* I) ของแบคทีเรียทั้งหมด 76 ไอโซเลต ได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้งหมด 42 แบบ เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ระบุชนิดของแบคทีเรียได้ 23 ชนิดดังนี้ *Agrobacterium* sp. PAE1, *Bacillus subtilis* strain MTH29, *Bacillus* sp. strain TZQ22, *Bacillus pumilus* strain ZAQ1, *Bacillus* sp. strain YQH58, *Bacillus* sp. strain WCH11, *Bacillus* sp. TZQ28, *Bacillus pumilus* strain S68, *Bacillus altitudinis* strain LCR47, *Bacillus* sp. TZQ41, *Bacillus* sp. RHH67, *Bacillus safensis*, *Bacillus* sp. SS122, *Bacillus* sp. PS2, *Curtobacterium citreum* strain LCR23, *Gordonia* sp. MTR-11, *Klebsiella* sp. ICB572, *Mycobacterium* sp. P-62, *Rhodococcus equi* strain BS001, *Rhodococcus* sp. OS-B25, *Rhodococcus* sp. Sulf-822, *Rhizobium* sp. KT 204 และ *Variovorax paradoxus* พบว่าร้อยละ 70 เป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ดังแสดงในภาพที่ 27



ภาพที่ 27 ร้อยละของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน ทั้งหมด 23 ชนิด

จากการพิจารณาความหลากหลายของแบคทีเรียที่จำแนกตามช่วงอายุของตะไคร้หอม รหัสเชื้อ และกิจกรรมของแบคทีเรีย พบว่าบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน มีการเข้าอยู่อาศัยของแบคทีเรียทั้งหมด 10 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 8 คือ *Bacillus* sp. strain TZQ22 (Rh10, Rh12, Rh21, Rh26, Rh29, Rh31, Rh36, Rh42, Rh45, Rh50 และ Rh53), *Bacillus pumilus* strain ZAQ1 (Rh22), *Bacillus* sp. strain YQH58 (Rh23, Rh28 และ Rh40), *Bacillus* sp. strain WCH1 (Rh27 และ Rh33), *Rhodococcus equi* strain BS001 (Rh37), *Bacillus* sp. TZQ28 (Rh43), *Bacillus pumilus* strain S68 (Rh49), *Bacillus altitudinis* strain LCR47 (Rh57, Rh58 และ Rh61), *Bacillus* sp. TZQ41 (Rh59 และ Rh62) และ *Bacillus* sp. RHH67 (Rh63) พบว่าส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ ร้อยละของแบคทีเรียที่พบสูงที่สุด คือ *Bacillus* sp. strain TZQ22 พบร้อยละ 42 ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ดังแสดงในภาพที่ 28 มีบทบาทเป็นแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนให้แก่พืช (Xie *et al.*, 2003) สามารถคัดแยกได้จากบริเวณรากพืชหลายชนิด เช่น หัวบีท อ้อย ข้าวสาลี ข้าว ข้าวโพด ปาล์มน้ำมัน และ กล้วยพืช เป็นต้น (Dobereiner, 1997; Hecht-Buchholz, 1998; Sahin *et al.*, 2004) จากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณผลผลิตโดยเฉพาะใน กล้วยพืช และข้าวโพด (Belimov *et al.*, 1995; Ozturk *et al.*, 2003; Cakmakci *et al.*, 2006) นอกจากนี้ ยังพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. TZQ41 และ *Bacillus* sp. RHH67 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซินได้

บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 4 เดือน มีการเข้าอยู่อาศัยของแบคทีเรียทั้งหมด 7 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 8 คือ *Rhodococcus* sp. OS-B25 (Rh2), *Bacillus* sp. SS122 (Rh7), *Rhodococcus* sp. Sulf-822 (Rh8 และ Rh16), *Bacillus* sp. strain TZQ22 (Rh38), *Agrobacterium* sp. PAE1 (Rh47), *Bacillus altitudinis* strain LCR47 (Rh60 และ Rh73) และ *Bacillus* sp. PS2 (Rh9) แบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือ *Rhodococcus* sp. Sulf-822 พบร้อยละ 23 รองลงมาคือ *Bacillus altitudinis* strain LCR47 พบร้อยละ 22 และ *Bacillus* sp. PS2 พบร้อยละ 11 ดังแสดงในภาพที่ 29 จากการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่า *Bacillus* sp. PS2 ซึ่งคัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 4 เดือน มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงสุด

บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน มีการเข้าอยู่อาศัยของแบคทีเรียทั้งหมด 14 ชนิด คือ *Rhodococcus* sp. OS-B25 (Rh1, Rh4, Rh39, Rh41 และ Rh46), *Rhodococcus equi* strain BS001 (Rh5, Rh11, Rh13, Rh18, Rh64 และ Rh66), *Rhizobium* sp. KT 204 (Rh14), *Variovorax paradoxus* (Rh15), *Bacillus subtilis* strain MTH29 (Rh20), *Gordonia* sp. MTR-11 (Rh24),

Bacillus sp. strain TZQ22 (Rh32, Rh44, Rh48 และ Rh19), *Bacillus* sp. PS2 (Rh51), *Klebsiella* sp. ICB572 (Rh54), *Curtobacterium citreum* strain LCR23 (Rh55), *Bacillus pumilus* strain S68 (Rh67 และ Rh76), *Bacillus altitudinis* strain LCR47 (Rh56, Rh68, Rh69, Rh70, Rh71 และ Rh72), *Mycobacterium* sp. P-62 (Rh65) และ *Bacillus safensis* (Rh17) ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน มีความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียบริเวณรากสูงที่สุด เนื่องจากความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณรากพืช ขึ้นอยู่กับปริมาณสารขับจากรากพืช ความสมบูรณ์ของรากพืช ส่งผลต่อปริมาณและขอบเขตของสารขับจากรากพืช พืชที่มีการเจริญเติบโตของรากและลำต้นที่ดี จะเอื้อต่อการเข้าอยู่อาศัยของแบคทีเรียบริเวณราก ส่งผลให้เกิดความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณรากพืชดังกล่าว (Humphris *et al.*, 2005) ร้อยละของแบคทีเรียที่พบมากที่สุดบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน คือ *Rhodococcus equi* strain BS001 พบร้อยละ 19 และ *Bacillus altitudinis* strain LCR47 ร้อยละ 19 เช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 30 เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชพบว่า *Curtobacterium citreum* strain LCR23 พบร้อยละ 3 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้สูงสุด ซึ่งพบจากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือนเพียงอย่างเดียว และ *Klebsiella* sp. ICB572 มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซินได้สูงสุด พบร้อยละ 3 จากการรายงานของ Ichiwaki *et al.* (2010) พบว่า *Klebsiella* sp. ICB572 มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืช คัดแยกได้จากบริเวณรากอ้อยประเทศบราซิล

และบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน มีการเข้าอยู่อาศัยของแบคทีเรียทั้งหมด 10 ไอโซเลต สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้ 3 ชนิด คือ *Bacillus* sp. strain TZQ22 (Rh3, Rh25, Rh30, Rh34, Rh35 และ Rh52), *Rhodococcus* sp. OS-B25 (Rh6) และ *Bacillus altitudinis* strain LCR47 (Rh74 และ Rh75) ดังแสดงในตารางที่ 8 พบร้อยละของ *Bacillus* sp. strain TZQ22 สูงสุด ร้อยละ 62 ดังแสดงในภาพที่ 31

จากการพิจารณาผลการคัดแยกแบคทีเรียในการทดลองที่ 2 พบว่าบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้จำนวนสูงสุด และพบความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียที่เข้าอาศัยอยู่มากกว่าบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุ 2, 4 และ 8 เดือน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่ได้จากเทคนิค DGGE (ในการทดลองที่ 1) เนื่องจากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน เป็นช่วงการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดของตะไคร้หอม ทั้งการเจริญในส่วนยอดและส่วนราก บริเวณรากของตะไคร้หอมมีการปลดปล่อยสารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณดังกล่าวได้ปริมาณมาก และจากลักษณะของรากตะไคร้หอมที่มีระบบรากเป็นรากฝอย มีการ

กระจายของราก ทำให้มีการขยายอาณาเขตของสารจับจากรากพืชได้ จึงส่งผลให้บริเวณรากที่อายุ 6 เดือน มีการเข้าอาศัยของประชากรแบคทีเรียสูงกว่าบริเวณรากที่อายุอื่น (Grayston *et al.*, 2001) กล่าวได้ว่าแบคทีเรียบริเวณรากส่งผลต่อการเจริญของตะไคร้หอมและปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ จากการทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่ามีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต ตรึงไนโตรเจนร่วมกับผลิตฮอร์โมนออกซิน ละลายฟอสเฟตร่วมกับผลิตฮอร์โมนออกซิน และตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซิน ร้อยละ 56, 17, 20, 3 และ 4 ตามลำดับ แบคทีเรียส่วนใหญ่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และจากการระบุชนิดของแบคทีเรียพบสกุล *Bacillus* ร้อยละ 70 เป็นแบคทีเรียที่พบทุกช่วงอายุของตะไคร้หอม แบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืชหลายด้าน จากการคัดแยกแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมในครั้งนี้นับพบแบคทีเรีย *Bacillus* sp. TZQ41 และ *Bacillus* sp. RHH67 ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถทั้งการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซินได้ อีกทั้งพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PS2 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงสุด และนอกจากนี้พบว่าแบคทีเรีย *Curtobacterium citreum* strain LCR23 และ *Klebsiella* sp. ICB572 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซินได้สูงสุด ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงสุดในแต่ละด้านเป็นแบคทีเรียตัวแทนที่จะนำไปศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซิน ที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมในอายุต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของพืชในระดับห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

ตารางที่ 8 การจัดกลุ่มและระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีประโยชน์บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน

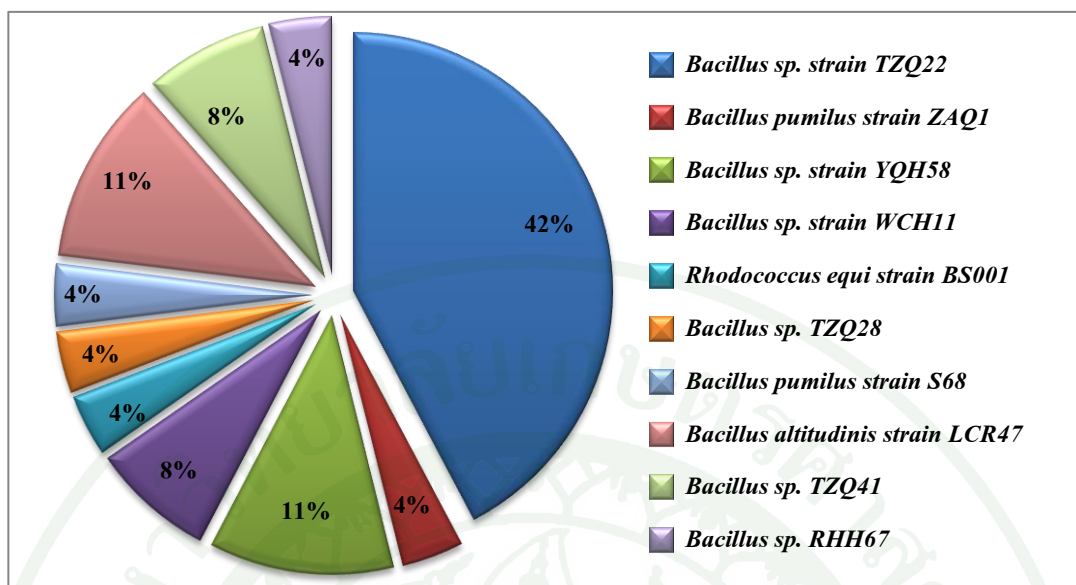
อายุพืช (เดือน)	รหัสเชื้อ	Accession No.	ชื่อเชื้อ	Identify (%)	กิจกรรมของแบคทีเรีย		
					ตรึงไนโตรเจน	ละลายฟอสเฟต	ผลิตฮอร์โมนออกซิน
2	Rh10 Rh12 Rh21	JN016598	<i>Bacillus</i> sp. strain TZQ22	99	0.01±0.001-1.5±0.01	-	-
	Rh26Rh29 Rh31						
	Rh36 Rh42Rh45						
	Rh50 Rh53						
	Rh22	JN016602	<i>Bacillus pumilus</i> strain ZAQ1	98	2.37±1.0	-	-
	Rh23 Rh28 Rh40	JN016606	<i>Bacillus</i> sp. strain YQH58	98	0.2±0.06-0.68±0.06	-	1.96±0.1-2.93±0.0
	Rh27 Rh33	JN016607	<i>Bacillus</i> sp. strain WCH11	93	0.13±0.04-0.17±0.08	-	-
	Rh43	JN016610	<i>Bacillus</i> sp. TZQ28	98	0.08±0.007	-	-
	Rh49	JN016612	<i>Bacillus pumilus</i> strain S68	72	0.53±0.06	-	1.88±0.08
	Rh57 Rh58 Rh61	JN016594	<i>Bacillus altitudinis</i> strain LCR47	92	-	0.12±0.02-0.13±0.02	-
	Rh59 Rh62	JN016615	<i>Bacillus</i> sp. TZQ41	92	0.12±0.05-0.65±0.3	0.05±0.0-0.1±0.05	1.96±0.13-2.04±0.06
	Rh63	JN016616	<i>Bacillus</i> sp. RHH67	74	0.07±0.01	0.23±0.01	1.8±0.09
	Rh37	JN016595	<i>Rhodococcus equi</i> strain BS001	86	0.08±0.0	-	2.49±0.1

ตารางที่ 8 (ต่อ)

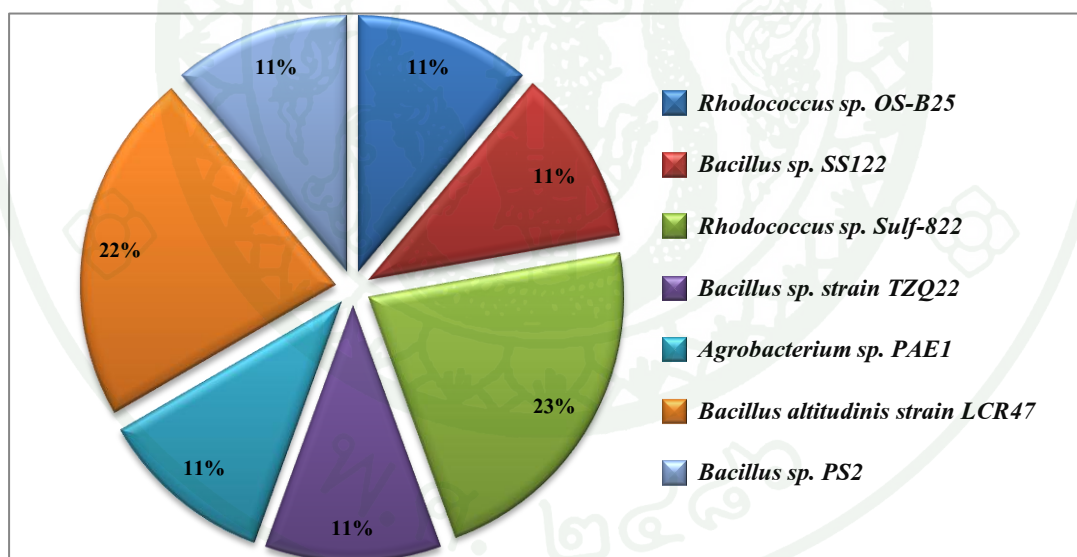
อายุพืช (เดือน)	รหัสเชื้อ	Accession No.	ชื่อเชื้อ	Identify (%)	กิจกรรมของแบคทีเรีย		
					ตรึงไนโตรเจน	ละลายฟอสเฟต	ผลิตฮอร์โมนออกซิน
4	Rh47	JN016611	<i>Agrobacterium</i> sp. PAE1	98	1.89±0.12	-	-
	Rh7	JN016593	<i>Bacillus</i> sp. SS122	98	0.07±0.04	-	-
	Rh38	JN016598	<i>Bacillus</i> sp. strain TZQ22	99	0.65±0.07	-	-
	Rh60 Rh73	JN016594	<i>Bacillus altitudinis</i> strain LCR47	92	-	0.06±0.01-0.08±0.01	-
	Rh9	JN016597	<i>Bacillus</i> sp. PS2	93	5.3±1.0	-	-
	Rh2	JN016592	<i>Rhodococcus</i> sp. OS-B25	86	1.89±0.1	-	-
	Rh8 Rh16	JN016596	<i>Rhodococcus</i> sp. Sulf-822	86	0.12±0.06	-	-
6	Rh20	JN016601	<i>Bacillus subtilis</i> strain MTH29	99	0.65±0.07	-	-
	Rh32 Rh44 Rh48	JN016598	<i>Bacillus</i> sp. strain TZQ22	99	0.02±0.4-2.37±0.02	-	-
	Rh19						
	Rh51	JN016597	<i>Bacillus</i> sp. PS2	93	0.79±0.06	-	-
	Rh67 Rh76	JN016612	<i>Bacillus pumilus</i> strain S68	72	0.02±0.004-0.77±0.07	-	2.11±0.07-2.51±0.04
	Rh56 Rh68 Rh69	JN016594	<i>Bacillus altitudinis</i> strain LCR47	92	-	0.02±0.01-0.08±0.06	-
	Rh70 Rh71 Rh72						
	Rh17	JN016605	<i>Bacillus safensis</i>	95	0.11±0.04	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)

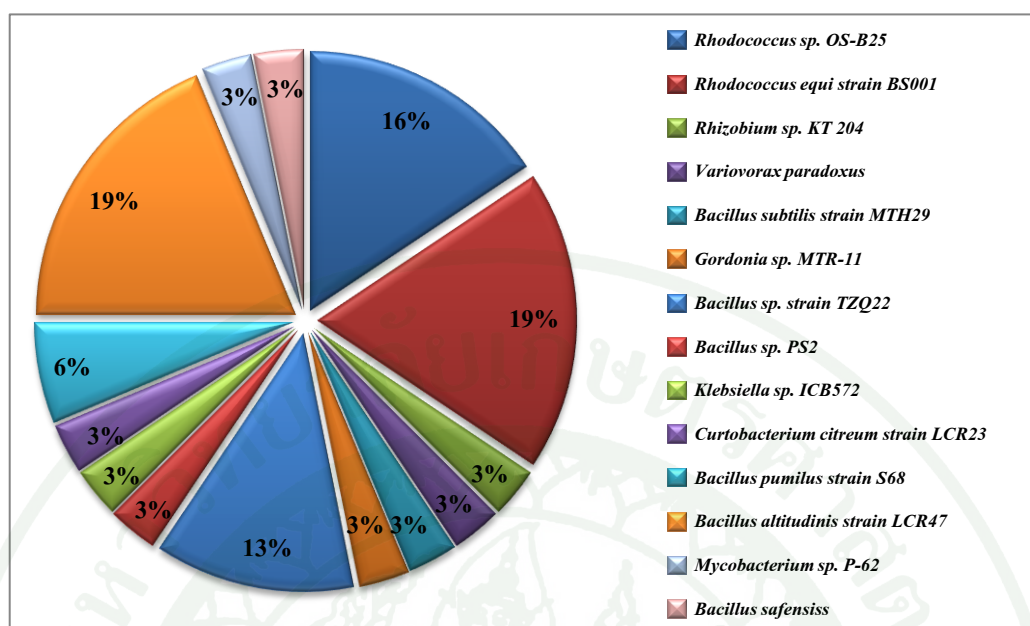
อายุพืช (เดือน)	รหัสเชื้อ	Accession No.	ชื่อเชื้อ	Identify (%)	กิจกรรมของแบคทีเรีย		
					ตรึงไนโตรเจน	ละลายฟอสเฟต	ผลิตฮอร์โมนออก ซิน
6	Rh55	JN016614	<i>Curtobacterium citreum</i> strain LCR23	98	-	0.56±0.02	2.98±0.09
	Rh24	JN016603	<i>Gordonia</i> sp. MTR-11	93	2.91±0.07	-	2.88±0.07
	Rh54	JN016613	<i>Klebsiella</i> sp. ICB572	98	-	0.03±0.007	5.21±0.04
	Rh65	JN016617	<i>Mycobacterium</i> sp. P-62	99	2.73±0.9	-	-
	Rh1 Rh4 Rh39	JN016592	<i>Rhodococcus</i> sp. OS-B25	86	0.01±0.001-0.08±0.006	-	-
	Rh41 Rh46						
	Rh5 Rh11 Rh13	JN016595	<i>Rhodococcus equi</i> strain BS001	86	0.01±0.001-0.06±0.004	-	2.1±0.09-2.76±0.1
	Rh18 Rh64 Rh66						
	Rh14	JN016599	<i>Rhizobium</i> sp. KT 204	66	0.07±0.005	-	3.41±0.1
	Rh15	JN016600	<i>Variovorax paradoxus</i>	87	0.01±0.003	-	-
8	Rh3 Rh25 Rh30	JN016598	<i>Bacillus</i> sp. strain TZQ22	99	0.02±0.005-2.34±0.3	-	-
	Rh34 Rh35 Rh52						
	Rh74 Rh75	JN016594	<i>Bacillus altitudinis</i> strain LCR47	92	-	0.08±0.03-0.12±0.05	-
	Rh6	JN016592	<i>Rhodococcus</i> sp. OS-B25	86	0.01±0.0	-	-



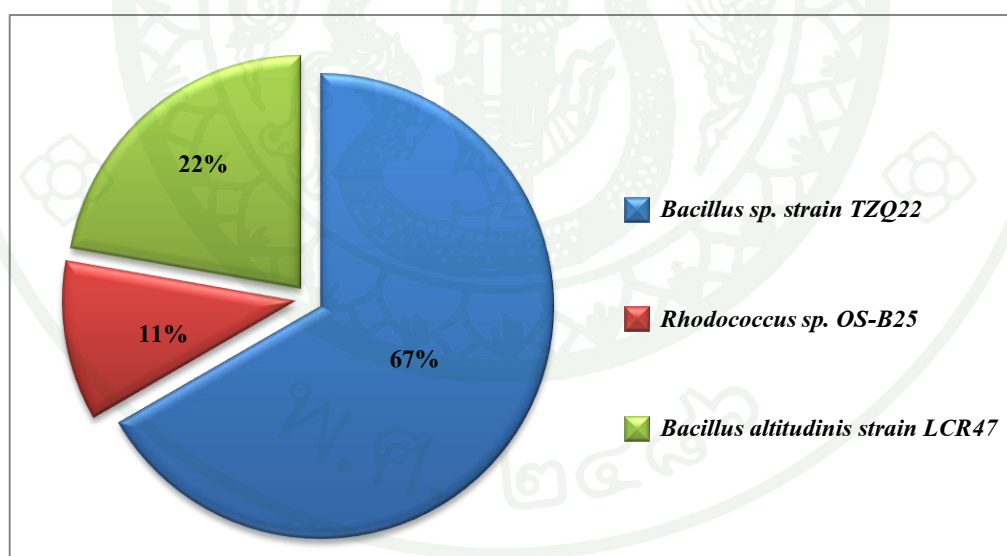
ภาพที่ 28 เปรียบเทียบร้อยละของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม อายุ 2 เดือน



ภาพที่ 29 เปรียบเทียบร้อยละของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม อายุ 4 เดือน



ภาพที่ 30 เปรียบเทียบร้อยละของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม อายุ 6 เดือน



ภาพที่ 31 เปรียบเทียบร้อยละของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม อายุ 8 เดือน

3. การทดลองที่ 3 ผลของการใช้แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซินที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม ต่อการเจริญเติบโตของพืชในระดับห้องปฏิบัติการ ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าแฝกกลุ่ม ที่ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังแสดงในภาพที่ 32



ภาพที่ 32 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหญ้าแฝกกลุ่ม T1 ดำรับควบคุมใส่น้ำฆ่าเชื้อ (A), T2 ดำรับควบคุม (*E. coli* DH5 α) (B), T3 เติม *Bacillus* sp. PS2 (C), T4 เติม *Curtobacterium citreum* strain LCR23 (D), T5 เติม *Klebsiella* sp. ICB572 (E) และ T6 เติม *Bacillus* sp. PS2, *Curtobacterium citreum* strain LCR23 และ *Klebsiella* sp. ICB572 (F)

3.1 ความยาวส่วนยอดและส่วนราก

3.1.1 แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

ผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม โดยวัดความยาวของส่วนยอดและส่วนราก หลังจากการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 15 วัน ผลการวัดความยาวเฉลี่ยของส่วนยอด พบว่าตำรับการทดลองที่เดิม *Bacillus* sp. PS2 มีความยาวเฉลี่ยของส่วนยอดเท่ากับ 4.43 ± 0.8 เซนติเมตร และตำรับควบคุมที่เดิมน้ำฆ่าเชื้อและเดิม *E. coli* DH5 α มีความยาวเฉลี่ยของส่วนยอดเท่ากับ 0.64 ± 0.1 และ 0.08 ± 0.4 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความยาวเฉลี่ยของส่วนยอด พบว่าตำรับทดลองมีความยาวเฉลี่ยของส่วนยอดมากกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 33 และตารางผนวกที่ ง1 และผลการวัดความยาวเฉลี่ยส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม พบว่าตำรับการทดลองที่เดิม *Bacillus* sp. PS2 มีความยาวเฉลี่ยส่วนรากเท่ากับ 0.48 ± 0.1 เซนติเมตร และตำรับควบคุมที่เดิมน้ำฆ่าเชื้อและเดิม *E. coli* DH5 α มีความยาวเฉลี่ยส่วนรากเท่ากับ 0.11 ± 0.01 และ 0.07 ± 0.01 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความยาวเฉลี่ยของส่วนราก พบว่าตำรับทดลองมีความยาวเฉลี่ยของส่วนรากมากกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 34 และตารางผนวกที่ ง1

3.1.2 แบคทีเรียละลายฟอสเฟต

ผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม โดยวัดความยาวของส่วนยอดและส่วนราก หลังจากการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 15 วัน ผลการวัดความยาวเฉลี่ยของส่วนยอด พบว่าตำรับการทดลองที่เดิม *Curtobacterium citreum* strain LCR23 มีความยาวเฉลี่ยของส่วนยอดเท่ากับ 5.50 ± 1.6 เซนติเมตร และตำรับควบคุมที่เดิมน้ำฆ่าเชื้อและเดิม *E. coli* DH5 α มีความยาวเฉลี่ยของส่วนยอดเท่ากับ 0.64 ± 0.1 และ 0.08 ± 0.4 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความยาวเฉลี่ยของส่วนยอด พบว่าตำรับทดลองมีความยาวเฉลี่ยของส่วนยอดมากกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 33 และตารางผนวกที่ ง1 และผลการวัดความยาวเฉลี่ยส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม พบว่าตำรับการทดลองที่เดิม *Curtobacterium citreum* strain LCR23 มีความยาวเฉลี่ยส่วนรากเท่ากับ 0.53 ± 0.15 เซนติเมตร และตำรับควบคุมที่เดิมน้ำฆ่าเชื้อและเดิม *E. coli* DH5 α มีความยาวเฉลี่ยส่วนรากเท่ากับ 0.11 ± 0.01 และ 0.07 ± 0.01 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความยาวเฉลี่ยของส่วนราก พบว่าตำรับทดลองมีความยาว

เฉลี่ยของส่วนรากลากกว่าค่าควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 34 และตารางผนวกที่ ง1

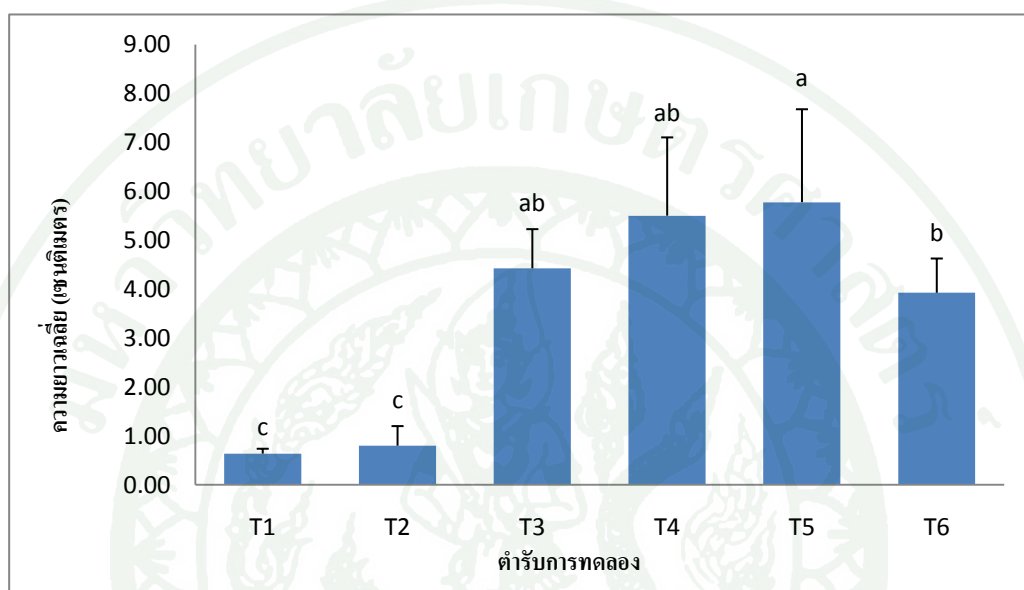
3.1.3 แบคทีเรียผลิตฮอร์โมนออกซิน

ผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มรากกลุ่ม โดยวัดความยาวของส่วนยอดและส่วนราก หลังจากการปักชำเป็นระยะเวลา 15 วัน ผลการวัดความยาวเฉลี่ยของส่วนยอด พบว่าค่าการทดลองที่เติม *Klebsiella* sp. ICB572 มีความยาวเฉลี่ยของส่วนยอดเท่ากับ 5.78 ± 1.9 เซนติเมตร และค่าควบคุมที่เติมน้ำฆ่าเชื้อและเติม *E. coli* DH5 α มีความยาวเฉลี่ยของส่วนยอดเท่ากับ 0.64 ± 0.1 และ 0.08 ± 0.4 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความยาวเฉลี่ยของส่วนยอด พบว่าค่าการทดลองมีความยาวเฉลี่ยของส่วนยอดมากกว่าค่าควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 33 และตารางผนวกที่ ง1 และผลการวัดความยาวเฉลี่ยส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มรากกลุ่ม พบว่าค่าการทดลองที่เติม *Klebsiella* sp. ICB572 มีความยาวเฉลี่ยส่วนรากเท่ากับ 1.28 ± 0.15 เซนติเมตร และค่าควบคุมที่เติมน้ำฆ่าเชื้อและเติม *E. coli* DH5 α มีความยาวเฉลี่ยส่วนรากเท่ากับ 0.11 ± 0.01 และ 0.07 ± 0.01 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความยาวเฉลี่ยของส่วนราก พบว่าค่าการทดลองมีความยาวเฉลี่ยของส่วนรากลากกว่าค่าควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 34 และตารางผนวกที่ ง1

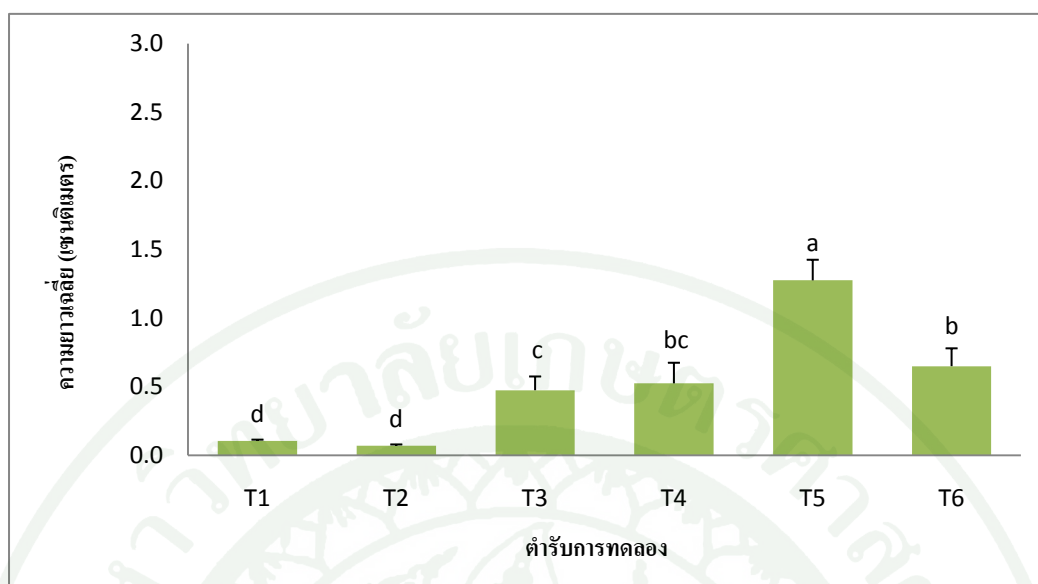
3.1.4 แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด *Bacillus* sp. PS2, *Curtobacterium citreum* strain LCR23 และ *Klebsiella* sp. ICB572

ผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มรากกลุ่ม โดยวัดความยาวของส่วนยอดและส่วนราก หลังจากการปักชำเป็นระยะเวลา 15 วัน ผลการวัดความยาวเฉลี่ยของส่วนยอด พบว่าค่าการทดลองที่เติมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน มีความยาวเฉลี่ยของส่วนยอดเท่ากับ 3.93 ± 0.7 เซนติเมตร และค่าควบคุมที่เติมน้ำฆ่าเชื้อและเติม *E. coli* DH5 α มีความยาวเฉลี่ยของส่วนยอดเท่ากับ 0.64 ± 0.1 และ 0.08 ± 0.4 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความยาวเฉลี่ยของส่วนยอด พบว่าค่าการทดลองมีความยาวเฉลี่ยของส่วนยอดมากกว่าค่าควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 33 และตารางผนวกที่ ง1 และผลการวัดความยาวเฉลี่ยส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มรากกลุ่ม พบว่าค่าการทดลองที่เติมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีความยาวเฉลี่ยส่วนรากเท่ากับ 0.65 ± 0.13 เซนติเมตร และค่าควบคุมที่เติมน้ำฆ่าเชื้อและเติม *E. coli* DH5 α

มีความยาวเฉลี่ยส่วนรากเท่ากับ 0.11 ± 0.01 และ 0.07 ± 0.01 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความยาวเฉลี่ยของส่วนราก พบว่าตำรับทดลองมีความยาวเฉลี่ยของส่วนรากมากกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 34 และตารางผนวกที่ 1



ภาพที่ 33 ความยาวเฉลี่ยส่วนยอดของเนื้อเยื่อหุ้ม จากการศึกษาด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 34 ความยาวเฉลี่ยส่วนรากของเนื้อเยื่อเห็ดฟางแฟกซ์ จากการศึกษาด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ

3.2 น้ำหนักสดของส่วนยอดและส่วนราก

3.2.1 แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

ผลการวิเคราะห์น้ำหนักสดของส่วนยอด พบว่าตำรับการทดลองที่เติม *Bacillus* sp. PS2 มีน้ำหนักสดของส่วนยอดเท่ากับ 0.0593 ± 0.003 กรัม และตำรับควบคุมที่เติมน้ำมาเชื้อและเติม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักสดของส่วนยอดเท่ากับ 0.0251 ± 0.003 และ 0.0270 ± 0.003 กรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของส่วนยอด พบว่าตำรับทดลองมีน้ำหนักสดของส่วนยอดมากกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 35 และตารางผนวกที่ ๓2 และผลการวิเคราะห์น้ำหนักส่วนรากของเนื้อเยื่อเห็ดฟางแฟกซ์ พบว่าตำรับทดลองที่เติม *Bacillus* sp. PS2 มีน้ำหนักสดของส่วนรากเท่ากับ 0.0067 ± 0.001 กรัม และตำรับควบคุมที่เติมน้ำมาเชื้อและเติม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักสดของส่วนรากเท่ากับ 0.0038 ± 0.001 และ 0.0037 ± 0.002 กรัมตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของส่วนราก พบว่าตำรับทดลองมีน้ำหนักสดของส่วนรากมากกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 36 และตารางผนวกที่ ๓2

3.2.2 แบคทีเรียละลายฟอสเฟต

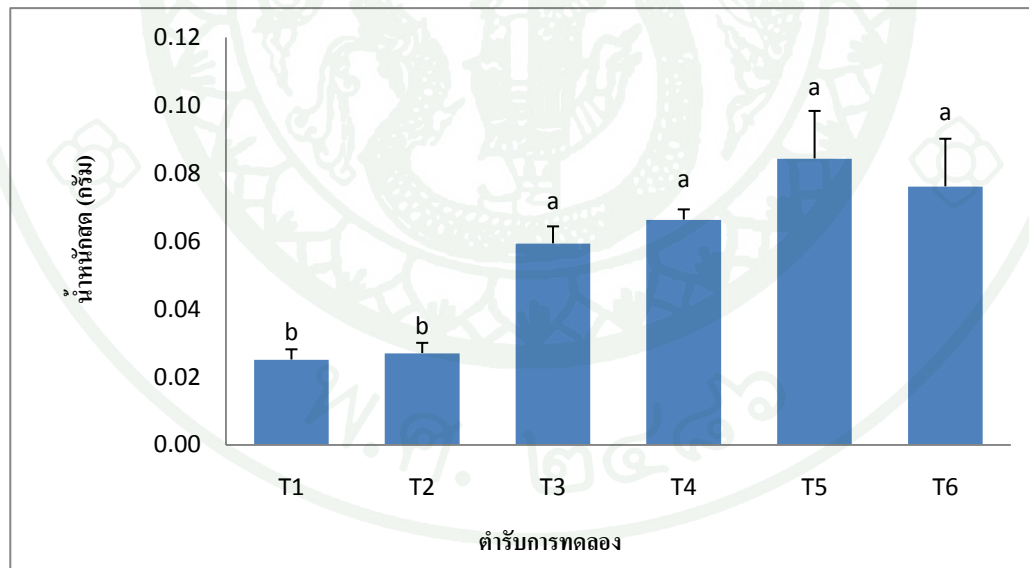
ผลการวิเคราะห์น้ำหนักสดของส่วนยอด พบว่าตำรับการทดลองที่เดิม *Curtobacterium citreum* strain LCR23 มีน้ำหนักสดของส่วนยอดเท่ากับ 0.0663 ± 0.003 กรัม และตำรับควบคุมที่เติมน้ำมาเชื้อและเดิม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักสดของส่วนยอดเท่ากับ 0.0251 ± 0.003 และ 0.0270 ± 0.003 กรัมตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของส่วนยอด พบว่าตำรับทดลองมีน้ำหนักสดของส่วนยอดมากกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 35 และตารางผนวกที่ ง2 และผลการวิเคราะห์น้ำหนักส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มาแฟกลุ่ม พบว่าตำรับการทดลองที่เดิม *Curtobacterium citreum* strain LCR23 มีน้ำหนักสดของส่วนรากเท่ากับ 0.0064 ± 0.002 กรัม และตำรับควบคุมที่เติมน้ำมาเชื้อและเดิม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักสดของส่วนรากเท่ากับ 0.0038 ± 0.001 และ 0.0037 ± 0.002 กรัมตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของส่วนราก พบว่าตำรับทดลองมีน้ำหนักสดของส่วนรากมากกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 36 และตารางผนวกที่ ง2

3.2.3 แบคทีเรียผลิตฮอร์โมนออกซิน

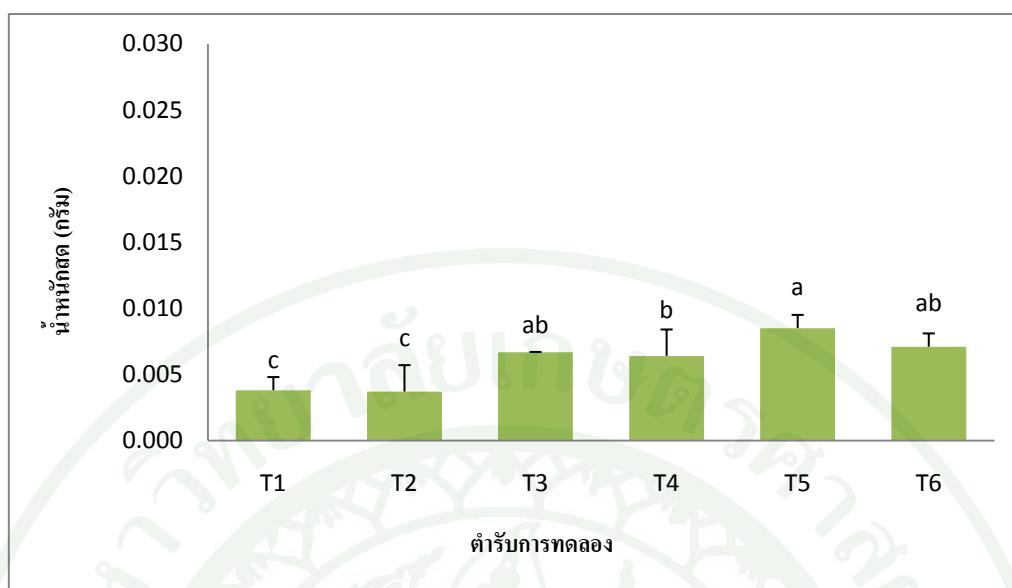
ผลการวิเคราะห์น้ำหนักสดของส่วนยอด พบว่าตำรับการทดลองที่เดิม *Klebsiella* sp. ICB572 มีน้ำหนักสดของส่วนยอดเท่ากับ 0.0843 ± 0.014 กรัม ตามลำดับ และตำรับควบคุมที่เติมน้ำมาเชื้อและเดิม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักสดของส่วนยอดเท่ากับ 0.0251 ± 0.003 และ 0.0270 ± 0.003 กรัมตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของส่วนยอด พบว่าตำรับทดลองมีน้ำหนักสดของส่วนยอดมากกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 35 และตารางผนวกที่ ง2 และผลการวิเคราะห์น้ำหนักส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มาแฟกลุ่ม พบว่าตำรับทดลองที่เดิม *Klebsiella* sp. ICB572 มีน้ำหนักสดของส่วนรากเท่ากับ 0.0085 ± 0.001 กรัม และตำรับควบคุมที่เติมน้ำมาเชื้อและเดิม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักสดของส่วนรากเท่ากับ 0.0038 ± 0.001 และ 0.0037 ± 0.002 กรัมตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของส่วนราก พบว่าตำรับทดลองมีน้ำหนักสดของส่วนรากมากกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 36 และตารางผนวกที่ ง2

3.2.4 แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด *Bacillus* sp. PS2, *Curtobacterium citreum* strain LCR23 และ *Klebsiella* sp. ICB572

ผลการวิเคราะห์น้ำหนักสดของส่วนยอด พบว่าตำรับการทดลองที่เติมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน มีน้ำหนักสดของส่วนยอดเท่ากับ 0.0761 ± 0.014 กรัม และตำรับควบคุมที่เติมน้ำฆ่าเชื้อและเติม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักสดของส่วนยอดเท่ากับ 0.0251 ± 0.003 และ 0.0270 ± 0.003 กรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของส่วนยอด พบว่าตำรับทดลองมีน้ำหนักสดของส่วนยอดมากกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 35 และตารางผนวกที่ ง2 และผลการวิเคราะห์น้ำหนักส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม พบว่าตำรับทดลองที่เติมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีน้ำหนักสดของส่วนรากเท่ากับ 0.0071 ± 0.001 กรัม และตำรับควบคุมที่เติมน้ำฆ่าเชื้อและเติม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักสดของส่วนรากเท่ากับ 0.0038 ± 0.001 และ 0.0037 ± 0.002 กรัมตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของส่วนราก พบว่าตำรับทดลองมีน้ำหนักสดของส่วนรากมากกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 36 และตารางผนวกที่ ง2



ภาพที่ 35 น้ำหนักสดส่วนยอดของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม จากการศึกษาด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 36 น้ำหนักสดส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม จากการศึกษาด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ

3.3 น้ำหนักแห้งของส่วนยอดและส่วนราก

3.3.1 แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

ผลการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของส่วนยอด พบว่าได้รับการทดลองที่เติม *Bacillus* sp. PS2 มีน้ำหนักแห้งของส่วนยอดเท่ากับ 0.0074 ± 0.000 กรัม และได้รับการควบคุมที่เติมน้ำมาเชื้อและเติม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักแห้งของส่วนยอดเท่ากับ 0.0028 ± 0.0000 และ 0.0029 ± 0.0000 กรัมตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของส่วนยอด พบว่าได้รับการทดลองที่มีน้ำหนักแห้งของส่วนยอดมากกว่าได้รับการควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 37 และตารางผนวกที่ ๖2 และผลการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม พบว่าได้รับการทดลองที่เติม *Bacillus* sp. PS2 มีน้ำหนักแห้งของส่วนรากเท่ากับ 0.0017 ± 0.0002 กรัม และได้รับการควบคุมที่เติมน้ำมาเชื้อและเติม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักแห้งของส่วนรากเท่ากับ 0.0004 ± 0.0002 และ 0.0005 ± 0.0002 กรัมตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของส่วนราก พบว่าได้รับการทดลองที่มีน้ำหนักแห้งของส่วนรากมากกว่าได้รับการควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 38 และตารางผนวกที่ ๖2

3.3.2 แบคทีเรียละลายฟอสเฟต

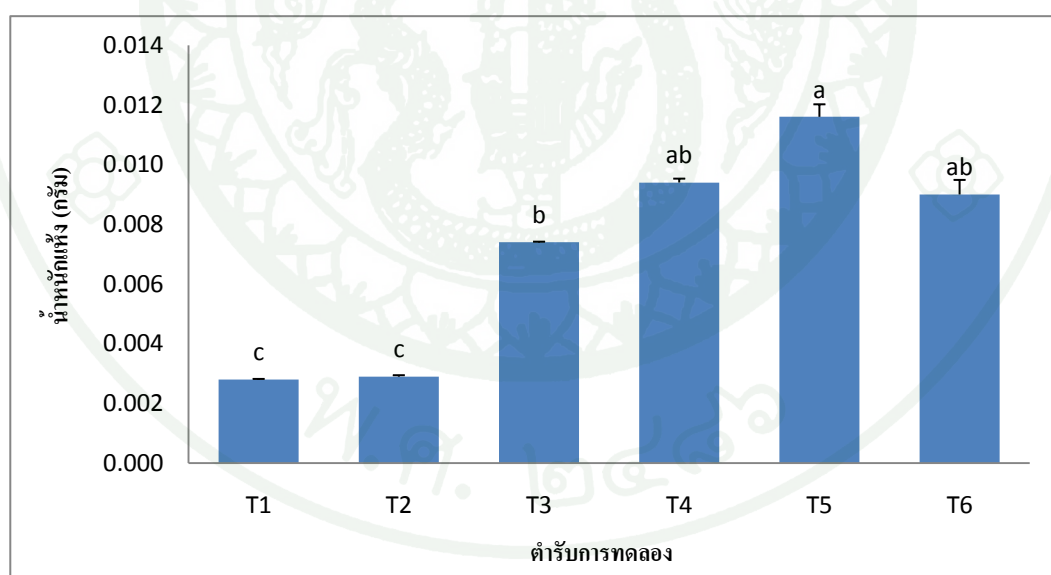
ผลการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของส่วนยอด พบว่าค่าการทดลองที่เดิม *Curtobacterium citreum* strain LCR23 มีน้ำหนักแห้งของส่วนยอดเท่ากับ 0.0094 ± 0.0001 กรัม และค่าการควบคุมที่เติมน้ำฆ่าเชื้อและเดิม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักแห้งของส่วนยอดเท่ากับ 0.0028 ± 0.0000 และ 0.0029 ± 0.0000 กรัมตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของส่วนยอด พบว่าค่าการทดลองมีน้ำหนักแห้งของส่วนยอดมากกว่าค่าการควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 37 และตารางผนวกที่ ๓2 และผลการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มราก พบว่าค่าการทดลองที่เดิม *Curtobacterium citreum* strain LCR23 มีน้ำหนักแห้งของส่วนรากเท่ากับ 0.0018 ± 0.0008 กรัม และค่าการควบคุมที่เติมน้ำฆ่าเชื้อและเดิม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักแห้งของส่วนรากเท่ากับ 0.0004 ± 0.0002 และ 0.0005 ± 0.0002 กรัมตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของส่วนราก พบว่าค่าการทดลองมีน้ำหนักแห้งของส่วนรากมากกว่าค่าการควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 38 และตารางผนวกที่ ๓2

3.3.3 แบคทีเรียผลิตฮอร์โมนออกซิน

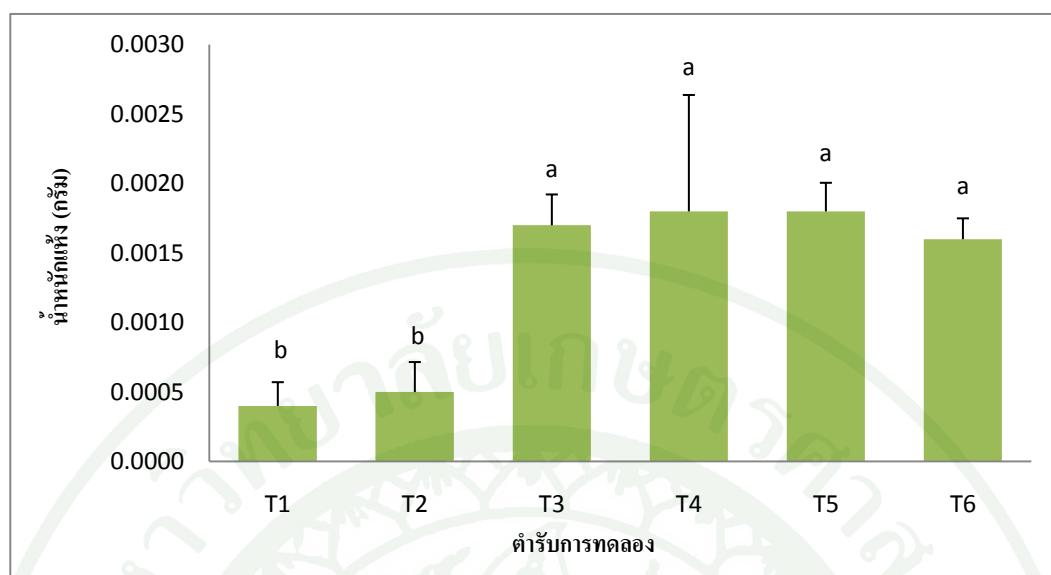
ผลการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของส่วนยอด พบว่าค่าการทดลองที่เดิม *Klebsiella* sp. ICB572 มีน้ำหนักแห้งของส่วนยอดเท่ากับ 0.0116 ± 0.0004 กรัม และค่าการควบคุมที่เติมน้ำฆ่าเชื้อและเดิม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักแห้งของส่วนยอดเท่ากับ 0.0028 ± 0.0000 และ 0.0029 ± 0.0000 กรัมตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของส่วนยอด พบว่าค่าการทดลองมีน้ำหนักแห้งของส่วนยอดมากกว่าค่าการควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 37 และตารางผนวกที่ ๓2 และผลการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มราก พบว่าค่าการทดลองที่เดิม *Klebsiella* sp. ICB572 มีน้ำหนักแห้งของส่วนรากเท่ากับ 0.0018 ± 0.0002 กรัม และค่าการควบคุมที่เติมน้ำฆ่าเชื้อและเดิม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักแห้งของส่วนรากเท่ากับ 0.0004 ± 0.0002 และ 0.0005 ± 0.0002 กรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของส่วนราก พบว่าค่าการทดลองมีน้ำหนักแห้งของส่วนรากมากกว่าค่าการควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 38 และตารางผนวกที่ ๓2

3.3.4 แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด *Bacillus* sp. PS2, *Curtobacterium citreum* strain LCR23 และ *Klebsiella* sp. ICB572

ผลการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของส่วนยอด พบว่าค่าการทดลองที่เติมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน มีน้ำหนักแห้งของส่วนยอดเท่ากับ 0.009 ± 0.0005 กรัม และค่าการควบคุมที่เติมน้ำฆ่าเชื้อและเติม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักแห้งของส่วนยอดเท่ากับ 0.0028 ± 0.0000 และ 0.0029 ± 0.0000 กรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของส่วนยอด พบว่าค่าการทดลองมีน้ำหนักแห้งของส่วนยอดมากกว่าค่าการควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 37 และตารางผนวกที่ 2 และผลการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม พบว่าค่าการทดลองที่เติมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน มีน้ำหนักแห้งของส่วนรากเท่ากับ 0.0016 ± 0.0002 กรัม และค่าการควบคุมที่เติมน้ำฆ่าเชื้อและเติม *E. coli* DH5 α มีน้ำหนักแห้งของส่วนรากเท่ากับ 0.0004 ± 0.0002 และ 0.0005 ± 0.0002 กรัมตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของส่วนราก พบว่าค่าการทดลองมีน้ำหนักแห้งของส่วนรากมากกว่าค่าการควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในภาพที่ 38 และตารางผนวกที่ 2



ภาพที่ 37 น้ำหนักแห้งส่วนยอดของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม จากการศึกษาด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 38 น้ำหนักแห้งส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกลุ่ม จากการศึกษาด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ

ผลของ *Bacillus* sp. PS2 ต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกลุ่ม พบว่าการเติม *Bacillus* sp. PS2 ร่วมกับอาหารเหลว MS คัดแปลงที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ แบคทีเรียดังกล่าวส่งผลทางบวกต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกลุ่ม จากการวัดการเจริญเติบโต ทั้งทางด้านความยาว น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งในส่วนยอดและส่วนราก พบว่าเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกลุ่มเจริญเติบโตได้สูงกว่าค่าควบคุม (ไม่เติมแบคทีเรีย และ เติมน *E. coli* DH5 α ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลของ *Curtobacterium citreum* strain LCR23 ต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกลุ่ม พบว่าการเติม *Curtobacterium citreum* strain LCR23 ร่วมกับอาหารเหลว MS คัดแปลงที่เติมฟอสเฟตในรูปที่ละลายยาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ แบคทีเรียดังกล่าวส่งผลทางบวกต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกลุ่ม จากการวัดการเจริญเติบโต ทั้งทางด้านความยาว น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งในส่วนยอดและส่วนราก พบว่าเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกลุ่มเจริญเติบโตได้สูงกว่าค่าควบคุม (ไม่เติมแบคทีเรีย และเติมน *E. coli* DH5 α ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลของ *Klebsiella* sp. ICB572 ต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกั่ม พบว่าการเติม *Klebsiella* sp. ICB572 ร่วมกับอาหารเหลว MS ดัดแปลงที่ไม่มีฮอร์โมนออกซินเป็นองค์ประกอบ แบคทีเรียดังกล่าวส่งผลทางบวกต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกั่ม จากการวัดการเจริญเติบโตทั้งทางด้านความยาวของส่วนยอดและส่วนราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งในส่วนยอดและส่วนราก พบว่าเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกั่มเจริญเติบโตได้สูงกว่าค่ารับควบคุม (ไม่เติมแบคทีเรีย และเติม *E. coli* DH5 α ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และนอกจากนี้ยังพบว่าการเติม *Klebsiella* sp. ICB572 มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของราก ทำให้รากเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกั่มมีความยาวสูงสุด

และจากการเติมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน พบว่าการเติม *Bacillus* sp. PS2, *Curtobacterium citreum* strain LCR23 และ *Klebsiella* sp. ICB572 ร่วมกับอาหารเหลว MS ดัดแปลงที่ไม่มีไนโตรเจนและฮอร์โมนออกซิน แต่มี $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ เป็นองค์ประกอบ แบคทีเรียดังกล่าวส่งผลทางบวกต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกั่ม จากการวัดการเจริญเติบโตทั้งทางด้านความยาว น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งในส่วนยอดและส่วนราก พบว่าเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกั่มเจริญเติบโตได้สูงกว่าค่ารับควบคุม (ไม่เติมแบคทีเรีย และเติม *E. coli* DH5 α ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่อย่างไรก็ตามการเติมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน ส่งผลต่อความยาวส่วนยอดและรากของเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกั่มได้ต่ำกว่าการเติมเชื้อเดี่ยว เนื่องจากความหนาแน่นของแบคทีเรียที่เติมลงในอาหารทดสอบ มีความหนาแน่นของเชื้อทดสอบต่างกัน คือ การเติมเชื้อเดี่ยว เติมน้ำหนักแห้ง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่มีค่าความขุ่น (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 แต่การเติมเชื้อร่วมกันทั้ง 3 ชนิด เติมน้ำหนักแห้ง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่มีค่าความขุ่น (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 จึงทำให้การเติมเชื้อทั้ง 3 ชนิดร่วมกันในการทดลองนี้มีปริมาณเชื้อหนาแน่น สารอาหารบริเวณรากมีจำกัด ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจึงน้อยกว่าการเติมเชื้อเดี่ยว ดังนั้นการเติมแบคทีเรียร่วมกัน ควรหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงต่อกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

การเติมแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมทั้ง 3 ชนิด (*Bacillus* sp. PS2, *Curtobacterium citreum* strain LCR23 และ *Klebsiella* sp. ICB572) พบว่าการเติมเชื้อเดี่ยวและการเติมเชื้อทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มแฟลกั่มได้อย่างมีประสิทธิภาพ พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับค่ารับควบคุม การเติมแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืช ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ (Burd *et al.*, 2000; Salantur *et al.*, 2006) กลไกที่สำคัญของ

แบคทีเรียในกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือ PGPR นั้นสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้หลายวิธี คือ สามารถผลิตฮอร์โมนพืช เช่น ผลิตฮอร์โมนออกซิน ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ เร่งการขยายขนาดเซลล์ และควบคุมการแตกราก ทำให้รากพืชมีพื้นที่ผิวสัมผัสและเกิดการแลกเปลี่ยนธาตุอาหารพืชเพิ่มสูงขึ้น (Gray and Smith, 2005) จากการทดลองเดิม *Klebsiella* sp. ICB572 มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน ส่งผลต่อความยาวของราก น้ำหนักสด และแห้งของรากสูงสุด สอดคล้องกับ Kaymak *et al.* (2008) พบว่าการเติม PGPR รหัส M3 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตฮอร์โมนออกซินส่งเสริมให้กิ่งปักชำของสาระแน (*Origanum majorana* L.) มีความยาวของรากมากกว่าดำรับควบคุม และมีน้ำหนักแห้งของรากสูงสุด นอกจากนี้การเติมแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การช่วยเพิ่มปริมาณธาตุอาหารในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วยในการตรึงไนโตรเจนให้แก่พืช จากการทดลองครั้งนี้เดิม *Bacillus* sp. PS2 มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความยาวของส่วนยอดและส่วนราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งทั้งส่วนยอดและส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มเมล็ด โดยเฉพาะการเจริญในส่วนของใบ การเจริญเติบโตของใบ ส่งผลเชิงบวกต่อปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบพืชด้วย เนื่องจากปริมาณของใบสอดคล้องกับปริมาณของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ จากพืชที่มีการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากส่วนของใบพืช ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Banchio *et al.* (2008) พบว่า การเติม PGPR ช่วยส่งเสริมการเจริญ โดยเพิ่มความยาวส่วนยอด น้ำหนักสดส่วนยอดจำนวนใบ และน้ำหนักแห้งส่วนราก ส่งผลเชิงบวกต่อปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบสาระแน และนอกจากนี้การเปลี่ยนรูปของฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ จากการทดลองครั้งนี้เดิม *Curtobacterium citreum* strain LCR23 พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มเมล็ดได้ ทั้งความยาวส่วนยอดและส่วนราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งทั้งส่วนยอดและส่วนราก ซึ่ง *Curtobacterium citreum* strain LCR23 สามารถเปลี่ยนรูป $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ซึ่งเป็นรูปที่พืชไม่สามารถดูดใช้ได้ ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถผลิตกรดอินทรีย์เพื่อละลายฟอสเฟตในรูปที่ละลายยากให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Hoberg *et al.*, 2005) จากผลการเติมแบคทีเรียตัวแทนที่ได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีคุณสมบัติต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มเมล็ดได้ทัดเทียมกับการใช้ธาตุอาหารพืชสังเคราะห์ และฮอร์โมนสังเคราะห์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. อายุของตะไคร้หอมส่งผลต่อการเข้าอาศัยของแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอม บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน มีการเข้าอาศัยอยู่ของแบคทีเรียสูงสุด โครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงเชิงบวกกับปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ซึ่งมีผลต่อปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ และโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุ 8 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงเชิงบวกกับปริมาณอินทรีย์วัตถุ และปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ ส่งเสริมให้ตะไคร้หอมมีปริมาณ citronallol ในปริมาณสูง

2. จากการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากบริเวณรากตะไคร้หอมที่อายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 76 ไอโซเลต บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลต มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซินเท่ากับ 20, 6 และ 8 ไอโซเลตตามลำดับ บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 4 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลต มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และละลายฟอสเฟตเท่ากับ 7 และ 2 ไอโซเลตตามลำดับ บริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 6 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 31 ไอโซเลต มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซินเท่ากับ 23, 8 และ 12 ไอโซเลตตามลำดับ และบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 8 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และละลายฟอสเฟตเท่ากับ 8 และ 2 ไอโซเลตตามลำดับ

3. จากผลการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้งหมด 58 ไอโซเลต มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 0.01-5.30 ไมโครโมลเอทธิลีนต่อชั่วโมง *Bacillus* sp. PS2 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 5.30 ไมโครโมลเอทธิลีนต่อชั่วโมง แบคทีเรียละลายฟอสเฟตทั้งหมด 18 ไอโซเลต มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตเท่ากับ 0.02-0.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร *Curtobacterium citreum* strain LCR23 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้สูงสุดเท่ากับ 0.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซิน ทั้งหมด 20 ไอโซเลต มีความสามารถในการ

การผลิตฮอร์โมนออกซินเท่ากับ 1.8-5.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร *Klebsiella* sp. ICB572 มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนออกซินได้สูงสุดเท่ากับ 5.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. ผลการจัดกลุ่มและระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโต จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 76 ไอโซเลต จัดกลุ่มด้วยเทคนิค RFLP สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ 23 กลุ่ม และระบุชนิดของแบคทีเรียได้ 23 ชนิด ดังนี้ *Bacillus* sp. strain TZQ22, *Bacillus pumilus* strain ZAQ1, *Bacillus* sp. strain YQH58, *Bacillus* sp. strain WCH11, *Rhodococcus equi* strain BS001, *Bacillus* sp. TZQ28, *Bacillus pumilus* strain S68, *Bacillus altitudinis* strain LCR47, *Bacillus* sp. TZQ41, *Bacillus* sp. RHH67, *Rhodococcus* sp. OS-B25, *Bacillus* sp. SS122, *Rhodococcus* sp. Sulf-822, *Agrobacterium* sp. PAE1, *Bacillus* sp. PS2, *Rhizobium* sp. KT 204, *Variovorax paradoxus*, *Bacillus subtilis* strain MTH29, *Gordonia* sp. MTR-11, *Klebsiella* sp. ICB572, *Curtobacterium citreum* strain LCR23, *Mycobacterium* sp. P-62 และ *Bacillus safensis* พบแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มากที่สุด ร้อยละ 70

5. ผลการทดสอบเชื้อเดี่ยวโดยการเติม *Bacillus* sp. PS2, *Curtobacterium citreum* strain LCR23 และ *Klebsiella* sp. ICB572 และเติมแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ร่วมกับอาหารเหลว MS คัดแปลง (ดังแสดงในหน้า 45-46) ต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม พบว่าดำรับการทดลองที่เติมแบคทีเรียเดี่ยว และการเติมแบคทีเรียร่วมกันทั้ง 3 ชนิด ส่งผลให้ความยาวส่วนยอดและส่วนราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งทั้งส่วนยอดและรากของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่มที่ใช้เป็นพืชทดสอบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับดำรับควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย และดำรับควบคุมที่เติมแบคทีเรียที่ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (*E. coli* DH5 α) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และการเติม *Klebsiella* sp. ICB572 ส่งผลให้เนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่มมีความยาวรากสูงที่สุด

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากความผันแปรของสารสำคัญทั้ง 3 ชนิด ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม การเก็บเกี่ยวตะไคร้หอมเพื่อการใช้ประโยชน์จากสารสำคัญ 3 ชนิด (citronellal, geraniol และ citronellol) การใช้ประโยชน์จาก citronellal สามารถเก็บเกี่ยวตะไคร้หอมที่อายุ 4 เดือน การใช้ประโยชน์จาก geraniol สามารถเก็บเกี่ยวตะไคร้หอมที่อายุ 6 เดือน การใช้ประโยชน์จาก citronellol สามารถเก็บเกี่ยวตะไคร้หอมที่อายุ 4 เดือน และสามารถเก็บเกี่ยวตะไคร้หอมที่อายุ 6 เดือน เพื่อให้ได้ผลผลิตน้ำมันหอมระเหยสูงสุด
2. จากการเติม *Klebsiella* sp. ICB572 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตฮอร์โมนออกซิน มีศักยภาพในการเพิ่มความยาวของรากเนื้อเยื่อหุ้มรากกลุ่ม ดังนั้นจึงเสนอให้มีการนำแบคทีเรียดังกล่าวมาใช้ร่วมกับหรือทดแทนการใช้ฮอร์โมนออกซินสังเคราะห์ ซึ่งมีราคาสูง (5 กรัม, 2000 บาท) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ *Gemineae* เพื่อกระตุ้นการขยายตัวของรากพืชวงศ์ดังกล่าวได้
3. ควรมีการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PS2, *Curtobacterium citreum* strain LCR23 และ *Klebsiella* sp. ICB572 ที่แยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอม เนื่องจากมีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช แต่ควรศึกษาเพิ่มเติมภายใต้สภาพโรงเรือน และแปลงทดลองก่อนการนำไปใช้ผลิตเป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพ เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อไป
4. จากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียพบว่า *Bacillus* sp. TZQ41 และ *Bacillus* sp. RHH67 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต และผลิตฮอร์โมนออกซินได้ จึงเป็นแบคทีเรียที่น่าสนใจในการนำมาพัฒนาเป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพ เนื่องจากการมีประสิทธิภาพหลายด้านในเชื้อเดี่ยว 1 ชนิด สามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตหัวเชื้อได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2548. รายงานการจัดการทรัพยากรดิน เพื่อการปลูกพืชเศรษฐกิจหลักตามกลุ่ม
ชุดดิน เล่มที่ 1 ดินบนพื้นที่ราบต่ำ. กรมพัฒนาที่ดินกระทรวงเกษตรและสหกรณ์,
กรุงเทพฯ.

ก่องกานดา ชยามฤต. 2540. สมุนไพรไทย ตอนที่ 6. โรงพิมพ์ไคมอนด์ พรินต์ติ้ง จำกัด. กรุงเทพฯ.

คณะกรรมการจัดทำพจนานุกรมปฐพีวิทยา. 2551. พจนานุกรมปฐพีวิทยา. สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.

ทัศนีย์ อัดตะนันท์ และ จงรักษ์ จันทรเจริญสุข. 2542. การวิเคราะห์ดินและพืช.
ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิธิยา รัตนานนท์. 2545. เคมี่อาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ โอ. เอส. พรินต์ติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ.

ภาควิชาชีววิทยา. 2547. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เจ้าพระยาการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ.

ขงยุทธ โอสดสภา. 2543. ธาตุอาหารพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.

รุ่งฤดี พรสกุลเลิศชัย. 2550. การศึกษาการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไพลโดยใช้วิธีไมโครเวฟ.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิลลี่ กาวีตะ, มาลี ณ นคร, ศรีสม สุวรรณวงศ์ และ สุริยา ตันติวิวัฒน์. 2549. สรีรวิทยาของพืช.
พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิทยา มะเสนา. 2526. จุลชีววิทยาทางดิน. ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

วินัย ปิทยานต์. 2540. ตะไคร้หอม (Citronella grass). ข่าววัตถุดิบพืช. 24: 78-84.

วัชรวิ ประชาศรัย. 2542. ผักพื้นบ้านเมืองเหนือ อีสาน ได้.

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ศุภมาส พนิชศักดิ์พัฒนา. 2529. จุลชีววิทยาของดินเพื่อผลผลิตทางการเกษตร.

ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. เศรษฐกิจสมุนไพรไทย ปี 2548/2549

กรณีศึกษา: ว่านหางจระเข้ ฟักทะลายโจร ตะไคร้หอม และไพล.

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ศิริลักษณ์ มาลานิยม. 2545. น้ำมันหอมระเหยสกัดจากพืชสมุนไพรไทย. สมอ. 28: 3-6.

สุนทรีย์ ภักตร์ผ่อง, นนทวิทย์ อารียชน และ สุรพล วิเศษสรรค์. 2547. ประสิทธิภาพของสกัด
ตะไคร้หอมเพื่อควบคุม *Zoothamnium* sp. ในกึ่งกลาดำระยะ PL15.

วารสารขลุ่ยดนตรี 26: 431-437.

สมศักดิ์ วั่งใน. 2528. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด. กรุงเทพฯ.

อรนุช เกษประเสริฐ. 2530. การปลูกตะไคร้หอม. กรมวิชาการเกษตร

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

Abramson, C.I., A. Paulo, J.A. Wanderley-Maria, J.S. Mina-Alexandre and Bd. Souza-Orlando.

2006. Effect of essential oil from citronella and alfazema on fennel aphids *Hyadaphis foeniculi* Passerini (Hemiptera: Aphididae) and its predator *Cycloneda sanguinea* L. (Coleoptera: Coccinellidae). **J. Env. Sci.** 3: 9-10.

- Ahmad, F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiol. Res.** 163: 173-181.
- Antoun, H. and D. Prevost. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. pp. 1-39. In Z.A. Siddiqui, ed. **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**. Springer, Inc., Netherlands.
- Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen, M.R. Ismail, Md.A. Hoque, M.Z. Islam, S.M. Shahidullah and S. Meos. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. **Afr. J. Biol.** 8: 1247-1252.
- Azlin, C.O., H.G. Amir and L.K. Chan. 2005. Isolation and charecterization of diazotrophic rhizobacteria of oil palm roots. **Malay. J. Microbiol.** 1: 31-35.
- Banchio, E., P.C. Bogino, J. Zygodlo and W. Giordano. 2008. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origamun majorana* L. **Biochem. System. Ecol.** 36: 766-771.
- Baset-Mia, M.A., Z.H. Shamsuddin, Z. Wahab and M.Marziah. 2010. Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured musa plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. **Aust. J. Crop Sci.** 4: 85-90.
- Baudoin, E., A. Lerner, M.S. Mirza, H. E. Zemrany, P.C. Claire, E. Jurkevich, S. Spaepen, J. Vanderleyden, S. Nazaret, Y.N. Okon and M.L. Yvan. 2010. Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin osynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. **Res. Microbiol.** 161: 219-226.
- Beneduzi, A., D. Peres, L.K.Vargas, M.H. Bodanese-Zanettini and L.M.P. Passaglia. 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Appl. Soil Ecol.** 39: 311-320.

- Bensen, H.J. 2005. **Microbiological Applications**. 9th ed. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Belimov, A.A., P.A. Kojemiakov and C.V. Chuvarliyeva. 1995. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. **Plant Soil** 17: 29-37.
- Bhaskara, K.V. and P.B. Charyulu. 2005. Evaluation of effect of inoculation of *Azospirillum* on *Setaria italica* (L.). **Afr. J. Biotechnol.** 4: 989-995.
- Bhavdish, N., A. Johri, J. Sharma and S. Viridi. 2003. Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health. **Adv. Biol. Eng. Biol.** 84: 49-89.
- Biari, A., A. Gholami and H.A. Rahmani. 2008. Growth promotion and enhanced nutrient uptake of Maize (*Zea mays* L.) by application of plant growth promoting rhizopheria in arid region of Iran. **J. Biol. Sci.** 8: 1015-1020.
- Bommegowda, A., M.R. Narayana and K.K. Krishnamoorthy. 1981. Nitrogen fertilizer use in Java citronella. **Mysore. J. Agric. Sci.** 15: 60-62.
- Bowen, G.D. and A.D. Rovira. 1991. The rhizosphere the hidden half of the hide Half, pp. 641-642. In Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi, eds. **Plant Roots: The Hidden Half**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Bray, R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soil. **Soil Sci.** 59: 37-59.
- Burd, G.I., D.G. Dixon and B.R. Glick. 2000. Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Can. J. Microbiol.** 46: 237-245.

- Cakmakci, R., F. Donmez, A. Aydin and F. Sahin. 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. **Soil Biol. Biochem.** 38: 1482-1487.
- Cassel, E. and R.M.F. Vargas. 2006. Experiments and modeling of the *Cymbopogon winterianus* essential oil extraction by stream distillation. **J. Mex. Chem. Soc.** 50: 126-129.
- Claton, W.D. and S.A. Renvoize. 1986. **Genera Graminum: Grasses of the World.** Her Majesty's Stationery office, London.
- Cobley, L.S. and W.M. Steek. 1976. **An Introduction to the Botany of Tropical Crops.** Longman Group, Ltd., London.
- Dobereiner, J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biol. Biochem.** 29: 771-774.
- Dutta, L. and N. Dutta. 1976. Effect of nitrogen fertilizers on yield and quality of citronella oil. **Ind. J. Agric. Chem.** 9: 67-72.
- El-Ghandour, I.A., E.M. Desouky, Y.G.M. Galal, R.A. Arafa and A.M.M. Abou-Seer. 2009. Effect of biofertilizers and organic phosphorus amendments on growth and essential oil yield of marjoram (*Majorana hortensis* L.). **Egypt. Acad. J. Biol. Sci.** 1: 29-36.
- El-Komy, H.M.A. 2005. Co immobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for plant nutrition. **Food Tech. Biotechnol.** 43: 19-27.
- El-Tarabiliya, K.A. and K. Sivasithamparamb. 2008. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Soil Biol. Biochem.** 38: 1505-1520.

Freitas, JR, M.R. Banerjee and J.J. Germida. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L).

Biol. Fertil. Soils 24: 358-364.

Glass, A.D.M. 1986. **Plant Nutrition: An Introduction to Current Concepts.**

Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts.

Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria.

Can. J. Microbiol. 41: 109-117.

Gordon, A.S. and R.P. Weber. 1950. Colorimetric estimation of indole acetic acid.

Plant Physiol. 26: 192-195.

Gray, E.J. and D.L. Smith. 2005. Intercellular and extracellular PGPR: commonalities and

distinctions in the plant-bactrium signaling processes. **Soil Biol. Biochem.** 37: 395-412.

Grayston, S.J., G.S. Griffith, J.L. Mawdsley, C.D. Campbell and R.D. Bardgett. 2001.

Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. **Soil Biol. Biochem.** 33: 533-551.

Griffiths, B. S., K. Ritz, N. Ebbelwhite and G. Dobson. 1999. Soil microbial community

structure: effect of substrate loading rate. **Soil Biol. Biochem.** 1: 145-153.

Hardy, R.W.F., R.C. Burns and R.S. Holsten. 1973. Application of acetylene-ethylene assay for

measurement of nitrogen fixation. **Soil Biol. Biochem.** 5:47-48.

Hecht-Buchholz, C. 1998. The apoplast-habitat of endophytic dinitrogen-fixing bacteria and

their significance for the nitrogen nutrition of non-legumious plants.

J. Plant Nutr. 161: 509-520.

- Hoberg, E., P. Marschner and R. Lieberei. 2005. Organic acid exudation and pH changes by *Gordonia* sp. and *Pseudomonas fluorescens* grown with padsorbed to goethite. **Microbiol. Res.** 160: 177-187.
- Humphris, S.N., A.G. Bengough, B.S. Griffiths, K. Kilham, S. Rodger, V. Stubbs, T.A. Valentine and I.M. Young. 2005. Root cap influences root colonization by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on maize. **FEMS. Microbiol. Ecol.** 54: 123-130.
- Ichiwaki, R., N. Carlin and E.M Szanto. 2010. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from sugarcane in Brazil. **Rev. Bras. Ensino. Fis.** 32: 1307-1309.
- Iruthayathas, E.E. and H.M.W. Herath. 1982. Microhairs of citronella leaves and their relationship to components of citronella oil. **Trop. Agric.** 59: 227-233.
- Kang, S.H., H.S. Cho, H. Cheong, C.M. Ryu, J.F Kim and S.H. Park. 2007. Two bacterial endophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). **J. Microbiol. Biotechnol.** 17: 96-103.
- Kaymak, H.C., F. Yarali, I. Guvenc and M.F. Donmez. 2008. The effect of inoculation with plant growth rhizobacteria (PGPR) on root formation of mint (*Mentha piperita* L.) cuttings. **Afr. J. Biol.** 7: 4479-4483.
- Khamna, S., A Yokota, F. John and S. Lumyong. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere. **Soils Eur. Asia. J. Biol. Sci.** 4: 23-32.
- Kilmer, V.J. and L.T. Alexander. 1949. Method of making mechanical analysis of soils. **Soil Sci.** 68: 15-24.

- Kloepper, J.W., R. Lifshitz and R.M. Zablotowitz. 1989. Free living bacteria inocula for enhancing crop productivity. **Trends Biol.** 7: 39-43.
- Kloepper, J.W. 1992. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agent. pp. 255-265. In F.B. Metting Jr., ed. **Soil Microbiol. Ecol.** Marcel Dekker, Inc., Washington, D.C.
- Lynch, J.M. and J.M. Whipps. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant Soil** 129: 1-10.
- Mahfouz, S.A. and M.A. Sharaf-Eldin. 2007. Effect of mineral vs. biofertilizer on growth yield and essential oil content of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Int. Agr.** 21: 361-366.
- Maier, R.M., I.L. Pepper and C.P. Gerba. 2000. **Environmental Microbiology.** Academic Press, New York.
- Medlin, L., H.J. Elwood, S. Stickel and M.L. Sogin. 1998. The characterization of enzymatically amplified eukaryote 16S like rRNA coding regions. **Gen.** 71: 491-499.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Pt.** 15: 473-497.
- Muyzer, G., E.C. De Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reactions-amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 695-700.
- Ozturk, A., O. Caglar and F. Sahin. 2003. Yield responses of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization. **J. Plant Nutr. Soil** 166: 262-266.

Peech, M. 1965. Soil pH by glass electrode pH meter. pp. 914-926.

In C.A. Black, ed. **Method of Soil Analysis Part II: Chemical and Microbiology Properties**. Amer. Soc. Agron., Inc., Wisconsin.

Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. **Microbiologiya**. 7: 62-370.

Pratt, P.E. 1965. Potassium, pp 1022-1030. In C.A. Black, ed. **Methods of Soil Analysis: Part II. Chemical and Microbiological Properties**. Amer. Soc. Agron., Inc., Madison, Wisconsin, USA.

Quintans-Junior, L.J., T.T. Souza, B.S. Leite, N.M.N. Lessa, L.R. Bonjardim, M.R.V. Santos, P.B. Alves, A.F. Blank and A.R. Antonioli. 2008. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt. (Gramineae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine**. 5: 619-624.

Raja, M. and S.J. William. 2008. Impact of volatile oils of plants against the Cowpea Beetle (FAB.) (*Coleoptera*: Bruchidae). **Int. J. Integrat. Biol.** 2: 61-64.

Ramanchandra, R.S. and G.A. Ravishankar. 2002. Plant cell cultures: chemical factories for secondary metabolites. **Biotechnol. Adv.** 20: 101-153.

Rao, E.V.S.P., M.R. Narayana, M. Singh and K. Puttanna. 1983. Effect of N, P and K fertilizers on growth yield and nutrient uptake in Java citronella (*C. winterianus* Jowitt). **Z. Acker Pflanzenbau**. 152: 279-283.

Richard, L.A. 1954. **Dianogsis and improvement of saline and akali soils**. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.

- Rouatt, J., W.H. Katznelson and T. M. B. Payne. 1960. Statistical evaluation of the rhizosphere effect. **Soil Sci. Soc. Amer. Proc.** 24: 271-271.
- Rudresh, D.L., M.K.Shivaprakash and R.D. Prasad. 2005. Effect of combined application of rhizobium phosphate solubilizing bacterium and *Tricoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chick pea (*Cicer aritenium* L.). **Appl. Soil Ecol.** 28: 139-146.
- Saad, A., S. Alamri and S. Yasser. 2009. Effect of nitrogen supply and *Azospirillum brasilense* Sp-248 on the response of wheat to seawater irrigation. **Saudi. J. Biol. Sci.** 16: 101-107.
- Sahin, F., R. Cakmakci and F. Kantar. 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate-solubilizing bacteria. **Plant Soil** 265: 123-129.
- Salantur, A., A. Ozturk and S. Akten. 2006. Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. **Plant Soil Environ.** 52: 111-118.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 2nded. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sangwan, N.S., A.H.A. Farooqi, F. Shabih and R.S. Sangwan. 2001. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation** 34: 3-21.
- Sarma, T.C. 2002. Variation in oil and its major constituents due to season and stage of the crop in Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **J. Spices Aromatic Crops** 11: 97-100.
- Singh, R.S., M.G. Pathak and D.W. Bodoli. 1980. Response of Java citronella cultivars to nitrogen under Jorhat conditions. **Indian Perfum.** 24: 192-198.

- Soil Survey Division Staff. 1993. **Soil Survey Manual**. United States Department of Agriculture, Washington, D.C.
- Sperberg, J.I. 1958. The incidence of apatite solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. **Aust. J. Agric. Res.** 9: 778-781.
- Supaphol, S. 2005. **Intrinsic Bioremediation and The Molecular Analysis of Microorganisms in Hydrocarbon Contaminated Thai Soil**. Ph.D. thesis, Kasetsart University.
- Tokala, R.K., J.L. Strap, C.M. Jung, D.L. Crawford, M.H. Salove, L.A. Deobald, J.F. Bailey and M.J. Morra. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 2161-2171.
- Vessey, K.J. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil** 255: 571-586.
- Walkley, A. and I.A. Black. 1934. An examination of the degtyarcff method of determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Sci.** 37: 29-38.
- Weiss, E.A. 1997. **Gramineae In Essential Oil Crops**. CAB International, Wallingford.
- Xie, G.H., M.Y. Cai, G.C. Tao and Y. Steinberger. 2003. Cultivable heterotrophic N₂-fixing bacterial diversity in rice fields in the Yangtze river plain. **Biol. Fertil. Soils** 23: 29-38.
- Yamin, F., R. Othman, K. Sijam and M.S. Saad. 2009. Characterization of beneficial properties of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. **Afr. J. Microbiol. Res.** 3: 815-821.

Zhou, J., M.A. Bruns and M.T. James. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition.
Am. Soc. Microbiol. 62: 316-322.







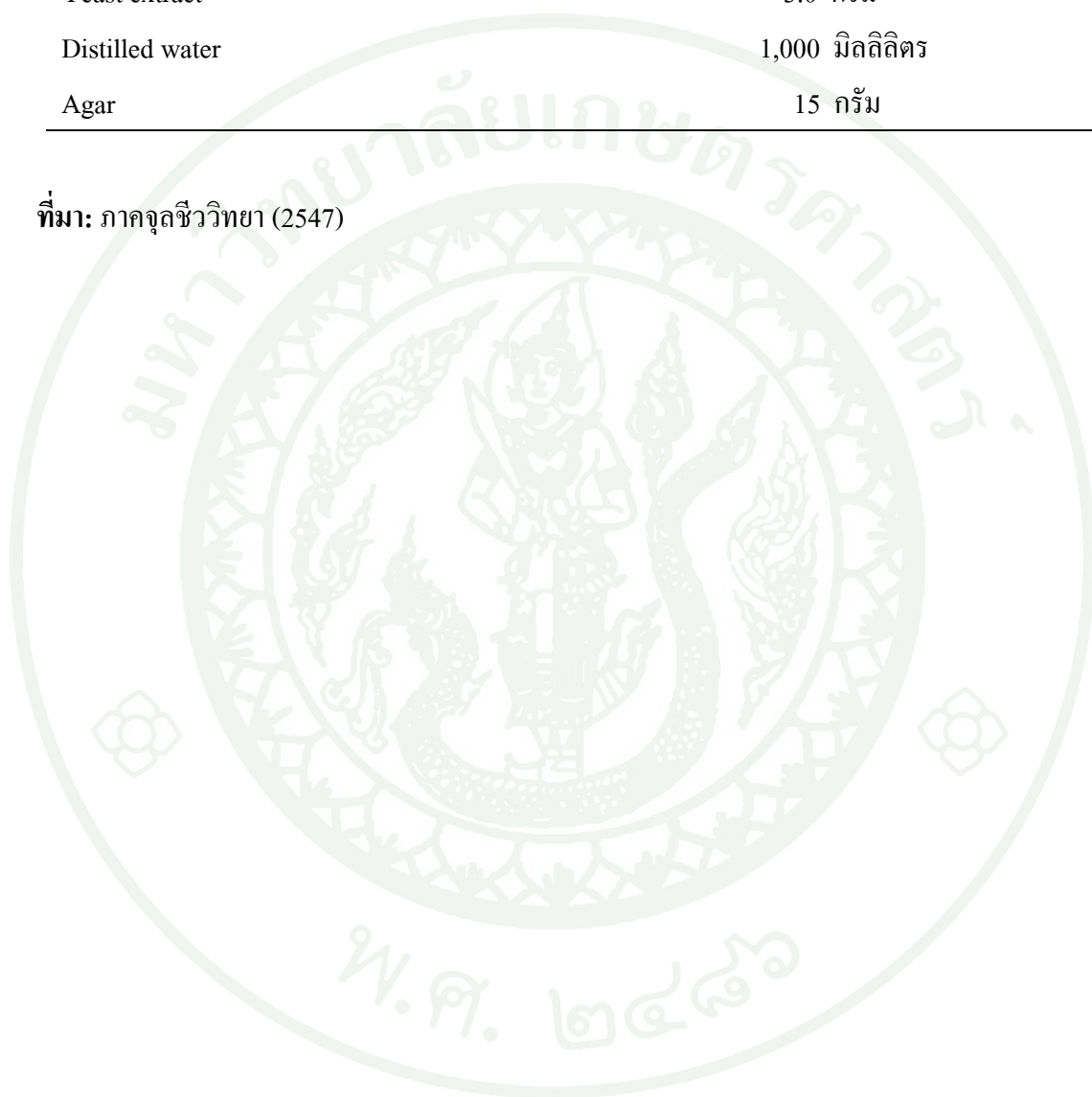
ภาคผนวก ก

สูตรอาหารคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ และสูตรอาหารมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ตารางผนวกที่ ก1 ส่วนประกอบของอาหาร nutrient agar (NA)

สารเคมี	ปริมาณ
Peptone	5.0 กรัม
Yeast extract	3.0 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร
Agar	15 กรัม

ที่มา: ภาควิชาชีววิทยา (2547)



ตารางผนวกที่ ก2 ส่วนประกอบของอาหาร N-free medium

สารเคมี	ปริมาณ
Malic acid	5.00 กรัม
KOH	4.00 กรัม
K ₂ HPO ₄	0.50 กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 กรัม
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.10 กรัม
NaCl	0.02 กรัม
CaCl ₂	0.01 กรัม
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.002 กรัม
Bromthymol blue	2.00 มิลลิลิตร
Agar	15.00 กรัม
Distilled water	1,000.00 มิลลิลิตร
pH	6.6-7.0

ที่มา: Hardy *et al.* (1968)

ตารางผนวกที่ ก3 ส่วนประกอบของอาหาร Pikovskaya's medium

สารเคมี	ปริมาณ
Glucose	10.00 กรัม
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5.00 กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.50 กรัม
KCl	0.20 กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10 กรัม
FeSO_4	0.001 กรัม
Yeast extract	0.50 กรัม
Agar	15.00 กรัม
Distilled water	1,000.00 มิลลิลิตร

ที่มา: Pikovskaya (1948)

ตารางผนวกที่ 4 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS)

สารเคมี	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macroelements	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00
KH_2PO_4	170.00
Microelements	
Na_2EDTA	37.25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
H_3BO_3	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.60
KI	0.85
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Organic compounds	
Inositol	100.00
Glycine	2.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50
Thiamine-HCl	0.10
Plant hormone	
IAA	30.00
Sucrose	30,000.00
Agar	5,500.00

ที่มา: Murashige and Skoog (1962)

ตารางผนวกที่ ก5 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog ดัดแปลงไม่เติมไนโตรเจน

สารเคมี	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macroelements	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00
KH_2PO_4	170.00
Microelements	
Na_2EDTA	37.25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
H_3BO_3	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.60
KI	0.85
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Organic compounds	
Inositol	100.00
Glycine	2.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50
Thiamine-HCl	0.10
Plant hormone	
IAA	30.00
Sucrose	30,000.00
Agar	5,500.00

ที่มา: ดัดแปลงจาก Murashige and Skoog (1962)

ตารางผนวกที่ ก6 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog คัดแปลงเติมฟอสเฟตในรูป
ละลายยาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

สารเคมี	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macroelements	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	170.00
Microelements	
Na_2EDTA	37.25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
H_3BO_3	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.60
KI	0.85
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Organic compounds	
Inositol	100.00
Glycine	2.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50
Thiamine-HCl	0.10
Plant hormone	
IAA	30.00
Sucrose	30,000.00
Agar	5,500.00

ที่มา: คัดแปลงจาก Murashige and Skoog (1962)

ตารางผนวกที่ ก7 องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog ดัดแปลงไม่เติมฮอร์โมน
ออกซิน

สารเคมี	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macroelements	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00
KH_2PO_4	170.00
Microelements	
Na_2EDTA	37.25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
H_3BO_3	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.60
KI	0.85
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Organic compounds	
Inositol	100.00
Glycine	2.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50
Thiamine-HCl	0.10
Sucrose	30,000.00
Agar	5,500.00

ที่มา: ดัดแปลงจาก Murashige and Skoog (1962)

ตารางผนวกที่ ๘ องค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog ดัดแปลงไม่เติมไนโตรเจน
เติมฟอสเฟตในรูปละลายยาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ไม่เติมฮอร์โมนออกซิน

สารเคมี	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macroelements	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	170.00
Microelements	
Na_2EDTA	37.25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
H_3BO_3	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.60
KI	0.85
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Organic compounds	
Inositol	100.00
Glycine	2.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50
Thiamine-HCl	0.10
Sucrose	30,000.00
Agar	5,500.00

ที่มา: ดัดแปลงจาก Murashige and Skoog (1962)



ภาคผนวก ข

ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอม
และร้อยละของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้หอม

ตารางผนวกที่ ข1 น้ำหนักสดในส่วนใบของตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน

อายุตะไคร้หอม (เดือน)	น้ำหนักใบเฉลี่ยต่อต้น (กรัม)
2	108±2.73 d
4	1,159±1.41 c
6	2,900±3.53 a
8	2,880±5.98 b
F-test	*
CV (%)	10.9

หมายเหตุ อักษร a, b, c และ d ที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างตามวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ ข2 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน
ด้วยวิธี microwave extraction (ME)

อายุตะไคร้หอม (เดือน)	ปริมาณน้ำมันหอมระเหย	
	น้ำหนัก (กรัม)	% w/w
2	0.04±0.01 d	0.08±0.01 d
4	0.85±0.03 c	0.29±0.02 c
6	1.66±0.40 a	0.55±0.01 a
8	1.40±0.20 b	0.46±0.06 b
F-test	*	
CV(%)	15.8	

หมายเหตุ ตัวเลขอักษร a, b, c และ d ที่ต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างตามวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ ข3 ปริมาณ citronellal, geraniol และ citronellol ในตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน

อายุ (เดือน)	ปริมาณ (ร้อยละ)					
	citronellal		geraniol		citronellol	
2	7.91±0.35	c	25.57±3.81	b	17.91±1.02	b
4	34.38±6.99	a	22.69±4.48	bc	32.08±6.01	a
6	39.60±3.95	a	36.62±1.70	a	19.21±1.59	b
8	16.14±2.35	b	20.54±2.16	c	31.09±7.50	a
F-test	*		*		*	
CV (%)	48.7		24.1		22.8	

หมายเหตุ อักษร a, b และ c ที่ต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างตามวิธี DMRT



ภาคผนวก ค

ความสามารถของแบคทีเรีย

ที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6 และ 8 เดือน

ตารางผนวกที่ ๑1 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต และการผลิตฮอร์โมน
ออกซิน จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ 2, 4, 6
และ 8 เดือน

อายุพืช (เดือน)	รหัสเชื้อ	ความสามารถของแบคทีเรีย			
		ตรึงไนโตรเจน	ขนาดของวงใส		ผลิตฮอร์โมน ออกซิน
			(clear zone)	ละลาย ฟอสเฟต	
		($\mu\text{mol hr}^{-1}$)	(cm)	($\mu\text{g ml}^{-1}$)	($\mu\text{g ml}^{-1}$)
2	Rh10	0.02±0.00	1	-	-
	Rh12	0.04±0.00	1	-	-
	Rh21	0.64±0.09	ij	-	-
	Rh22	2.37±1.00	c	-	-
	Rh23	0.30±0.05	kl	-	1.93±0.09 j
	Rh26	0.18±0.01	kl	-	-
	Rh27	0.13±0.04	kl	-	-
	Rh28	0.68±0.06	hij	-	2.28±0.1 fgh
	Rh29	0.02±0.09	l	-	-
	Rh31	1.35±0.07	e	-	-
	Rh33	0.17±0.008	kl	-	-
	Rh36	0.01±0.01	l	-	-
	Rh37	0.05±0.00	l	-	2.49±0.1 ef
	Rh40	0.20±0.06	kl	-	2.93±0.01 cd
	Rh42	1.21±1.09	efg	-	-
	Rh43	0.09±0.07	l	-	-
	Rh45	1.50±0.01	e	-	-
	Rh49	0.53±0.06	j	-	1.88±0.08 ij
	Rh50	0.08±0.00	l	-	-
	Rh53	0.05±0.06	l	-	-
	Rh57	-	0.13±0.02 cde	0.03±0.05 c	-

ตารางผนวกที่ ๑ (ต่อ)

อายุพืช (เดือน)	รหัสเชื้อ	ความสามารถของแบคทีเรีย					
		ตรึงไนโตรเจน		ขนาดของวงใส (clear zone)		ละลายฟอสเฟต	
		($\mu\text{mol hr}^{-1}$)		(cm)		($\mu\text{g ml}^{-1}$)	ผลิตภัณฑ์ออกซิน ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
2	Rh 58	-		0.12±0.02	cde	0.15±0.01	bc
	Rh 59	0.65±0.03	ij	0.05±0.0	e	0.01±0.01	c
	Rh 61	-		0.12±0.02	cde	0.03±0.06	c
	Rh 63	0.01±0.05	l	0.13±0.05	cde	0.22±0.03	b
	Rh 62	0.12±0.07	l	0.10±0.02	de	0.05±0.01	c
4	Rh2	1.89±1.02	d	-		-	-
	Rh7	0.07±0.04	l	-		-	-
	Rh8	0.12±0.06	l	-		-	-
	Rh9	5.30±1.00	a	-		-	-
	Rh16	0.12±0.00	l	-		-	-
	Rh38	0.65±0.07	ij	-		-	-
	Rh47	0.98±0.02	fgh	-		-	-
	Rh60	-		0.17±0.05	cde	0.05±0.01	c
	Rh73	-		0.08±0.07	e	0.08±0.01	bc
6	Rh1	0.01±0.08	l	-		-	-
	Rh4	0.02±0.03	l	-		-	-
	Rh5	0.03±0.03	l	-		-	2.71±0.11
	Rh11	0.01±0.00	l	-		-	2.34±0.07
	Rh13	0.05±0.06	l	-		-	2.76±0.15
	Rh14	0.08±0.05	l	-		-	3.41±0.11
	Rh15	0.01±0.03	l	-		-	-
	Rh17	0.11±0.04	l	-		-	-
	Rh18	0.94±0.04	ghi	-		-	2.10±0.09

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

อายุพืช (เดือน)	รหัสเชื้อ	ความสามารถของแบคทีเรีย			
		ตรึงไนโตรเจน		ละลาย	ผลิตฮอร์โมน
		($\mu\text{mol hr}^{-1}$)	(cm)	ฟอสเฟต ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	ออกซิน ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
6	Rh19	0.11±0.00	l	-	-
	Rh20	0.15±0.08	kl	-	-
	Rh24	2.91±0.07	b	-	2.88±0.07 cd
	Rh32	1.30±0.04	ef	-	-
	Rh39	0.03±0.00	l	-	-
	Rh41	0.06±0.07	l	-	-
	Rh44	0.02±0.04	l	-	-
	Rh46	0.62±0.04	ij	-	-
	Rh48	1.37±0.02	e	-	-
	Rh51	0.79±0.06	de	-	-
	Rh54	-	0.15±0.05 cde	0.03±0.07 c	5.20±0.04 a
	Rh55	-	0.70±0.21 a	0.56±0.02 a	2.98±0.09 c
	Rh56	-	0.25±0.1 bcd	0.03±0.01 c	-
	Rh64	0.06±0.04	l	-	2.33±0.08 fg
	Rh65	2.73±0.09	b	-	-
	Rh66	0.04±0.00	l	-	2.26±0.04 fgh
	Rh67	0.02±0.04	l	-	2.11±0.07 ghi
	Rh68	-	0.07±0.02 e	0.04±0.03 c	-
	Rh69	-	0.08±0.01 e	0.05±0.07 c	-
	Rh70	-	0.10±0.05 de	0.07±0.06 c	-
	Rh71	-	0.10±0.05 de	0.02±0.01 c	-
	Rh72	-	0.10±0.05 de	0.05±0.02 c	-
	Rh76	0.77±0.07	hi	-	2.51±0.46 ef
	Rh3	2.34±0.03	c	-	-

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

อายุพืช (เดือน)	รหัสเชื้อ	ความสามารถของแบคทีเรีย				
		การตรึงไนโตรเจน		ขนาดของวงใส	ละลาย	ผลิตฮอร์โมน
		($\mu\text{mol hr}^{-1}$)		(clear zone) (cm)	ฟอสเฟต ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	ออกซิน ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
8	Rh6	0.01±0.00	l	-	-	-
	Rh25	0.02±0.005	l	-	-	-
	Rh30	0.45±0.06	k	-	-	-
	Rh34	1.37±0.03	e	-	-	-
	Rh35	1.38±0.08	e	-	-	-
	Rh52	1.23±0.08	efg	-	-	-
	Rh74	-		0.35±0.15 b	0.08±0.03 bc	-
	Rh75	-		0.27±0.07 bc	0.12±0.02 bc	-
F-test		*		*	*	*
CV (%)		8.6		3.2	7.8	3.8

หมายเหตุ อักษร a-l ที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างตามวิธี DMRT



ภาคผนวก ง

การใช้แบบที่เรียนที่คัดแยกได้จากบริเวณรากตะไคร้หอมอายุ
2, 4, 6 และ 8 เดือน ต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหุ้มราก

ตารางผนวกที่ 1 ความยาวส่วนยอดและส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มรากกลุ่ม จากการเติมแบคทีเรีย ที่มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืช

คำรับการทดลอง	ความยาว (เซนติเมตร)	
	ยอด	ราก
T1 ใส่ น้ำฆ่าเชื้อ	0.64±0.1 b	0.11±0.01 b
T2 ใส่ แบคทีเรีย <i>E. coli</i> DH5α	0.08±0.4 b	0.07±0.01 b
T3 <i>Bacillus</i> sp. PS2 (ตรึงไนโตรเจน)	4.43±0.8 a	0.48±0.10 a
T4 <i>Curtobacterium citreum</i> strain LCR23 (ละลายฟอสเฟต)	5.50±1.6 a	0.53±0.15 a
T5 <i>Klebsiella</i> sp. ICB572 (ผลิตฮอร์โมนออกซิน)	5.78±1.9 a	1.28±0.15 a
T6 ใส่ แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด	3.93±0.7 a	0.65±0.13 a
F-test	*	*
CV (%)	19.8	12.7

หมายเหตุ อักษร a และ b ที่ต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างตามวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ 2 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งส่วนยอดและส่วนรากของเนื้อเยื่อหุ้มแผลกลุ่ม จากการ
เติมแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืช

ดำรับการทดลอง	น้ำหนักสด (กรัม)		น้ำหนักแห้ง (กรัม)	
	ยอด	ราก	ยอด	ราก
T1 ใส่ น้ำมาเชื้อ	0.0251±0.003b	0.0038±0.001b	0.0028±0.000b	0.0004±0.0002b
T2 ใส่แบคทีเรีย <i>E. coli</i> . DH5α	0.0270±0.003b	0.0037±0.002b	0.0029±0.000b	0.0005±0.0002b
T3 <i>Bacillus</i> sp. PS2 (ตรึงไนโตรเจน)	0.0593±0.005a	0.0067±0.001a	0.0074±0.0000a	0.0017±0.0002a
T4 <i>Curtobacterium citreum</i> strain LCR23 (ละลายฟอสเฟต)	0.0663±0.003a	0.0064±0.002a	0.0094±0.0001a	0.0018±0.0008a
T5 <i>Klebsiella</i> sp. ICB572 (ผลิตฮอร์โมนออกซิน)	0.0843±0.014a	0.0085±0.001a	0.0116±0.0004a	0.0018±0.0002a
T6 ใส่แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด	0.0761±0.014a	0.0071±0.001a	0.009±0.0005a	0.0016±0.0002a
F-test	*	*	*	*
CV (%)	9.7	12.4	2.9	20.3

หมายเหตุ อักษร a, b และ c ที่ต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างตามวิธี DMRT



ภาคผนวก จ
คำพิสัยการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของดิน

ตารางผนวกที่ จ1 ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยา

ระดับ (rating)	พิสัย (range)
เป็นกรดรุนแรงมากที่สุด (ultra acid)	<3.5
เป็นกรดรุนแรงมาก (extremely acid)	3.5-4.5
เป็นกรดจัดมาก (strongly acid)	4.5-5.0
เป็นกรดจัด (strongly acid)	5.1-5.5
เป็นกรดปานกลาง (moderately acid)	5.6-6.0
เป็นกรดเล็กน้อย (slightly alkaline)	6.1-6.5
เป็นกลาง (neutral)	6.6-7.3
เป็นด่างเล็กน้อย (slightly alkaline)	7.4-7.8
เป็นด่างปานกลาง (moderately alkaline)	7.9-8.4
เป็นด่างจัด (strongly alkaline)	8.5-9.0
เป็นด่างจัดมาก (very strongly alkaline)	>9.0

ที่มา: คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา (2548)

ตารางผนวกที่ จ2 ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (ร้อยละ)

ระดับ (rating)	พิสัย (ร้อยละ)
ต่ำมาก (VL)	<0.5
ต่ำ (L)	0.5-1.0
ค่อนข้างต่ำ (ML)	1.0-1.5
ปานกลาง (M)	1.5-2.5
ค่อนข้างสูง (MH)	2.5-3.5
สูง (H)	3.5-4.5
สูงมาก (VH)	>4.5

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ ๓ ค่าการนำไฟฟ้าของดิน electric conductivity (EC)

ระดับ (rating)	พิสัย (dS m ⁻¹)	
ต่ำมาก (VL)	0-0.2	ดินไม่เค็ม
ต่ำ (L)	2.0-4.0	ดินเค็มเล็กน้อย
ปานกลาง (M)	4.0-8.0	ดินเค็มปานกลาง
สูง (H)	8.0-12.0	ดินเค็มสูง
สูงมาก (VH)	12.0-16.0	ดินเค็มสูงมาก

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ ๔ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ)

ระดับ (rating)	พิสัย (ร้อยละ)
ต่ำมาก (VL)	<0.1
ต่ำ (L)	0.1-0.2
ปานกลาง (M)	0.2-0.5
สูง (H)	0.5-0.75
สูงมาก (VH)	>0.75

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ ๖5 ปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ (extracable K) (NH_4OAc)

ระดับ (rating)	พิสัย (ร้อยละ)
ต่ำมาก (VL)	<30
ต่ำ (L)	30-60
ปานกลาง (M)	60-90
สูง (H)	91-120
สูงมาก (VH)	>120

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ ๖6 ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) (Bray II)

ระดับ (rating)	พิสัย (ร้อยละ)
ต่ำมาก (VL)	<3
ต่ำ (L)	3–5
ค่อนข้างต่ำ (ML)	6–10
ปานกลาง (M)	11–15
ค่อนข้างสูง (MH)	16–25
สูง (H)	26–45
สูงมาก (VH)	>45

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวพิชามณัฐ อินตะโม
เกิดวันที่ 1 พฤศจิกายน 2528
สถานที่เกิด อำเภอแม่เมาะ จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการศึกษา วท.บ. (เคมีการเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน -
สถานที่ทำงานปัจจุบัน -
ทุนการศึกษาที่ได้รับ -

