

## บทที่ 5

### อภิปรายผล สรุปและข้อเสนอแนะ

#### การแยกคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนได้ดี

จากการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน จากส่วนของลำต้นและรากของข้าวพันธุ์ปลูกสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าป่าสายพันธุ์ *O. rufiogon* พบว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากรากของข้าวปลูกและข้าป่า โดยแยกได้ถึงร้อยละ 66 ของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด โดยพบว่าในรากมีจำนวนแบคทีเรียมากกว่าในลพต้น สอดคล้องกับ Zinniel *et al.* (2002) ระบุว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากข้าว พบมากที่สุดในส่วนที่เป็นรากและค้อย ๆ ลดลงจากส่วนที่เป็นลำต้นและใบ ดังงานวิจัยของ Prakamhang *et al.* (2009) ที่พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบในรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มากกว่าส่วนของลำต้นและใบ ตามลำดับ และงานวิจัยของ Rodrigues *et al.* (2008) ที่แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากส่วนของรากมากกว่าส่วนของลำต้นโดยมีค่าประมาณมาตรฐานร้อยละ 74 ของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด แต่ในงานวิจัยของ Koomnok *et al.* (2006) ที่พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากรากและลำต้นไม่แตกต่างกัน แต่มีมากกว่าในใบของข้าวพันธุ์ปลูกทั้ง 3 สายพันธุ์คือขาวดอกมะลิ 105 กระเหรียง และก่ำดอยสะเก็ด และข้าวพันธุ์ป่า 2 สายพันธุ์คือ *O. rufipogon* *O. nivara* และยังพบอีกว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าป่ามีปริมาณมากกว่าข้าวปลูก ดังเช่นรายงานของ Govindarajan *et al.* (2008) ทำการปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Burkholderia vietnamsis* MGK3 ที่ติดเครื่องหมายยีน *gusA* ให้กับต้นข้าวที่ปลูกในประเทศอินเดีย พบว่าในระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังการปลูกถ่ายเชื้อและย้ายปลูกมีแบคทีเรียอยู่กันอย่างหนาแน่นที่บริเวณรอบรากข้าว จากการผ่าตามขวางของรากข้าวที่ปลูกถ่ายเชื้อแล้ว 15 วัน จะพบแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้เข้าไปอาศัยอยู่ภายในส่วนที่เป็นช่องว่างระหว่างเซลล์ในส่วนของท่อลำเลียงน้ำและอาหาร

การพบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในส่วนต่าง ๆ ของพืชแตกต่างกันนั้น Boddey and Dobreiner (1995) คาดว่าเป็นเพราะว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์จะแสดงศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน เมื่อเจริญอยู่ในพืชอาศัย ทั้งนี้เนื่องจากสภาพการแก่งแย่งอาหาร และภายในพืชอาศัยมีสภาวะที่มีปริมาณ  $O_2$  ต่ำกว่าบริเวณผิวภายนอกรอบรากพืช และบริเวณใบพืชนั้นเป็นบริเวณที่สัมผัสกับอากาศและ  $O_2$  ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสงจึงมีปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนน้อยกว่าส่วนอื่น ทั้งนี้เนื่องจากการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพนั้นขึ้นอยู่กับศักยภาพการแสดงออกของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งจะถูกยับยั้งเมื่อมีปริมาณออกซิเจนในอากาศมาก ( $21\% O_2$ ) และจะถูกชักนำให้สามารถทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในบรรยากาศที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ ( $2\% O_2$ ) (You *et al.*, 2005)

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากงานวิจัยนี้ทั้งหมด แสดงลักษณะของความ ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อย โดยสามารถเจริญในอาหารกึ่งแข็ง (semisolid medium) แสดงให้ว่า แบคทีเรียเหล่านี้สามารถปรับตัวเข้ามาอาศัยในส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ดี โดยเฉพาะในส่วนของพืช เช่น ท่อ ลำเลียงน้ำ ซึ่งมีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำซึ่งจะช่วยให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสทำงานได้ดี และแสดง ศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชอาศัย (James *et al.*, 2000) และจากงานวิจัยนี้พบว่ามี แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนได้ในบริเวณของใบข้าวด้วย แม้ว่าบริเวณดังกล่าวจะเป็นเนื้อเยื่อใน ส่วนที่มีการแลกเปลี่ยนอากาศและ  $O_2$  สำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง อาจเป็นเพราะว่ามีกลุ่มชุมชนของ แบคทีเรียอยู่ด้วยกันหรืออาจเกิดจากการหายใจของพืช ซึ่งส่งผลต่อปริมาณ  $O_2$  จนสามารถพบการเจริญ ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนได้ในบริเวณนี้ (Minamisawa *et al.*, 2004)

จากการวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ด้วยวิธี acetylene reduction assay (ARA) พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นพวกที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีต่ำ ถึงปานกลางคือตรึงไนโตรเจนได้ตั้งแต่ 1 - 100 นาโนโมลของเอทิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง มี จำนวนเท่ากับ 44 ไอโซเลตคิดเป็นร้อยละ 85 ของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด มีเพียง 8 ไอโซเลตหรือร้อยละ 15 เท่านั้นที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้มากกว่า 100 นาโนโมลของเอทิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อ ชั่วโมง ซึ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากรากของข้าวป่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Koomnok (2006) ที่พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวป่าจำนวนร้อยละ 9 ของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด สามารถตรึงไนโตรเจนได้มากกว่า 100 นาโนโมลของเอทิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง รวมทั้ง งานวิจัยของ Zhang *et al.* (2008) ที่แยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าวป่า *O. rufipogon* ได้ทั้งหมด 23 ไอโซเลต และทุกไอโซเลตมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้สูงมากกว่า 100 นาโนโมลของเอทิลีนต่อ มิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง โดยไอโซเลตที่ตรึงไนโตรเจนได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 817 นาโนโมลของเอทิลีนต่อ มิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และตรึงไนโตรเจนได้มากกว่า 140 นาโนโมลของเอทิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีน ต่อชั่วโมง ถึง 10 ไอโซเลต

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ปลูก มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนต่ำ อาจเป็น เพราะเอนไซม์ไนโตรจีเนสไม่ถูกสังเคราะห์หรือมีปริมาณน้อย ในข้าวที่ปลูกในสภาพแวดล้อมที่มีไนโตรเจน มากเพียงพอ (Rudnick *et al.*, 1997) เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Koomnok *et al.* (2006) ที่พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ปลูกทั้ง 3 สายพันธุ์คือข้าวดอกมะลิ 105 กระเหรียง และกำผาดอยสะเก็ด มีค่า nitrogenase activity อยู่ระหว่าง 0-50 nmol  $C_2H_4$ /mg protein/hr และจาก รายงานของ Rodrigues *et al.* (2008) ที่ระบุว่า แบคทีเรียสกุล *Azospirillum* ที่แยกได้จากข้าวนั้นมี เพียงร้อยละ 9 ที่มีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนสูง และแบคทีเรียส่วนใหญ่ร้อยละ 54 ตรึงไนโตรเจนได้ดี

ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์มีความหลากหลาย เช่น งานวิจัยของ Han and New (1998) ทำวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียสกุล *Azospirillum* ด้วยวิธี acetylene reduction assay พบว่า *A. lipoferum* และ *A. brasilense* มีค่าแตกต่างกันตั้งแต่ 0-155

นาโนโมลของเอทธิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ในขณะที่ Malik *et al.* (1997) พบว่าศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียสกุลนี้สูงถึง 686 นาโนโมลของเอทธิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง

Park *et al.* (2005) ได้พบว่า *S. maltophilia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากพื้นที่ทำการเกษตรในประเทศไทย สามารถตรึงไนโตรเจนสูงประมาณ 167.07 นาโนโมลของเอทธิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ในขณะที่แบคทีเรียเอนโดไฟท์ในนาข้าวไทยที่มาจากการเพาะปลูกมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนค่อนข้างสูง ในอัตรา 66.24-753.94 นาโนโมลของเอทธิลีนต่อล้านเซลล์ต่อวัน (Teaumroong, *et al.*, 2001) ในขณะที่ Prasad *et al.* (2001) รายงานว่าในนาข้าวพบเชื้อ *Serratia marcescens* ซึ่งมีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้ประมาณ 65 นาโนโมลของเอทธิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนต่ำ มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Bromsiri and Bromsiri (2010) พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าว ที่ตรึงไนโตรเจนต่ำมีค่าประมาณ 0.44-0.71 นาโนโมลของเอทธิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการเป็นจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญของพืช ซึ่งมักจะมีการสร้างสารควบคุมการเจริญของพืช เช่น ออกซิน (auxin) กรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid; GA) และไซโตไคนิน (cytokinin) เป็นต้น (El-khawas and Adachi, 1999) สำหรับออกซินนั้นกรดอินโดอะซีติก (IAA) เป็นสารควบคุมการเจริญของพืชที่สำคัญตัวหนึ่งที่ส่งผลต่อการเจริญของพืชทั้งระยะสั้นและระยะยาว (Mantelin and Touraine, 2004) แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนที่พบในเนื้อเยื่อและดินบริเวณรอบรากของข้าวส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในสกุล *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* และ *Pseudomonas* (Baldani *et al.*, 1997 ; Ladha and Reddy; 2003) แบคทีเรียหลายชนิดในสกุล *Azospirillum* มีบทบาทในการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช โดยการสังเคราะห์สารส่งเสริมการเจริญ หรือการเพิ่มปริมาณธาตุไนโตรเจนให้แก่พืชด้วยการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (Steendhoudt and Vanderleyden, 2000) และ Costacurta *et al.* (1998) พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชหลายชนิดมีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ซึ่งช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้เช่น *Azospirillum* spp., *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella* sp., *E. cloacae*, *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *Rhizobium* sp. และ *Bradyrhizobium* sp.

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากข้าวป่าและข้าวปลูกทั้ง 52 ไอโซเลต มีค่าตั้งแต่ 9.54 - 67.91 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรียจากข้าวป่าซึ่งมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้สูงจะมีค่าการสร้าง IAA ได้สูงด้วยโดยมีค่าตั้งแต่ 50-67.91 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 11 อัตราการสร้าง IAA นี้มีค่าสูงกว่าอัตราการตรึงไนโตรเจนและการสร้าง IAA ที่ได้จากงานวิจัยของ Bromsiri and Bromsiri (2010) โดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในสกุล *Azospirillum* ที่แยกได้จากข้าวในประเทศไทยมีค่าเฉลี่ยของ nitrogenase activity เท่ากับ 2.76 นาโนโมลของเอทธิลีนต่อล้านเซลล์ต่อชั่วโมง และอัตราการสร้าง IAA เท่ากับ 36.10 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่การวิจัยของ Rodrigues *et al.* (2008) พบว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนส่วนใหญ่ที่แยกได้ในสกุล *Azospirillum* มีอัตราการสร้าง IAA อยู่

ในระดับ 0.42-0.85  $\mu\text{mol/mg protein}$  คิดเป็นร้อยละ 90 และอีกร้อยละ 10 มีอัตราการสร้าง IAA มากกว่า 1.33-2.02  $\mu\text{mol/mg protein}$

Teaumrung *et al.* (2001) พบว่าเอนโดไฟท์จำนวน 3 ใน 4 ไอโซเลตที่แยกได้จากข้าว สามารถผลิต IAA ได้ มีรายงานวิจัยว่าไม่เพียงเฉพาะแต่แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวเท่านั้นที่ผลิต IAA ได้ยังมีพืชชนิดอื่นอีก เช่น ถั่วเหลืองที่พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ร้อยละ 34 ที่แยกได้จาก ถั่วเหลืองมีความสามารถในการผลิต IAA โดยพบในช่วงใกล้เก็บเกี่ยวผลผลิต (Jalia *et al.*, 2004) Fuentes *et al.* (1993) ศึกษาเอนโดไฟท์ในอ้อย 13 สายพันธุ์ในแม็กซิโก พบว่าเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* 18 ไอโซเลตที่แยกได้สามารถผลิต IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีปริมาณ 0.14-2.42  $\mu\text{g/ml}$  และงานวิจัยของ Malik *et al.* (1997) รายงานว่า *Pseudomonas* 96-51 และ *Azospirillum brasilense* Wb-3 ซึ่งแยกได้จากหญ้า Kallar และข้าว สามารถสร้าง IAA ได้เท่ากับ 35  $\mu\text{g/ml}$  และ 10.5  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากงานวิจัยนี้จัดอยู่ในสกุล *Azospirillum* *Pseudomonas* และ *Herbaspirillum* ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและสร้าง IAA ได้สูง *Azospirillum* เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบได้ในพืชอาศัยหลายชนิดโดยเฉพาะข้าวป่าและข้าวปลูกมีศักยภาพในการเป็นจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญของพืช เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Koomnok *et al.* (2006b) ที่พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ปลูกและข้าวพันธุ์ป่าในประเทศไทย เป็นแบคทีเรียในสกุล *Azospirillum* *Herbaspirillum* *Beijerinckia* และ *Pseudomonas* โดย *Azospirillum* sp. CM15 และ *Azospirillum* sp. CM44 แบคทีเรียที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของข้าวขาวดอกมะลิ 105 นอกจากนี้ ยังพบว่ามีการศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในข้าวไทย โดยทำการแยกและเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน และตรวจสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี acetylene reduction assay (ARA) ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง (rod)

*Azospirillum* เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่เจริญแบบอิสระ แต่สามารถเข้าสู่พืชอาศัยและสามารถอยู่ร่วมกับพืชอาศัยแบบเอนโดไฟท์ได้บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ โดย *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. irekense*, *A. halopraeferens* และ *A. amazonense* แยกได้จากข้าวพันธุ์ปลูกและข้าวพันธุ์ป่า (Mano and Morisaki, 2008) นอกจากนี้ *A. lipoferum* มีรายงานว่าแยกได้จากข้าวโพด ในขณะที่ *A. brasilense* แยกได้จากข้าวสาลีและข้าว (Bashan *et al.*, 2004) สำหรับ *Herbaspirillum* เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ปลูกและข้าวพันธุ์ป่า ที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชด้วยการตรึงไนโตรเจนและสร้าง IAA (Elbeltagy *et al.*, 2001) ในส่วนของ *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากพืชหลายชนิด และสามารถตรึงไนโตรเจนได้และมีการแสดงออกของยีน *nif* ในข้าวที่ปลูกบริเวณ Yangtze River Plain (Xie *et al.*, 2006) และส่งเสริมการเจริญให้กับต้นข้าวที่ถูกปลูกถ่ายเชื้อนี้ในประเทศจีน (Desnoues *et al.*, 2003; Hallmann *et al.*, 1997)

### ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าว

การปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนสกุล *Herbaspirillum* และ *Azospirillum* ที่มีอัตราการตรึงไนโตรเจนได้มากกว่า 100 นาโนโมลของเอทิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และมีอัตราการสร้าง IAA ได้สูงตั้งแต่ 54-67 ไมโครกรัมต่อลิตร ทั้ง 6 ไอโซเลตให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ทำการเพาะเลี้ยงในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 250 กรัมในสภาพเรือนทดลอง ในช่วงแรกของการเจริญเติบโต แล้วพบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนทุกไอโซเลตส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการปลูกถ่ายแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจน โดยที่น้ำหนักแห้งส่วนลำต้นและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน มีผลในทำนองเดียวกัน คือข้าวขาวดอกมะลิที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต CMOR15 มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือไอโซเลต CMOR06 CMOR04 และ CMOR09 ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้โดยเฉพาะไอโซเลต CMOR15 มีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลต CMOR06 สามารถสร้าง IAA ได้สูงที่สุดในส่วนของไอโซเลต CMOR04 และ CMOR09 จะมีอัตราการตรึงไนโตรเจนและอัตราการสร้าง IAA รองลงมาตามลำดับ โดยแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของข้าวในระยะแรกของการเจริญได้ดีคือแบคทีเรียในสกุล *Azospirillum* สอดคล้องกับงานวิจัยของ Koomnok (2006) ที่รายงานว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ถูกปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจน มีจำนวนน้ำหนักแห้งของลำต้นเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุมทั้งที่ปลูกในอาหาร สูตรตัดแปลง N-free Hoagland's solution และในดินภายใต้สภาพเรือนทดลอง รวมทั้งปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน โดยที่แบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนที่ให้ผลสูง 5 อันดับจากทั้งหมด 15 ไอโซเลตคือ *Azospirillum* CM15, *Beijerinckia* CM12, *Azospirillum* CM23, *Azospirillum* CM44 และ *Beijerinckia* CM35 ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการสร้าง IAA ได้สูงเช่นเดียวกัน

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของข้าวได้จากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและการสร้างฮอร์โมนที่สำคัญในการเจริญเติบโต เช่น IAA (Doni *et al.*, 2013 และ Contacurta *et al.*, 1998) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mia *et al.* (2012) ที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (PGPR) 4 สายพันธุ์ให้กับข้าวแล้วพบว่าเร่งการงอกของกล้าข้าว การเจริญของกล้าข้าว และการเจริญของรากข้าว นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Malik *et al.* (1997) ที่มีการปลูกถ่ายเชื้อ *Azospirillum lipoferum* N-4, *A. brasilense* Wb-3, *Pseudomonas* 96-51, *Zoogloea* Ky-1 และ *Azoarcus* K-1 ให้กับต้นข้าวแล้วทำให้ชีวมวล และปริมาณไนโตรเจนในเนื้อเยื่อข้าวเพิ่มขึ้น Ashrafuzzaman *et al.* (2009) พบว่าการปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (PGPR) จำนวน 10 สายพันธุ์ซึ่งแยกได้จากดิน Mymensingh สามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวโดยทุกไอโซเลตจะทำให้ความสูงของลำต้น ความยาวของราก และน้ำหนักแห้งทั้งในส่วนรากและลำต้นเพิ่มขึ้น

จากความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในช่วงแรกของการเจริญเติบโตคือมีอายุ 30 วัน จึงได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจน 2 ไอโซเลตที่มีความสามารถสูงที่สุดคือไอโซเลต CMOR15 และ CMOR06 มาทำการศึกษาความสามารถในการส่งเสริม

การเจริญของข้าวที่ช่วงอายุเพิ่มขึ้นและผลต่อความจำเพาะกับข้าวพันธุ์อื่น ๆ ที่นิยมปลูกในจังหวัด พิษณุโลก 3 พันธุ์คือพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์พิษณุโลก 80 และพันธุ์ชัยนาท 80

การปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนให้ข้าวทั้งสามพันธุ์นั้นนอกจากส่งเสริมการเจริญของข้าวทางด้านความสูงของลำต้นและน้ำหนักแห้งของลำต้นและรากแล้ว ยังพบอีกว่าการปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนทั้งสองไอโซเลต ทำให้รากแขนงของข้าวสั้นแต่หนาและใหญ่ ส่วนข้าวที่ไม่ได้ปลูกถ่ายเชื้อมีรากแขนงที่ยาวแต่เล็กและบาง รวมทั้งในส่วนของรากฝอยมีความหนาแน่นมากกว่าชุดควบคุม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Koomnok *et al.* (2006) ที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต *Azospirillum* CM15 และ *Azospirillum* CM44 ให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่าสามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของลำต้นและราก รวมทั้งความสูงของลำต้นและยังเพิ่มความหนาแน่นให้กับรากของข้าวด้วย รวมทั้งงานวิจัยของ Villegas and Paterno (2008) ที่ทำการปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* ให้กับต้นอ้อย พบว่าต้นที่ได้รับการปลูกเชื้อมีรากแขนงและรากฝอยหนาแน่นกว่าต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้สูง การที่มีรากแขนงและรากฝอยที่มีความแข็งแรงและหนาแน่นจะส่งผลให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นในที่สุด (Glick, 1995; Gunarto *et al.*, 1999; Biwas *et al.*, 2000) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้พืชสามารถดูดซับธาตุอาหารได้มากขึ้น และส่งผลให้มีน้ำหนักของพืชเพิ่มขึ้นทั้งในส่วนของลำต้นและราก ดังนั้นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 และ CMOR06 ทั้งสองไอโซเลตนั้นต่างอยู่ในสกุล *Azospirillum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและสร้างกรดอินโดลอะซีติกสูง และใช้เป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของข้าวได้

ข้าวทั้งสามพันธุ์ที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนทุกไอโซเลตในทุกช่วงอายุตั้งแต่อายุ 30 วันจนถึง 75 วันหลังย้ายปลูกให้ความสูงของลำต้นมากกว่าชุดควบคุม โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต CMOR15 ส่งเสริมให้ส่วนของลำต้นข้าวสูงกว่าไอโซเลต CMOR06 แต่เมื่อพิจารณาถึงจำนวนก่อดอต้นแล้วแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนทั้งสองไอโซเลตส่งเสริมให้มีจำนวนก่อดอต้นของข้าวไม่แตกต่างกันในข้าวพันธุ์เดียวกัน ยกเว้นในข้าวพันธุ์ชัยนาท 80 ที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 มีจำนวนก่อดอต้นสูงกว่าไอโซเลต CMOR06 ทั้งนี้จำนวนก่อดอต้นเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตของข้าวในที่สุด (Gunarto *et al.*, 1999; Koomnok, 2006)

การส่งเสริมการเจริญของข้าวมีความสัมพันธ์กับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในเนื้อเยื่อพืช โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 มีจำนวนมากกว่า ไอโซเลต CMOR06 ในส่วนของลำต้นและรากในข้าวทั้ง 3 พันธุ์ และพบว่าในส่วนของรากมีจำนวนแบคทีเรียมากกว่าส่วนของลำต้น แม้ว่าในส่วนของรากในพันธุ์พิษณุโลก 80 และชัยนาท 80 จะไม่มีความแตกต่างทางสถิติก็ตาม จำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนในข้าวนี้จะสอดคล้องกับน้ำหนักแห้งของรากและลำต้นที่ช่วงอายุ 75 วัน โดยข้าวที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 จะมีค่ามากกว่าการปลูกถ่ายด้วยไอโซเลต CMOR06 แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยให้ผลในทำนองเดียวกันในข้าวทั้ง 3 พันธุ์

## สรุป

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนได้ดี สามารถสรุปผลการวิจัยได้ว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในข้าวพันธุ์ปลูกสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวป่า *O.rufipogon* โดยแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่แยกได้จากรากของพืชอาศัย มีแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและสร้าง IAA สูง ที่ส่งเสริมการเจริญของข้าวในระยะแรกของการเจริญโดยมีน้ำหนักรากแห้งและปริมาณไนโตรเจนที่สะสมในส่วนเหนือดินสูงจำนวน 2 ไอโซเลตคือ CMOR15 และ CMOR06 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในสกุล *Azospirillum* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 ส่งเสริมการเจริญของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์พิษณุโลก 80 และพันธุ์ชัยนาท 80 โดยทำให้ความสูงของลำต้น จำนวนกอดต่อต้น มากกว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR06 และชุดควบคุมที่ทุกช่วงอายุตั้งแต่ 30 วันจนถึง 75 วันหลังย้ายปลูก รวมทั้งน้ำหนักรากแห้งของลำต้นและรากที่ช่วงอายุ 75 วันหลังย้ายปลูกโดยพบจำนวนแบคทีเรียในรากมากกว่าลำต้น ทำให้เชื่อได้ว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 น่าจะเป็นแบคทีเรียที่เหมาะสมในการเป็นจุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญของข้าว โดยไม่มีความจำเพาะกับพันธุ์ข้าว

## ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลต CMOR15 เพื่อพัฒนาเป็นหัวเชื้อ (inoculums) ของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของข้าว
2. ศึกษาศักยภาพของการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลต CMOR15 จนถึงช่วงระยะที่ให้ผลผลิตทั้งในสภาพเรือนทดลองและในสภาพแปลงทดลอง