บทสรุปสำหรับผู้บริหาร
ชุดโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี พ.ศ. 2554

การศึกษาสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชและคุณลักษณะของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่ได้จากเขตพื้นที่เขื่อนอุบลรัตน์

Determination of plant growth promoting compounds and characterization of endophytic bacteria isolated from Ubolratana Dam

บทคัดย่อ สารเร่งการเจริญเติบโตของพืช เป็นสารที่พืชผลิตขึ้นเพื่อกระตุ้นกระบวนการงอกของเมล็ด การเจริญของลำต้น มีทั้งเป็นฮอร์โมน สารระเหยต่างๆ โดยสารเหล่านี้สามารถพบได้ในกิจกรรมของจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน จึงเรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting microorganisms) แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มนี้มีอยู่หลายพันธุ์ ทั้งที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับพืช (Endophytic bacteria) หรืออาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบๆ รากพืช (rhizobacteria) เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่คัดแยกมาและมีประสิทธิภาพในการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโต แบ่งออกเป็นกลุ่ม คือ กลุ่มที่ผลิตสารอินโดลอะซิติกแอซิด ซึ่งเป็นสารฮอร์โมนพืชช่วยกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ และการแบ่งเซลล์ ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพ คือ UD270 เป็นไอโซเลตที่เจริญได้ดี ผลิตสารอินโดลอะซิติกแอซิดได้ดีที่อุณหภูมิ 35°C ที่เวลา 48-60 ชั่วโมง และต้องอาศัยทริปโตแฟนในการกระตุ้นการผลิตสาร ปริมาณที่เหมาะสมคือ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อีกหนึ่งกลุ่ม คือ กลุ่มผลิตสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคพืช ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพ คือ UD288 แต่กลับพบแบคทีเรียนี้ สามารถผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตอื่นๆ ได้ดีกว่าไอโซเลต UD270 สารเหล่านั้น ได้แก่ สารอะซีโทอิน ซึ่งเป็นสารระเหย ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการเจริญของพืช (plant growth promoter) ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ด โดยจะย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ใช้เป็นพลังงานสำหรับการเจริญของต้นอ่อน สามารถละลายฟอสเฟตได้ ซึ่งพืชใช้เป็นแหล่งอาหาร จึงเป็นการช่วยหาอาหารให้แก่พืช และสามารถผลิตแอมโมเนียได้ ซึ่งใช้เป็นแหล่งอาหารให้กับพืชเช่นกัน และเป็นส่วนสำคัญในวัฏจักรไนโตรเจนอีกด้วย ดังนั้นเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต น่าจะสามารถนำมาใช้ร่วมกัน เพื่อช่วยในการส่งเสริมการเจริญของพืชทั้งในด้านการเจริญเติบโต และการป้องกันโรคได้เป็นอย่างดี

บทนำ เชื้อเอ็นโดไฟต์ เป็นจุลินทรีย์ที่เข้าไปอาศัย และเพิ่มจำนวนเป็นโคโลนี หรือเป็นกลุ่มไบโอฟิล์มอยู่ภายในเซลล์พืช โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อพืช โดยพบว่าพืช 300,000 ชนิด จะมีเชื้อเอ็นโดไฟต์อยู่อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ซึ่งความสัมพันธ์หรือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเอ็นโดไฟต์กับพืช ยังคงไม่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานว่าเชื้อเอ็นโดไฟต์หลายชนิดผลิตสารเมแทบอไลต์ที่ป้องกันเชื้อก่อโรคให้กับพืช และสารเมแทบอไลต์ที่พบยังสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในคน และสัตว์ได้อีกด้วย นอกจากนี้เชื้อเอ็นโดไฟต์ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่พืช โดยมีกิจกรรมทั้งทางตรง และทางอ้อม วิธีทางตรง คือ เชื้อจะผลิตฮอร์โมน (phytohormones) เช่น auxin, cytokinin หรือ ผลิตเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ซึ่งจะลดปริมาณเอทิลลีนในพืช ส่วนวิธีทางอ้อม คือ ช่วยเพิ่มการนำเข้าของสารอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสเฟต หรือเหล็ก และช่วยป้องการติดเชื้อก่อโรค โดยการผลิตสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อปฏิปักษ์ ผลิตไซเดอร์โรฟอร์ และสารประกอบอื่นๆ เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช เอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย มีหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Enterobacter*, *Rahnella*, *Rhodanobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Phyllobacterium* พบว่ามีการผลิตสาร indole acetic acid

(IAA) ในบางสายพันธุ์ และบางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนมาใช้ได้ สาร IAA มีบทบาทในการป้องกันพืชจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น มีความเป็นกรด อุณหภูมิสูง แรงดันออสโมซิส รังสีต่างๆ และช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ด้วย สาร ACC เป็นสารที่พบได้จากเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย ซึ่งมีหน้าที่ส่งเสริมการเจริญของรากพืชให้ยาวมากขึ้น โดยควบคุมปริมาณเอทิลลีน ของพืช ดังนั้นบทบาทของเชื้อเอ็นโดไฟต์จึงเป็น plant growth promoting bacteria (PGPB) ได้เป็นอย่างดี แต่อย่างไรก็ตามกลไกการตอบสนอง และการแสดงออกของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียจะแตกต่างกัน ตามความจำเพาะของพืชที่อาศัย โดยบางสายพันธุ์จะมีความจำเพาะต่อเจ้าบ้าน บางสายพันธุ์สามารถเข้าอยู่อาศัยในพืชได้หลายชนิด

จากความสำคัญและความสามารถของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย จึงนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืชในเขตพื้นที่อนุรักษ์พันธุกรรมพืช เขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น (จากงานวิจัยปีที่แล้ว) มาทดสอบความสามารถในการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อปฏิปักษ์ได้ดี จากข้อมูลการศึกษาทำให้ทราบถึงคุณลักษณะเด่นของเชื้อในกลุ่มนี้ และเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์กับพืชในระดับกระถาง เรือนทดลอง หรือแปลงทดลองต่อไป จะเห็นได้ว่าจากความหลากหลายทางชีวภาพของป่า พืช และจุลินทรีย์ เป็นแหล่งทรัพยากรที่มีคุณค่า ควรนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งต่อชุมชนที่อาศัยในพื้นที่นั้นๆ และต่อสังคม เศรษฐกิจในด้านต่างๆ ดังนั้นในโครงการนี้มุ่งเน้นศึกษาประโยชน์ของเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียในด้านคุณลักษณะของเชื้อที่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืช

วัตถุประสงค์ของการวิจัย เพื่อศึกษาการผลิตสารชีวภาพที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต การผลิตแอมโมเนีย และอื่นๆ นอกจากนี้ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารชีวภาพ ในการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ทนต่อความเป็นเกลือสูง ทนต่อโลหะ หรือสารพิษ เป็นต้น

วิธีการดำเนินงาน เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลต ได้แก่ UD15, 25, 41, 44, 50, 57, 66, 136, 169, 205, 247, 270, 288, 292, 306, 317, 343, 392, 405 และ 412 นำมาทดสอบคุณสมบัติด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ดังนี้ 1) ทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส บนอาหาร starch agar 2) ทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต บนอาหาร Pikovskaya’s agar 3) ทดสอบการผลิตแอมโมเนียในอาหาร peptone broth 4) ทดสอบการผลิตอะซีโตอิน ในอาหาร MR-VP และ 5) ทดสอบการผลิตอินโดลอะซีติกแอซิด (IAA)ในอาหาร nutrient broth ที่มี tryptophan เป็นองค์ประกอบ โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่งโมง จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืช มาศึกษาคุณสมบัติการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ได้แก่ ทนต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทนต่อเกลือ ทนต่อโลหะหนัก และทดสอบการย่อยสลายสารประกอบกลุ่มฟีนอล นอกจากนี้ไอโซเลตที่มีคุณสมบัตินำมาทดสอบการผลิตสารต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสาร IAA

ผลการวิจัย เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาศึกษา จำนวน 20 ไอโซเลต มีคุณสมบัติในการผลิตสารเร่งการเจริญของพืชที่เป็นสาร IAA และการผลิตสารออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคพืช แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

1) กลุ่มที่ผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และสารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช จำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ UD15, UD25, UD41, UD57, UD66, UD136, UD169, UD205, UD288, UD292, UD306, UD317, UD343 ที่พบการผลิตสารอะซีโทอิน และเอนไซม์อะไมเลส ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่

สามารถละลายฟอสเฟต และผลิตแอมโมเนียได้ด้วย ซึ่งเชื้อทั้ง 13 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน และมีการสร้างสปอร์ จึงจัดอยู่ในจีนัส *Bacillus* เชื้อที่มีประสิทธิภาพในกลุ่มนี้ ที่เลือกมาศึกษา คือ UD288

2) กลุ่มที่ผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชที่เป็น IAA จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ UD44, UD247 และ UD270 แต่ไม่สามารถผลิตสารอื่นๆ ได้ และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืชอีกด้วย เชื้อที่ประสิทธิภาพและเลือกมาศึกษา คือ UD270 ซึ่งได้ทำการบ่งชี้ 16S rRNA เพียงบางส่วน (500 bp) เป็นเชื้อ *Lysinibacillus* sp. นอกจากนี้ไอโซเลต UD270 สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลได้ดีอีกด้วย

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตสาร IAA ของเชื้อ UD270 พบว่าเชื้อต้องการ tryptophan เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้าง IAA โดยปริมาณที่เหมาะสม คือ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิเหมาะสม คือ 35 องศาเซลเซียส โดยการผลิตสาร IAA สอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่การผลิตสาร IAA ของเชื้อสายพันธุ์ *Lysinibacillus* sp. ยังไม่พบมีรายงานกระบวนการผลิตว่าใช้วิธีใด

เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้ง 2 กลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อเด่น จำนวน 2 ไอโซเลต คือ UD270 และ UD288 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ นำไปศึกษาต่อยอดในโครงการต่อไป ในด้านการนำไปใช้ประโยชน์ ความจำเพาะต่อพืช และด้านองค์ความรู้ หากสายพันธุ์ที่ได้ไม่เคยมีรายงานข้อมูลดังกล่าวมาก่อน รวมถึงการศึกษาความสามารถของเชื้อผสมของ 2 สายพันธุ์ ทำให้มีประโยชน์ในการส่งเสริมพืชทั้งทางตรง และทางอ้อม

ข้อเสนอแนะด้านงานวิจัย

1. เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสามารถนำไปใช้ได้จริงในธรรมชาติ จึงควรศึกษาความจำเพาะหรือการเข้าอยู่อาศัยร่วมกับพืช เป็นข้อมูลในการนำไปใช้กับพืชต่างๆ
2. ความทนต่อโลหะในธรรมชาติเป็นสิ่งสำคัญต่อการบำบัดหรือลดการสะสมของโลหะในดิน ซึ่งวิธีทางชีวภาพโดยใช้พืชและจุลินทรีย์น่าจะเป็นวิธีที่ดีทั้งในด้านประสิทธิภาพ และสิ่งแวดล้อม จึงควรศึกษาปริมาณความเข้มข้นของโลหะที่แบคทีเรียทนได้ และศึกษากลไกการต่อต้านหรือทนต่อโลหะนั้นๆ
3. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร IAA ควรศึกษาอุณหภูมิที่สูงกว่านี้ เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปใช้เนื่องจากปัจจุบันอุณหภูมิสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉลี่ยอยู่ที่ 35-40 $^{\circ}$C
4. จากผลการทดลองได้เชื้อเอ็นโดไฟติกแบคทีเรีย 2 กลุ่มเด่น คือ กลุ่มที่ผลิตสาร IAA ซึ่งเป็นสาระสำคัญต่อการส่งเสริมการเจริญของพืช และกลุ่มที่ผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืชได้ แต่ไม่สามารถผลิตสาร IAA ได้ ดังนั้นหากมีการใช้เชื้อผสมระหว่าง 2 กลุ่ม น่าจะเป็นต่อการส่งเสริมการเจริญของพืช โดยจำเป็นต้องศึกษาการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรีย 2 ชนิดว่าเป็นอย่างไร ร่วมถึงผลกระทบต่อการผลิตสารชีวภาพด้วย เพราะจุลินทรีย์บางชนิดผลิตสารยับยั้งเชื้ออีกกลุ่มไม่ให้เจริญเติบโตได้ ก็จะไม่เป็นผลดีในการผลิตกล้าเชื้อที่เป็นเชื้อผสม
5. ควรทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้จริงในระดับห้องปฏิบัติการหรือเรือนทดลอง