



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การคัดเลือกและใช้แบคทีเรียเอนโดไฟติกเพื่อส่งเสริมการเจริญของต้นกล้ายางและต้นยางชำถุง
ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

Selection and usage of endophytic bacteria to enhance growth of rubber seedlings
and poly-bag rubber seedlings in North-Eastern Thailand

โดย เสาวนิต ทองพิมพ์ และ กุลวดี คตชนะเลขา

30 กันยายน 2558

สัญญาเลขที่ RDG5750101

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การคัดเลือกและใช้แบบที่เรียเอนโดไฟติกเพื่อส่งเสริมการเจริญของต้นกล้วยและต้นยางชำถุงใน
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | | |
|--------------------------|-----------------------------------|--|
| 1. หัวหน้าโครงการวิจัย | รศ.ดร. เสาวนิต ทองพิมพ์ | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 2. ผู้ร่วมวิจัย | นางสาวกุลวดี คตชนะเลขา | คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ราชภัฏชัยภูมิ |
| 3. ที่ปรึกษาโครงการวิจัย | รศ.ดร. วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ | คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

รายงานผลการวิจัยฉบับบทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ทุนวิจัยมุ่งเป้า ยางพารา ปีงบประมาณ 2557

โครงการ การคัดเลือกและใช้แบคทีเรียเอนโดไฟติกเพื่อส่งเสริมการเจริญของต้นกล้ายางและต้นยางชำถุง
ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

โดย เสาวนิต ทองพิมพ์ และ กุลวดี คตชนะเลขา

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยซึ่งผลิตและส่งออกยางธรรมชาติเป็นอันดับหนึ่งของโลก ปัจจุบันพื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นแหล่งปลูกยางใหม่ที่มีปริมาณการปลูกยางพารามากเป็นลำดับสองรองจากภาคใต้ ปัญหาหนึ่งที่พบได้แก่เกษตรกรขาดแคลนต้นยางชำถุงพันธุ์ที่ได้รับการรับรองมาตรฐานจากกรมวิชาการเกษตร อีกทั้งดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีปริมาณธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญของต้นพืช เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม ในปริมาณต่ำกว่าระดับที่เหมาะสม (นุชนารถ และคณะ, 2556) ทำให้ต้นยางชำถุงมีการเจริญเติบโตช้าและอัตราการตายสูงเมื่อปลูกลงในแปลง ส่งผลเสียต่อเกษตรกรที่ต้องรับภาระต้นทุนสูงขึ้นจากค่าแรงงาน ค่าปลูกต้นยางซ่อม และค่าปุ๋ยเคมีที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังต้องใช้เวลาในการดูแลรักษาต้นยางพารา 5-7 ปี จึงจะเปิดกรีดน้ำยางได้ ปัญหาดังกล่าวส่งผลกระทบในระยะยาวในเรื่องผลผลิตน้ำยางที่เปิดกรีดได้ล่าช้า เกษตรกรขาดรายได้ ไม่สามารถแข่งขันกับประเทศผู้ผลิตอื่นได้

แบคทีเรียเอนโดไฟติก (endophytic bacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรคหรืออันตรายต่อพืชนั้นๆ (Hallmann, 1997) จากรายงานวิจัยพบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟติกหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็น plant growth promoting bacteria (PGPB) เนื่องจากสามารถผลิตฮอร์โมนพืช และเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมธาตุอาหารของพืชได้ (Canbolat et al., 2006) แต่ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาวิจัยถึงการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟติกเพื่อส่งเสริมการเจริญในต้นกล้ายางและต้นยางชำถุง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกซึ่งแยกได้จากต้นยางพาราที่แข็งแรงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่มีคุณสมบัติเป็น plant growth promoting bacteria (PGPB) เพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ายางและต้นยางชำถุง เป็นการพัฒนาการผลิตยางพาราในระดับต้นน้ำด้วยชีววิธี ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการใช้ปุ๋ยเคมี และช่วยย่นระยะเวลาในการผลิตต้นกล้ายางและการแตกต่าหลังจากติดตาด้วยต่ายางพันธุ์ดี การดำเนินงานวิจัยได้นำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต้นยางพาราที่แข็งแรงในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 415 ไอโซเลทมาคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติเด่นในการส่งเสริมการเจริญในพืช พบ 335 ไอโซเลท (80.7%) ผลิต IAA ได้ โดย 5 ไอโซเลทที่ผลิต IAA ได้สูงสุดคือ AL6A1, AP6A3, AP611, FR421 และ FP1A2 และพบ 220 ไอโซเลท (50.6%) ตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ โดยตรึงได้สูงสุด 5

อันดับแรกได้แก่ไอโซเลท BR3A1, AL512, AL111, BR4A4 และ AP6A3 นอกจากนี้ยังพบว่ามี 17 ไอโซเลทที่ละลายสาร tri-calcium phosphate (TCP) ได้ โดยไอโซเลท ER212 ละลายได้สูงสุด

ผู้วิจัยได้เลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกจำนวน 2 ไอโซเลท คือ AP6A3 ที่แยกได้จากใบของต้นยางพารา สามารถสร้างสาร IAA ($58.39 \mu\text{g/ml}$) และ ตรึงไนโตรเจน ($64.14 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{tube/h}$) ได้สูง และ ER212 ที่แยกจากรากของต้นยางพาราซึ่งสามารถปลดปล่อยฟอสเฟตได้มากที่สุด (197.01 mg/L) โดยพบว่าทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถเจริญร่วมกันได้ และเจริญได้ดีในน้ำมะพร้าวให้ปริมาณเซลล์ $\geq 10^8 \text{ cfu/ml}$ เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบการรอดชีวิตในดินและการเพิ่มจำนวนในต้นยางในเรือนทดลองปลูกพืชพบว่า ไอโซเลท AP6A3 และ ER212 สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในดินและในเมล็ดยางได้ โดยเจริญรอดชีวิตในดินได้ถึง 10^5 - 10^6 cfu/g soil ในขณะเดียวกันยังสามารถเข้าอาศัยและเพิ่มจำนวนในต้นกล้ายางได้ และมีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้ายาง ทำให้ต้นกล้ายางมีความสูงลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น พื้นที่ใบ ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งมากกว่าต้นกล้ายางในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งนี้ได้วางแผนศึกษาในระดับเรือนทดลองและแปลงเพาะชำในลำดับถัดไป

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติก (endophytic bacteria) ซึ่งแยกได้จากต้นยางพาราที่แข็งแรงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและมีคุณสมบัติเป็น plant growth promoting bacteria (PGPB) ได้แก่ ความสามารถในการผลิตสาร indole acetic acid (IAA) ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ และละลายอินทรีย์ฟอสเฟตได้ เพื่อนำไปใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้วยและต้นยางชำถุง จากการทดลอง คัดเลือกได้เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ AP6A3 ซึ่งแยกจากใบยางพาราสามารถสร้าง IAA ($58.39 \mu\text{g/ml}$) และ ตรึงไนโตรเจน ($64.14 \mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{tube/h}$) ได้สูง และ ไอโซเลท ER212 แยกจากรากยางพารา สามารถปลดปล่อยฟอสเฟตได้มากที่สุด (197.01 mg/L) โดยทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถเจริญร่วมกันได้ และเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก ได้แก่ น้ำมะพร้าวอ่อนและน้ำมะพร้าวแก่ โดยให้ปริมาณเซลล์ $\geq 10^8 \text{ cfu/ml}$ หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมง เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตในดินและเพิ่มจำนวนในต้นพืชในเรือนทดลองปลูกพืช พบว่า ไอโซเลท AP6A3 และ ER212 สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในดินและในเมล็ดยางได้ โดยสามารถรอดชีวิตในดินและเพิ่มจำนวนถึง 10^5 - 10^6 cfu/g soil ในขณะเดียวกันยังสามารถเข้าอาศัยและเพิ่มจำนวนในต้นกล้วยได้ชี้ให้เห็นว่าไอโซเลท AP6A3 และ ER212 มีศักยภาพเป็น plant growth promoter ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นกล้วย ทำให้ความสูงลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น พื้นที่ใบ ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งสูงกว่าต้นกล้วยในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ

Abstract

This study aimed to select endophytic bacteria, which were isolated from healthy rubber trees in the Northeastern area of Thailand, for their effective plant growth promoting properties including indole acetic acid (IAA) production, nitrogen fixation and inorganic phosphate solubilization. From selection processes, two bacterial endophytes, AP6A3 and ER212, were obtained. The isolate AP6A3 derived from rubber tree's leaves could produce 58.39 µg/ml IAA and fix nitrogen at 64.14 µmolC₂H₄/tube/h. The isolate ER212 obtained from rubber tree's roots could release 197.01 mg/l phosphate from tri-calcium phosphate. It was found that these 2 isolates could grow well as co-culture in both young and mature coconut water resulting in $\geq 10^8$ cfu/ml after 24-h incubation. In addition, these two bacterial isolates were tested for their ability to survive in soil and increase their populations within rubber tree tissues under greenhouse conditions. It was found that isolates AP6A3 and ER212 could compete with the indigenous microbes in soil and rubber seeds. Their populations in soil was about 10^5 - 10^6 cfu/g soil. Meanwhile, these isolates also colonized and increased their number within the rubber seedlings as well. As expected, isolates AP6A3 and ER212 significantly enhanced the growth of rubber seedlings in terms of stem height, stem diameter, root length, leaf area, fresh weight and dry weight when compared to the control groups. Therefore, the endophytic bacteria AP6A3 and ER212 have high potential to be used as plant growth promoters in order to reduce the cost of chemical fertilizer in the preparation of rubber seedlings and poly-bag rubber seedlings.

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
คำย่อ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 สมมติฐานงานวิจัย	2
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย	2
1.6 คำสำคัญของการวิจัย	3
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ ที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	17
3.2 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	22
บทที่ 4 ผลการวิจัย	23
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	
5.1 อภิปรายผลการวิจัย	38
5.2 สรุปผลการวิจัย	42
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	54
บทความสำหรับเผยแพร่	55
กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์	58
ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ	59

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 วิธีการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟติกส่งเสริมการเจริญในพืช	12
3.1 สรุปขั้นตอนการทดลอง	21
4.1 แบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญในพืชที่แยกเชื้อได้จากส่วนต่างๆ ของต้นยางพารา	23
4.2 จำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญในพืช	24
4.3 จำนวนไอโซเลทที่เจริญบนอาหารแข็ง nitrogen-free medium	26
4.4 แบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชในแต่ละด้าน	30
4.5 ค่า specific growth rate ของแบคทีเรียเอนโดไฟติกเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเชื้อเดี่ยวและ เชื้อร่วมใน TSB medium	31
4.6 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและอัตราส่วนระหว่างแบคทีเรียเอนโดไฟติกเมื่อเลี้ยงเชื้อร่วมกัน ใน TSB medium	31
4.7 ผลการเจริญของต้นกล้าอายุ 28 วัน ที่ได้รับการวิธีที่แตกต่างกัน	37

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
4.1 การเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพูหลังจากเติม Salkowski's reagent 30 นาที	24
4.2 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่ผลิตสาร IAA ($\mu\text{g/ml}$)	25
4.3 การตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟติกด้วยวิธี Acetylene reduction assay	26
4.4 ไอโซเลทที่สร้าง halo zone รอบๆโคโลนีบนอาหาร mPVK medium ที่มี TCP เป็นแหล่ง ฟอสฟอรัส	27
4.5 ค่า Solubilization index ของเชื้อที่สร้างส่วนใสรอบโคโลนีบนอาหาร mPVK medium ที่มี TCP เป็นแหล่งฟอสฟอรัส	27
4.6 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIIP liquid medium ที่มี 0.5% (w/v) TCP เป็นแหล่ง ฟอสฟอรัส	28
4.7 ปริมาณฟอสเฟต (mg/L) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIIP liquid medium ที่มี 0.5% (w/v) TCP เป็นแหล่งฟอสฟอรัส	29
4.8 โคโลนีแบคทีเรียเอนโดไฟติก ไอโซเลทที่คัดเลือก	31
4.9 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท AP6A3 เมื่อเลี้ยงใน TSB medium (TAP6A3) น้ำมะพร้าวอ่อน (YAP6A3) และน้ำมะพร้าวแก่ (MAP6A3)	32
4.10 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท ER212 เมื่อเลี้ยงใน TSB medium (TER212) น้ำมะพร้าวอ่อน (YER212) และน้ำมะพร้าวแก่ (MER212)	33
4.11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ของเชื้อผสม (mixed cultures) AP6A3 และ ER212 และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท AP6A3 (YAP6A3) และ ER212 (YER212) เมื่อเลี้ยงร่วมกันในน้ำมะพร้าวอ่อน	33
4.12 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ของเชื้อผสม (mixed cultures) AP6A3 และ ER212 และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท AP6A3 (MAP6A3) และ ER212 (MER212) เมื่อเลี้ยงร่วมกันในน้ำมะพร้าวแก่	34
4.13 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท AP6A3 และ ER212 ในรากของต้นกล้วย	35
4.14 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท AP6A3 และ ER212 ในเนื้อเยื่อส่วนเหนือรากของ ต้นกล้วย	35
4.15 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท AP6A3 และ ER212 ในดินปลูกต้นกล้วย	36

คำย่อ

ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
APP	Aluminium phosphate (AlPO_4)
ARA	Acetylene Reduction Assay
cfu	Colony forming unit
C_2H_2	Acetylene
C_2H_4	Ethylene
FID	Flame Ionization Detector
g	gram
GC	Gas Chromatography
h	hours
IAA	Indole-3-acetic Acid
IPP	Ferric phosphate (FePO_4)
kg	Kilogram
mg	milligram
ml	mililiter
mPVK	modified Pikovskaya medium
N_2	Nitrogen gaseous
NBRIP	National Botanical Research Institute's Phosphate
nm	nanometer
OD	Optical Density
PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria
PSB	Phosphate Solubilizing Bacteria
RP	Rock phosphate
rpm	Revolutions per minute
SI	Solubilization Index
TCP	Tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
TSA	Tryptic Soya Agar
TSB	Tryptone Soya Broth

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยซึ่งผลิตและส่งออกยางพาราเป็นอันดับหนึ่งของโลก ปัจจุบันพื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นแหล่งปลูกยางใหม่ที่มีปริมาณการปลูกยางพารามากเป็นลำดับสองรองจากภาคใต้ และเกษตรกรยังมีความต้องการปลูกยางพารามากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เนื่องจากมีราคายางเป็นแรงจูงใจ และรัฐบาลมีนโยบายสนับสนุน เพื่อมุ่งหวังที่จะเตรียมพร้อมการเข้าสู่ประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน (AEC) ของอุตสาหกรรมยางพาราไทยในปีพ.ศ. 2558 แต่เนื่องจากเกษตรกรยังขาดแคลนต้นยางชำถุงพันธุ์ที่ดีที่ได้รับการรับรองมาตรฐานจากกรมวิชาการเกษตร ประกอบกับภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยต่อปีต่ำ มักประสบปัญหาภัยแล้งและมีสภาพแวดล้อมบางประการที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการปลูกยางพารา เช่น โครงสร้างเนื้อดิน ความลึกของดิน การระบายน้ำ และสมบัติทางเคมีของดินต่ำ (สถาบันวิจัยยาง, 2555) ประกอบกับดินปลูกยางพาราในภาคตะวันออกเฉียงเหนือส่วนใหญ่มีปริมาณธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญของต้นพืช เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม ในปริมาณต่ำกว่าระดับที่เหมาะสม (นุชนารถ และคณะ, 2556) ทำให้ต้นยางชำถุงมีการเจริญเติบโตช้าและอัตราการตายสูงเมื่อปลูกลงในแปลง ส่งผลเสียต่อเกษตรกรที่ต้องรับภาระต้นทุนสูงขึ้นจากค่าแรงงาน ค่าปลูกต้นยางซ่อม และค่าปุ๋ยเคมีที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังต้องใช้เวลาในการดูแลรักษาต้นยางพารา 5-7 ปี จึงจะเปิดกรีดน้ำยางได้ ปัญหาดังกล่าวส่งผลกระทบในระยะยาวในเรื่องผลผลิตน้ำยางที่เปิดกรีดได้ล่าช้า ไม่ทันต่อการแข่งขันกับประเทศอื่นๆ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อระบบการผลิตยางพาราทั่วประเทศ

แบคทีเรียกลุ่มเอนโดไฟติก เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรคหรืออันตรายต่อพืชนั้นๆ (Hallmann, 1997) จากรายงานวิจัยพบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟติกหลายชนิดเป็น plant growth promoting bacteria (PGPB) เนื่องจากสามารถผลิตฮอร์โมนพืช และเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมสารอาหารของพืชได้ (Canbolat et al., 2006) แต่ปัจจุบันยังขาดการศึกษารายละเอียดถึงการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟติกเพื่อส่งเสริมการเจริญในต้นกล้ายางและต้นยางชำถุง

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงต้องการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติก (endophytic bacteria) ซึ่งแยกได้จากต้นยางพาราที่แข็งแรงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่มีคุณสมบัติเป็น PGPB เพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ายางและต้นยางชำถุงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นการพัฒนาการผลิตยางพาราในระดับต้นน้ำด้วยชีววิธี ซึ่ง

เป็นการลดต้นทุนจากการใช้ปุ๋ยเคมี และช่วยย่นระยะเวลาในการผลิตต้นกล้าและการแตกตาหลังจากติดต่อด้วยตายเป็นพันธุ์ดีแล้ว อันจะนำไปสู่การแข่งขันและการพึ่งพาตนเองตามนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2555-2559) ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 2 การสร้างศักยภาพและความสามารถในการพัฒนาทางเศรษฐกิจ กลยุทธ์การวิจัยที่ 1 สร้างมูลค่าผลิตทางการเกษตรและการพัฒนา ศักยภาพในการแข่งขันและการพึ่งพาตนเองของสินค้าเกษตร

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกซึ่งแยกได้จากต้นยางพาราที่แข็งแรงที่มีประสิทธิภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าและต้นยางชำถุงในระดับเรือนทดลองและแปลงเพาะชำ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืช คัดเลือกจากเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่แยกได้จากต้นยางพาราที่แข็งแรงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และเปิดกรีดหน้ายางแล้ว ซึ่งเชื้อเก็บรักษาอยู่ใน culture collection ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. ต้นกล้ายางได้จากการเพาะเมล็ดยางพันธุ์ RRIM 600
3. ต้นยางชำถุงที่ใช้ในการทดลองเป็นพันธุ์ RRIM 600 ที่เพาะเมล็ดแล้วติดตาในถุง
4. ในการทดสอบระดับเรือนทดลองและแปลงเพาะชำ ใช้พื้นที่ของศูนย์เรียนรู้ยางพารา อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น
5. ศึกษาจำแนกและระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกอย่างน้อยจนถึงระดับจีโนม
6. ถ่ายทอดวิธีการผลิตและการใช้เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกในการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าและต้นยางชำถุง ดำเนินการโดยใช้พื้นที่ของศูนย์เรียนรู้ยางพารา อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น

1.4 สมมติฐานงานวิจัย

แบคทีเรียเอนโดไฟติกสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของต้นกล้าและต้นยางชำถุงได้

1.5 ทฤษฎี และกรอบแนวความคิดของการวิจัย

มีรายงานถึงแบคทีเรียเอนโดไฟติกหลายชนิดที่มีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น ผลิตฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน ช่วยกระตุ้นเซลล์พืชให้เจริญขยายขนาดขึ้น ทำให้พืชเจริญเติบโต (Jasim et al., 2013) ตรึงไนโตรเจนในอากาศให้กลายเป็นแหล่งไนโตรเจนที่พืชนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม (Li et al., 2008) ทำให้พืชมีสีเขียวและแข็งแรง นอกจากนี้แบคทีเรียเอนโดไฟติกบางชนิดยังช่วยละลายฟอสเฟตในรูปที่ถูกตรึงในดิน (Rashid et al., 2012) ซึ่งเป็นแหล่งฟอสฟอรัสในดินที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยตรงได้ โดยฟอสฟอรัสมีความสำคัญต่อการแบ่งเซลล์ และการสร้างเซลล์ในพืช ช่วยในการเจริญเติบโตของราก

ดังนั้นแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่เป็น PGPB จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับการนำไปใช้ส่งเสริมการเจริญให้กับต้นกล้าและต้นยางชำถุงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่ประสบปัญหาการขาดแคลนต้นยางชำถุงที่ได้มาตรฐาน อันเนื่องมาจากต้นกล้ายางเจริญเติบโตช้า ใช้ธาตุอาหารในดินได้น้อย ทำให้ใช้เวลาในการผลิตนานและมีต้นทุนค่าปุ๋ยเคมีสูง เพื่อให้ได้ต้นกล้าและต้นยางชำถุงที่มีการเจริญเติบโตเร็วขึ้น แข็งแรงมากขึ้น และช่วยย่นระยะเวลาในการเพาะต้นกล้ายางพาราให้พร้อมสำหรับติดตามและเพิ่มอัตราการแตกตา ตลอดจนมีการเจริญของกิ่งตาที่เร็วและมีประสิทธิภาพ สามารถลงแปลงปลูกได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้มาต่อยอดในการพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เป็นสารชีวภัณฑ์ (bioproduct) เพื่อให้เกษตรกรที่เป็นผู้ประกอบการนำไปใช้ในแปลงเพาะชำต้นกล้ายางพาราและต้นยางชำถุงได้สะดวก โดยคำนึงถึงการลดต้นทุนและความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมด้วย

1.6 คำสำคัญ (Keyword) ของการวิจัย

ต้นกล้ายาง ต้นยางชำถุง แบคทีเรียเอนโดไฟติก การส่งเสริมการเจริญในพืช

rubber seedling, poly-bag rubber seedling, endophytic bacteria, plant growth promoting

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าและต้นยางชำถุงโดยชีววิธี

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

2.1 ต้นกล้ายางและต้นยางชำถุง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและเป็นสินค้าเกษตรที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศ ซึ่งเดิมส่วนใหญ่นิยมปลูกในภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียกว่าพื้นที่ปลูกยางเดิม ต่อมาได้มีการขยายพื้นที่ปลูกยางใหม่ไปยังภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากยางพาราเป็นพืชที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ในทุกส่วน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง น้ำยาง (latex) ซึ่งมีคุณสมบัติเฉพาะตัว เช่น มีความยืดหยุ่น กันน้ำ ต้านทานต่อแรงดึงได้ดี เป็นต้น จึงเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในระดับอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมผลิตยางรถยนต์ อุตสาหกรรมผลิตรองเท้า และการนำไปใช้ในทางวิศวกรรมโยธา อีกทั้งเนื้อไม้ของต้นยางพารายังมีประโยชน์ในด้านการก่อสร้างและการผลิตเฟอร์นิเจอร์อีกด้วย (จำลอง และคณะ, 2550)

การปลูกยางเพื่อให้ได้ผลผลิตที่ต้องการ ขึ้นอยู่กับการเลือกพันธุ์ยาง ความเหมาะสมของพื้นที่ และการจัดการสวนยางที่ถูกต้อง ทั้งนี้เพื่อให้ต้นยางเปิดกรีดได้เร็ว ลดต้นทุนในการปลูกสร้างสวนยางให้ต่ำลง รวมทั้งเพิ่มผลผลิตต่อไร่ในอนาคตให้สูงขึ้น (กิจกรรมยางพารา งานศึกษาและพัฒนาเกษตรกรรม, 2555) และเป็นไปตามมาตรฐานการเจริญเติบโตของต้นกล้ายางพาราของสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร ซึ่งกำหนดโดยพิจารณาจากปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของต้นยางพารา ได้แก่ พันธุ์ยาง สภาพแวดล้อม การเลือกใช้ต้นกล้า ตลอดจนการบำรุงดูแลสวนยาง (สถาบันวิจัยยาง, 2555)

ในปัจจุบัน การปลูกยางพาราในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมใช้ต้นยางชำถุง (กิจกรรมยางพารา งานศึกษาและพัฒนาเกษตรกรรม, 2555) เพราะเป็นวิธีปลูกยางพาราที่ประสบผลสำเร็จสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกด้วยต้นตอตาหรือติดตาในแปลง เนื่องจากช่วยให้ต้นยางมีการเจริญเติบโตอย่างสม่ำเสมอ ลดช่วงระยะเวลาในการดูแลรักษาต้นยางอ่อนให้สั้นลง และสามารถกรีดยางได้เร็วกว่า (สถาบันวิจัยยาง, 2555)

ต้นยางชำถุง หมายถึง ต้นกล้ายางคุณภาพดี ที่ติดตาด้วยยางพันธุ์ดี และบำรุงรักษาในถุงจนต้นยางที่ติดตาแล้วมีการเจริญเติบโตไม่น้อยกว่า 1 ฉัตร แต่ไม่เกิน 2 ฉัตร การผลิตต้นยางชำถุง ควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆดังนี้

2.1.1 สิ่งที่น่ามาใช้ในการผลิตต้นกล้ายางพารา คือ เมล็ดยางสด หรือเมล็ดยางงอก ซึ่งเมล็ดยางจะมีระยะเวลาร่วงหล่นแตกต่างกันขึ้นกับพื้นที่ปลูกยางพารา ได้แก่ ภาคใต้ฝั่งตะวันออก ประมาณเดือนสิงหาคม ถึงตุลาคม ส่วนภาคใต้ฝั่งตะวันตก ประมาณเดือนสิงหาคม หรือ กันยายน ถึงตุลาคม หรือ พฤศจิกายน ในขณะที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประมาณเดือนกรกฎาคม หรือ สิงหาคม ถึงกันยายน หรือ ตุลาคม สำหรับภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

มักจะซื้อเมล็ดจากแหล่งปลูกยางภาคตะวันออกมาเพาะ ซึ่งต้องคำนึงถึงการคำนวณจำนวนและอัตราการงอกของเมล็ดที่ใช้ โดยเมล็ดยางสด 1 กิโลกรัม มีประมาณ 200-240 เมล็ด ซึ่งมักซื้อขายเมล็ดยางปริมาณมากบรรจุในกระสอบป่าน 1 กระสอบหนักประมาณ 55-60 กิโลกรัม เนื่องจากเมล็ดยางใหม่จะมีอัตราการงอกร้อยละ 80-90 หากเกิน 10 วัน อัตราการงอกจะลดลงเหลือร้อยละ 40-50

2.1.2 วิธีการเพาะเมล็ดยาง หลังจากเมล็ดยางงอกแล้วให้รับนำมาเพาะในถุงพลาสติกสีดำที่กรอกดินจนเต็มถุงละ 3 เมล็ด ให้เมล็ดงอกอยู่ตรงกลางถุง โดยดินที่ใช้มีลักษณะค่อนข้างเหนียว ใช้ดิน 2 ส่วน ผสมอินทรีวัตถุ (ปุ๋ยคอก/ปุ๋ยหมัก) 1 ส่วน และปุ๋ยหินฟอสเฟต 10 กรัม/ถุง (1 ซ่อนแกง) หรือหินฟอสเฟต 5 กิโลกรัม/ดิน 1 ลูกบาศก์เมตร บรรจุได้ประมาณ 500 ถุง วางไว้เป็นแถวตามที่กำหนดไว้ และได้วางระบบน้ำไว้เรียบร้อยแล้ว หลังจากเพาะแล้ว 30-45 วัน ให้ถอนแยกต้นที่ไม่สมบูรณ์ทิ้ง เหลือไว้เพียงถุงละ 1 ต้น

2.1.3 วิธีการดูแลรักษาด้านกล้ายางชำถุง

2.1.3.1 รดน้ำทุกวันๆละ 1 ครั้ง ประมาณ 10-30 นาที ให้ดูความชื้นในถุง

2.1.3.2 ปราบวัชพืช ใช้ยาพาราควอต อัตรา 80-100 ซีซี / น้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่น ต้องระวังไม่ให้ยาฆ่าหญ้าโดนต้นยางและต้องฉีดพ่นในกรณีที่ไม่มีลมแรง

2.1.3.3 พ่นยาปราบโรคราฟิซ ใช้ยาแทนเอ็มผสมยาจับใบ อัตรา 10 - 20 กรัม (1-2 ซ่อนแกง/น้ำ) 20 ลิตร ฉีดพ่นขณะที่ต้นยางมียอดอ่อน เพื่อป้องกันโรคสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ถ้ามีโรคระบาดใช้ยา อัตรา 20 - 30 กรัม (2-3 ซ่อนแกง)/ น้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่น 3-5 วัน/ครั้ง ถ้ามีหมอกให้รดน้ำ ขณะที่ใบยางยังเปียกอยู่ และให้พ่นยาป้องกันกำจัดโรคราฟิซสัปดาห์ละครั้ง

2.1.3.4 ใส่ปุ๋ยสูตร 20-8-20 อัตรา 2 กิโลกรัม / น้ำ 200 ลิตร โดยนำปุ๋ยมาละลายน้ำ ผสมน้ำสะอาด ใช้บัวรดรดลงในถุงเพาะชำยางให้เต็มทุกถุง เดือนละ 1 ครั้ง จนกว่าจะติดตาได้ ขณะที่ติดตาอย่าให้หยุดใส่ปุ๋ย และจะใส่ปุ๋ยได้อีกหลังจากเปิดพลาสติกพันตาออกแล้ว

2.1.4 การติดตา ยางจะติดตาเมื่อต้นกล้ายางอายุ 4½ - 8 เดือน ขึ้นอยู่กับขนาดของลำต้นโตพอที่จะทำการติดตา กล่าวคือมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตร โดยวัดที่ความสูงห่างจากพื้นดิน 10 เซนติเมตร สำหรับตาที่จะนำมาติดนั้น ต้องเลือกใช้พันธุ์ยางตามพันธุ์ที่ต้องการและมีความเหมาะสมกับสภาพพื้นที่ปลูก โดยพันธุ์ยางที่แนะนำให้ปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ RRIT 408, RRIT 251, RRIT226, BPM 24 และ RRIM 600 ซึ่งเป็นพันธุ์ยางชั้น 1 กลุ่ม 1 ที่ให้ผลผลิตน้ำยางสูง ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการติดตาคือตั้งแต่กลางเดือนมกราคมจนถึงเดือนมิถุนายน แต่ต้องระวังช่วงเวลาฝนตก หมอกลงจัดหรือมีน้ำค้างมาก ต้องรอให้ฝน

หยุดตกและให้น้ำค้างแห้งก่อนหลังจากติดตาครบกำหนดและเปิดพลาสติกพันตาออกแล้ว ให้ใส่ปุ๋ยได้ตามปกติ อัตราส่วนปุ๋ยสูตร 20-8-20 อัตรา 2 กิโลกรัม ผสมกับน้ำสะอาด 200 ลิตร ใช้บัวรดน้ำตกรดไปตามแถววาง ให้น้ำ ปุ๋ยเต็มปากถุงทุกถุง และหลังจากนั้น 15-45 วัน ให้ตัดต้นเดิมทิ้ง โดยตัดให้เหนือแผ่นตา 2½ นิ้ว และให้รอยตัด เอียงไปด้านหลังแผ่นตาพันธุ์ดี (ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตรจังหวัดระยอง (พืชสวน), 2555)

2.1.5 มาตรฐานต้นยางชำถุง

ต้นยางชำถุงที่มีคุณภาพดี ต้องตรงตามมาตรฐานของกรมวิชาการเกษตรดังนี้

- ขนาดของถุง 4.5" x 14" (วางในแผงราบ) เป็นอย่างน้อยและเจาะรูรอบถุงในจำนวนที่เหมาะสม เพื่อระบายน้ำ
- ดินที่ใช้บรรจุต้องมีลักษณะค่อนข้างเหนียว เพื่อไม่ให้ดินในถุงแตกเมื่อมีการขนย้าย
- ปริมาณดินต่ำกว่าขอบถุง 1 เซนติเมตร และไม่มีวัชพืชในถุง
- ยางชำถุงถูกต้องตรงตามพันธุ์
- ต้องเป็นต้นยางชำถุงที่ติดตาถูกต้องสมบูรณ์ ปราศจากโรคยางทั้งใบ ลำต้นและราก มีความ เจริญเติบโตไม่น้อยกว่า 1 ฉัตร แต่ไม่เกิน 2 ฉัตร
- ต้นยางชำถุงต้องมีใบแก่เต็มที่ และมีความสูงของต้นยางจากรอยแตกตาถึงปลายยอด ไม่น้อยกว่า 20 เซนติเมตร

(สำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง, มปป)

2.2 แบคทีเรียเอนโดไฟติก

แบคทีเรียเอนโดไฟติก เป็นแบคทีเรียที่มีวงชีวิตส่วนหนึ่งหรือทั้งหมดอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตแต่ไม่ ก่อให้เกิดโรคกับพืช (Mei & Flinn, 2010; Hallmann et al., 1997) และสามารถพบได้ทุกส่วนของพืช ได้แก่ ราก ใบ ลำต้น ดอก และผล (Lodewyck et al., 2002) ส่วนใหญ่แล้วพืชชนิดต่างๆจะได้รับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับพืชนั้นๆมาจากสิ่งแวดล้อมในดิน ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะเคลื่อนย้ายอยู่ในดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) และบริเวณผิวรากของพืช (rhizoplane) โดยแบคทีเรียบางส่วนที่เกาะบริเวณผิวรากสามารถ แทรกผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อของรากพืชได้ ซึ่งอาจจะเคลื่อนย้ายไปยังส่วนต่างๆของพืช เช่น ลำต้น ใบ ดอก ผล ทั้งนี้ ความหนาแน่นของประชากรแบคทีเรียจะพบน้อยกว่าในรากและในดินรอบรากพืช (Compant et al., 2010) โดยจากรายงานผลการวิจัยหลายฉบับแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียเอนโดไฟติกมีคุณสมบัติเป็น plant growth promoting (Jha et al., 2013) เช่นเดียวกับแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญอยู่บริเวณดินรอบรากพืช (plant

growth promoting rhizobacteria; PGPR) (Feng et al., 2006) แต่การส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแบคทีเรียเอนโดไฟติกจะให้ผลที่ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่ม PGPR และ แบคทีเรียที่อาศัยที่ผิวราก (root surface) (Chanway et al., 2000)

คุณสมบัติของแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช ได้แก่ การสร้างฮอร์โมนพืชกลุ่มไซโตไคนิน กลุ่มจิบเบอเรลลิน และกลุ่มออกซิน โดยเฉพาะ Indole-3-acetic acid (IAA) ส่งผลให้ปลายยอดและปลายรากเจริญ ทำให้ได้รับสารอาหารจากดินเพิ่มมากขึ้น (Jasim et al., 2013) และแบคทีเรียเอนโดไฟติกสามารถละลายฟอสเฟตในรูปที่ถูกตรึงในดิน (Rashid et al., 2012) ให้อยู่ในรูปของฟอสเฟตอนินทรีย์ (inorganic phosphate; H_2PO_4^-) (Sharma, Gaur & Choudhary, 2013) พืชจึงจะสามารถนำไปใช้ได้

นอกจากนี้แบคทีเรียเอนโดไฟติกบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ เนื่องจากมี nitrogenase subunit gene, *nifH* จึงช่วยให้พืชสามารถเจริญในดินที่มีธาตุไนโตรเจนต่ำได้ดี (Khan & Doty, 2009) รวมถึงแบคทีเรียเอนโดไฟติกบางกลุ่มสร้างสาร siderophore เพื่อจับธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์ในสภาพแวดล้อมที่มีธาตุเหล็กต่ำได้ ธาตุเหล็กเป็นธาตุอาหารรองที่มีความสำคัญกับแบคทีเรียและพืช โดยเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึม (Rachid & Ahmed, 2005) อีกทั้งแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่สร้างสาร siderophore ยังสามารถแย่งจับธาตุเหล็กกับจุลินทรีย์ก่อโรคพืช ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ จึงเป็นการส่งเสริมการเจริญให้กับพืชทางอ้อม (Jasim et al., 2013) ในขณะที่แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งสามารถลดระดับของเอทิลีนที่พืชผลิตขึ้นมาในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น สภาวะแห้งแล้ง ซึ่งเอทิลีนจะทำให้รากพืชชะงักการยืดยาว จึงได้รับสารอาหารน้อยลง พืชจึงเจริญได้ไม่ดี โดยที่แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้ ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำคัญที่พืชใช้ในการผลิตเอทิลีน และย่อยสลายไปเป็นแอมโมเนียและ α - ketobutyrate ทำให้เอทิลีนถูกสร้างน้อยลง (Shahzad et al., 2010) เมื่อปริมาณของ ACC และ เอทิลีนลดลง ส่งผลให้รากพืชมีการยืดยาวต่อไปได้ และทำให้พืชเจริญได้ดีขึ้น (Walpolo and Yoon, 2013)

2.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญในพืช

เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม plant growth promoting bacteria (PGPB) ที่อาศัยอยู่ภายในพืชหรือเรียกอีกชื่อว่าแบคทีเรียเอนโดไฟติก (endophytic bacteria) นั้น เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีศักยภาพในการช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร โดยมีความสามารถในการอยู่ร่วมกับเนื้อเยื่อพืชแบบพึ่งพาซึ่งกันและกัน (symbiosis) และช่วย

ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช แต่อย่างไรก็ตาม กลไกการตอบสนองและการแสดงออกของแบคทีเรียเอนโดไฟติกจะแตกต่างกันตามความจำเพาะของพืชที่ให้อาศัย โดยบางสายพันธุ์จะมีความจำเพาะต่อโฮสต์ บางสายพันธุ์สามารถเข้าอยู่อาศัยในพืชได้หลายชนิด (Long et al., 2008) ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อให้ได้แบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติตามต้องการเพื่อนำไปใช้ได้ตรงตามวัตถุประสงค์ ซึ่งวิธีการคัดเลือกให้ได้ PGPB ที่มีคุณสมบัติตามต้องการมีดังต่อไปนี้

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสาร indole acetic acid (IAA)

ฮอร์โมนพืช เป็นสารที่มีความสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะออกซิน หรือ Indole acetic acid (IAA) จึงได้มีผู้ศึกษาหาแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่อาศัยในพืชชนิดต่างๆและมีคุณสมบัติสร้าง IAA ให้กับพืชได้ ดังเช่น รายงานของ Rashid et al., 2012 โดยทำการทดลองถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 20 μ l ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB medium ที่เติม ทริปโตเฟน 200 μ g/ml และ 500 μ g/ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเชื้อมาปั่นเหวี่ยงและใช้ส่วนใส (supernate) 1 ml ผสมกับ Salkowski's reagent ปริมาตร 4 ml ตามวิธีของ Gordon and Weber (1951) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 535 nm เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของ IAA กับกราฟมาตรฐานสารละลาย IAA บริสุทธิ์ พบว่าเชื้อ *Microbacterium* sp. 3407bBRRJ ซึ่งแยกเชื้อมาจากมะเขือเทศสามารถสร้าง IAA ได้สูงสุด เท่ากับ 88.34 และ 143.34 μ g/ml เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมทริปโตเฟน 200 μ g/ml และ 500 μ g/ml ตามลำดับ ในขณะที่ สุจิตตรา และคณะ, 2556 ทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟติกจากรากข้าว โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 ml บ่มเขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C จากนั้นเมื่อครบ 2 วัน เติมหทริปโตเฟนที่มีความเข้มข้น 200 mM ปริมาตร 125 μ l บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาทดสอบการผลิตออกซินด้วยวิธี Salkowski colouring reagent ตามวิธีของ Fernando et al., 2007 และ Ravikumar et al., 2004 แล้ววัดปริมาณการผลิต ออกซินด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 530 nm พบว่าความสามารถในการผลิตออกซิน อยู่ระหว่าง 8.0-21.9 μ g/ml โดยไอโซเลต KJHSB-12 มีความสามารถในการผลิตออกซินสูงสุด คือ 21.9 μ g/ml ส่วน Zhao et al., 2013 ทดสอบการสร้าง IAA โดยเฉพาะเชื้อ (1×10^8 cfu/mL) ในอาหารเหลว LB medium ที่เติมหทริปโตเฟน 100 μ g/ml บ่มเขย่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนใสมาทำปฏิกิริยากับ Salkowskis reagent ตามวิธีของ Gordon and Weber (1951) ผลการทดลองพบว่า การเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างแบคทีเรียเอนโดไฟติก *Pseudomonas chlororaphis* Zong1 กับ

Mesorhizobium sp. ที่แยกมาจากพืชตระกูลถั่ว พบว่าสร้าง IAA ได้ 63.07 mg/l ซึ่งมากกว่า IAA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อเดี่ยวอย่างมีนัยสำคัญ

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ

ธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารพืชที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากเป็นองค์ประกอบภายในของเซลล์พืช แต่พืชส่วนใหญ่ยังขาดธาตุไนโตรเจนเพราะในดินมีปริมาณไนโตรเจนต่ำ ในขณะที่แหล่งธาตุไนโตรเจนที่สำคัญและมีอยู่มากถึง 78 % คือในบรรยากาศซึ่งอยู่ในรูปก๊าซไนโตรเจน (N_2) ซึ่งพืชไม่สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงจึงต้องอาศัยจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถในการเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่พืชใช้ประโยชน์ได้ผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (Biological nitrogen fixation ; BNF) (Gothwal et al., 2013) ซึ่งเกิดจากการรีดิวซ์ไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนีย โดยใช้เอนไซม์ที่เรียกว่า ไนโตรจีเนส (nitrogenase) โดยแบคทีเรียจะต้องมี nitrogenase subunit gene, *nifH* (Santi et al, 2013) จึงมีผู้ศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ ดังรายงานของ Forchetti et al. (2007) เพาะเลี้ยงเชื้อใน Nitrogen-free base (Nfb) semisolid media บ่มที่ 28°C เป็นเวลา 10 วัน พบว่าสามารถแยกเชื้อที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 8 ไอโซเลท ซึ่งเป็นชนิด *Achromobacter xiloxidans* (หรือ *Alcaligenes* sp.) และ *Bacillus pumilus* นอกจากนี้ยังมีการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ด้วยเทคนิค PCR amplification ของ *nifH* gene ดังผลการทดลองของ Souza et al., 2013 พบ *nifH* gene ดังกล่าวใน 24 ไอโซเลท จาก 102 ไอโซเลท ซึ่งจัดอยู่ในจีนัส *Bacillus*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* และ *Sporolactobacillus* ในขณะที่ Gothwal et al. (2013) คัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง Nitrogen free malate medium ที่มี bromothymol blue (BTB) เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดวงใสรอบๆ โคลนของแบคทีเรียที่มีความสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ เพื่อนำไปศึกษาการตรึงไนโตรเจนเชิงปริมาณต่อไปด้วยวิธี acetylene reduction activity (ARA) assay โดยเพาะเชื้อในอาหารเหลว nitrogen free malate broth บ่มเขย่า 180 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C และ 50°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ดูดสารละลายเชื้อ 5 ml มาใส่ในอาหารเหลวปริมาตร 45 ml บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วถ่ายสารละลายเชื้อดังกล่าว 20 ml ลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อที่ปิดด้วยจุกยาง จากนั้นแทนที่อากาศในหลอดทดลองปริมาตร 3 ml ด้วยก๊าซอะเซทิลีน แล้วบ่มเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดปริมาณก๊าซเอทิลีนที่เกิดขึ้น ตามวิธี ARA ด้วยเครื่อง gas chromatography (Porapak N column, flame ionization detector; FID) พบว่า ไอโซเลท TS-13 ตรวจพบก๊าซเอทิลีนมากที่สุด 8,303 nmoles/24 h

ทดสอบการละลายหินฟอสเฟต

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการมากเป็นอันดับสองรองจากไนโตรเจน แต่ฟอสฟอรัสที่พืชสามารถนำมาใช้ได้ (HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-) มีน้อยมากในดิน เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาการตรึง การตกตะกอนทางเคมีสูง และละลายออกมาได้ยาก พืชจึงไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างเพียงพอ (Jones and Oburger, 2011) ดังนั้นจึงต้องอาศัยแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต (phosphate solubilizing bacteria; PSB) ซึ่งสามารถสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาละลายฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงอยู่ในดิน และหินฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้ ดังเช่น Islam et al., 2006 ได้คัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเชิงคุณภาพ ซึ่งเพาะเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ไม้จิ้มฟันปลดเชื้อเชื้อเข้ามาตะบองอาหารแห้ง National Botanical Research Institute's phosphate (NBRI-P) 4 ไอโซเลทต่อจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 14 วัน และวัดวงไฮรอปโคโลนีและเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเพื่อคำนวณค่า solubilization index ตามวิธีของ Premono et al. (1996) [solubilization index = the ratio of the total diameter (colony + halo zone) to the colony diameter] จากนั้น ศึกษาการละลายฟอสเฟตเชิงปริมาณ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาณ 10^8 - 10^9 CFU/ml ในอาหารเหลว NBRI-P broth medium ปริมาตร 10 ml บ่มเข้าที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (8,000 xg, 15 นาที, 4 °C) แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปกรองผ่านกระดาษกรอง (4.5 µm) และตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัสด้วยวิธี vanado-molybdate colorimetric method พบว่า ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน คือไอโซเลทที่มีวงไฮรอปโคโลนี กว้างบนอาหารแห้ง ทำให้มีค่า solubilization index สูงและจะตรวจพบฟอสฟอรัสในอาหารเหลวมาก โดยที่ *Acinetobacter* sp. BR-25 มีค่า solubilization index เท่ากับ 6.7 และปริมาณฟอสฟอรัส 524 µg/ml เช่นเดียวกันกับ Walpola and Yoon, 2013 ได้ศึกษาเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (1×10^8 CFU/ml) ในอาหารเหลว NBRI-P medium ปริมาตร 200 ml บ่มเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยเก็บตัวอย่าง 10 ml ในวันที่ 2, 5 และ 7 ของการบ่ม แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 15 นาที เพื่อวัดปริมาณฟอสฟอรัสที่ปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี phospho-molybdate blue color method ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในวันที่ 2 ของการบ่มทั้งเชื้อ *Pantoea agglomerans* และ *Burkholderia anthina* มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ มากกว่า 600 g/ml ของ culture filtrate และยังคงมีปริมาณสม่ำเสมอจนถึงวันสุดท้ายของการบ่ม (Walpola and Yoon, 2013; Murphy and Riley, 1962) ในขณะที่ Rout et al., 2013 ดัดแปลงวิธีการศึกษาจาก Nautiyal (1999) โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว yeast extract phosphate salts broth บ่มเขย่า 180 rpm ที่อุณหภูมิห้องและถ่ายเชื้อ 20 µl ที่ปรับค่าความขุ่นที่ $\text{OD}_{600\text{nm}}$ เท่ากับ 0.5 ลง

ในอาหารเหลว National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRI, Nautiyal, 1999) ปริมาตร 20 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (13,000×g, 10 min, 4 °C) วัดปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายในส่วนใสด้วยวิธี Fiske and Subbarow (1925) พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas jessenii* (CIP 105274) และ *Sphingobium amiense* (YT) มีปริมาณฟอสฟอรัสมากที่สุดคือ 13,501 μmol/L และ 6,904 μmol/L ตามลำดับ

2.4 การนำแบคทีเรียเอนโดไฟติกไปใช้ส่งเสริมการเจริญในพืช

การใช้จุลินทรีย์ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเป็นแนวทางที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน เพื่อลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการส่งเสริมการใช้ธาตุอาหารของพืช ช่วยส่งเสริมให้พืชมีสุขภาพที่ดี และยังสามารถปรับปรุงคุณภาพของดินให้ดีขึ้นด้วย (Jeffries et al., 2003 ; Franco-Correa et al., 2010) ปัจจุบันพบมีรายงานงานวิจัยที่ศึกษาแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกหลายกลุ่มเพื่อนำมาใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืชหลากหลายชนิด ตัวอย่างเช่น การแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้นข้าว แล้วนำมาทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญในพืช ได้แก่การสร้างฮอร์โมนพืช การตรึงไนโตรเจน และการละลายฟอสเฟต เพื่อนำไปทดสอบการส่งเสริมการเจริญในต้นกล้าข้าว พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟติกดังกล่าวระบุชนิดเป็น *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* และ *Paenibacillus kribbensis* สามารถช่วยเพิ่มความยาวใบสด ความยาวรากสด น้ำหนักใบแห้ง และน้ำหนักรากแห้งได้ (Ji et al., 2014) นอกจากนี้ยังพบงานวิจัยในลักษณะเดียวกันเช่น การแยกเชื้อและใช้แบคทีเรียเอนโดไฟติกกลุ่ม *Rhizobium* และ *Pseudomonas* spp. เพื่อส่งเสริมการเจริญในต้นถั่ว (*Vigna aconitifolia* L.) (Sharma et al., 2013) เช่นเดียวกันกับการใช้ *Bacillus subtilis* DLA ร่วมในการปลูกถั่ว (*Phaseolus vulgaris* L.) ทำให้เพิ่มปริมาณผลผลิตและการเจริญของต้นถั่วได้ (Lee et al., 2005) ในขณะที่มีการศึกษาใช้ *Klebsiella* sp. และ *Enterobacter* sp. ส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าถั่วเขียว (Jasim et al., 2013) ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟติกกลุ่ม *Pseudomonas* และ *Serratia* สามารถส่งเสริมการเจริญของมะเขือเทศ และ oilseed rape plant (Nejad & Johnson, 2000) นอกจากนี้ *Paenibacillus macerans* สามารถส่งเสริมการเจริญของกล้วยไม้ได้ (Faria et al., 2012) ในขณะที่ *Gluconacetobacter diazotrophicus* VI27 แสดงการส่งเสริมการเจริญในอ้อย (Beneduzi et al., 2012)

นอกจากจะมีการศึกษาการใช้เชื้อเดี่ยวแล้ว ยังมีนักวิจัยศึกษาการใช้เชื้อร่วมของแบคทีเรียเอนโดไฟติกด้วย โดยพบรายงานการวิจัยการใช้เชื้อร่วมระหว่าง *Microbispora* sp. GKU 827 ร่วมกับ *Enterobacter* sp. EN-16 และ *Pantoea* sp. EN-29 ซึ่งแยกได้จากรากอ้อยมาทดสอบการส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดในระดับกระถาง

พบว่ารากและต้นของข้าวโพดมีการเจริญสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับต้นข้าวโพดที่ได้รับด้วยเพียงเชื้อเดี่ยว และต้นที่ไม่ได้รับเชื้อ (วรรัตน์และอรินทิพย์, 2013)

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา พบรายงานการวิจัยส่วนใหญ่ใช้จุลินทรีย์กับยางพาราในด้านของการควบคุมโรคทางชีวภาพ (biocontrol) เช่น ในปีพ.ศ. 2542 นริสาสามารถคัดเลือกแบคทีเรียจากดินในสวนยางพารา ได้แก่ เชื้อ *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิชีวนะควบคุมเชื้อรา *Phytophthora botryose* ได้ ในขณะที่ Piyaboon และคณะ (2013) ใช้เชื้อราเอนโดไฟต์จากรากของต้นยางพาราในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora botryose* สาเหตุโรคใบร่วงในต้นยางพาราได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับเชื้อ *Alcaligenes* sp. และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบร่วงจากเชื้อ *Phytophthora meadii* (Abraham et al., 2013) ได้ แต่ยังไม่มียางพาราถึงการนำจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียเอนโดไฟต์มาใช้ในด้านการส่งเสริมการเจริญของต้นยางพาราทั้งในและต่างประเทศ พบแต่การส่งเสริมการเจริญในต้นยางพาราด้วยเทคนิควิธีอื่นๆ เช่น การใช้ดินที่มีคุณสมบัติและคุณภาพเหมาะสมต่อการเจริญและการให้ผลผลิตน้ำยางของต้นยางพารา (Rao & Jessy, 2007)

2.5 การเตรียมเชื้อและเทคนิคการขยายเชื้อ PGPB

การศึกษาเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ส่งเสริมการเจริญในพืชนั้น มีการเตรียมเชื้อและวิธีการใช้หลากหลาย ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงวิธีการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ส่งเสริมการเจริญในพืช

ชนิดเชื้อ PGPB	ชนิดพืช	วิธีการนำไปใช้กับพืช	วิธีการเตรียมเชื้อ	reference
- <i>Pseudomonas</i> sp. - <i>Bacillus megaterium</i>	Indian mustard	แช่เมล็ดพืชใน bacterial solution ก่อนนำไปปลูก	เตรียมสารละลายแบคทีเรีย ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml	Rajkumar and Freitas (2008)
- <i>Pseudomonas</i> sp. - <i>Bacillus</i> sp.	strawberry	-ราก : ใช้วิธีการจุ่มรากพืชลงใน bacterial solution เป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำไปปลูก -ดอก และใบ : ใช้วิธีการสเปรย์ bacterial	ละลายเชื้อแบคทีเรียในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^9 cfu/ml	Esitken et al., 2010

		solution		
- <i>Pseudomonas chlororaphis</i> - <i>Bacillus megaterium</i>	walnut	ใช้วิธี Syringing method โดยฉีดสารละลายแบคทีเรียเข้าไปในช่วงกลางของรากของพืชที่มีอายุการงอกจากเมล็ด 1 ปี	เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร Nutrient broth ให้เจริญในช่วงระยะ mid-exponential growth จากนั้น dilute ด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^9 cfu/ml ก่อนนำไป treat กับรากพืช	Yu et al., 2012
- <i>Bacillus</i> sp. - <i>Brevibacillus reuszeri</i> - <i>Virgibacillus pantothenicus</i>	Maize	ผสมเชื้อกับเมล็ดพืชเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนนำไปปลูก	เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว (broth) ให้มีอายุ 1 วัน จากนั้นวัด OD 550= 0.1 (10^8 cfu/ml)	Kavamura et al., 2013
- <i>Bacillus megaterium</i> - <i>Enterobacter sakazakii</i> - <i>Pseudomonas putida</i> - <i>Azotobacter vinelandii</i>	Mammilla-ria fraileana (cactus)	ราดสารละลายแบคทีเรียปริมาตร 1ml ลงในกระถางเพาะเมล็ดพืช	เตรียมสารละลายแบคทีเรียใน PBSK ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^9 cfu/ml	Lopez et al., 2012
<i>Pseudomonas putida</i>	cotton	แช่เมล็ดพืชในสารละลายแบคทีเรียเป็นเวลา 6	เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร nutrient	Yao et al., 2010

		ชั่วโมง ก่อนนำไปปลูก	broth บ่ม 30°C, 200rpm, 48hr จากนั้นนำไปปั่น เหวี่ยง ละลาย ตะกอนเซลล์ด้วย น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และวัด OD600 ให้ มีความเข้มข้นเซลล์ 10 ⁹ cfu/ml	
<i>Achromobacter piechaudii</i>	Tomato	ราดสารละลายแบคทีเรีย ลงบนเมล็ดพืชอายุ 2 สัปดาห์	ตะเชื้อจากโคลน เดี่ยวที่เจริญบน อาหาร DF ที่มี ACC มาเลี้ยงใน อาหาร YT บ่ม 250 rpm, 24 ชม. นำมาปั่นแยกเซลล์ 5000g, 10 นาที จากนั้นละลาย ตะกอนเซลล์ด้วย น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และสุดท้ายนำไป วัด OD 600 ให้ได้ ค่าเท่ากับ 1.0	Mayaka et al., 2004
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-monocot <i>Lemna minor</i> (duckweed) -dicot <i>Lactuca sativa</i>	ผสมสารแขวนลอย แบคทีเรียลงในอาหาร เหลวที่เพาะเลี้ยงพืช (hydroponic culture system)	เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ใน broth จากนั้น ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยการปั่นเหวี่ยง และแขวนลอย ตะกอนเซลล์ด้วย	Suzuki et al., 2013

	(lettuce)		น้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้ววัด OD ₆₀₀ ให้ ได้ค่าเท่ากับ 0.3	
- <i>Penibacillus</i> sp. - <i>Microbacterium</i> sp. - <i>Bacillus</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp.	Rice	แช่เมล็ดในสารละลาย แบคทีเรียในอัตราส่วน 20 เมล็ด/10ml	เลี้ยงแบคทีเรียใน อาหารเหลว จากนั้นปรับความ เข้มข้นของเซลล์ ให้ได้ OD ₆₀₀ เท่ากับ 1.0 ด้วยน้ำ กลั่นปลอดเชื้อ	Ji et al., 2014

อย่างไรก็ตาม ในการใช้จุลินทรีย์ในงานวิจัยนั้น สมควรที่จะเลือกสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดี และมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ควรคำนึงถึงการนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่นำไปใช้ทางการเกษตร จะต้องมีประสิทธิภาพ เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้ด้วยตนเอง โดยมีวิธีการเพิ่มจำนวนและวิธีการใช้ไม่ยุ่งยาก ซึ่งรองศาสตราจารย์ ดร.จूरียรัตน์ ลีสมีทธิ์ หัวหน้าโครงการวิจัยด้านทรัพยากรจุลินทรีย์ แนะนำวิธีการเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ประมาณ 100-1,000 เท่า โดยขึ้นอยู่กับชนิดเชื้อและอุณหภูมิภายนอกด้วย (ขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์อย่างง่าย สไตร์ชาวบ้าน-เกษตรทั่วไทย, 2555) เนื่องจากน้ำมะพร้าวมีปริมาณสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการค่อนข้างสูง โดยมี Total carbohydrate 2.32-3.69 g/100 ml และ Total nitrogen 20-60 mg/100 ml นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโน แร่ธาตุ วิตามินและฮอร์โมนอีกด้วย (Vigliar et al., 2006, Sekar et al., 2013) จึงมีการนำน้ำมะพร้าวมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเพาะเลี้ยงเชื้อรา แบคทีเรีย และจุลินทรีย์อื่นๆ (Reyes et al., 2009, Lin & Dianese, 1976, Mauney et al., 1952) ดังเช่น Kongruang (2008) ได้ทดสอบเลี้ยงแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Acetobacter xylinum* สายพันธุ์ TISTR 998, 975 และ 893 เพื่อผลิต bacterial cellulose โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำสับปะรด ซึ่งเมื่อผลิตเชื้อเริ่มต้นโดยเพาะเชื้อปริมาตร 10% ของอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 500 ml ที่มีการเติม 1% yeast extract และ 95% ethanol 14 ml ปรับ pH เท่ากับ 4.75 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5,000 ml แล้วบ่มในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงให้เห็น

เห็นว่า เมื่อตรวจนับเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างกระบวนการหมักพบว่าในระยะ exponential phase แบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้น 10^{11} เท่าจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น (10^{10} เป็น 10^{21} cfu/ml) หลังจากบ่ม 8 วัน ในขณะที่ Sekar และคณะ (2013) ได้ศึกษาการใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต recombinant protein ใน *Escherichia coli* ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยง *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำมะพร้าวเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถวัดค่าความขุ่น (Optical density : OD) ที่ OD_{600nm} ได้เท่ากับ 1.55 ทั้งนี้ อัตราการเจริญของเชื้อจะขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของน้ำมะพร้าวซึ่งแตกต่างกันตามแหล่งที่มาของน้ำมะพร้าว นอกจากนี้หากเติม 25 mM (NH₄)₂SO₄ ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำมะพร้าวจะสามารถเพิ่ม biomass ของ *E. coli* ได้ 2-10 เท่า (Sekar et al., 2013) ในขณะเดียวกัน น้ำมะพร้าวยังจัดเป็น complete growth media สำหรับยีสต์ *Rhodotorula glutinis* (Oloke & Glick, 2006) ด้วย และยังมีรายงานผลการวิจัยพบว่าน้ำมะพร้าวสามารถใช้เป็นวัตถุดิบเสริมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนใน MRS sucrose media เพื่อผลิต exopolysaccharide ของเชื้อ *Lactobacillus confusus* ซึ่งช่วยลดต้นทุนค่าอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Kuntiya et al., 2010) นอกจากนี้ Prabakaran และคณะ (2008) ได้รายงานการใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringiensis* var. israelensis เพื่อผลิตสาร δ endotoxin สำหรับกำจัดยุง โดยเมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง จะได้ Cell mass yield เท่ากับ 3.1g/L และนับสปอร์ได้ 3.4×10^{11} spores/ml

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง เป็นเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกจาก stock culture ของ รศ.ดร. เสาวนิต ทองพิมพ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 415 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้นยางพาราที่แข็งแรง และเปิดกรีดหน้ายางแล้วในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ตรวจสอบความบริสุทธิ์และ viability ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกดังกล่าวซึ่งเก็บอยู่ใน culture collection โดยเฉพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soya Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ยกเว้นแบคทีเรียกลุ่ม actinomycetes บ่มเป็นเวลา 5 วัน เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญในพืช

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกจำนวน 415 ไอโซเลทตามคุณสมบัติดังนี้

3.1.2.1 เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญในพืช

1) ทดสอบการสร้างสาร indole acetic acid (IAA production)

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟติกในการสร้างสาร IAA ด้วย colorimetric method โดยดัดแปลงจากวิธีของ Glickmann & Dessaux (1995) ดังนี้ เลี้ยงเชื้อใน Soyabean Casein Digest Medium (Tryptone Soya Broth; TSB medium) ที่เติม ทริปโตเฟน 200 µg/ml บ่มเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (โดยมีกลุ่มควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำสวอนใส (supernatant) มาเติม Salkowski's reagent ในอัตราส่วน 1:1 บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพู แสดงว่า มีการสร้าง IAA จึงนำไปตรวจปริมาณ IAA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 530 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer เทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA บริสุทธิ์

2) ตรวจสอบการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (Nitrogen fixation)

ตรวจสอบเชิงคุณภาพการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (Stella & Suhaimi, 2010)

เพาะเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติก บนอาหารแข็ง nitrogen-free medium 2 ชนิด คือ Burk's medium (Subba Rao, 1984; Stella & Suhaimi, 2010) และ Ashby's medium (Jack et al. 1953;

Stella & Suhaimi, 2010) ด้วยวิธี point inoculation โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อ บ่มเป็นเวลา 7 วัน และตรวจวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถเจริญบนผิวหน้าอาหารได้ดี ไปทดสอบการตรึงไนโตรเจนเชิงปริมาณต่อไป

ตรวจสอบเชิงปริมาณการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (ดัดแปลงจาก Gothwal et al., 2008)

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง nitrogen free medium จำนวน 27 ไอโซเลท มาเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง TSA medium บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียใน 0.85% Normal saline นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์มาเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลว Burk's medium เพื่อใช้เตรียม inoculum ในหลอดทดลองขนาด 15x150 mm ที่มีอาหารเหลว Burk's medium หรือ Ashby's medium ปริมาตร 5 ml โดยปรับ OD_{600nm} เริ่มต้น เท่ากับ 0.8 บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ inoculum ลงในขวด serum ขนาด 10 ml ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ml โดยปรับ OD_{600nm} เริ่มต้น เท่ากับ 0.2 บ่มสถานะเดิมเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นดูดอากาศภายในขวด serum ออก 0.5 ml (10% v/v) แล้วแทนที่ด้วยแก๊สอะเซทิลีนในปริมาณที่เท่ากัน บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดูดตัวอย่างแก๊สภายในขวด serum มาวัดผลการตรึงไนโตรเจนจากอากาศของแบคทีเรียเอนโดไฟติกด้วยวิธี acetylene reduction assay (Hardy et al., 1968) ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟฟีที่มี hydrogen-flame ionization detector (120°C) และใช้คอลัมน์ชนิด Poropak N (65°C) โดยใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพา (carrier gas) ด้วยอัตรา 40 ml/min และใช้ก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์เป็นตัวเติมเต็ม (makeup gas) การทดลองควบคุม ใช้อาหารเหลว Burk's medium หรือ Ashby's medium ที่ปราศจากจุลินทรีย์ คำนวณประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของก๊าซเอทิลีน

3) ทดสอบการละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilization)

ตรวจสอบเชิงคุณภาพการละลายหินฟอสเฟต

ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง TSA medium มาเพาะเชื้อลงบนอาหารแข็ง modified Pikovskaya (mPVK) medium ที่มีแหล่งฟอสฟอรัสแตกต่างกันคือ Ca₃(PO₄)₂; TCP, FePO₄; IPP และ AlPO₄; APP โดยวิธี point inoculation จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลการละลายฟอสเฟตโดยสังเกตส่วนใสรอบๆโคโลนี วัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและส่วนใสรอบโคโลนีเพื่อคำนวณ solubilization index [ratio of total diameter (colony + halo

zone) / colony diameter] (Mehta & Nautiyal, 2001; Islam, 2006 ; Pikovskaya, 1948) และคัดเลือกไอโซเลทที่มีค่า solubilization index สูง มาศึกษาการละลายฟอสเฟตเชิงปริมาณต่อไป

ตรวจสอบเชิงปริมาณการละลายหินฟอสเฟต

คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟติก จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ EL1A11, EL1A12, EL111, EP122, ER212 และ EP3B3 ซึ่งสร้างโซนใส (halo zone) รอบโคโลนีบนอาหารทดสอบเชิงคุณภาพมาเตรียม suspension ของเชื้อให้มีค่า OD_{600nm} เท่ากับ 2 ใน 0.85% NSS จากนั้นปิเปต suspension ของเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIIP liquid medium ปริมาตร 50 ml โดยปรับ pH เริ่มต้นก่อนฆ่าเชื้อ เท่ากับ pH5 และ pH7 และมี TCP (0.5% (w/v)) เป็นแหล่งฟอสฟอรัส (คัดเลือกจากการตรวจสอบเชิงคุณภาพ) เปรียบเทียบกับหินฟอสเฟต (RP) ขนาด 60 mesh (0.5% (w/v)) โดยปรับค่า OD_{600nm} ของเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0.15 บ่มเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิ 28°C (โดยมีกลุ่มควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ) เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 2, 5 และ 10 ของการบ่ม เพื่อวัดค่า pH จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาตรวจหาปริมาณฟอสเฟตโดยดัดแปลงจากวิธี Fiske and Subbarow (Fiske & Subbarow, 1925; Chaiharu & Lumyong, 2011) โดยนำส่วนใสปริมาตร 500 µl มาทำปฏิกิริยากับ 10%(w/v) trichloroacetic acid จากนั้นเติม color reagent ปริมาตร 4 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 820 nm ด้วยเครื่อง Fluorescence microplate reader รุ่น SpectraMax M5 เทียบกับ Standard curve ของ Potassium dihydrogenphosphate (KH₂PO₄)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล:

ค่าเฉลี่ยที่ได้จากแต่ละการทดลอง นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One Way Analysis of Variance, One Way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.1.2.2 ตรวจสอบการเจริญร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติก

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญในพืช จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท AP6A3 (สามารถสร้างสาร IAA และตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ดี) และ ER212 (สามารถละลาย TCP และหินฟอสเฟตได้) มาทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันโดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อ ใน TSB medium ปรับความขุ่นเริ่มต้นที่ OD_{660 nm} เท่ากับ 0.05 บ่มเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิ 28±2°C โดยศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียเอนโดไฟติกแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

เก็บตัวอย่างสารแขวนลอยเชื้อเพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อโดยวัดความขุ่นที่ OD_{660 nm} และ ทำ dilution plate count ในชั่วโมงที่ 0, 5, 10, 15 และ 25 ของการบ่มเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ (cfu/ml) ที่เพิ่มขึ้นของเชื้อแต่ละไอโซเลท และนำมาคำนวณ specific growth rate (μ) ดังสมการ (Wharfe et al., 2010)

$$\mu = \frac{2.303 (\log OD_2 - \log OD_1)}{t_2 - t_1}$$

แบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญในพืชและเจริญร่วมกันได้ที่คัดเลือกไปใช้ในการทดลองต่อไป มีจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท AP6A3 ซึ่งสามารถผลิต IAA และตรึงไนโตรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ และไอโซเลท ER212 ซึ่งสามารถละลาย TCP และหินฟอสเฟตได้ดี

3.1.3 ทดสอบการเตรียมหัวเชื้อสดของแบคทีเรียเอนโดไฟติกในอาหารเลี้ยงเชื่อน้ำมะพร้าว

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกไอโซเลท AP6A3 และ ER212 ในอาหารเลี้ยงเชื่อน้ำมะพร้าวปลอดเชื้อ (ในกรณีที่เป็น อาจเติมสารอาหารบางอย่างเพื่อเพิ่มการเจริญของเชื้อ ตามการตรวจเอกสาร ข้อ 2.5 หน้า 16) ปริมาตร 100 ml บ่มเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 27 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28°C โดยศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียเอนโดไฟติกในรูปแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมดังนี้

3.1.3.1 แบคทีเรียเอนโดไฟติก ไอโซเลท AP6A3 (ปรับความขุ่นเริ่มต้นที่ OD_{600 nm} เท่ากับ 0.05) ในอาหารเลี้ยงเชื่อน้ำมะพร้าว

3.1.3.2 แบคทีเรียเอนโดไฟติก ไอโซเลท ER212 (ปรับความขุ่นเริ่มต้นที่ OD_{600 nm} เท่ากับ 0.1) ในอาหารเลี้ยงเชื่อน้ำมะพร้าว

3.1.3.3 แบคทีเรียเอนโดไฟติก ไอโซเลท AP6A3 และ ER212 (ปรับความขุ่นเริ่มต้นที่ OD_{600 nm} เท่ากับ 0.05 และ 0.1 ตามลำดับ) ในอาหารเลี้ยงเชื่อน้ำมะพร้าว

ตรวจนับปริมาณเชื้อโดยวัดความขุ่นที่ OD_{600nm} และ dilution plate count (DPC) ที่เวลา 0, 3, 7 และ 24 ชั่วโมง แล้วเลือกเวลาบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของเชื้อแต่ละไอโซเลท $\geq 10^8$ CFU/ml เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.4 ทดสอบการรอดชีวิตในดินและการเพิ่มจำนวนในต้นกล้วยของแบคทีเรียเอนโดไฟติก

นำเมล็ดยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.5% NaOCl นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง (Marques et al., 2010) จากนั้นนำเมล็ดยางพาราเพาะในขุยมะพร้าวรดน้ำให้ชุ่ม บ่มเพื่อให้ได้เมล็ดยางพาราที่งอกแล้วอายุ 1 วัน แล้วดำเนินการดังนี้

3.1.4.1 ขั้นตอนแช่เมล็ด นำมาแช่ในสารต่างๆต่อไปนี้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- (1) สารแขวนลอยไอโซเลท A ที่เจริญอยู่ในน้ำมะพร้าว
- (2) สารแขวนลอยไอโซเลท B ที่เจริญอยู่ในน้ำมะพร้าว

(3) น้ำมะพร้าว

(4) น้ำปอดเชื้อ

จากนั้น ปลุกเมล็ดยางพาราในถุงพลาสติกสีดำที่มีดินปอดเชื้อและอยู่ในโรงเรือน

3.1.4.2 ขั้นตอนการให้สารระหว่างการทดลอง โดยรดน้ำทุกวันวันละ 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) และมีการให้สารกับเมล็ดยางด้วยวิธีเทราดบริเวณส่วนที่งอกของเมล็ดยางหรือโคนต้นกล้า (Faria et al., 2013) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (10^8 cfu/ml) ในวันที่ 7 ของการทดลอง (ตารางที่ 2.1) ทำการทดสอบ 5 ซ้ำๆ ละ 15 ต้น โดยวางแผนการทดลองที่มีแผนแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design ; RCBD) ซึ่งแบ่งการให้สารระหว่างการทดลองตามกรรมวิธีการทดลองดังนี้

(1) ไอโซเลท A

(2) ไอโซเลท B + ดินผสม RP

(3) น้ำมะพร้าว

(4) น้ำมะพร้าว + ดินผสม RP

(5) น้ำปอดเชื้อ

ตารางที่ 3.1 สรุปขั้นตอนการทดลอง

ขั้นตอนการทดลอง	วันที่ทำการทดลอง	กรรมวิธีการทดลอง				หมายเหตุ
1. การแช่เมล็ด	วันที่ 0	(1) ไอโซเลท A	(2) ไอโซเลท B	(3) น้ำมะพร้าว	(4) น้ำปอดเชื้อ	-
2. การให้สารระหว่างทดลอง	วันที่ 7	(1) ไอโซเลท A	(2) ไอโซเลท B + ดินผสม RP	(3) น้ำมะพร้าว (4) น้ำมะพร้าว + ดินผสม RP	(5) น้ำปอดเชื้อ	รดน้ำเช้าและเย็น
	วันที่ 14 และวันที่ 28	-	-	-	-	

การตรวจผล สุ่มเก็บตัวอย่าง 5 ต้นในแต่ละกรรมวิธีเพื่อตรวจการเข้าอาศัยและปริมาณของแบคทีเรียเอนโดไฟติกในเนื้อเยื่อราก (root) และเนื้อเยื่อส่วนเหนือราก (shoot) ของต้นกล้ายางพารา โดยตรวจ

นับแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชด้วยวิธี dilution plate count หลังจากทำการฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นส่วนพืชแล้ว รวมทั้งตรวจการรอดชีวิตของแบคทีเรียเอนโดไฟติกในดินปลูกด้วยวิธี dilution plate count ในวันที่ 7 (ตรวจภายหลังจากการรากเชื้อ 24 ชั่วโมง), 14, 21 และ 28 ของการทดลอง โดยใช้ selective media สำหรับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกทั้ง 2 ไอโซเลท โดยไอโซเลท AP6A3 ใช้ Trypticase soy agar (TSA) ที่เติม 0.1% malachite green และ ไอโซเลท ER212 ใช้ TSA ที่เติม 8% NaCl

และเมื่อสิ้นสุดการทดลองเปรียบเทียบการเจริญของต้นกล้าอย่างทีเหลือจำนวน 12 ต้นต่อซ้ำในแต่ละ treatment ได้แก่ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง จำนวนใบ/ฉัตร พื้นที่ใบ ความสูงของลำต้น ความยาวรอบต้น และความยาวของราก

3.2 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ศูนย์เรียนรู้ยางพารา จังหวัดขอนแก่น

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง เป็นเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกจาก stock culture ของ รศ.ดร. เสาวนิต ทองพิมพ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 415 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ได้แก่ ราก ใบ ก้าน และดอกของต้นยางพาราที่แข็งแรง และเปิดกรีดหน้ายางแล้วในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยประเมินจากลักษณะโคโลนีแล้วคาดว่าน่าจะเป็นกลุ่ม *Bacillus* ราว 90 ไอโซเลท กลุ่ม *Pseudomonas* ราว 150 ไอโซเลท กลุ่มแอคติโนมัยซีทราว 15 ไอโซเลท ที่เหลือเป็นกลุ่มอื่นๆ ประมวล 160 ไอโซเลท

เมื่อเพาะเชื้อและทำ cross streak technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soya Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ยกเว้นแบคทีเรียกลุ่ม actinomycetes บ่มเป็นเวลา 5 วัน พบว่าทุกไอโซเลทยังคงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ จึงได้นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญในพืช

จากการทดสอบเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่แยกได้จากส่วนต่างๆของต้นยางพารา จำนวน 415 ไอโซเลท ในการสร้าง IAA การละลายฟอสเฟต และการตรึงไนโตรเจนจากอากาศทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 แบคทีเรียเอนโดไฟติกซึ่งมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญในพืชที่แยกเชื้อได้จากส่วนต่างๆของต้นยางพารา

Source of isolates	Number of isolates		
	IAA producers	Nitrogen fixers	Phosphate solubilizers
Root	184	139	8
Leave	68	44	4
Petiole	79	37	5
Flower	4	0	0
Total	335	220	17

ตารางที่ 4.2 จำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญในพืช

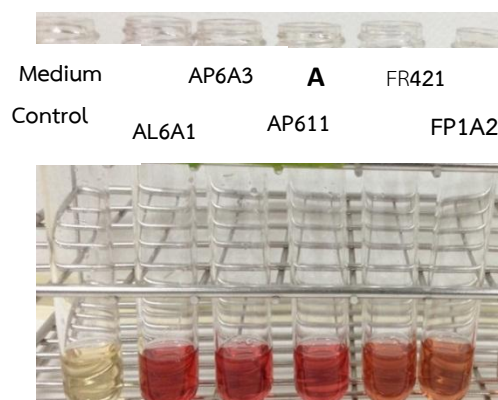
Location	Total Isolates	Number of isolates exhibiting				
		IAA production	Phosphate solubilization			Nitrogen fixation
			Ca ₃ (PO ₄) ₂	FePO ₄	AlPO ₄	
A	58	51	-	-	-	33
B	18	7	-	-	-	16
C	56	38	-	-	-	35
D	13	11	-	-	-	9
E	61	59	11	-	-	42
F	56	42	1	-	-	21
G	153	127	5	-	-	54
Total	415	335	17	0	0	210

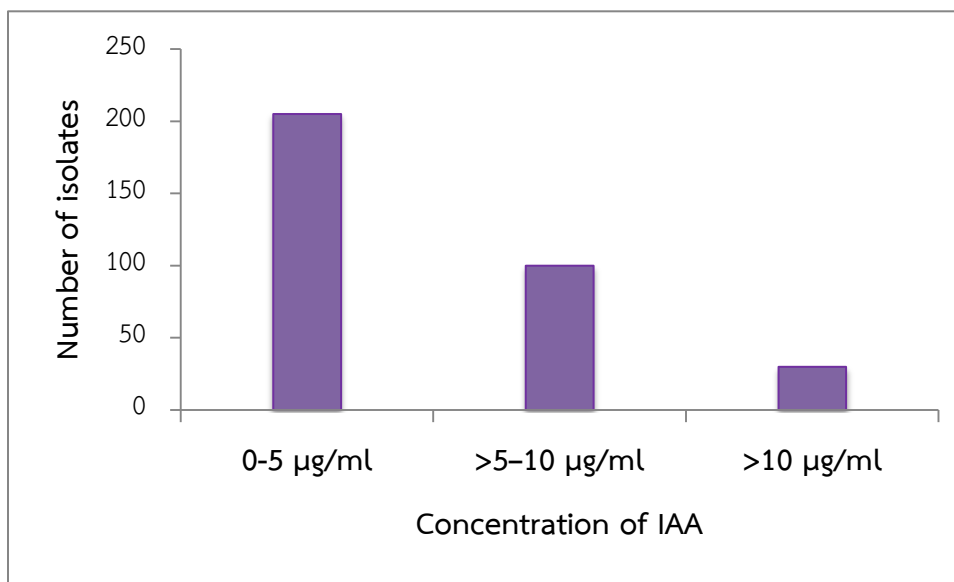
4.2.1 เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญในพืช

1) การสร้างสาร Indole acetic acid (IAA production)

จากการทดสอบการสร้างสาร IAA ของแบคทีเรียเอนโดไฟติก ด้วย Salkowski's reagent แล้วเปลี่ยนเป็นสีชมพู (รูปที่ 4.1) พบว่ามีจำนวน 335 ไอโซเลต (80.7%) ที่สามารถผลิตสาร IAA ได้ และมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.52 - 68.45 µg/ml โดยไอโซเลต AL6A1 ซึ่งแยกเชื้อได้จากใบยางพารา ผลิตสาร IAA มากที่สุด (68.45 µg/ml) รองลงมาคือ ไอโซเลต AP6A3, AP611, FR421 และ FP1A2 ผลิตสาร IAA ได้ 58.39, 49.23, 48.77 และ 45.35 µg/ml ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียเอนโดไฟติกตามความสามารถในการสร้างสาร IAA เป็นสร้าง IAA ได้สูง (>10 µg/ml) กลาง (>5–10 µg/ml) และต่ำ (0–5 µg/ml) (Kukla et al., 2014) แสดงดังรูปที่ 4.2

รูปที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพู หลังจากเติม Salkowski's reagent 30 นาที





รูปที่ 4.2 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่ผลิตสาร IAA (µg/ml)

2) ตรวจสอบการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ

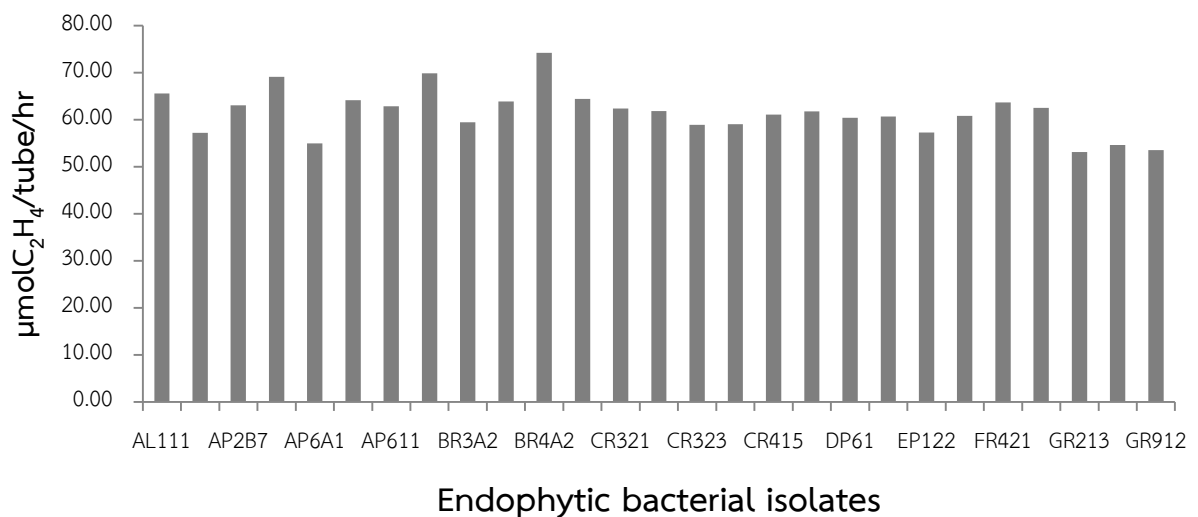
จากการทดลองเพาะเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกจำนวน 415 ไอโซเลทบนอาหารแข็ง nitrogen free medium 2 ชนิด คือ Burk's medium และ Ashby's medium พบว่ามี 220 ไอโซเลท (คิดเป็น 50.6%) ที่สามารถเจริญบนอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนได้ โดยมี 9 ไอโซเลท (4.1%) สามารถเจริญบน Ashby's medium เท่านั้น และอีก 49 ไอโซเลท (22.3%) สามารถเจริญบน Burk's medium เท่านั้น ในขณะที่ 162 ไอโซเลท (73.6%) สามารถเจริญบนอาหารทั้ง 2 ชนิดได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และเมื่อวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่สามารถเจริญบนผิวหน้าอาหาร พบว่ามีขนาดอยู่ระหว่าง 2-20 มิลลิเมตร

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่เจริญได้ดีบนอาหารแข็ง Nitrogen-free medium ที่ให้โคโลนีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 10 มิลลิเมตรขึ้นไป พบว่ามีจำนวน 27 ไอโซเลท นำมาทดสอบการตรึงไนโตรเจนเชิงปริมาณด้วยวิธี acetylene reduction assay พบว่า ไอโซเลท BR4A2 สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงที่สุด เท่ากับ 74.24 µmolC₂H₄/tube/h รองลงมาคือ ไอโซเลท BR3A1, AL512, AL111, BR4A4 และ AP6A3 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 จำนวนไอโซเลทที่เจริญบนอาหารแข็ง nitrogen-free medium

Location of rubber tree plantation	Number of isolates grown on nitrogen-free medium			No growth	Total
	Ashby's medium	Burk's medium	Ashby's & Burk's medium		
มหาวิทยาลัยขอนแก่น	1	5	37	15	58
จ.ขอนแก่น	-	-	16	2	18
จ.ชัยภูมิ	1	8	26	21	56
ศูนย์เรียนรู้ยางพารา จ. ขอนแก่น	-	2	7	4	13
จ.ร้อยเอ็ด	2	13	27	19	61
จ.สกลนคร	2	8	11	35	56
จ.หนองคาย	3	13	38	99	153
Total	9	49	162	195	415

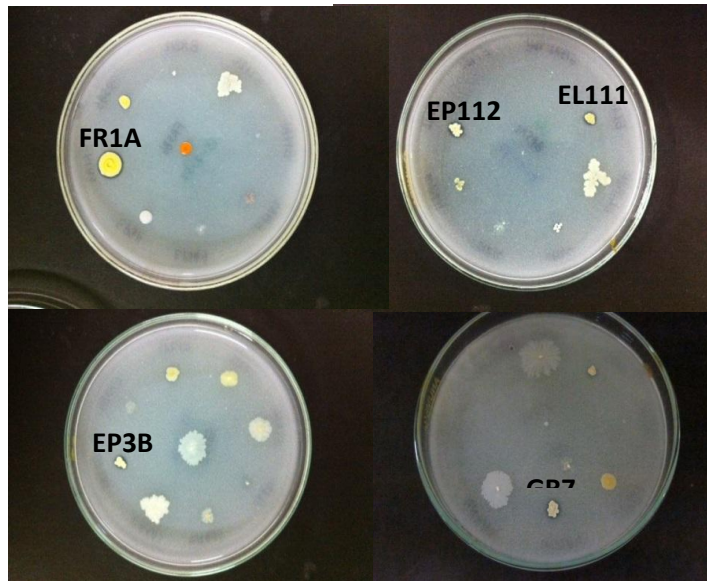
หมายเหตุ No growth; ไม่มีการเจริญบนอาหารทั้ง 2 ชนิด



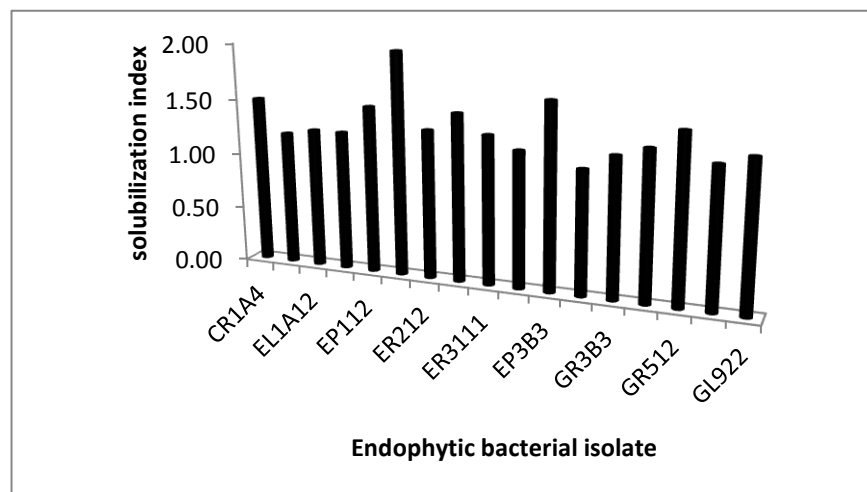
รูปที่ 4.3 การตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟติกตรวจสอบด้วยวิธี acetylene reduction assay

3) ทดสอบการละลายอนินทรีย์ฟอสเฟต

ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟติกจำนวน 415 ไอโซเลทบน mPVK medium ที่มีแหล่งของอนินทรีย์ฟอสเฟตเป็น $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 และ AlPO_4 พบ 17 ไอโซเลทสร้างโซนใสรอบโคโลนีบนอาหารที่มี $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (รูปที่ 4.4) โดยให้ solubilization index ในช่วง 1.1-2 (รูปที่ 4.5) ซึ่งแบคทีเรียเอนโดไฟติกดังกล่าวแยกได้จากใบ 4 ไอโซเลท แยกจากก้าน 6 ไอโซเลท และแยกจากรากมีจำนวนไอโซเลทมากที่สุดคือ 7 ไอโซเลท

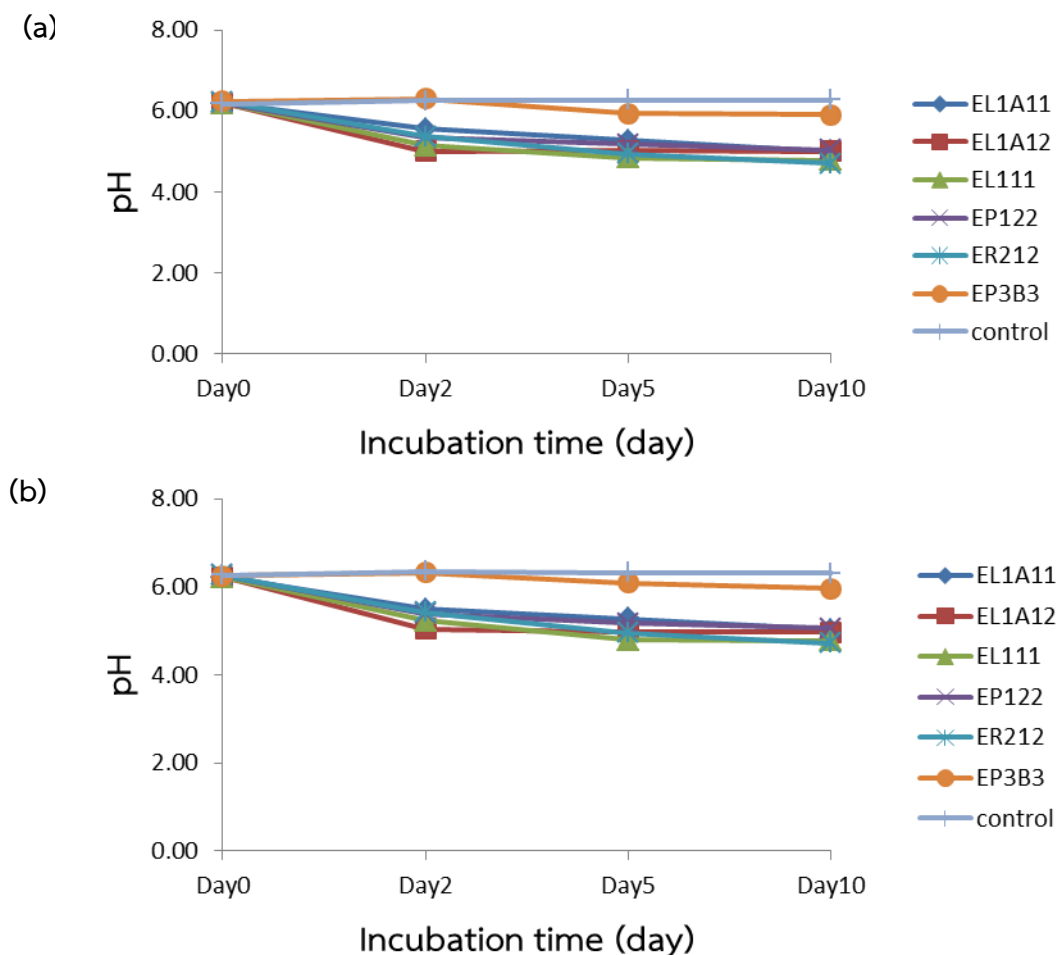


รูปที่ 4.4 ไอโซเลทที่สร้างโซนใสรอบโคโลนีบนอาหาร mPVK medium ที่มี TCP เป็นแหล่งของอนินทรีย์ฟอสเฟต

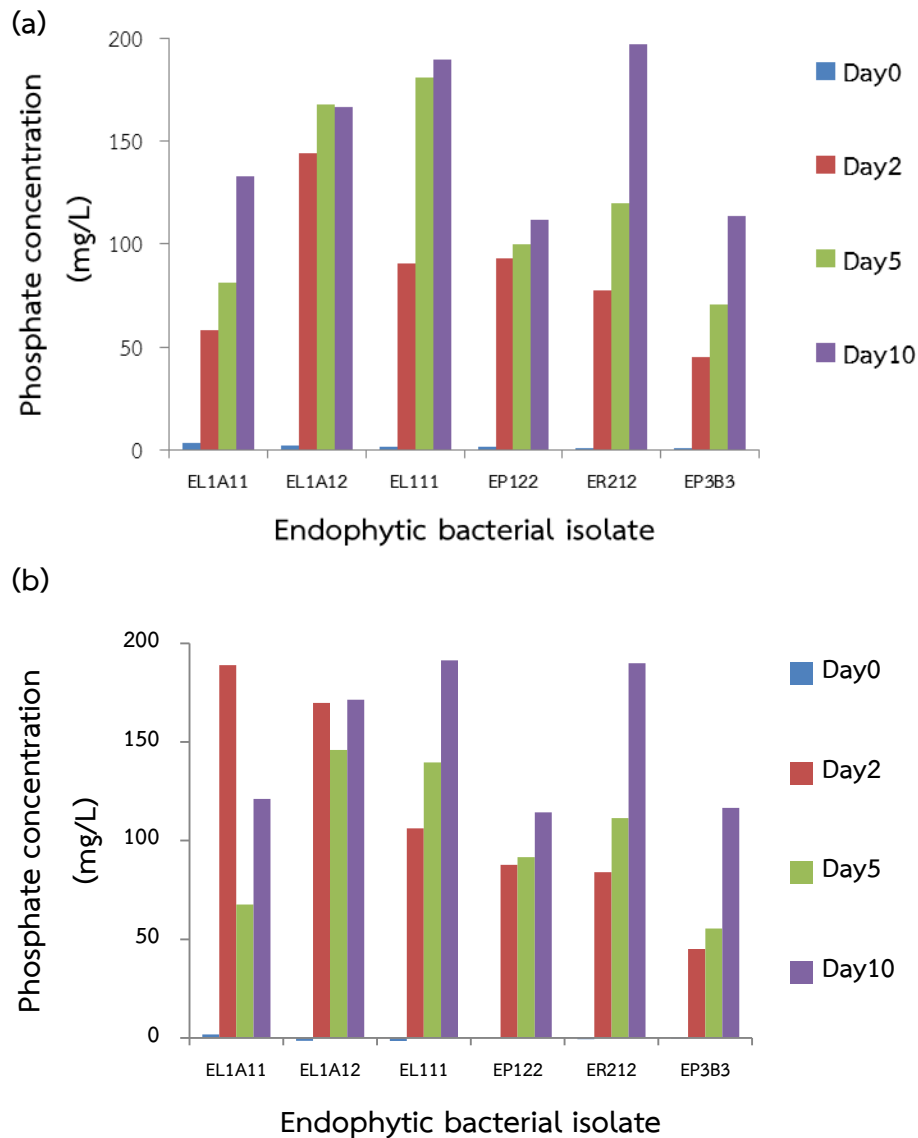


รูปที่ 4.5 ค่า solubilization index ของเชื้อที่สร้างโซนใสรอบโคโลนีบนอาหาร mPVK medium ที่มี TCP เป็นแหล่งของอนินทรีย์ฟอสเฟต

นำเชื้อที่สร้างโซนไลบน mPVK medium ได้กว้างสุดมา 6 ไอโซเลท ได้แก่ EL1A11, EL1A12, EL111, EP122, ER212 และ EP3B3 มาเลี้ยงใน NBRIP liquid medium ที่มี 0.5% (w/v) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ pH และปริมาณฟอสเฟต ในวันที่ 0, 2, 5 และ 10 ของการบ่ม พบว่า NBRIP ทั้งที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 5 และ 7 มี pH ลดลงจากกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.6a และ 4.6b) และมีปริมาณฟอสเฟตเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มนานขึ้น โดยในวันที่ 10 ของการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ pH 5 พบว่าไอโซเลท ER212 ซึ่งแยกได้จากรากยางพาราสารพัดปลูกปล่อยฟอสเฟตได้มากที่สุดคือ 197.01 mg/L รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท EL111, EL1A12, EL1A11, EP3B3 และ EP122 ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท EL111 ซึ่งแยกเชื้อได้จากใบยางพาราสารพัดปลูกปล่อยฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น pH 7 เท่ากับ 191.5 mg/L รองลงมาคือไอโซเลท ER212, EL1A12, EL1A11, EP3B3 และ EP122 (รูปที่ 4.7a และ 4.7b)



รูปที่ 4.6 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP liquid medium ที่มี 0.5% (w/v) TCP เป็นแหล่งฟอสฟอรัส; (a) pH เริ่มต้นเท่ากับ pH 5, (b) pH เริ่มต้นเท่ากับ pH 7



รูปที่ 4.7 ปริมาณฟอสเฟต (mg/L) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP liquid medium ที่มี 0.5% (w/v) TCP เป็นแหล่งฟอสฟอรัส; (a) pH เริ่มต้นเท่ากับ pH5, (b) pH เริ่มต้นเท่ากับ pH7

เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP liquid medium ที่มี 0.5% (w/v) RP เป็นแหล่งฟอสฟอรัส พบว่ามีความเข้มข้นของฟอสเฟต 3.4 – 10.45 mg/L และมีค่า pH ลดลงจากกลุ่มควบคุมเล็กน้อย จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟติกมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตจาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ได้ดีและยังมีความสามารถละลายหินฟอสเฟตได้อีกด้วย

จากการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช สามารถคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในแต่ละด้านดังแสดงในตารางที่ 4.4 จึงทำให้ผู้วิจัยเลือก 2 ไอโซเลทใช้ในการศึกษาต่อไปคือ AP6A3 ซึ่งสร้างสาร IAA และตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ดี และ ER212 ซึ่งละลาย TCP และหินฟอสเฟตได้อีกทั้งเป็นไอโซเลทที่แยกได้จากรากต้นยางพารา ซึ่งน่าจะปรับตัวได้ดีในดินและจำเพาะกับรากของต้นยาง ซึ่งเป็นบริเวณที่สามารถเกิดการละลายอินทรีย์ฟอสเฟตที่ถูกตรึงไว้ในดินได้มีประสิทธิภาพดีที่สุด

ตาราง 4.4 แบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชในแต่ละด้าน

IAA production		Phosphate solubilization*		Nitrogen fixation	
Isolate	µg/ml	Isolate	mg/L	Isolate	µmolC ₂ H ₄ /tube/hr
AL6A1	68.45	ER212	197.01	BR4A2	74.24
AP6A3	58.39	EL111	189.58	BR3A1	69.89
AP611	49.23	EL1A12	166.67	AL512	69.09
FR421	48.77	EL1A11	132.54	AL111	65.56
FP1A2	45.35	EP3B3	113.26	BR4A4	64.40
FR214	33.74	EP122	111.95	AP6A3	64.14

* ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับ pH ก่อนการ autoclave เท่ากับ pH 5

4.2.2 ตรวจสอบการเจริญร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติก

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญในพืช จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท AP6A3 (สามารถสร้างสาร IAA และตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ดี) และ ER212 (สามารถละลาย TCP และหินฟอสเฟตได้) มาทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกัน และตรวจผลโดยวิธี dilution plate count ในช่วงเวลาที่ 0, 5, 10, 15 และ 25 ของการเพาะเลี้ยง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียเอนโดไฟติกแต่ละไอโซเลท มีค่า specific growth rate (μ) ใกล้เคียงกันทั้งในการเลี้ยงเชื้อแบบเชื้อเดี่ยว (Single culture) และแบบเชื้อร่วม (Co-culture) แสดงว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทมีการเจริญเพิ่มจำนวนได้ไม่ช้าจะเลี้ยงเชื้อแบบเชื้อเดี่ยว หรือแบบเชื้อร่วม โดยในการเลี้ยงแบบเชื้อร่วมมีอัตราส่วนประชากรระหว่างทั้งสองไอโซเลทค่อนข้างคงที่ตั้งแต่เริ่มต้นเพาะเลี้ยง (ช่วงเวลาที่ 0) จนถึงช่วงเวลาที่ 25 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟติกทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถเจริญอยู่ด้วยกันได้ดี ดังแสดงในตารางที่ 4.6 นอกจากนี้ยังมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ทำให้

สามารถนับโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเดียวกันได้ โดยไอโซเลท AP6A3 มีลักษณะโคโลนีสีครีม รูปร่างโคโลนีกลม ขอบเรียบ และมีผิวหนานูน ส่วนไอโซเลท ER212 มีโคโลนีกลม สีขาว ขอบเรียบ ผิวหนานูน ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 โคโลนีแบคทีเรียเอนโดไฟติก ไอโซเลทที่คัดเลือก

ตารางที่ 4.5 ค่า specific growth rate (μ) ของแบคทีเรียเอนโดไฟติกเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อรวมใน TSB medium

Isolate	Specific growth rate (μ)	
	Single culture	Co-culture
AP6A3	0.78	0.89
ER212	0.65	0.64

ตารางที่ 4.6 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและอัตราส่วนระหว่างแบคทีเรียเอนโดไฟติกเมื่อเลี้ยงเชื้อร่วมกันใน TSB medium

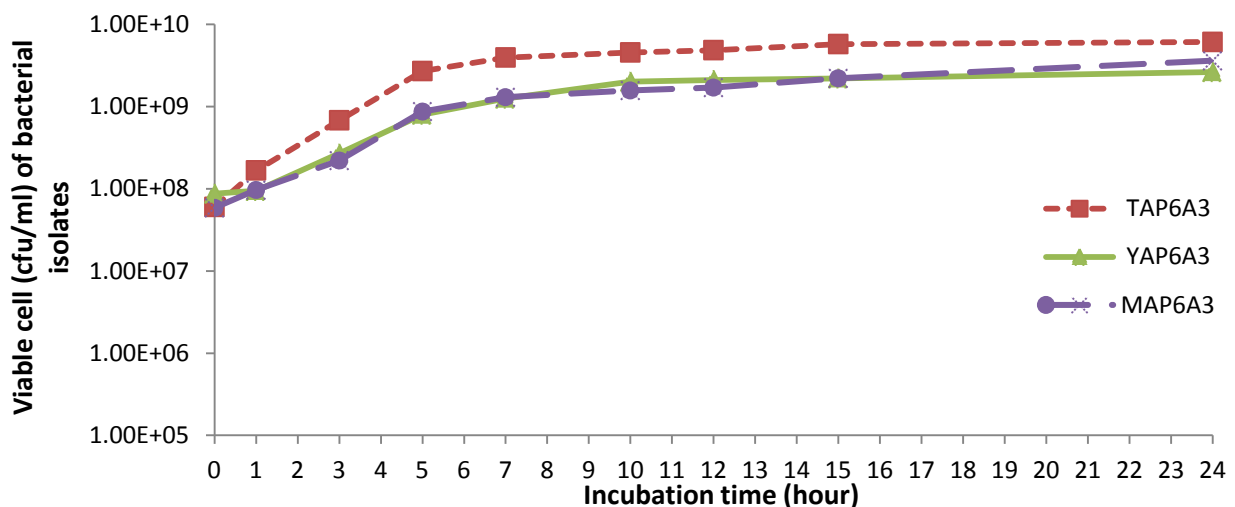
Incubation time (hours)	Viable cell (cfu/ml) of bacterial isolates		Log cfu/ml of bacterial isolates		Ratio of Log cfu/ml AP6A3:ER212
	AP6A3	ER212	AP6A3	ER212	
0	4.5×10^7	9.5×10^6	7.653	6.978	1.10 : 1
5	2.7×10^9	2.3×10^8	9.315	8.362	1.11 : 1
10	2.12×10^9	1.7×10^8	9.326	8.230	1.13 : 1
15	6.5×10^9	1.0×10^8	9.813	8.000	1.23 : 1
25	7.05×10^9	4.0×10^8	9.848	8.602	1.15 : 1

4.3 ทดสอบการเตรียมหัวเชื้อสดของแบคทีเรียเอนโดไฟติกในน้ำมะพร้าว

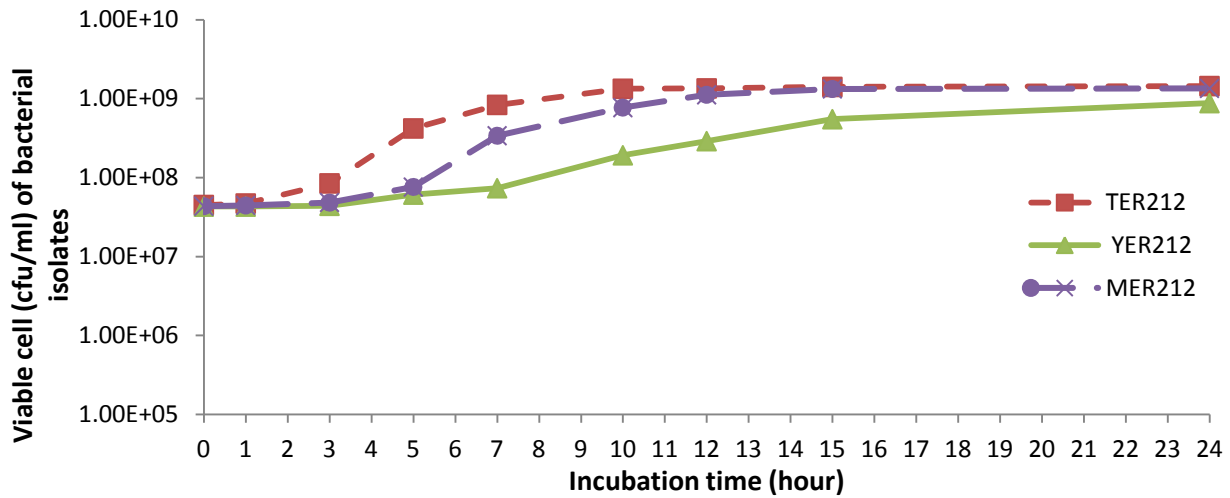
เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อไอโซเลท AP6A3 และ ER212 ในน้ำมะพร้าวอ่อนเปรียบเทียบกับน้ำมะพร้าวแก่และอาหาร Trypticase soy broth (TSB) แบบเชื้อเดี่ยว พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ดีในอาหารทั้ง 3 ชนิด โดยหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณเซลล์ของ AP6A3 สูงถึง 2.6×10^9 cfu/ml และ 3.6×10^9 cfu/ml ในน้ำมะพร้าวอ่อนและ น้ำมะพร้าวแก่ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับเมื่อเพาะเลี้ยงใน TSB medium (6.1×10^9 cfu/ml) ดังรูปที่ 4.9 ในขณะที่สภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกันได้ปริมาณเซลล์ของไอโซเลท ER212 8.8×10^8 cfu/ml และ 1.4×10^9 cfu/ml ในน้ำมะพร้าวอ่อนและน้ำมะพร้าวแก่ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับใน TSB medium (1.4×10^9 cfu/ml) และเมื่อบ่มเชื้อในน้ำมะพร้าวอ่อนต่อถึงชั่วโมงที่ 36 พบว่ามีปริมาณเชื้อ ER212 เพิ่มขึ้นเป็น 1.3×10^9 cfu/ml ดังรูปที่ 4.10

สำหรับการเลี้ยงเชื้อร่วม (co-culture) พบว่าทั้งสองไอโซเลทสามารถเจริญร่วมกันได้ดีในน้ำมะพร้าวทั้ง 2 ชนิดเช่นกัน โดยในชั่วโมงที่ 24 ของการบ่มในน้ำมะพร้าวอ่อน ไอโซเลท AP6A3 มีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 3.8×10^9 cfu/ml และไอโซเลท ER212 มีปริมาณ 1×10^8 cfu/ml ดังรูป 4.11 ซึ่งใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อร่วมในน้ำมะพร้าวแก่ โดยไอโซเลท AP6A3 มีปริมาณ 3.7×10^9 cfu/ml และไอโซเลท ER212 มีปริมาณ 1.4×10^8 cfu/ml ดังรูป 4.12

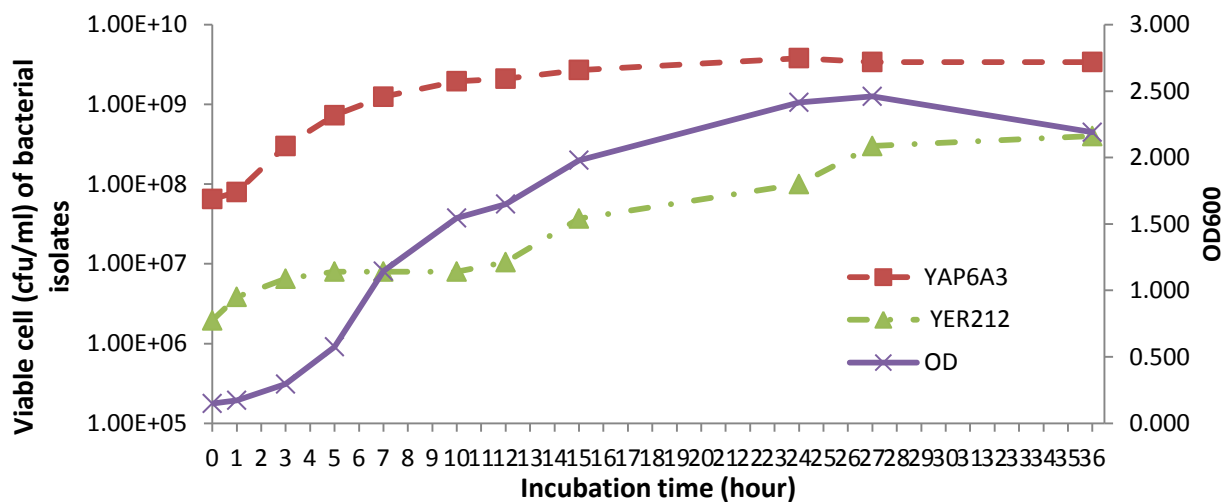
ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกน้ำมะพร้าวแก่มาใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกสำหรับการทดลองต่อไป เนื่องจากให้ปริมาณเซลล์ที่ต้องการ $\geq 10^8$ cfu/ml หาซื้อได้ง่ายและราคาถูกกว่าน้ำมะพร้าวอ่อน



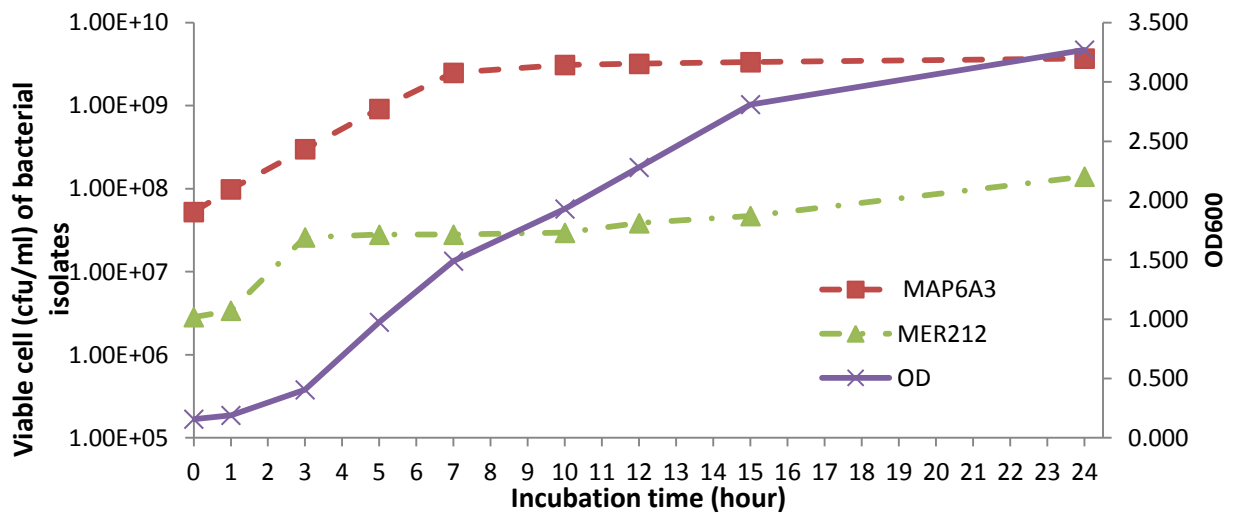
รูปที่ 4.9 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท AP6A3 เมื่อเพาะเลี้ยงใน TSB medium (TAP6A3) ในน้ำมะพร้าวอ่อน (YAP6A3) และในน้ำมะพร้าวแก่ (MAP6A3)



รูปที่ 4.10 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท ER212 เมื่อเพาะเลี้ยงใน TSB medium (TER212) ในน้ำมะพร้าวอ่อน (YER212) และในน้ำมะพร้าวแก่ (MER212)



รูปที่ 4.11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ของเชื้อผสม (mixed cultures) AP6A3 และ ER212 และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท AP6A3 (YAP6A3) และ ER212 (YER212) เมื่อเลี้ยงร่วมกันในน้ำมะพร้าวอ่อน

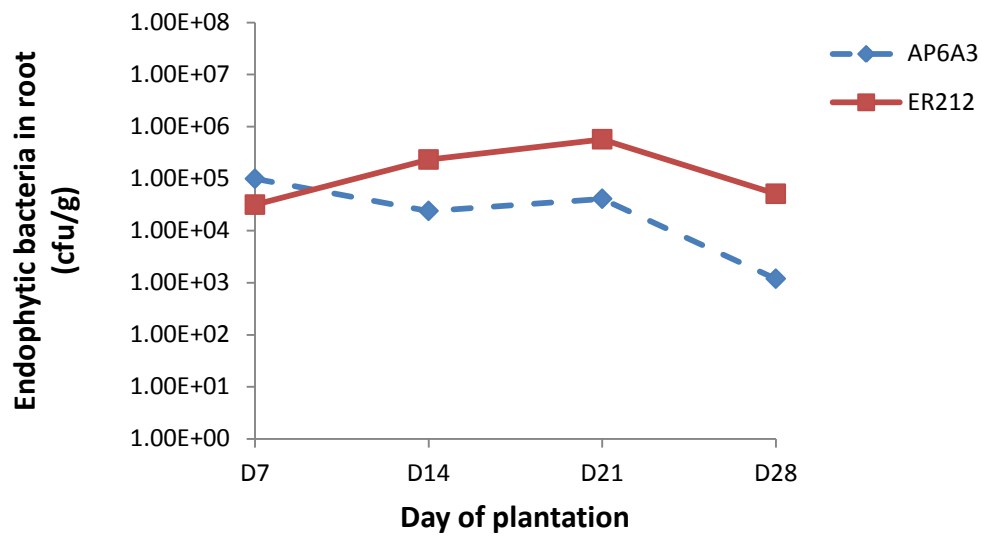


รูปที่ 4.12 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ของเชื้อผสม (mixed cultures) AP6A3 และ ER212 และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท AP6A3 (MAP6A3) และ ER212 (MER212) เมื่อเลี้ยงร่วมกันในน้ำมะพร้าวแก่

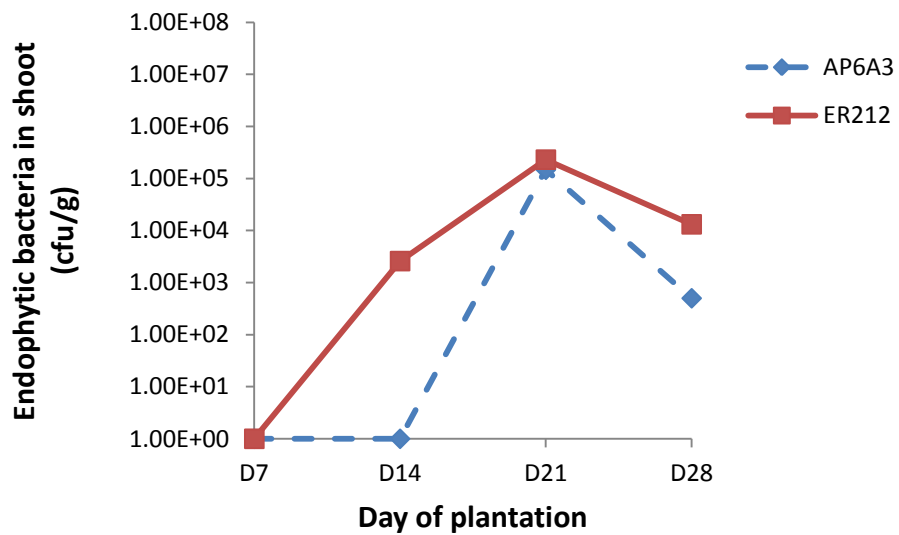
4.4 ตรวจสอบการรอดชีวิตในดินและการเพิ่มจำนวนในต้นกล้าของแบคทีเรียเอนโดไฟติก

จากการแช่เมล็ดยางในสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกไอโซเลท AP6A3 และ ER212 ก่อนปลูกลงดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นรดเชื้อลงดินปลูกอีกครั้งในวันที่ 7 ของการปลูก พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อต้นกล้ายาง ตลอดจนสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ในขณะที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชได้ด้วย โดยตรวจพบปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกันคือไอโซเลท AP6A3 เท่ากับ 9.9×10^4 cfu/g และ ER212 เท่ากับ 3.2×10^4 cfu/g ในเนื้อเยื่อรากตั้งแต่วันที่ 7 ของการปลูก จากนั้นพบปริมาณเซลล์ไอโซเลท AP6A3 อยู่ในช่วง 10^3 - 10^4 cfu/g และปริมาณเซลล์ไอโซเลท ER212 อยู่ในช่วง 10^3 - 10^5 cfu/g ในวันที่ 14-28 ของการปลูก ดังแสดงในรูปที่ 4.13 ส่วนตัวอย่างเนื้อเยื่อเหนือราก ตรวจพบไอโซเลท ER212 วันที่ 14 ของการปลูกซึ่งมีปริมาณเซลล์อยู่ในช่วง 10^3 - 10^5 cfu/g ในขณะที่ตรวจพบไอโซเลท AP6A3 ในเนื้อเยื่อส่วนเหนือลำต้นหลังจากปลูก 21 วัน โดยมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.5×10^5 cfu/g และลดลงเหลือ 5×10^2 cfu/g ในวันที่ 28 ของการปลูก ดังรูปที่ 4.14

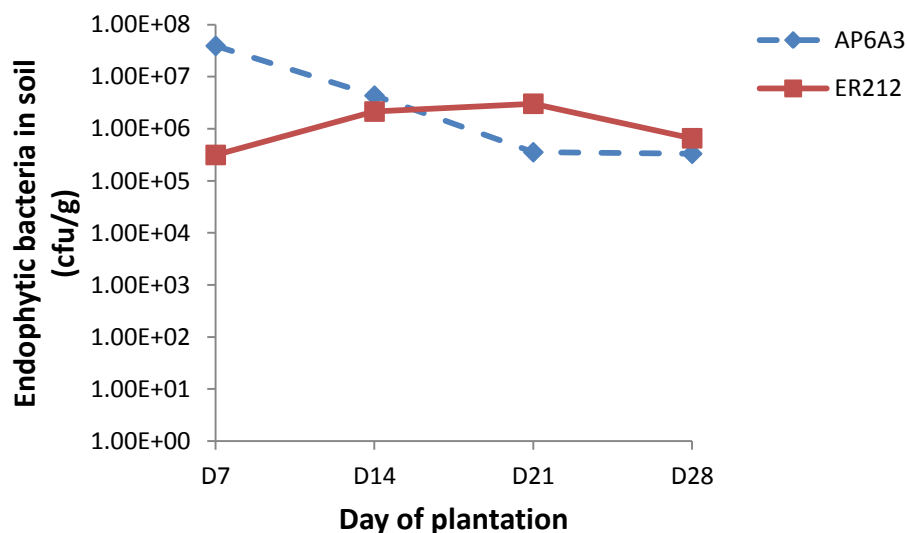
เมื่อตรวจสอบการรอดชีวิตในดินของแบคทีเรียเอนโดไฟติกหลังจากรดเชื้อลงบนดินปลูกในวันที่ 7 ของการปลูก พบว่าสามารถตรวจพบแบคทีเรียเอนโดไฟติกทั้ง 2 ไอโซเลทในดินตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยพบปริมาณเซลล์อยู่ในช่วง 10^5 - 10^6 cfu/g ดังแสดงในรูป 4.15



รูปที่ 4.13 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท AP6A3 และ ER212 ในรากของต้นกล้วย



รูปที่ 4.14 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท AP6A3 และ ER212 ในเนื้อเยื่อส่วนเหนือรากของต้นกล้วย



รูปที่ 4.15 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของไอโซเลท AP6A3 และ ER212 ในดินปลูกต้นกล้วย

เมื่อต้นกล้วยมีอายุครบ 28 วัน จึงตรวจการเจริญของต้นกล้วยพบว่า ต้นกล้วยที่ได้รับสารแขวนลอยเชื้อ AP6A3 มีความสูงลำต้นมากที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับต้นกล้วยที่ได้รับเชื้อ ER212 และต้นกล้วยในกลุ่มควบคุม ในขณะที่เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น พื้นที่ใบ ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นกล้วยที่ได้รับสารแขวนลอยเชื้อ AP6A3 และ ER212 ไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ผลการเจริญของต้นกล้ายางอายุ 28 วัน ที่ได้รับกรรมวิธีที่แตกต่างกัน

Treatment	Growth of rubber seedling					
	Stem height (cm)	Stem diameter (mm)	Leaf area (cm ²)	Root length (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
AP6A3	33.86a	3.16a	85.31a	21.56a	4.67a	1.16a
ER212+RP	31.80b	3.11a	96.74a	21.43a	4.68a	1.16a
Water	23.76c	2.84c	62.06b	12.88c	3.36c	0.74c
CW	24.44c	2.90bc	64.20b	16.78b	3.54c	0.78bc
CW+RP	25.33c	3.02bc	66.73b	18.57b	4.07b	0.92b
Mean	27.84	3.01	75.01	18.24	4.06	0.95
F-test	**	**	**	**	**	**
C.V.(%)	4.24	12.36	16.38	11.39	7.67	12.36

หมายเหตุ CW; Coconut water, RP; Rock phosphate

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติเป็น plant growth promoting ที่แยกเชื้อได้จาก ราก ใบ ก้าน และดอกของต้นยางพาราในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เพื่อนำไปใช้ส่งเสริมการเจริญของต้นกล้ายาง และต้นยางชำถุง เนื่องจากงานวิจัยในปัจจุบันให้ความสนใจมากเกี่ยวกับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชและแบคทีเรียเอนโดไฟติกกลุ่มส่งเสริมการเจริญในพืช (plant growth-promoting endophytes) (Luo et al., 2012; Afzal et al., 2013) ซึ่งสามารถช่วยให้พืชเจริญเติบโตและพัฒนาได้เพราะแบคทีเรียเอนโดไฟติกเหล่านี้สามารถตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟต รวมทั้งผลิตฮอร์โมนพืชได้ (Hardoim et al., 2008; Pacwa-Płociniczak et al., 2011; Rashid et al., 2012; Kukla et al., 2014) ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียเอนโดไฟติกจึงมีความสำคัญอย่างมาก นอกจากจะเพื่อให้เข้าใจบทบาททางนิเวศวิทยาของความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียเอนโดไฟติกกับพืชแล้ว ยังเป็นแนวทางในการนำแบคทีเรียเอนโดไฟติกไปประยุกต์ใช้ โดยเฉพาะในด้านส่งเสริมการเจริญในพืช ซึ่งจะเห็นได้ว่าประโยชน์ของจุลินทรีย์กลุ่มเอนโดไฟต์ที่มีต่อพืชอาศัยนั้นเกิดขึ้นผ่านกลไกที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญในพืชกลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้แบคทีเรียเอนโดไฟติกส่วนใหญ่ยังสามารถมีชีวิตได้ทั้งภายในและภายนอกเนื้อเยื่อของพืช (Kukla et al., 2014) กล่าวคืออาจมีช่วงชีวิตทั้งหมดหรือบางส่วนของวงจรชีวิตอาศัยอยู่ในหรือระหว่างเซลล์พืชได้โดยไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช (Hallmann et al., 1997, Bacon and White, 2000; Long et al., 2008; Ngamau et al., 2014) แต่เป็นการทำให้แบคทีเรียเอนโดไฟติกอยู่ใกล้ชิดและสามารถส่งสารที่เป็นประโยชน์กับเซลล์พืชได้โดยตรง

5.1 แบคทีเรียเอนโดไฟติกที่สร้างสาร Indole acetic acid (IAA)

สาร IAA ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ช่วยกระตุ้นการเจริญของพืชโดยเฉพาะที่ปลายยอดและปลายราก ทำให้พืชดูดสารอาหารจากดินได้มากขึ้น (Jasim et al., 2013) มีรายงานการสร้างสาร IAA จากจุลินทรีย์หลายกลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียในดิน (soil bacteria) แบคทีเรียที่อาศัยบริเวณผิวภายนอกพืช (epiphytic bacteria) และแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเซลล์พืช (endophytic bacteria) (Patten and Glick, 1996) งานวิจัยในครั้งนี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่ผลิตสาร IAA ได้ 68.45-52.0 $\mu\text{g/ml}$ โดยไอโซเลท AL6A1 ซึ่งแยกเชื้อได้จากใบยางพารา สามารถผลิตสาร IAA ความเข้มข้นสูงได้ (68.45 $\mu\text{g/ml}$) ใกล้เคียงกับรายงานของ Rashid et al., 2012 ซึ่งพบว่าเชื้อ *Microbacterium* sp. 3407bBRRJ ที่แยกเชื้อมาจากมะเขือเทศสามารถสร้าง IAA ได้สูงสุด เท่ากับ

88.34 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ สุจิตตรา และคณะ (2556) พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟติกจากรากข้าว มีความสามารถในการผลิตออกซิน อยู่ระหว่าง 8.0-21.9 $\mu\text{g/ml}$ โดยไอโซเลต KJHSB-12 มีความสามารถในการผลิตออกซินสูงสุด คือ 21.9 $\mu\text{g/ml}$ ส่วน Zhao และคณะ (2013) พบว่า การเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างแบคทีเรียเอนโดไฟติก *Pseudomonas chlororaphis* Zong1 กับ *Mesorhizobium* sp. ที่แยกมาจากพืชตระกูลถั่ว พบว่าสร้าง IAA ได้ 63.07 mg/l ซึ่งมากกว่า IAA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อเดี่ยวอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับ Prasad & Dagar (2014) ซึ่งแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกจากผลไม้และทดสอบการสาร IAA พบว่า ไอโซเลต SA3 สร้างสาร IAA ได้มากที่สุด 54.83 $\mu\text{g/ml}$ และ Khalifa & Almalki (2014) ได้ศึกษาแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกจากปมรากของถั่วอัลฟาลฟา (*Medicago sativa*) เพื่อนำมาทดสอบการสร้างสาร IAA พบว่า *Bacillus megaterium* BMN1 ผลิต IAA ได้ 51 $\mu\text{g/ml}$

5.2 แบคทีเรียเอนโดไฟติกที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (Nitrogen fixation)

ความสามารถในการรีดิวซ์อะเซทิลีนของจุลินทรีย์ เป็นการวัดการตรึงไนโตรเจนทางอ้อม ซึ่งนอกจากจะมีความจำเพาะในการติดตามการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสแล้วยังบ่งบอกถึงศักยภาพของการตรึงไนโตรเจนได้อีกด้วย (Andrade et al., 1997; Park et al., 2005) ดังนั้น acetylene reduction assay จึงเป็นวิธีที่สำคัญในการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ถึง 74.24 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{tube/h}$ ได้แก่ไอโซเลต BR4A2 ซึ่งแยกจากรากต้นยางพารา ในขณะที่ Gothwal และคณะ ((2013 คัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและศึกษาการตรึงไนโตรเจนเชิงปริมาณด้วยวิธี acetylene reduction activity (ARA) assay พบว่า ไอโซเลต TS-13 ตรวจพบก๊าซเอทิลีนมากที่สุด 8.303 $\mu\text{moles/ 24h}$ ในขณะที่ Quecine และคณะ (2012) พบว่าเชื้อ *Pantoea agglomerans* 33.1 ซึ่งแยกมาจาก *Eucalyptus grandis* สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 0.03 nmol ethylene /h

5.3 แบคทีเรียเอนโดไฟติกที่ละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilization)

ในการตรวจสอบการละลายฟอสเฟตเชิงคุณภาพโดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกบนอาหารแข็งที่มีแหล่งอินทรีย์ฟอสเฟตเป็น TCP นั้นพบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟติก 17 ไอโซเลตสามารถผลิตกรดออกมาย่อย TCP ทำให้เกิดส่วนใสรอบๆโคโลนี เมื่อคำนวณค่า SI พบว่าอยู่ในช่วง 1.1-2 ซึ่งการศึกษานอาหารแข็งอย่างเดียวยังไม่น่าเชื่อถือเท่าที่ควร (Johri et. al., 1999) ดังนั้นจึงได้ทดสอบการละลายฟอสเฟตในเชิงปริมาณด้วย โดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติก 6 ไอโซเลต ได้แก่ EL1A11, EL1A12, EL111, EP122, ER212 และ

EP3B3 มาเลี้ยงใน NBRIP liquid medium ที่มี 0.5% (w/v) TCP เป็นแหล่งอนินทรีย์ฟอสเฟต พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพสูงในการละลาย TCP ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับ pH 5 และ pH 7 ซึ่ง ไอโซเลท EL1A11, EL1A12 และ EL111 แยกได้จากใบยางพารา ส่วนไอโซเลท EP122 และ EP3B3 แยกได้จากก้านยางพารา ในขณะที่ไอโซเลท ER212 แยกได้จากรากต้นยางพารา แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่อาศัยอยู่ในพืชสามารถเคลื่อนย้ายจากรากซึ่งเป็นบริเวณเข้าสู่พืชครั้งแรกไปยังส่วนต่างๆของพืชได้ (Mei & Flinn, 2010) ซึ่ง Rashid et al. (2012) ได้ทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของมะเขือเทศนั้นเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่แท้จริงโดยวิธี re-inoculation และ re-test พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟติกดังกล่าวยังสามารถเข้าอาศัยและเพิ่มจำนวนได้ในเนื้อเยื่อมะเขือเทศ

นอกจากนี้งานวิจัยในครั้งนี่ยังเป็นครั้งแรกที่มีการทดสอบการละลายฟอสเฟตโดยปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนฆ่าเชื้อเท่ากับ pH 5 เนื่องจากมีรายงานก่อนหน้านี้ประกอบกับผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างดินปลูกยางในพื้นที่ตะวันออกเฉียงเหนือในบางพื้นที่มาตรวจวัดค่า pH พบว่ามี pH 4-5.5 ซึ่งค่า pH ของดินปลูกยางมีผลต่อการละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตและการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่คัดเลือก สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ที่ pH ดังกล่าว และยังสามารถสร้างกรดออกมาย่อย TCP และปลดปล่อยฟอสเฟตออกมาได้ซึ่งข้อมูลนี้มีความสำคัญต่อการนำแบคทีเรียเอนโดไฟติกไปใช้กับต้นยางพาราอย่างยิ่งสำหรับการทดลองที่ใช้หินฟอสเฟตเป็นแหล่งของอนินทรีย์ฟอสเฟตนั้น พบว่ามีการปลดปล่อยฟอสเฟตออกมาได้น้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องจากหินฟอสเฟตมีสมบัติเป็นเบสค่อนข้างสูง ซึ่งจากการทดลองเติมหินฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณเท่ากับสูตรอาหารที่เติม TCP (0.5%, w/v) พบว่าการปรับ pH เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ pH 5 และ pH 7 นั้นทำได้ยาก ในธรรมชาติหินฟอสเฟตละลายได้ช้ามากอยู่แล้ว ดังนั้นจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียเอนโดไฟติกที่คัดเลือกมีความสามารถในการละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตจาก TCP ได้ดีและยังมีความสามารถละลายหินฟอสเฟตได้อีกด้วย

5.4 การเจริญร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติก 2 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืช จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท AP6A3 (สร้างสาร IAA และตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ดี) และ ER212 (ละลาย TCP และหินฟอสเฟตได้) ได้นำมาตรวจสอบการเจริญร่วมกัน พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถเจริญร่วมกันได้ดี และได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตปริมาณสูงทั้ง 2 ไอโซเลท ซึ่งเหมาะสมที่จะนำไปใช้ส่งเสริมการเจริญของพืชต่อไป

5.5 การเตรียมหัวเชื้อสดของแบคทีเรียเอนโดไฟติกในน้ำมะพร้าว

แบคทีเรียเอนโดไฟติกไอโซเลท AP6A3 และ ER212 สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนในน้ำมะพร้าวอ่อนและน้ำมะพร้าวแก่ได้ความเข้มข้นของเซลล์ตามต้องการคือ $\geq 10^8$ cfu/ml ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมะพร้าวอ่อนและน้ำมะพร้าวแก่มีปริมาณสารอาหารที่จำเป็นเพียงพอสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย จากการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ในน้ำมะพร้าว ด้วยวิธี Sulfuric Acid–UV method (Albalasmeh et al., 2013) พบว่ามีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำมะพร้าวอ่อนและน้ำมะพร้าวแก่ เท่ากับ 80.15 mg/ml และ 41.62 mg/ml ตามลำดับ โดยน้ำตาลที่พบในน้ำมะพร้าวส่วนใหญ่ได้แก่กลูโคส ฟรักโทส และซูโครส (Yong et al., 2009) โดยแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและแหล่งของพลังงานในการเจริญ ซึ่งมีรายงานถึงการวิเคราะห์น้ำมะพร้าวว่าประกอบด้วย Total carbohydrate 2.32-3.69 g/100 ml และ Total nitrogen 20-60 mg/100 ml นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโน แร่ธาตุ วิตามินและฮอริโมน (Vigliar et al., 2006, Sekar et al., 2013) ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกน้ำมะพร้าวแก่มาใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกสำหรับการทดลองต่อไป เนื่องจากให้ปริมาณเซลล์ที่ต้องการคือ $\geq 10^8$ cfu/ml อีกทั้งหาซื้อง่ายและราคาถูก จัดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ ซึ่งเหมาะสมที่เกษตรกรจะนำไปประยุกต์ใช้ผลิตหัวเชื้อสดต่อไป

5.6 การรอดชีวิตในดินและการเพิ่มจำนวนในต้นกล้วยของแบคทีเรียเอนโดไฟติก

จากการทดสอบปลูกต้นกล้วยโดยแช่เมล็ดยางในสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกไอโซเลท AP6A3 และ ER212 และมีการรดสารแขวนลอยเชื้อลงบนดินบริเวณโคนต้นในวันที่ 7 ของการปลูก พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟติกทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถเข้าอาศัยและเพิ่มจำนวนในต้นกล้วยได้ดี (10^3 - 10^5 cfu/g fresh weight) โดยสามารถตรวจพบเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทจากเนื้อเยื่อส่วนรากและส่วนเหนือรากของต้นกล้วยที่ได้รับการให้เชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดสามารถเข้าอาศัยทางรูเปิดของเมล็ด เพิ่มจำนวนและแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ในระหว่างที่ต้นกล้วยเจริญเติบโต (systemic distribution) โดยไอโซเลท AP6A3 และ ER212 มีแนวโน้มช่วยเพิ่มความสูงลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น พื้นที่ใบ ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นกล้วยได้มากกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Falcao และคณะ (2014) พบว่า *Bacillus subtilis* ALB629 ซึ่งแยกได้จากต้น cacao สุขภาพดี สามารถเข้าอาศัย ในราก ลำต้น ใบ ใบเลี้ยง และปลายยอดของต้นกล้า cacao หลังจากแช่เมล็ดในสารแขวนลอยเชื้อของไอโซเลท ALB629 ก่อนนำไปปลูก และยังช่วยส่งเสริมการเจริญของราก ความสูงลำต้น และพื้นที่ใบของต้นกล้าได้อีกด้วย Hallmann (2001) อธิบายว่าแบคทีเรียบางส่วนที่เกาะบริเวณผิวรากสามารถแทรกผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อของรากพืชได้ และอาจเคลื่อนย้ายไปยังส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ลำต้น ใบ ดอก ผล และอาจเพิ่มจำนวนประชากรแบคทีเรียได้ถึง 10^5 - 10^7 cfu/g fresh weight เมื่อแบคทีเรียเอนโดไฟติกสามารถเข้าอาศัยในพืชได้แล้ว มักจะมีผลกระทบที่

เป็นประโยชน์ได้แก่การส่งเสริมการเจริญในพืช ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Paz และคณะ (2012) ที่ได้ศึกษาเชื้อ *Bacillus* sp. EUC10 ที่แยกได้จากยูคาลิปตัส พบว่าเชื้อช่วยเพิ่มการเจริญของรากและส่วนเหนือรากของต้นยูคาลิปตัสลูกผสม (*Eucalyptus urograndis*) ได้ ทั้งนี้ การที่ต้นพืชมีพื้นที่ใบมากขึ้น ช่วยให้พืชมีการสังเคราะห์ด้วยแสงมากขึ้นด้วย และเมื่อมีระบบรากที่สมบูรณ์ก็จะช่วยให้พืชสามารถเข้าถึงน้ำและแร่ธาตุในดินได้มาก ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตได้ดี (Leite et al., 2013) อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ตรวจผลการเจริญของต้นกล้าอายุ 28 วัน ซึ่งต้นกล้าอาจจะใช้อาหารสำรองในเมล็ดในการเจริญร่วมด้วย ดังนั้น ในการศึกษาการส่งเสริมการเจริญในต้นกล้าอาจต้องเพิ่มระยะเวลาในการปลูกมากขึ้น เมื่อตรวจการรอดชีวิตในดินของแบคทีเรียเอนโดไฟติกหลังจากรดเชื้อลงบนดินปลูกในวันที่ 7 ของการปลูก พบว่าสามารถตรวจพบแบคทีเรียเอนโดไฟติกทั้ง 2 ไอโซเลทในดินตลอดระยะเวลาการทดลอง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากแบคทีเรียสามารถเจริญแข่งกันกับจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในดิน และสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพทางกายภาพของดินปลูก ได้แก่ อนุภาคดินแบบดินเหนียวปนดินร่วน และมีค่า pH ประมาณ 5.2 ได้

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติก (endophytic bacteria) ซึ่งแยกได้จากต้นยางพาราที่แข็งแรงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่มีคุณสมบัติเป็น plant growth promoting bacteria (PGPB) เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ายางและต้นยางชำถุงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟติกจำนวน 415 ไอโซเลท มี 335 ไอโซเลท (80.7%) ที่สามารถผลิตสาร IAA ได้ ให้ความเข้มข้นของ IAA อยู่ในช่วง 68.45 - 0.52 $\mu\text{g/ml}$ โดยไอโซเลท AL6A1 ซึ่งแยกได้จากใบยางพารา ผลิตสาร IAA มากที่สุด (68.45 $\mu\text{g/ml}$) รองลงมาคือ ไอโซเลท AP6A3, AP611, FR421 และ FP1A2 ผลิตสาร IAA ได้ 58.39, 49.23, 48.77 และ 45.35 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เมื่อทดสอบการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ พบว่ามี 220 ไอโซเลท คิดเป็น 50.6% ที่สามารถเจริญบนอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนได้ จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีตั้งแต่ 10 mm ขึ้นไป ซึ่งมีจำนวน 27 ไอโซเลท มาทดสอบการตรึงไนโตรเจนเชิงปริมาณด้วยวิธี acetylene reduction assay พบว่า ไอโซเลท BR4A2 สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงที่สุด เท่ากับ 74.24 $\mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{tube/h}$ รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท BR3A1, AL512, AL111, BR4A4 และ AP6A3 ตามลำดับ อีกคุณสมบัติหนึ่งที่ใช้คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟติกคือการละลายอินทรีย์ฟอสเฟต พบ 17 ไอโซเลทที่สร้างโซนใส (halo zone) รอบโคโลนีบนอาหารที่มี TCP เป็นแหล่งอินทรีย์ฟอสเฟต โดยให้ค่า solubilization index อยู่ในช่วง 1.1-2 จากนั้นคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติก 6 ไอโซเลท ได้แก่ EL1A11, EL1A12, EL111, EP122, ER212 และ EP3B3

มาเลี้ยงใน NBRIP liquid medium ที่มี 0.5% (w/v) TCP เป็นแหล่งอนินทรีย์ฟอสเฟต พบว่าไอโซเลท ER212 ซึ่งแยกได้จากรากของต้นยางพาราสามารถปลดปล่อยฟอสเฟตได้มากที่สุด 197.01 mg/L

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกจำนวน 2 ไอโซเลท คือ AP6A3 (สร้างสาร IAA และ ตรึงไนโตรเจนได้สูง) และ ER212 (ละลายฟอสเฟตได้ดี) โดยทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถเจริญร่วมกันได้ และเจริญได้ดีในน้ำมะพร้าวอ่อนและน้ำมะพร้าวแก่ โดยให้ปริมาณเซลล์ $\geq 10^8$ cfu/ml เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดสอบในโรงเรือน พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในดินและในเมล็ดยางได้ โดยสามารถรอดชีวิตในดินและเพิ่มจำนวนถึง 10^5 - 10^6 cfu/g ในขณะที่เดียวกันยังสามารถเข้าอาศัยและเพิ่มจำนวนในต้นกล้ายางได้ นอกจากนี้ไอโซเลท AP6A3 และ ER212 ยังเป็น plant growth promoter ช่วยส่งเสริมการเจริญในต้นกล้ายาง โดยช่วยเพิ่มความสูงลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น พื้นที่ใบ ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นกล้ายางได้มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารอ้างอิง

- กิจกรรมยางพารา งานศึกษาและพัฒนาเกษตรกรรม ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดสกลนคร. (2555). **คู่มือการปลูกยางพารา**. กรุงเทพฯ; มูฟเม้นท์ เจนทรี จำกัด.
- วรรัตน์ เครือสุวรรณ และ อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต. (2013). สมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชจากแอคติโนมัยสิทธิ์และแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกจากอ้อยและการส่งเสริมการเจริญของข้าวโพด. การประชุมวิชาการ พันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18. *Thai Journal of Genetics*. 5(1): 423.
- นริสา จันทรเรือง. (2542). การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora botryosa* ของยางพาราโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต วิทยาศาสตร์ (โรคพืชวิทยา) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นุชนารถ กังพิศดาร, มนัชญา รัตนโชติ, ปุธิตา เปรมกระสิน, ธมลวรรณ ชิวรัมย์, ลาวัลย์ จันทรอัมพร และอนันต์ ทองภู. (2556). การพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการธาตุอาหารพืชสำหรับยางพาราเฉพาะพื้นที่. กรุงเทพฯ; โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. (2555). **เอกสารวิชาการ ข้อมูลยางพารา 2555**. กรุงเทพฯ; โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- สำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (มปป.). การคัดเลือกต้นยางชำถุงเพื่อใช้ปลูกสร้างสวนยาง. **ข่าวกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง**, 44(163): 1.
- สุจิตตรา ปะนันโต, ภาควัฒิ ตันเตชสาธิต, ศิริลักษณ์ จิตรอักษร, รังสฤษฎี กาวีตะ และ กรรณิการ์ สัจจาพันธ์. (2556). เอนโดไฟต์แบคทีเรียและผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว. **แก่นเกษตร**. 41(4): 457-468.
- Abraham, A., Philip, S., Jacob, C.K. & Jayachandran, K. (2013). Novel bacterial endophytes from *Hevea brasiliensis* as biocontrol agent against *Phytophthora* leaf fall disease. **Biological Control**. 58(5), 675-684.
- Afzal, M., Khan, S., Iqbal, S., Mirza, M.S. & Khan, Q.M. (2013). Inoculation method affects colonization and activity of Burkholderia phytofirmans PsJN during phytoremediation of diesel-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 85: 331-336.
- Andrade, G., Esteban, E., Velasco, L., Maria, J.L., Bedmar, E.J., 1997. Isolation and identification of N₂-fixing microorganisms from the rhizosphere of *Capparis spinosa* (L.). *Plant and Soil* 197, 19-23.
- Bacon, C.W., White, J.F. (2000). **Microbial endophytes**, Marcel Dekker, New York.

- Beneduzia, A., Moreirab, F., Costab, P.B., Vargasa, L.K., Lisboaa, B.B., Favreto, R, Baldanic, J.I. & Passaglia, L.M.P. (2013). Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**. 63: 94–104.
- Canbolat, M.Y., Bilen, S., Çakmakçı, R., Şahin, F. & Aydın, A. (2006). Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. **Biology and Fertility of Soils**. 42: 350–357.
- Chaihar, M. & Lumyong, S. (2011). Screening and Optimization of Indole-3-Acetic Acid Production and Phosphate Solubilization from Rhizobacteria Aimed at Improving Plant Growth. **Current Microbiology**. 62: 173–181.
- Chanway, C.P., M. Shishido, J. Nairn, S.S. Jungwirth, J. Markham, G. Xiao, and F.B. Holl. (2000). Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**. 133, 81-88.
- Compant, S., Clément, C. & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants : Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**. 42: 669-678.
- Edi Premono, M., Moawad, A.M. & Vlek, P.L.G. (1996). Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. Indones. **Journal of Agronomy and Crop Science**. 11: 13-23.
- Esitken, A., Yildiz, H.E., Ercisli, S., Donmez, M.F., Turan, M. & Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. **Scientia Horticulturae**. 124: 62–66.
- Falcao, L.L., Silva-Werneck, J.O., Vilarinho, B.R., da Silva, J.P., Pomella, A.W.V. & Marcellino, L.H. (2014). Antimicrobial and plant growth-promoting properties of the cacao endophyte *Bacillus subtilis* ALB629. **Journal of Applied Microbiology**. 116: 1584-1592.
- Faria, D.C., Dias, A.C.F., Melo, I.S., Costa, F.E.D.C. (2013). Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 29:217–221.

- Feng, Y., D. Shen, and W. Song. (2006). Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. **Journal of Applied Microbiology**. 100: 938-945.
- Fernando, L.W.R., Quadros, P.D., F. A. Camargo, O. & Triplett, E.W. (2007). Screening of diazotrophic bacteria *Azopirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 23: 1377-1383.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y. (1925). A colorimetric determination of phosphorus. **The Journal of Biological Chemistry**. 66: 375–400.
- Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D. & Abdala, G. (2007). Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 76:1145–1152.
- Franco-Correa, M., A. Quintana, C. Duque, C. Suarez, M.X. Rodríguez, and J.M. Barea. 2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. **Applied Soil Ecology**. 45: 209–217.
- Glickmann, E. & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environment Microbiology**. 61(2): 793–796.
- Gordon, S.A., Weber, R.P., 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**. 26: 192–195.
- Gothwal, R.K., Nigam, V.K., Mohan, M.K., Sasmal, D. & Ghosh, P. (2008). Screening of nitrogen fixers from rhizospheric bacterial isolates associated with important desert plants. **Applied Ecology and Environmental**. 6(2): 101-109.
- Gupta, G., Panwar, J. & Jha, P.N. (2013). Natural occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*, a dominant cultivable diazotrophic endophytic bacterium colonizing *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. **Applied Soil Ecology**. 64: 252–261.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. & Kloepper, J.W.. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**. 43: 895–914.

- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Elsas, J.D., 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**. 10 (16), 463–471.
- Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E. K. & Burns, R.C. (1968). The Acetylene - Ethylene Assay for N₂ Fixation: Laboratory and Field Evaluation. **Plant Physiology**. 43: 1185-1207.
- Islam, Md. T., Deora, A., Hashidoko, Y., Rahman, A., Ito, T. & Tahara, S. (2007). Isolation and Identification of potential phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of *oryzae sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh. **Z Natureforsch**. 62: 103–110.
- Jack, W.N., Wilson, P.W. and Burris, R.H.(1953). Direct demonstration of ammonia as an intermediate in nitrogen fixation by *Azotobacter*. **Journal of Biological Chemistry**. 204: 445–451
- Jasim, B., Jimtha, J.C., Jyothis, M. & Radhakrishnan, K.E. (2013). Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*. **Plant Growth Regulation**. 71(1): 1-11.
- Jha, N.P., Gupta, G., Jha, P. & Mehrotra, R. (2013). Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: A potential gateway to sustainable agriculture. **Greener Journal of Agricultural Sciences**. 3(2): 73-84.
- Ji, S.H., Gururani, M.A. & Chun, S.C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**. 169: 83– 98.
- Jia, S.H., Gururanib, M.A. & Chun S.C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**. 169: 83– 98.
- Jones ,D.L & Oburger, E. (2011). **Solubilization of phosphorus by soil microorganism . In EK Buenemann, A Oberson, E Frossard, eds, Phosphorus in Action**. Springer, New York, 169–198.
- Kavamura, V.N., Santos, S.N., Silva, J.L.D., Parma, M.M., Ávila, L.A., Visconti, A., Zucchi , T.D., Taketani, R.G., Andreote, F.D. & Melo, I.S.D. (2013). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**. 168: 183–191.
- Khalifa, A.Y.Z. & Almalki, M.A. (2014). Isolation and characterization of an endophytic bacterium, *Bacillus megaterium* BMN1, associated with root-nodules of *Medicago sativa* L.

- growing in Al-Ahsaa region, Saudi Arabia. **Annals of Microbiology**. DOI 10.1007/s13213-014-0946-4
- Khan, Z. & Doty, L.S. (2009). Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. **Plant and Soil**. 32: 197–207.
- Kongruang, S. (2008). Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* Strains from Agricultural Waste Products. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 148:245–256.
- Kukla, M., Płociniczak, T. & Piotrowska-Seget, Z. (2014). Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. **Chemosphere**. 117: 40–46.
- Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., Techapun, C., Sasaki, K. & Seesuriyachan, P. (2010). Influence of pH, sucrose concentration and agitation speed on exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* using coconut water as a raw material substitute. **The International Journal of Science & Technology**. 4: 318 –330.
- Lee, K.D., Bai, Y., Smith, D., Han, H.S., Supanjani. (2005). Isolation of plant-growth-promoting endophytic bacteria from bean nodules. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**., 1: 232-236.
- Leite, H.A., Silva, A.B., Gomes, F.P., Gramacho, K.P., Faria, J.C., de Souza, J.T. & Loguercio, L.L. (2013). *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 97: 2639–2651.
- Li, J.H., Wang, E.T., Chen, W.F. & Chen, W.X. (2008). Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Helongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**. 40: 238–246.
- Lin, M.T., Dianese, J.C. (1976). A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **The American Phytopathological Society**. 66: 1466–1469.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R.B. , Taghavi, S., Mezgeay, M. & Lelie, D.V.D. (2002). Endophytic bacteria and their potential application. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 21(6): 583-606.

- Long, H., Schmidt, D. & Baldwin, I. (2008) Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. **PLOS ONE**. 3(7): 1-10: e2702.
- Lopez, B.R., Ojanguren, C.T., Bacilio, M., Mendozac, A. & Bashana, Y. (2012). Endophytic bacteria of the rock-dwelling cactus *Mammillaria fraileana* affect plant growth and mobilization of elements from rocks. **Environmental and Experimental Botany**. 81: 26–36.
- Luo, S., Xu, T., Chen, L., Chen, J., Rao, Ch., Xiao, X., Wan, Y., Zeng, G., Long, F., Liu, Ch., Liu, Y. (2012). Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1745–1753.
- Marques, A.P.G.C., Pires, C., Moreira, H., Rangel, A.O.S.S. & Castro, P.M.L. (2010). Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. **Soil Biology and Biochemistry**. 42: 1229-1235.
- Mauney, J.R., Hillman, W.S., Miller, C.O., Skoog, F., Clayton, R.A. & Strong, F.M. (1952). Bioassay, purification and properties of a growth factor from coconut. **Physiologia Plantarum**. 5: 485 – 497.
- Mayaka, S., Tirosh, T. & Glick, B.R. (2004). Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. **Plant Science**. 166: 525–530.
- Mehta, S. & Nautiyal, C.S. (2001). An efficient method for screening phosphate solubilization bacteria. **Current Microbiology**. 43: 57–58.
- Mei, C. & Flinn, M.S. 2010. The Use of Beneficial Microbial Endophytes for Plant Biomass and Stress Tolerance Improvement. **Recent Patents on Biotechnology**. 4, 81-95.
- Murphy, J. & Riley, J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**. 27: 31-36.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**. 170: 265 – 270 .
- Naveed, M., Mitter, B., Yousaf, S., Pastar, M., Afzal, M. & Sessitsch, A. (2014). The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of

- plant beneficial traits and colonization characteristics. **Biology and Fertility of Soils.** 50(2): 249-262.
- Nejad, P. & Johnson, P. A. (2000). Endophytic bacteria Induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. **Biological Control.** 1: 208–215.
- Ngamau, C.N., Matiru, V.N., Tani, A. & Muthuri, C.W. (2014). Potential use of endophytic bacteria as biofertilizer for sustainable banana (*Musa* spp.) production. **African Journal of Horticultural Science.** 8:1-11.
- Nico, M., Ribaud, C.M., Gori, J.I., Cantore, M.L. & Curá, J.A. (2012). Uptake of phosphate and promotion of vegetative growth in glucose-exuding rice plants (*Oryza sativa*) inoculated with plant growth-promoting bacteria. **Applied Soil Ecology.** 61: 190– 195.
- Oloke, J.K. & Glick, B.R. (2006). Expression of melanin and insecticidal protein from *Rhodotorula glutinis* in *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology.** 5: 327– 332.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S., (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences.** 12: 633–654.
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., Sa, T. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiological Research.** 160: 127—133.
- Patten, C.L., Glick, B.R., 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology.** 42: 207–220.
- Paz, I.C., Santin, R.C., Guimaraes, A.M., Rosa, O.P., Dias, A.C., Quecine, M.C., Azevedo, J.L. & Matsumura, A.T. (2012). Eucalyptus growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. **Genetics and Molecular Research.** 11: 3711–3720.
- Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. **Mikrobiologiya.** 17: 362–370.
- Piyaboon, O., Thunyamada, S., Numsiripongpan, W., Pattayanan, K., Wattanagetkul, M., Ophawatanasina, T., Tantithama, N. & Upala, W. (2013). Application of endophytic fungi from para rubber tree as high ability in inhibitors of against *Phytophthora botryosa*, the pathogen of leaf-fall disease in para rubber tree. **Journal of Agricultural Technology.** 9(5): 1179-1187.

- Prabakaran, G., Hoti, S.L., Manonmani, A.M. & Balaraman, K. (2008). Coconut water as a cheap source for the production of δ endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis, a mosquito control agent. **Acta Tropica**. 105:35– 38.
- Prasad, M.P. & Dagar, S., (2014). Identification and characterization of Endophytic bacteria from fruits like Avacado and Black grapes. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**. 3(8): 937-947.
- Qin, S., Zhang, Y.J., Yuan, B., Xu, P.Y., Xing, K., Wang, J. & Jiang, J.H. (2013). Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. **Plant and Soil**. 374(1-2), 753-766.
- Quecine, M.C., Araújo, W.L., Rossetto, P.B., Ferreira, A., Tsui, S., Lacava, P.T., Mondin, M., Azevedo, J.L., & Pizzirani-Kleiner, A.A. Sugarcane Growth Promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**. 78(21): 7511–7518.
- Rachid, D. & Ahmed, B. (2005). Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Biotechnology**. 4(7): 697-702.
- Rajkumar, M. & Freitas, H. (2008). Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. **Bioresource Technology**. 99: 3491–3498.
- Rao, D.V.K.N. & Jessy, M.D. (2007). Impact of effective soil volume on growth and yield of rubber (*Hevea brasiliensis*). **Geoderma**. 141: 332–340.
- Rashid, S., Charles, C.T. & Glick, R.B. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. **Applied Soil Ecology**. 61: 217– 224.
- Ravikumara, S., Kathiresan, K., Ignatiammal, S.T.M., Selvama, M.B. & Shanthya, S. (2004). Nitrogen-fixing azotobacters from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 312: 5-17.
- Reiter, B., Pfeifer, U., Schwab, H., Sessitsch, A. (2002). Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**. 68: 2261–2268.
- Reyes, R.G., Graßl, W. & Rau, U. (2009). Coconut water as a novel culture medium for the biotechnological production of Schizophyllan. **Journal of Nature Studies**. 7(2).

- Rout, M.E., Chrzanowski, T.H., Westlie, T.K., Deluca, T.H., Callaway, R.M. & Holben, W.E. (2013). Bacterial endophytes enhance competition by invasive plants. **American Journal of Botany**. 100(9): 1726–1737.
- Santi, C., Bogusz, D. & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-Legume plants. **Annals of Botany**. 111: 743–767.
- Sekar, N., Veetil, S.K. & Neerathilingam, M. (2013). Tender coconut water an economical growth medium for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**. 13: 70.
- Shahzad, S.M, A. Khalid, M. Arshad & Kalil-ur-Rehman. (2010). Screening rhizobacteria containing ACCdeaminase for growth promotion of chickpea seedlings under axenic conditions. **Soil and Environment**. 29(1): 38-46.
- Sharma, S., Gaur, R.K. & Choudhary, D.K. (2013). Solubilization of inorganic phosphate (Pi) and plant growth-promotion (PGP) activities by root-nodule bacteria isolated from cultivated legume, mothbean (*Vigna aconitifolia* L.) of the Great Indian Thar desert. **Research Journal of Biotechnology**. 8(3): 4-10.
- Souza, S.A., Xavier, A.A., Costa, M.R., Cardoso, A.M.S., Pereira, M.C.T. & Nietzsche, S. (2013). Endophytic bacterial diversity in banana ‘Prata Anã’ (*Musa* spp.) roots. **Genetics and Molecular Biology**. 36(2): 252-264.
- Stella, M. & Suhaimi, M. (2010). Selection of suitable growth medium for free-living diazotrophs isolated from compost. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**. 38(2) : 211–219.
- Subba Rao, N.S. (1984). **Biofertilizers in agriculture**. New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co.
- Suzuki, W., Sugawara, M., Miwa, K. & Morikawa, M. (2014). Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa* (lettuce). **Journal of Bioscience and Bioengineering**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.007>
- Tapias, D.R., Galván, A.M., Díaz, S.P., Obando, M., Rivera, D. & Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). **Applied Soil Ecology**. 61: 264– 272.

- Vigliar, R., Sdepanian, V.L. & Fagundes, N.U. (2006). Biochemical profile of coconut water from coconut palms planted in an inland region. **Jornal de Pediatria**. 82: 308 – 312.
- Walpol, B.C. & Yoon, M-H. (2013). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorous uptake. **African Journal of Microbiology Research**. 7(3): 266-275.
- Wharfe, E.S., Winder, C.L., Jarvis, R.M. & Goodacre, R. (2010). Monitoring the effects of chiral & pharmaceuticals on aquatic microorganisms by metabolic fingerprinting. *Applied and Environment Microbiology*. 76(7): 2075-2085.
- Yao, L., Wu, Z., Zheng, Y., Kaleem, I. & Li, C. (2010). Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. **European Journal of Soil Biology** 46: 49-54.
- Yu, X., Liu, X., Zhu, T.H., Liu, G.H. & Mao, C. (2012). Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. **European Journal of Soil Biology**. 50: 112-117.
- Zhao, L.F., Xu, Y.J., Ma, Z.Q., Deng, Z.S., Shan, C.J. & Wei, G.H. (2013). Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic *Pseudomonas chlororaphis* strain Zong1 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. **Brazilian Journal of Microbiology**. 44(2): 629-637.
- ขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์อย่างง่าย สไตล์ชาวบ้าน-เกษตรทั่วไทย. (24 มีนาคม 2555). **เดลินิวส์**. (ออนไลน์). สืบค้นเมื่อวันที่ 20 กันยายน 2556, จาก <http://www.dailynews.co.th/agriculture/18614>
- จำลอง จิตต์หาญ, บรรเลง จันทร์วาววม, จุมพล ผึ้งผดุง, ธนัท แอ้วสกุลทอง และ ชานินทร์ หิมมะ (2550). **คู่มือการปลูก บำรุงรักษา และเก็บเกี่ยวผลผลิตยางพารา ขององค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ ฉบับปี พ.ศ. 2550**. (ออนไลน์). สืบค้นเมื่อวันที่ 25 กันยายน 2556, จาก <http://www.fio.co.th/south/Acrobat/fio-rubber-replanting50.pdf>
- ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตรจังหวัดระยอง (พืชสวน). (2557). **การขยายพันธุ์ยาง**. (ออนไลน์). สืบค้นเมื่อวันที่ 10 กุมภาพันธ์ 2557, จาก www.aopdh02.doae.go.th_yangpara

ภาคผนวก

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญในต้นกล้วยและต้นยางชำถุง

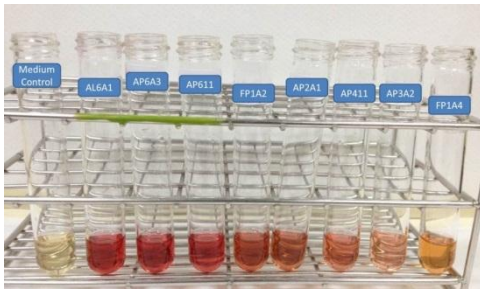
รศ.ดร. เสาวนิต ทองพิมพ์ นางสาวกุลวดี คตชนะเลขา และรศ.ดร. วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

แบคทีเรียเอนโดไฟติก เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรคหรืออันตรายต่อพืชนั้นๆ จากการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติเป็น plant growth promoting bacteria (PGPB) ได้แก่ การสร้างสาร IAA การตรึงไนโตรเจนในอากาศ และการละลายอินทรีย์ฟอสเฟต พบว่า ไอโซเลท AP6A3 และ ER212 สามารถเข้าอาศัยและเพิ่มจำนวนในต้นกล้วยได้ อีกทั้งเชื้อยังช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นกล้วยได้อีกด้วย เนื่องจาก ไอโซเลท AP6A3 สามารถผลิตฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน ซึ่งเป็นตัวช่วยกระตุ้นเซลล์พืชให้เจริญขยายขนาดขึ้น ทำให้ปลายยอดและปลายรากพืชเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังตรึงไนโตรเจนในอากาศให้กลายเป็นแหล่งไนโตรเจนที่พืชนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ทำให้พืชมีสีเขียวและแข็งแรง ส่วนไอโซเลท ER212 สามารถช่วยละลายสาร อินทรีย์ฟอสเฟตที่ถูกตรึงอยู่ในดิน ซึ่งเป็นแหล่งฟอสฟอรัสที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยตรงได้ โดยฟอสฟอรัสมีความสำคัญต่อการแบ่งเซลล์ และการสร้างเซลล์ในพืช ช่วยในการเจริญเติบโตของราก ทำให้ต้นยางที่ได้รับเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท มีความสูงลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น พื้นที่ใบ ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้นแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่เป็น PGPB จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับการนำไปใช้เพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมีในต้นกล้วยและต้นยางชำถุงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่ประสบปัญหาการขาดแคลนต้นยางชำถุงที่ได้มาตรฐาน อันเนื่องมาจากต้นกล้วยเจริญเติบโตช้า ใช้ธาตุอาหารในดินได้น้อย ทำให้ใช้เวลาในการผลิตนานและมีต้นทุนค่าปุ๋ยเคมีสูง จะสามารถช่วยย่นระยะเวลาในการเพาะต้นกล้วยพาราให้พร้อมสำหรับติดตามและเพิ่มอัตราการแตกตา ตลอดจนมีการเจริญของกิ่งตาที่เร็วและมีประสิทธิภาพ สามารถลงแปลงปลูกได้เร็วขึ้น

การใช้ประโยชน์จากผลงานวิจัย

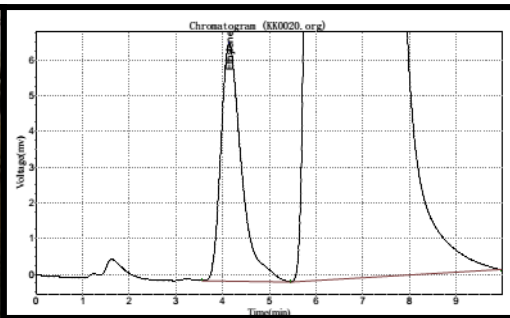
1. ได้เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีประสิทธิภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญในพืชอย่างน้อย 2 ไอโซเลท
2. เกษตรกรมีทางเลือกในการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้วยและต้นยางชำถุงด้วยเชื้อจุลินทรีย์เพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมี ซึ่งศูนย์เรียนรู้ยางพารา และสำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยางจะเป็นหน่วยงานที่นำความรู้ที่เป็นประโยชน์นี้เผยแพร่ให้แก่เกษตรกรต่อไป
3. บริษัท/ผู้ประกอบการผลิตปุ๋ย สามารถนำเชื้อจุลินทรีย์ไปต่อยอดผลิตในเชิงการค้าได้



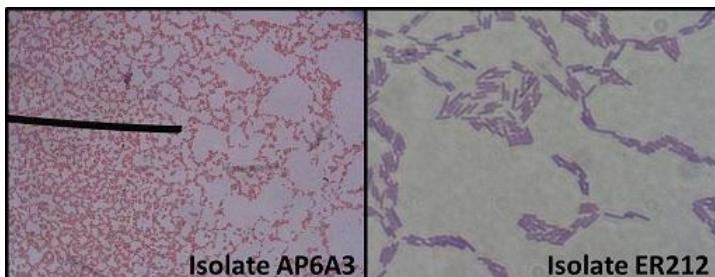
การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่สร้างสาร IAA โดยตรวจสอบโดยวิธี Colorimetric assay ด้วย Salkowski reagent



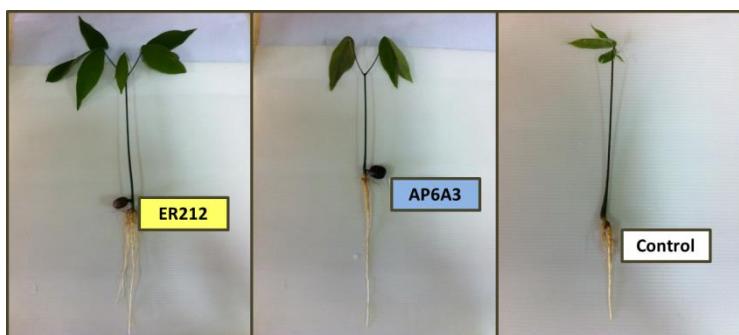
การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่สามารถละลาย $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ โดยใช้วิธี Fiske and Subbarow



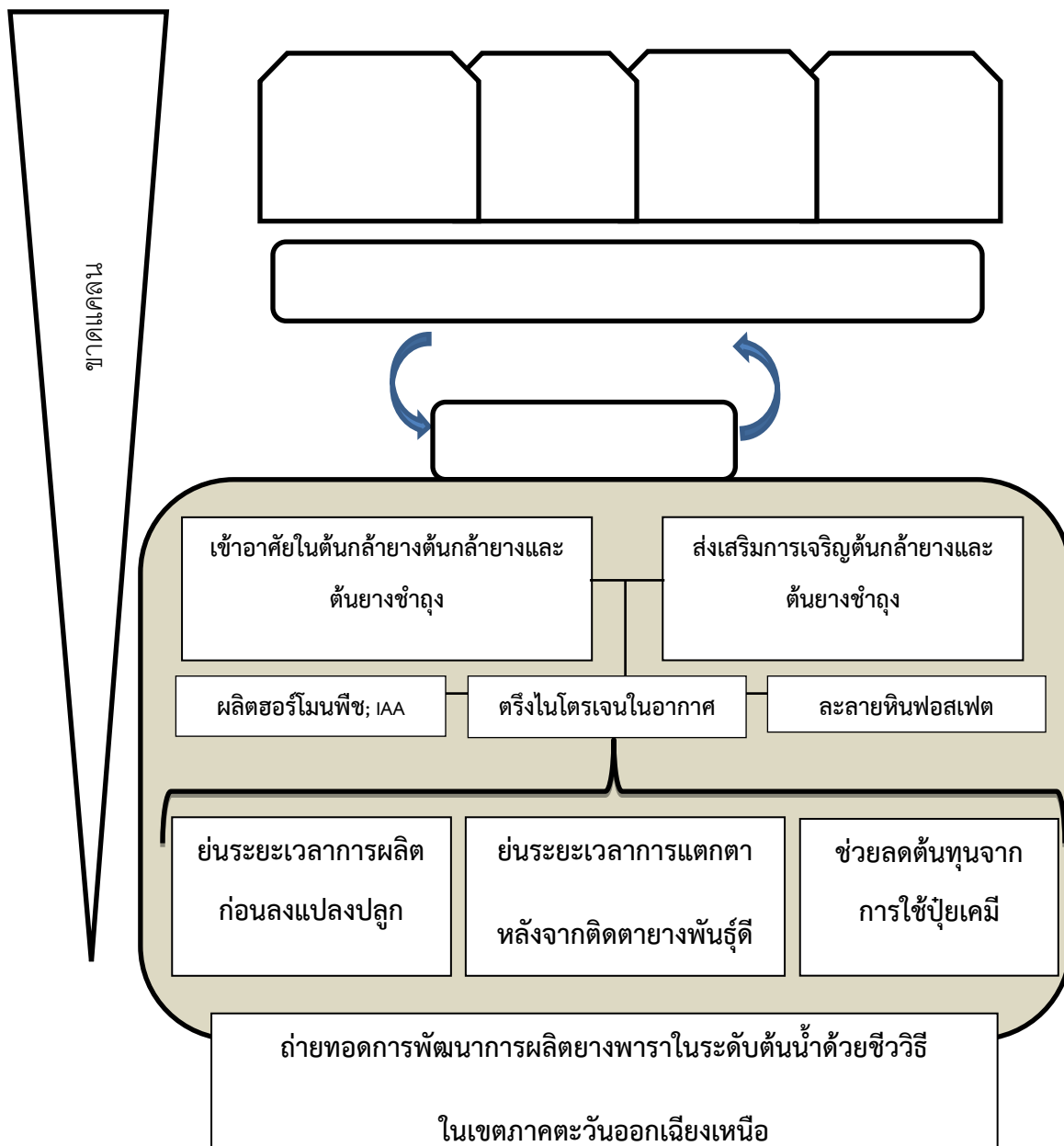
การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้โดยใช้วิธี acetylene reduction assay และตรวจวัดด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟฟีที่มี flame ionization detector



แบคทีเรียเอนโดไฟติกที่คัดเลือกได้จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ AP6A3 (IAA producer and Nitrogen fixer) และ ER212 (phosphate solubilizer)



ต้นกล้า yang ได้รับเชื้อไอโซเลท ER212 และ AP6A3 มีการเจริญเติบโตดีกว่าต้นกล้า yang ในกลุ่มควบคุม (control)



สัญญาเลขที่ RDG5750101

โครงการ การคัดเลือกและใช้แบคทีเรียเอนโดไฟติกเพื่อส่งเสริมการเจริญของต้นกล้ายางและต้นยางชำถุงในภาค
ตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

1. เผยแพร่ผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการ

1.1 ชื่อเรื่อง Isolation and screening of plant growth promoting, endophytic bacteria from Para rubber tree

ระดับการเผยแพร่	ระดับชาติ
รูปแบบการนำเสนอ	Oral presentation
ในระหว่างวันที่	7-8 เมษายน 2558
ชื่อการประชุม	Workshop on sustainability of rubber plantation in NE Thailand; What was done in Thailand, What could we do in Isaan?
สถานที่จัดประชุม	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1.2 ชื่อเรื่อง Endophytic bacteria as potential growth promoters in Para rubber seedling

ระดับการเผยแพร่	ระดับนานาชาติ
รูปแบบการนำเสนอ	Oral presentation
ในระหว่างวันที่	4-6 พฤศจิกายน 2558
ชื่อการประชุม	The 4th International Conference on Life Science & Biological Engineering
สถานที่จัดประชุม	ANA CROWNE PLAZA Hotel Grand Court Nagoya 1-1-1 Kanayama- cho, Naka-ku, Nagoya 460-0023 Japan

สัญญาเลขที่ RDG5750101

โครงการ การคัดเลือกและใช้แบคทีเรียเอนโดไฟติกเพื่อส่งเสริมการเจริญของต้นกล้วยและต้นยางชำถุงในภาค
ตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	ผลสำเร็จ (%)	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกซึ่งแยกได้จากต้นยางพารา เพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเชื้อในน้ำมะพร้าวเพื่อนำไปใช้ส่งเสริมการเจริญของต้นกล้วยและต้นยางชำถุง	1. ตรวจสอบความบริสุทธิ์และ viability ของเชื้อ แบคทีเรียเอนโดไฟติกที่เก็บอยู่ใน culture collection 2. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืชและถ้าจำนวนเชื้อมีมากกว่า 1 ชนิด เชื้อต้องเจริญร่วมกันได้ 3. ศึกษาการเจริญเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียเอนโดไฟติกในน้ำมะพร้าว 4. ตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อในดินและการเพิ่มจำนวนในต้นกล้วยของแบคทีเรียเอนโดไฟติก 5. ตรวจสอบการเจริญเติบโตของต้นกล้วย ได้แก่ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง จำนวนใบ/ฉัตร พื้นที่ใบ ความสูงของลำต้น ความยาวรอบต้น และความยาวของราก 6. วิเคราะห์ข้อมูล และจัดทำรายงานวิจัย	100%	1. คัดเลือกได้เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่มีคุณสมบัติผลิตฮอร์โมนพืช IAA ละลายในฟอสเฟต และตรึงไนโตรเจนจากอากาศ เพื่อนำไปใช้ส่งเสริมการเจริญของต้นกล้วยและต้นยางชำถุง 2. ได้กรรมวิธีการผลิตเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกให้ได้จำนวนเซลล์ $\geq 10^8$ cfu/ml จากน้ำมะพร้าวที่มีราคาถูก 3. เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟติกที่คัดเลือกได้สามารถรอดชีวิตในดินและเพิ่มจำนวนในต้นกล้วย