หัวข้อวิจัย การเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงและผลผลิตมันสำปะหลัง โดยแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชที่สามารถผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์
ผู้ดำเนินงานวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐบดี วิริยาวัฒน์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรชาติ สินวรณ์
หน่วยงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
ปี พ.ศ. 2561

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth - Promoting Bacteria ; PGPR) ที่มีความสามารถในการผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์ นำมาเตรียมให้อยู่ในรูปเจลเซลล์ตรึง ศึกษาการพองตัวของเจลเซลล์ตรึง ปริมาณการปลดปล่อยของแบคทีเรีย และการรอดชีวิตของแบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึงในสภาวะต่าง ๆ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในแปลงมันสำปะหลังต่อไป โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากมันสำปะหลังที่ไม่มีประวัติการเป็นโรค ในเขตจังหวัดนครราชสีมา คัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชได้แก่ phosphate solubilization assay และ siderophore production พบแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชและมีความสามารถในการสร้างไซเดอร์โรฟอร์ 1 ไอโซเลท นำมาสกัด Genomic DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ส่วน Conserved region ของ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ วิเคราะห์ลำดับเบส เปรียบเทียบกับลำดับเบสอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่า มีลำดับเบสคล้ายกับลำดับเบสของ *Pseudomonas fluorescens* strain IGFRI_PSB_9a(2)_16S ถึง 99 % เตรียมให้อยู่ในรูปเจลเซลล์ตรึง พบว่า ระดับความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.05 โมล มีความเหมาะสมในการห่อหุ้มเซลล์ ช่วยการรอดชีวิตของแบคทีเรีย การศึกษาการรอดชีวิตในสภาวะต่าง ๆ พบว่า แบคทีเรียสามารถรอดชีวิตในสภาวะที่ค่าพีเอช 6 ถึง 8 และอุณหภูมิ 37 ถึง 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะในดินของประเทศไทยที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ จึงมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสง และผลผลิตมันสำปะหลังในพื้นที่เกษตรกรรมต่อไป

Research Title Enhancement of Photosynthesis and Yields in Cassava by Siderophore Producing Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)
Resaercher Assistant Professor Dr. Nuttabodee Viriyawattana
Assistant Professor. Dr. Surachat Sinworn
Organization Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University.
Year 2018

Abstract

The objective of this study is to select Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR) which is capable of producing siderophore. Preparation of immobilized bacterial cells gel form. Study the swelling of immobilized cells gel, the amount of release of bacteria and survival of bacteria in the form of immobilized cells gel in various conditions to be applied to the cassava field. By collecting soil samples around cassava roots without a history of disease in Nakhon Ratchasima province. Isolated bacteria that have plant growth promoting properties such as phosphate solubilization assay and siderophore production. Bacteria that have plant growth promoting properties and the ability to create siderophore one isolate were extracted from Genomic DNA and increased DNA in the conserved region of 16S rRNA by PCR using specific primer. Sequence analysis compared to other sequences in the NCBI GenBank database, it had a sequence similar to *Pseudomonas fluorescens* strain IGFRI_PSB_9a (2) _16S (2) _16S to ถึง 99%. In the form of immobilized cells gel, the concentration of 3% sodium alginate in 0.05 mol calcium chloride solution was suitable for encapsulation that help the survival of bacteria. Survival studies in various conditions found that bacteria can survive in conditions at pH 6 to 8 and temperature 37 to 45 degrees celsius, which is the condition in the soil of Thailand suitable for microbial activities. Therefore, it was suitable to applied to increase the efficiency of photosynthesis and cassava production in agricultural areas.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความร่วมมือและความอนุเคราะห์จากหลายฝ่ายในคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสวนดุสิตที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

และงานวิจัยนี้จะเกิดขึ้นไม่ได้เลย หากไม่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ในปีงบประมาณ 2561 ซึ่งเล็งเห็นความสำคัญของการวิจัยนี้ ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง

ประโยชน์อันเนื่องมาจากงานวิจัยฉบับนี้จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแด่บิดา มารดาและคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอนให้มีความรู้จนถึงปัจจุบัน

คณะผู้วิจัย

2561

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญภาพ		ช
บทที่ 1	**บทนำ**	**1**
	ความเป็นมาและความสำคัญ	1
	วัตถุประสงค์	2
	ขอบเขตการวิจัย	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	**แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	**4**
	มันสำปะหลัง	4
	ลักษณะพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง	4
	แหล่งปลูก	5
	ฤดูกาลปลูก	5
	การเตรียมดิน	5
	การเตรียมท่อนพันธุ์	5
	ระยะปลูกและวิธีปลูก	5
	การกำจัดวัชพืช	6
	การใช้ปุ๋ยในมันสำปะหลัง	6
	ดิน พันธุ์และการปลูก	6
	ความต้องการธาตุอาหาร	7
	การใช้ปุ๋ยธาตุหลัก	8
	ความสำคัญของจุลธาตุเหล็กต่อมันสำปะหลัง	11
	อาการขาดเหล็กในมันสำปะหลัง	12
	Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)	13
	กลไกการให้ธาตุอาหารและการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช	17
	กลไกทางตรง	17
	กลไกทางอ้อม	20

	ไซเดอร์โรฟอร์ (siderophore)	22
	ความสำคัญของธาตุเหล็ก	22
	ความสัมพันธ์ระหว่างไซเดอร์โรฟอร์กับเหล็ก	22
	การจัดจำแนกไซเดอร์โรฟอร์	22
	กระบวนการแยกไซเดอร์โรฟอร์	23
	การประยุกต์ใช้ไซเดอร์โรฟอร์	23
	สมมติฐานการวิจัย	23
	กรอบแนวคิดในการวิจัย	24
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25
บทที่ 3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	**27**
	การเก็บรวบรวมข้อมูล	27
	เครื่องมือในการวิจัย	27
	การวิเคราะห์ข้อมูล	29
บทที่ 4	**ผลการวิจัย**	**32**
	การคัดแยกแบคทีเรีย	32
	การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Activities) ของแบคทีเรียรอบรากพืช	33
	ปริมาณไซเดอร์โรฟอร์ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย	35
	การจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์	35
	การศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA ของแบคทีเรียเพื่อจัดจำแนกสปีชีส์	35
	การตรึงเซลล์แบคทีเรีย	36
	ปริมาณการปลดปล่อยแบคทีเรียในรูปของเซลล์ตรึง	40
	การศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึง	46
บทที่ 5	**สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ**	**50**
	สรุปผลการวิจัย	50
	การอภิปรายผล	52
	ข้อเสนอแนะ	53
บรรณานุกรม		**54**
	บรรณานุกรมภาษาไทย	54
	บรรณานุกรมภาษาอังกฤษ	55
ประวัติผู้วิจัย		**58**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ความเข้มข้นของธาตุอาหารในส่วนต่างๆของมันสำปะหลังอายุระหว่าง 2 – 4 เดือน ซึ่งปลูกโดยใช้ปุ๋ย 16 กก N, 21 กก P, 13.3 กก K, 3.2 กก S, 1.6 กก Zn, 160 มก B ต่อไร่	9
2.2	ความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบมันสำปะหลังจากต้นอายุ 3 – 4 เดือนที่จัดว่าเพียงพอ ใบ ดัชนี (index leaf) ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ แผ่นใบบนสุดที่เจริญเต็มที่	10
2.3	อัตราปุ๋ยธาตุหลักสำหรับมันสำปะหลังที่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ดิน	10
2.4	อัตราปุ๋ยธาตุหลักสำหรับมันสำปะหลังที่ปลูกในดินซึ่งมีเนื้อดินต่างกัน	10
2.5	ตัวอย่าง Plant Growth Promoting Rhizobacteria	15
2.6	ตัวอย่าง PGPR ที่ช่วยในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช	16
4.1	การพองตัวของเจลเซลล์ตรึงที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำ ระยะเวลา 6, 12 ชั่วโมง และ 1, 2, 4 และ 7 วัน ตามลำดับ	38
4.2	ปริมาณการปลดปล่อยแบคทีเรีย ไอโซเลท S9 ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.03, 0.05 และ 0.07 โมล ในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	41
4.3	ปริมาณการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 โมล ในระยะเวลา 2, 4 และ 6 วัน	47

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	มันสำปะหลังที่ขาดธาตุเหล็ก	12
2.2	*Pseudomonas* spp.	13
2.3	*Azospirillum* spp.	13
2.4	*Azotobacter* spp.	14
2.5	โครงสร้าง ferrioxamine B	18
2.6	โครงสร้าง indole-3-acetic acid (IAA)	18
2.7	โครงสร้างของเอธิลีน	19
2.8	วิถีการสังเคราะห์เอทธิลีน	20
2.9	กรอบแนวคิดในการวิจัย	24
2.10	วิถีการสังเคราะห์เอทธิลีน	20
2.11	กรอบแนวคิดการวิจัย	33
3.1	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved regions ของ 16S rRNA ของแบคทีเรียโดยใช้เครื่อง Thermocycler	31
3.2	การแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electrophoresis	31
4.1	พื้นที่แปลงมันสำปะหลังที่เก็บตัวอย่างดิน	32
4.2	การเก็บตัวอย่างดินรอบรากมันสำปะหลัง	33
4.3	โคโลนีแบคทีเรียที่ให้ลักษณะ halo zone รอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified pikovskaya agar	34
4.4	การสร้าง siderophore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CAS agar ของแบคทีเรียที่แยกได้	34
4.5	ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ส่วน Conserved regions ของ 16S ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ เลน M 100 bp DNA ladder; เลน 1 PCR product ขนาด 750 bp จากดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลท S9	36
4.6	แบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึงที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์	36

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.7	การพองตัวของเจลเซลล์ตรึงที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำ ระยะเวลา 6, 12 ชั่วโมง และ 1, 2, 4 และ 7 วัน ตามลำดับ	39
4.8	ปริมาณการปลดปล่อยแบคทีเรีย ไอโซเลท S9 ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.03, 0.05 และ 0.07 โมล ในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	42
4.9	ปริมาณแบคทีเรียไอโซเลท S9 ที่ปลดปล่อยจากเจลเซลล์ตรึง ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	43
4.10	ปริมาณแบคทีเรียไอโซเลท S9 ที่ปลดปล่อยจากเจลเซลล์ตรึง ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	44
4.11	ปริมาณแบคทีเรียไอโซเลท S9 ที่ปลดปล่อยจากเจลเซลล์ตรึง ระยะเวลา 72 ชั่วโมง	45
4.12	ผลของสภาวะค่าพีเอช 6 ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส และสภาวะค่าพีเอช 8 ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียในรูปเจลเซลล์ตรึง	47
4.13	การรอดชีวิตของแบคทีเรียไอโซเลท S9 ในสภาวะค่าพีเอช เท่ากับ 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 2, 4 และ 6 วัน	48
4.14	การรอดชีวิตของแบคทีเรียไอโซเลท S9 ในสภาวะค่าพีเอช เท่ากับ 6 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 2, 4 และ 6 วัน	48
4.15	การรอดชีวิตของแบคทีเรียไอโซเลท S9 ในสภาวะค่าพีเอช เท่ากับ 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 2, 4 และ 6 วัน	49
4.16	การรอดชีวิตของแบคทีเรียไอโซเลท S9 ในสภาวะค่าพีเอช เท่ากับ 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 2, 4 และ 6 วัน	49