วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

ผลของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนและสังเคราะห์ไอเอเอต่อการเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้แวนดาในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of potential N-fixing and IAA synthesis of endophytic bacteria on growth of *Vanda* plantlets in aseptic condition

วรรณวิสา อิ่นแก้วปวงคำ[1], กนกวรรณ ปัญจะมา[1], ชัยอาทิตย์ อิ่นคำ[2], ยุพา จอมแก้ว[1] และ โสระยา ร่วมรังษี[1]*

Wanwisa Inkaewpuangkham[1], Kanokwan Panjama[1], Chaiartid Inkham[2], Yupa Chromkaew[1] and Soraya Ruamrungsri[1]*

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
[1] Department of Plant and Soil Science, faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
[2] หน่วยวิจัยธาตุอาหารพืชและการปลูกพืชแบบไม่ใช่ดิน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
[2] Plant Nutrition and Hydroponics Research Unit, Science and Technology Research Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

บทคัดย่อ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกล้วยไม้ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น สารกลุ่มออกซิน จิบเบอเรลลิน เป็นต้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงนำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 3 ไอโซเลท ที่แยกได้จากแวนดาสายพันธุ์มนุวดีที่สามารถตรึงไนโตรเจนและผลิตสารออกซินได้ มาทดสอบในการช่วยส่งเสริมการเติบโตของกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ วางแผนการทดลองปัจจัยร่วมแบบสุ่มสมบูรณ์ 2 ปัจจัย ได้แก่ 1) ชนิดแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 2R13 3S19 และ 3R14 2) อัตราส่วนของแบคทีเรียต่อน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 4 ระดับ ได้แก่ 1:1, 1:10, 1:25 และ 1:50 ร่วมกับกรรมวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (ไม่มีแบคทีเรียเอนโดไฟท์) กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ต้น โดยทำการแช่แวนดาที่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงในสารละลายเชื้อแบคทีเรียแต่ละอัตราส่วน รวมทั้งกรรมวิธีควบคุม นาน 30 นาที จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Vacin & Went นาน 4 เดือน ผลการทดลองอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย พบว่า ไอโซเลท 3S19 อัตราส่วน 1:25 ความสูงต้นเฉลี่ยมากที่สุดคือ 10.2 ซม. แต่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีควบคุม ส่วนจำนวนใบ พบว่า ไอโซเลท 3S19 อัตราส่วน 1:25 และ 1:50 ส่งผลให้ต้นอ่อนมีจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด คือ 7.7 และ 7.1 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ นอกจากนี้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นอ่อนที่ได้รับสารแขวนลอยแบคทีเรียไอโซเลท 3S19 อัตราส่วน 1:25 มีค่ามากที่สุดคือ 1.93 และ 0.28 ก./ต้น ตามลำดับ ส่วนลักษณะสัณฐานของต้นอ่อนแวนดาที่ได้รับสารแขวนลอยแบคทีเรียไอโซเลท 3S19 อัตราส่วน 1:25 มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ผิดปกติน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ ดังนั้นจากการทดลองสามารถสรุปผลได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลท 3S19 อัตราส่วน 1:25 เป็นกรรมวิธีที่เหมาะสมในการส่งเสริมการเติบโตกล้วยไม้แวนดาในสภาพปลอดเชื้อและมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงแวนดาได้ในอนาคต

คำสำคัญ: ไนโตรเจน; ออกซิน; สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช; การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ABSTRACT: Orchid tissue culture is a popular technique for orchid production. This method frequently makes use of plant growth regulators such as auxin, gibberellin, and so on. Therefore, this research was aimed to explore around 3 isolates of endophytic bacteria that were isolated from *Vanda* orchid CV. Manuvadee. These isolates had the ability to fix nitrogen and produce auxin. This research was conducted based on factorial in a completely randomized design that consists 2 factors such as 1) isolate of endophytic bacteria including isolate 2R13, 3S19, and

* Corresponding author: sorayaruamrung@gmail.com

Received: date; June 7, 2022 Accepted: date; April 28, 2023 Published: date;

3R14 2) ratio of bacteria suspension: sterilize deionize water had 4 levels including 1:1, 1:10, 1:25, 1:50 and control treatment with sterilize deionize water (not contaminate endophytic bacteria). This research had three replications per treatment, and each replication had three plants. *Vanda* plantlets from tissue culture were immersed in bacteria suspension each ratio including control treatment for 30 minutes and were transferred in Vacin & Went media for 4 months. The results of interaction between factors showed isolate 3S19 at a ratio of 1:25 had the highest average plant height at 10.2 cm. but there was not significantly difference between control treatment. The number of leaves, isolate 3S19 at a ratio of 1:25 and 1:50 had the highest average leaves number per plant of plantlets at 7.7 and 7.1, respectively, compared with other treatments. Furthermore, fresh and dry weights of plantlets were inoculated by bacterial suspension of isolate 3S19 at a ratio of 1:25 had the highest at 1.93 and 0.28 g/plant, respectively. *Vanda* plantlets morphology were inoculated by bacterial suspension of isolate 3S19 at a ratio of 1:25 that had less morphology disorder than other treatments. Therefore, this research concludes that isolate 3S19 bacteria at a ratio of 1:25 was the optimum treatment for the growth promoting of *Vanda* under aseptic conditions and this treatment had the potential of *Vanda* culturing in the future.

Keywords: nitrogen; auxin; plant growth promoter; tissue culture

บทนำ

กล้วยไม้สกุลแวนดาเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Orchidaceae ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มพืชไม้ดอก (flowering plants) (Cakova et al., 2015) โดยปัจจุบันกล้วยไม้วงศ์แวนดามีจำนวนชนิดมากถึง 184 ชนิด มี 62 ชนิดที่มีการยอมรับชื่อ (accepted) อีก 122 ชนิด จัดอยู่ในกลุ่มชื่อพ้อง (synonyms) และยังไม่ได้แก้ไขข้อมูล (The Plant List, 2013) แวนดาเป็นกล้วยไม้ที่มีลักษณะการเติบโตทางยอด (monopodial) (De et al., 2015) คือ มีการเติบโตทางยอดขึ้นไปเรื่อย ๆ ช่อดอกเกิดบริเวณ ลำต้น รากเป็นรากอากาศ (McConnell and Cruz, 1996) และมีการกระจายตัวมากในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Gardiner et al., 2013; Khan et al., 2019) รวมถึงประเทศไทย แวนดาเป็นกล้วยไม้สกุลหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย จากข้อมูลการส่งออกกล้วยไม้ของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2558 พบว่า เฉพาะกล้วยไม้สกุลแวนดามีการส่งออกทั้งในรูปของไม้ตัดดอกและต้นกล้วยไม้ โดยแบ่งออกเป็น 0.13% และ 8.9% ของมูลค่าการส่งออกทั้งหมด ตามลำดับ (De et al., 2015) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าการส่งออกแวนดาของประเทศไทยนิยมส่งออกทั้งในของรูปดอกและต้น โดยการผลิตกล้วยไม้ให้เพียงพอต่อตามความต้องการของตลาดโลก จึงมักใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หรือที่เรียกว่า การขยายพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่จำเป็นสำหรับ การผลิตกล้วยไม้เพื่อการค้า เนื่องจากมีต้นทุนต่ำ ให้ผลผลิตสูงและสม่ำเสมอ ขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น (Arditti and Krikorian, 2008; Thammasiri, 2015) นอกจากนี้ยังสามารถให้ต้นที่มีคุณภาพสูง ปราศจากโรค ไม่มีข้อจำกัดของฤดูกาลมาเกี่ยวข้อง เป็นต้น การเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้ออาหารสังเคราะห์ เปรียบเสมือนเป็นแหล่งธาตุอาหารให้แก่เนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก, ธาตุอาหารรอง, น้ำตาล, วิตามิน, ผงวุ้น, กรดอะมิโน หรืออาหารเสริมไนโตรเจนอื่น ๆ รวมไปถึงสารควบคุมการเจริญเติบโต (George et al., 2008) ธาตุอาหารหลักโดยเฉพาะไนโตรเจน มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน, สังเคราะห์คลอโรฟิลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนสังเคราะห์แสง, ส่งเสริมการเติบโตทางด้านลำต้น, คุณภาพผลผลิต รวมถึงกระตุ้นการเติบโตของรากพืชด้วย ถ้าหากพืชขาดธาตุไนโตรเจนจะทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง ใบเหลือง คุณภาพผลผลิตลดลง (Leghari et al., 2016) อีกทั้งสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นอีกองค์ประกอบสำคัญต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ เช่น สารกลุ่มออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน เป็นต้น โดยสารกลุ่มออกซิน ถือว่ามีบทบาทสำคัญต่อกล้วยไม้ตั้งแต่การงอกของเมล็ดกล้วยไม้, การเจริญของยอด, การสร้างรากใหม่ รวมไปถึงส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากกล้วยไม้ด้วย (Novak et al., 2014) แต่อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นแนวทางในการลดการใช้อาหารสังเคราะห์และส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชมีรายงานว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (host) ที่สามารถตรึงไนโตรเจนที่อยู่ในบรรยากาศในรูปแก๊สให้เป็นแอมโมเนียมในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ ภายใต้สภาพปกติและภายใต้สภาพท้าทาย (Afzal et al., 2019) อีกทั้งยังสามารถสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโต ในกลุ่มออกซินได้ จึงมีส่วนช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ (Santos et al., 2018) โดยงานวิจัยของ Andrade et al. (2023) ได้ทำการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากรากและใบของกล้วยไม้ *Cattleya walkeriana* จากแหล่งที่อยู่ต่างกัน จำนวน 67 ไอโซเลท และนำมาจัดจำแนกโดยคัดเลือก 7 สายพันธุ์ที่มีความโดดเด่นในการส่งเสริมการเติบโตพืชได้ ได้แก่ *Paenibacillus taichungensis*, *Enterobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Paenibacillus* sp.,

Pseudomonas sp., *Paenibacillus pabuli* และ *Paraburkholderia caffeinilytica* มาทำการปลูกถ่ายเชื้อลงกล้วยไม้ *C. walkeriana* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *P. taichungensis*, *Enterobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Paenibacillus* sp., และ *P. pabuli* ทำให้กล้วยไม้มีพื้นที่ใบเพิ่มขึ้น 106, 120, 105, 116, และ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ไม่รับการปลูกถ่ายเชื้อ) และกรรมวิธีที่ได้รับเชื้อ *P. taichungensis*, *Enterobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Pseudomonas sp.*, และ *P. pabuli* มีจำนวนรากมากกว่ากรรมวิธีควบคุม ขณะที่กรรมวิธีที่ได้รับเชื้อ *P. taichungensis*, *Enterobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas sp.*, และ *P. pabuli* ส่งผลให้มีความยาวรากเฉลี่ยมากกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ Joko et al. (2018) รายงานว่า นำต้นอ่อนกล้วยไม้ *Phalaenopsis amabilis* จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการสังเคราะห์ไอเอเอโดยวิธีการจุ่ม และนำไปทดสอบการต้านทานโรคเน่าจากเชื้อสาเหตุ *Pectobacterium carotovorum* พบว่า การจุ่มเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท TbPh7, AkOc1 และ DnAr4 สามารถยับยั้งการเกิดโรคเน่าได้ 100, 80 และ 80% ตามลำดับ นอกจากนี้ แบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท AkOc1 ซึ่งสังเคราะห์ไอเอเอได้มากที่สุด ส่งผลให้กล้วยไม้มีจำนวนรากและความยาวรากมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ และจากการรายงานของ Faria et al. (2013) พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สังเคราะห์ไอเอเอได้ 8 ไอโซเลท แยกได้จากเนื้อเยื่อเจริญของกล้วยไม้ *Cymbidium eburneum* เมื่อนำไปปลูกถ่ายเชื้อในต้นอ่อนกล้วยไม้ *Cattleya loddigesii* จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า สามารถส่งเสริมการเติบโตและเพิ่มการรอดชีวิตของต้นอ่อนกล้วยไม้ ได้ในระหว่างการปรับตัวกับสภาพแวดล้อมภายนอก (acclimatization) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะนำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนและสร้างไอเอเอได้มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้แวนดาในสภาพปลอดเชื้อเพื่อส่งเสริมการเติบโตของกล้วยไม้แวนดาให้ดียิ่งขึ้น

วิธีการศึกษา

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟท์

นำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 3 ไอโซเลท ที่ผ่านการประเมินศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน (วรรณวิสา และคณะ, 2564) และการสังเคราะห์ไอเอเอ (Inkaewpuangkham et al., 2021) มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrients agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน จนเชื้อเจริญเต็มที่ จากนั้นขยายปริมาณเชื้อในอาหาร Nutrient broth (NB) และนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จนเชื้อเจริญเต็มที่

การตรวจสอบความขุ่นของเชื้อ

นำสารแขวนลอยแบคทีเรียเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลท มาทำการวัดค่าความทึบแสง (Optimal density: OD) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง Spectophotometer (ยี่ห้อ (Thermo SCIENTIFIC GENESYS 20) ที่ความยาวคลื่น 600 น.ม. ค่าความทึบแสงเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้ เท่ากับ 0.5 (Lertjantarangkool et al., 2017) หรือคิดเป็นปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 ซีเอฟยู/มล.

การปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์สู่ต้นพืช

นำต้นแวนดาลูกผสม อายุ 8 เดือน (นับจากการนำปลายยอดของต้นแวนดามาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) จากบริษัทอุตสาหกรรมกล้วยไม้ไทย จำกัด แช่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 3 ไอโซเลท (OD = 0.5) เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 4 อัตราส่วน (ได้แก่ 1:1, 1:10, 1:25 และ 1:50) รวมถึงกรรมวิธีควบคุม (แช่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) เป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการย้ายต้นแวนดาที่ผ่านการปลูกถ่ายเชื้อและแช่ในน้ำกลั่นแล้ว มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร Vacin & Went (VW) ตลอดการทดลอง นาน 4 เดือน ภายในห้องที่อุณหภูมิเฉลี่ย 25 ˚C ความยาวที่ได้รับแสงนาน 16 ชม.ต่อวัน จากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง (PPFD) 45 ไมโครโมล/ตร.ม./วินาที นาน 16 สัปดาห์

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in completely randomized design) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่

ปัจจัยที่หนึ่ง คือ ชนิดไอโซเลท จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ 2R13, 3S19 และ 3R14 (ทั้ง 3 isolation อยู่ในระหว่างการดำเนินการเพื่อตรวจหา Genus และ species)

ปัจจัยที่สอง คือ อัตราส่วนของสารแขวนลอยแบคทีเรียเอนโดไฟท์:น้ำกลั่น 4 อัตราส่วน ได้แก่ 1:1, 1:10, 1:25 และ 1:50 โดยมีน้ำกลั่นเป็นกรรมวิธีควบคุม จำนวนกรรมวิธีทดลอง (3x4) + 1 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลอง ได้แก่ ความสูงต้น จำนวนใบ น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นแวนดา หลังได้รับการปลูกถ่ายเชื้อระยะเวลา 4 เดือน วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 20 และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยข้อมูล โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ดิน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ช่วงเวลาดำเนินการทดลอง

เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2564 - มิถุนายน พ.ศ. 2564

ผลการศึกษา

ความสูงเฉลี่ยของแวนดาหลังได้รับการปลูกถ่ายเชื้อนาน 4 เดือน

จากการทดลองพบว่า ชนิดของไอโซเลทแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไม่มีผลต่อความสูงเฉลี่ยของต้นแวนดาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยความสูงต้นเฉลี่ยที่ได้รับเชื้อไอโซเลท 3S19, 3R14 และ 2R13 มีค่าเท่ากับ 9.3, 9.1 และ 8.8 ซม. ตามลำดับ **(Table 1)** เมื่อพิจารณาปัจจัยอัตราส่วนระหว่างเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ต่อน้ำกลั่น พบว่า อัตราส่วนที่ 1:25 มีผลทำให้ความสูงเฉลี่ยของต้นแวนดามากที่สุด คือ 9.80 ซม. แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่อัตราส่วน 1:50 **(Table 1)** และเมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดไอโซเลทและอัตราส่วนระหว่างเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ต่อน้ำกลั่น พบว่า ไอโซเลท 3S19 อัตราส่วน 1:25 มีค่าเฉลี่ยความสูงต้นเฉลี่ยมากที่สุดคือ 10.2 ซม. แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม **(Table 1)**

จำนวนใบเฉลี่ยต่อต้นของแวนดาหลังได้รับการปลูกถ่ายเชื้อนาน 4 เดือน

จำนวนใบเฉลี่ยต่อต้นแวนดาหลังได้รับการปลูกถ่ายเชื้อ นาน 4 เดือน พบว่า ปัจจัยชนิดไอโซเลทของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ มีผลต่อจำนวนใบเฉลี่ยของต้นแวนดา โดยกรรมวิธีที่ได้รับไอโซเลท 3S19 จะมีจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด คือ 6.6 ใบต่อต้น **(Table 2)** และเมื่อพิจารณาอัตราส่วนที่ใช้การปลูกถ่ายเชื่อ พบว่า กรรมวิธีที่ใช้อัตราส่วน 1:25 และ 1:50 เป็นกรรมวิธีที่ทำให้มีจำนวนใบเฉลี่ยต่อต้นมากที่สุดคือ 5.9 และ 5.7 ใบต่อต้น ตามลำดับ **(Table 2)** ส่วนอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดไอโซเลทและอัตราส่วนระหว่างเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ต่อน้ำกลั่น พบว่า ไอโซเลท 3S19 ที่อัตราส่วน 1:25 และ 1:50 ทำให้มีค่าเฉลี่ยจำนวนใบมากที่สุด คือ 7.7 และ 7.1 ใบต่อต้น ตามลำดับ **(Table 2)**

Table 1 Effects of endophytic bacteria and ratios of bacterial suspension on plant height of *Vanda* at 4 months after inoculation

Factors	Plant height (cm)
Isolates	
2R13	8.8[a]
3S19	9.3[a]
3R14	9.1[a]
Ratios	
1:1	8.4[c]
1:10	8.8[bc]
1:25	9.8[a]
1:50	9.4[ab]
Isolates x Ratios	
2R13 x 1:1	7.2[e]
2R13 x 1:10	9.8[ab]
2R13 x 1:25	9.1[abcd]
2R13 x 1:50	9.1[abcd]
3S19 x 1:1	9.5[abc]
3S19 x 1:10	8.2[de]
3S19 x 1:25	10.2[a]
3S19 x 1:50	9.5[abc]
3R14 x 1:1	8.4[cd]
3R14 x 1:10	8.5[bcd]
3R14 x 1:25	10.1[a]
3R14 x 1:50	9.5[abc]
Control	9.5[abc]

Means with different lowercase letters within a column indicate a significant difference or means with same lowercase letters within a column indicate no significant difference according to Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) at $P<0.05$

Table 2 Effects of endophytic bacteria and ratios of bacterial suspension on number of leaves/plant of *Vanda* at 4 months after inoculation

Factors	Number of leaves/plant
Isolates	
2R13	5.0[b]
3S19	6.6[a]
3R14	4.8[b]
Ratios	
1:1	5.1[b]
1:10	5.1[b]
1:25	5.9[a]
1:50	5.7[ab]
Isolates x Ratios	
2R13 x 1:1	4.7[def]
2R13 x 1:10	6.0[bc]
2R13 x 1:25	4.9[def]
2R13 x 1:50	4.4[ef]
3S19 x 1:1	6.3[b]
3S19 x 1:10	5.4[bcd]
3S19 x 1:25	7.7[a]
3S19 x 1:50	7.1[a]
3R14 x 1:1	4.4[ef]
3R14 x 1:10	4.0[f]
3R14 x 1:25	5.3[cd]
3R14 x 1:50	5.5[bcd]
Control	5.2[cde]

Means with different lowercase letters within a column indicate a significant difference or means with same lowercase letters within a column indicate no significant difference according to Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) at $P<0.05$

น้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นแวนดาหลังได้รับการปลูกถ่ายเชื้อนาน 4 เดือน

เมื่อพิจารณาปัจจัยชนิดไอโซเลท พบว่า ไอโซเลท 3S19 ส่งผลทำให้ต้นแวนดามีค่าเฉลี่ยน้ำหนักมากที่สุด คือ 1.62 ก./ต้น **(Table 3)** ส่วนปัจจัยอัตราส่วน พบว่า อัตราส่วน 1:1 ทำให้มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดต้นแวนดามากที่สุดคือ 1.34 ก./ต้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอัตราส่วน 1:25 และ 1:50 **(Table 3)** และเมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดไอโซเลทและอัตราส่วนเชื้อต่อน้ำกลั่น พบว่า ไอโซเลท 3S19 อัตราส่วน 1:1 และ 1:25 ทำให้มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดมากที่สุด คือ 1.87 และ 1.93 ก./ต้น ตามลำดับ **(Table 3)**

น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของต้นแวนดาหลังได้รับการปลูกถ่ายเชื้อนาน 4 เดือน

จากการทดลองปัจจัยชนิดไอโซเลท พบว่า ไอโซเลท 3S19 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งมากกว่า 2R13 **(Table 4)** หากพิจารณาที่ปัจจัยอัตราส่วนเชื้อที่ใช้พบว่า ทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **(Table 4)** และหากพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดไอโซเลทและอัตราส่วนเชื้อต่อน้ำกลั่น พบว่า ไอโซเลท 3S19 อัตราส่วน 1:25 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งมากที่สุด คือ 0.28 ก./ต้น เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้ไอโซเลท 2R13 อัตราส่วน 1:10, ไอโซเลท 3S19 อัตราส่วน 1:1, 1:50 และไอโซเลท 3R14 อัตราส่วน 1:25 และ 1:50 **(Table 4)**

Table 3 Interactions between isolates and ratios on fresh weight of *Vanda* after inoculation for 4 months

Factors	Fresh weight (g/plant)
Isolates	
2R13	1.07^{b}
3S19	1.62^{a}
3R14	1.03^{b}
Ratios	
1:1	1.34^{a}
1:10	1.08^{b}
1:25	1.25^{ab}
1:50	1.29^{ab}
Isolates x Ratios	
2R13 x 1:1	1.22^{c}
2R13 x 1:10	1.17^{cd}
2R13 x 1:25	0.89^{g}
2R13 x 1:50	1.02^{ef}
3S19 x 1:1	1.87^{a}
3S19 x 1:10	1.22^{c}
3S19 x 1:25	1.93^{a}
3S19 x 1:50	1.45^{b}
3R14 x 1:1	0.92^{fg}
3R14 x 1:10	0.85^{g}
3R14 x 1:25	0.94^{fg}
3R14 x 1:50	1.40^{b}
Control	1.08^{de}

Means with different lowercase letters within a column indicate a significant difference or means with same lowercase letters within a column indicate no significant difference according to Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) at $P<0.05$

Table 4 Interactions between isolates and ratios on dry weight of *Vanda* after inoculation for 4 months

Factors	Dry weight (g/plant)
Isolates	
2R13	0.17[b]
3S19	0.24[a]
3R14	0.20[ab]
Ratios	
1:1	0.20[a]
1:10	0.19[a]
1:25	0.21[a]
1:50	0.22[a]
Isolates x Ratios	
2R13 x 1:1	0.15[c]
2R13 x 1:10	0.21[abc]
2R13 x 1:25	0.15[c]
2R13 x 1:50	0.16[c]
3S19 x 1:1	0.25[ab]
3S19 x 1:10	0.19[bc]
3S19 x 1:25	0.28[a]
3S19 x 1:50	0.23[abc]
3R14 x 1:1	0.19[bc]
3R14 x 1:10	0.16[c]
3R14 x 1:25	0.20[abc]
3R14 x 1:50	0.26[ab]
Control	0.16[c]

Means with different lowercase letters within a column indicate a significant difference or means with same lowercase letters within a column indicate no significant difference according to Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) at $P<0.05$

นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานของแวนดาในระหว่างการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยในเดือนที่ 1 หลังได้รับการปลูกถ่ายเชื้อ สีต้นแวนดาเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นแดงเข้มจนถึงสีน้ำตาลเข้มปนม่วง ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงแวนดาเปลี่ยนเป็นสีเทาเข้มจนถึงสีดำจากเดิมสีขาวขุ่น ยกเว้นกรรมวิธี ไอโซเลท 3S19 อัตราส่วน 1:25 ที่สีของอาหารยังมีลักษณะตามปกติของอาหารสูตร VW **(Figure 1)** ส่วนในเดือนที่ 4 หลังการปลูกถ่ายเชื้อ พบว่า กรรมวิธีไอโซเลท 2R13 อัตราส่วน 1:1, 1:25 และ 1:50 ลักษณะต้นแวนดาเริ่มเป็นสีน้ำตาล คล้ายอาการการตายของเนื้อเยื่อพืช (necrosis) โดยจะเริ่มความผิดปกติตรงบริเวณโคนใบที่สัมผัสกับอาหารวุ้นก่อนและจะลามขึ้นด้านบนเรื่อย ๆ โดยจะเห็นได้ชัดใน กรรมวิธีไอโซเลท 2R13 อัตราส่วน 1:1 แต่ที่อัตราส่วน 1:10 มีอาการใบสีน้ำตาลเพียงแค่บางส่วนเท่านั้น ส่วนกรรมวิธี ไอโซเลท 3S19 อัตราส่วน 1:1, 1:10, 1:25 และ 1:50 พบว่า ในเดือนที่ 4 สีแดงเข้มจนถึงน้ำตาลที่ปรากฏในต้นแวนดาลดลงและต้นแวนดาเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวตามปกติ และกรรมวิธี ไอโซเลท 3R14 อัตราส่วน 1:1,

1:10, 1:25 และ 1:50 พบว่า ใบแวนดาเริ่มมีสีเขียวมากขึ้น แต่ใบบางส่วนเกิดอาการการตายของเนื้อเยื่อปรากฏร่วมด้วย ส่วนกรรมวิธีควบคุม พบว่า ใบต้นแวนดามีสีเขียวและเกิดอาการการตายของเนื้อเยื่อปะปนกัน ส่วนลักษณะอาหารเพาะเลี้ยงกล้วยไม้พบว่า มีสีเทาเข้มไปจนถึงสีดำ รวมทั้งกรรมวิธีควบคุม ยกเว้น กรรมวิธี ไอโซเลท 3S19 อัตราส่วน 1:25 ยังมีลักษณะสีขาวขุ่นตามปกติ โดยลักษณะสีอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนแปลง อาจเกิดขึ้นจากการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ปลูกถ่ายให้กับต้นแวนดาหรือแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีอยู่เดิมในต้นแวนดาเจริญลงสู่อาหารเพาะเลี้ยงโดยสังเกตได้จากฝ้าที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ จึงทำให้สีอาหารเปลี่ยนแปลงไป **(Figure 2)**

Isolate 2R13 ratio 1:1

Isolate 2R13 ratio 1:10

Isolate 2R13 ratio 1:25

Isolate 2R13 ratio 1:50

Isolate 3S19 ratio 1:1

Isolate 3S19 ratio 1:10

Isolate 3S19 ratio 1:25

Isolate 3S19 ratio 1:50

Isolate 3R14 ratio 1:1

Isolate 3R14 ratio 1:10

Isolate 3R14 ratio 1:25

Isolate 3R14 ratio 1:50

Control

Figure 1 Morphological of *Vanda* plantlets and culture media at 1 month after inoculation

Isolate 2R13 ratio 1:1

Isolate 2R13 ratio 1:10

Isolate 2R13 ratio 1:25

Isolate 2R13 ratio 1:50

Isolate 3S19 ratio 1:1

Isolate 3S19 ratio 1:10

Isolate 3S19 ratio 1:25

Isolate 3S19 ratio 1:50

Figure 2 Morphological of *Vanda* plantlets and culture media at 4 months after inoculation

วิจารณ์

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ปัจจัยชนิดของเชื้อแบคทีเรียและอัตราส่วนที่ใช้ปลูกถ่ายเชื้อแก่ต้นแวนดาส่งผลต่อการเติบโตของต้นแวนดา หากพิจารณาปัจจัยด้านชนิดของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ พบว่า ไอโซเลท 3S19 ส่งผลให้จำนวนใบเฉลี่ยต่อต้น น้ำหนักสดเฉลี่ยต่อต้นมากที่สุด คือ 6.6 ใบ/ต้น, 1.62 ก./ต้น ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ชนิดอื่น นอกจากนี้ไอโซเลท 3S19 ยังส่งผลต่อน้ำหนักแห้งเฉลี่ยต่อต้นมากที่สุดด้วย แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับไอโซเลท 3R14 ดังนั้นผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าชนิดของเชื้อแบคทีเรียมีผลต่อการส่งเสริมการเติบโตของพืช โดยจากการทดลองของ วรรณวิสา และคณะ (2564) ได้ทำการทดสอบศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 14 ไอโซเลท ที่แยกได้จากกล้วยไม้แวนดาพันธุ์มนุวดี ด้วยวิธี Acetylene reduction assay (ARA) พบว่า ไอโซเลท 3S19 มีอัตราการตรึงไนโตรเจนมากที่สุด คือ 24.32 ไมโครโมล เอทิลีน/หลอด/24 ชม. ซึ่งมากกว่าไอโซเลท 2R13 และ 3R14 ที่มีอัตราการตรึงไนโตรเจนอยู่ที่ 22.63 และ 16.22 ไมโครโมล เอทิลีน/หลอด/24 ชม. ตามลำดับ ดังนั้นไอโซเลท 3S19 จึงมีศักยภาพในการส่งเสริมการเติบโตได้ดีกว่าไอโซเลท 2R13 และ 3R14 นอกจากนี้ยังบ่งชี้ว่าชนิดแบคทีเรียเอนโดไฟท์มีผลต่อการส่งเสริมการเติบโตพืชที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับการรายงานปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียในเมล็ดข้าว ที่พบว่า ไอโซเลท 3010 ส่งผลให้ต้นกล้าข้าวมีอัตราส่วนน้ำหนักสดสูงที่สุด เนื่องจากไอโซเลทนี้มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน, ผลิตเอนไซม์ ACC-deaminase, การสังเคราะห์สาร siderophore และสารไอเอเอได้ดีกว่าไอโซเลทอื่น ๆ (Raweekul et al., 2016) และจากการอ้างอิงของ Aleynova, et al. (2021) ที่ทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) ของ *Vitis amurensis* Rupr. นาน 2 สัปดาห์ ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เมื่อปลูกถ่ายด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Xanthomonas* sp. และเชื้อรา *Alternaria* sp., *Biscogniauxia* sp., *Cladosporium* sp., *Didymella* sp. 2, และ *Fusarium* sp. ส่งผลให้มวลชีวภาพของเซลล์เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าชนิดหรือสกุลของจุลินทรีย์มีผลต่อมวลชีวภาพพืช นอกจากนี้ความสามารถในการเข้าสู่ต้นพืชของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ยังส่งผลต่อการส่งเสริมการเติบโตของต้นพืชด้วย เช่นกับการรายงานของ

Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado (2003) ที่นำต้นกล้าอ้อยพันธุ์ MEX 57-473 จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลูกถ่ายเชื้อ *Gluconacetobact diazotrophicu* สายพันธุ์ PAl 5^T ทำให้พืชมีน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในพืชมากกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ 35 และ 75 วัน

เมื่อพิจารณาปัจจัยอัตราส่วนที่ใช้ในการปลูกถ่ายเชื้อพบว่า ที่อัตราส่วน 1:25 และ 1:50 มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมความสูงต้นและจำนวนใบมากที่สุด แต่อัตราส่วนที่ 1:1 พบว่าส่งผลให้มีน้ำหนักสดต่อต้นมากที่สุด (ต้นสีน้ำตาล) ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่มีความหนาแน่นของเชื้อสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Setiawati et al. (2021) พบว่า เมื่อนำเมล็ดข้าวแช่ในสารละลายเชื้อที่มีความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียสูงจะทำให้แบคทีเรียมีโอกาสเข้าสู่ชิ้นส่วนพืชได้มากขึ้น เนื่องจากความแตกต่างของแรงดันสารแขวนลอยเชื้อ (suspension pressure) ดังนั้นหากเข้าสู่ต้นพืชได้มากขึ้น แบคทีเรียเหล่านั้นก็สามารถส่งเสริมการเติบโตของพืชอาศัยได้มากเช่นกัน

หากพิจารณาผลของอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดไอโซเลทกับอัตราส่วนสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย พบว่า กรรมวิธีที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท 2R13 และ 3R14 ทุก ๆ อัตราส่วนสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย อาจไม่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงแวนดาที่มีการปลูกถ่ายเชื้อในสภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากต้นแวนดามีลักษณะคล้ายอาการตายของเนื้อเยื่อพืชเกิดขึ้นและอาหารเพาะเลี้ยงกล้วยไม้มีสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งอาจเกิดจากชนิดไอโซเลท โดยไอโซเลท 2R13 และ 3R14 อาจเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการเจริญเติบโตภายใต้สภาพปลอดเชื้อได้มากเกินไป จึงยับยั้งการเติบโตของจุลชีพที่เป็นประโยชน์อื่น ๆ เช่นเดียวกับในต้นที่เชื้อเอนโดไฟท์ *Prunus yedoensis* ยับยั้งการเติบโตของ *P. yedoensis* และเป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดและใบเหลืองร่วมด้วย (Cheong et al. 2020) นอกจากนี้การที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเทาจนถึงดำเข้ม อาจเป็นไปได้ว่าไอโซเลท 2R13 และ 3R14 มีการผลิตสารในกลุ่มเมลานิน และแพร่สู่อาหารเลี้ยงเชื้อ คล้ายกับการผลิตสารเมลานินของเชื้อแอคทีโนไมซีส PNST-01 และ PRBS-12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 medium แล้วทำให้เกิดสีเทาเช่นเดียวกัน (ปราณี และคณะ, 2562) ส่วนกรรมวิธีควบคุม พบว่า ต้นแวนดามีอาการคล้ายเนื้อเยื่อตายและเกิดบริเวณโคนขึ้นไปเรื่อย ๆ เช่นกัน ซึ่งอาจเกิดจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ดั้งเดิมที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อแวนดาแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมและสามารถเจริญได้ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งโดยปกติแล้วการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องมีการกำจัดแบคทีเรียพื้นผิวภายนอกชิ้นส่วนพืชให้สะอาด แต่ในขณะเดียวกันแบคทีเรียที่อาศัยในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่าง ๆ ของพืช ไม่ได้ถูกกำจัดออกไป จึงทำให้เนื้อเยื่อพืชยังคงมีแบคทีเรียดั้งเดิมอาศัยอยู่ (Orlikowska et al., 2017). ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียเดิมที่อาศัยในเนื้อเยื่อแวนดาเจริญออกสู่อาหารเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนได้มากเกินไป จนชะงักการเติบโตของต้นอ่อนแวนดา (Tsao et al., 2000; Orlikowska et al., 2017) และจากการทดลองนี้พบว่า กรรมวิธีไอโซเลท 3S19 ที่อัตราส่วน 1:25 เป็นกรรมวิธีที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเติบโตแวนดาที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมากที่สุด ทั้งในเชิงปริมาณที่สามารถส่งเสริมความสูงต้นเฉลี่ย, จำนวนใบเฉลี่ยต่อต้น, น้ำหนักสดเฉลี่ยต่อต้น และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยต่อต้น ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น อีกทั้งในเชิงคุณภาพยังพบว่า กรรมวิธีดังกล่าวต้นแวนดาและอาหารเพาะเลี้ยงแวนดามีลักษณะที่สมบูรณ์มากที่สุด เนื่องจากไอโซเลท 3S19 เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน ปรับตัวเข้ากับสภาวะปลอดเชื้อได้ดี และมีความสามารถเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช (colonization) และที่อัตราส่วน 1:25 เป็นอัตราส่วนที่มีความหนาแน่นของประชากรเชื้อเหมาะสมต่อการส่งเสริมการเติบโตของกล้วยไม้แวนดาในสภาวะปลอดเชื้อ อาจเป็นเพราะอัตราส่วนนี้ที่มีความหนาแน่นของประชากรของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์เหมาะสมต่อระยะเติบโตของกล้วยไม้

สรุป

จากการศึกษาผลของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ต่อการเติบโตกล้วยไม้แวนดาในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท 3S19 ที่อัตราส่วน 1:25 (สารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์: น้ำกลั่น) เป็นกรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเติบโตของแวนดาในด้านความสูงต้นเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ยต่อต้น น้ำหนักสดเฉลี่ยต่อต้น น้ำหนักแห้งเฉลี่ยต่อต้น และลักษณะของต้นแวนดาที่มีคุณภาพมากที่สุด ดังนั้นไอโซเลท 3S19 ที่อัตราส่วน 1:25 มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อโดยส่งเสริมการเติบโตและคุณภาพของกล้วยไม้ที่ให้ดีขึ้นได้ในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์บริการการพัฒนา ขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ที่สนับสนุนสถานที่ทำการทดลองและอาหารเพาะเลี้ยงแวนดาจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ สาขาวิชาปฐพีศาสตร์ ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, ภานุมาศ พรมลา และสุภาภรณ์ ศรีจันทา. 2562. การสร้างเม็ดสีเมลานินและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยเมลานินที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ PNST-01 และสายพันธุ์ PRBS-12. วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร. 13(2): 142-155.

วรรณวิสา อิ่นแก้วปวงคำ, ชัยอาทิตย์ อิ่นคำ, ยุพา จอมแก้ว, กนกวรรณ ปัญจะมา และโสระยา ร่วมรังษี. 2564. การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของกล้วยไม้สกุลแวนดา. น. 87-95. ใน: โครงการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติเครือข่ายวิจัยสถาบันอุดมศึกษา 5-6 สิงหาคม 2564. เครือข่ายวิจัยเครือข่ายอุดมศึกษาภาคกลางตอนบน ร่วมกับ กระทรวงการอุดมศึกษาวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒและจุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.

Afzal, I., Z.K. KhanShinwari, S. Sikandar, and S. Shahzad. 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants**.** Microbiological Research. 221: 36-49.

Aleynova, O.A., A.R. Suprun, N.N. Nityagovsky, A.S. Dubrovina, and K.V. Kiselev. 2021. The influence of the grapevine bacterial and fungal endophytes on biomass accumulation and stilbene production by the in vitro cultivated cells of *Vitis amurensis* Rupr. Plants. 10(7): 1-13.

Andrade, G.V.S., F.A. Rodrigues, M.C. Nadal, C.M.S. Dambroz, A.D. Martins, V.A. Rodrigues, G.M.R. Ferreira, M. Pasqual, V.H. Buttros, and J. Doria. 2023. Plant-endophytic bacteria interactions associated with root and leaf microbiomes of *Cattleya walkeriana* and their effect on plant growth. Scientia Horticulturae. 309(2023): 1-15.

Arditti, J., and A. Krikorian.2008. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. Botanical Journal of the Linnean Society. 122(3): 183-241.

Cakova, V., A. Urbain, C.L. Quéméner, G. Audo, F. Bonté, and A. Lobstein. 2015. Purification of vandaterosides from *Vanda teres* (Orchidaceae) by stepwise gradient centrifugal partition chromatography. Journal of Separation Science. 38(17): 3006-3013.

Cheong, E.J., M. Na, and U. Jeong. 2020. The effect of endophytic bacteria on *in vitro* shoot growth of *Prunus yedoensis* and its identification and elimination. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology. 56: 200-206.

De, L.C., P.K. Rajeevan, A.N. Rao, M. Srivastava, and G. Chhetri. 2015. Morphological characterization in *Vanda* species. International Journal of Scientific Research. 4: 1-7.

Faria, D.C., A.C.F. Dias, I.S. Melo, and F.E.C. Costa. 2013. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. World Journal Microbiolology & Biotechnology. 29(2): 217-221.

Gardiner, L.M., A. Kocyan, M. Motes, D.L. Roberts, and B.C. Emerson. 2013. Molecular phylogenetics of *Vanda* and related genera (Orchidaceae). Botanical Journal of the Linnean Society. 173(4): 549-572.

George, E.F., M.A. Hall, and GJ.D. Klerk. 2008. Chapter 3. The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. p. 65-113. In: E.F. George, M.A. Hall, and GJ.D. Klerk. Plant Propagation by Tissue Culture. Springer, Dordrecht.

Inkaewpuangkham, W., K. Panjama, C. Inkham, Y. Chromkaew, and S. Ruamrungsri. 2021. Assessment of IAA synthesis by endophytic bacteria in *Vanda* (*Orchidaceae*), pp. 331-338. In Proceedings of the IX International Scientific and Practical Conference on Biotechnology as an Instrument for Plant Biodiversity Conservation (Physiological, Biochemical, Embryological, Genetic and Legal Aspects) 12-13 July 2021. Bangkok, Thailand.

Joko, T., D.N. Anggraeni, M. Irianti, B.S. Daryono, J. Widada, and S. Subandiyah. 2018. Bacterial endophytes isolated from orchids and their influence on plant health, pp. 37-41. In Proceedings of International Symposium on Innovative Crop Protection for Sustainable Agriculture 7-8 March 2018. Gifu University, Japan.

Khan, H., Marya, T. Belwal, M. Tariq, A.G. Atanasov, and H.P. Devkota. 2019. Genus Vanda: A review on traditional uses, bioactive chemical constituents and pharmacological activities. Journal of Ethnopharmacology. 229: 46-53.

Leghari, S.J., N.A. Wahocho, G.M. Laghari, A. HafeezLaghari, G. MustafaBhabhan, K. HussainTalpur, T.A. Bhutto, S.A. Wahocho, and A.A. Lashari. 2016. Role of nitrogen for plant growth and development: A review. Advances in Environmental Biology. 10: 209-218.

Lertjantarangkool, T., A. Pengnoo, W. Punsak, and W. Homhaul. 2017. Effectiveness of free living nitrogen fixing bacteria on seed germination of rice, pp. 359-367. In Naresuan research conference 13th 20-21 July 2017. Naresuan University, Phitsanulok.

McConnell, J., and F. Cruz. 1996. Growing Orchids on Guam. Available: https://www. researchgate.net/ publication/ 239556539_Growing_Orchids_on_Guam. Accessed Apr.5, 2022.

Muñoz-Rojas, J., and J. Caballero-Mellado. 2003. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. Microbial Ecology. 46(4): 454-464.

Novak, S.D., L.J. Luna, and R.N. Gamage. 2014. Role of Auxin in Orchid development. Plant Signaling and Behavior. 9(10): e972277-1-8.

Orlikowska, T., K. Nowak, and B. Reed. 2017. Bacteria in the plant tissue culture environment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 128: 487-508.

Raweekul, W., S. Wuttitummaporn, W. Sodchuen, and C. Kittiwongwattana. 2016. Plant growth promotion by endophytic bacteria isolated from Rice (*Oryza sativa*). Thammasat International Journal of Science and Technology. 21: 6-17.

Santos, M.L., D.L. Berlitz, S.L.F. Wiest, R. Schünemann, N. Knaak, and L. M. Fiuza. 2018. Benefits associated with the interaction of endophytic bacteria and plants. Brazilian Archives of Biology and Technology. 61: e18160431 1-11.

Setiawati, M.R., L. Sugiyono, N.N. Kamaluddin, and T. Simarmata. 2021. The use of endophytic growth-promoting bacteria to alleviate salinity impact and enhance the chlorophyll, N uptake, and growth of rice seedling. Open Agriculture. 6: 798-806.

Thammasiri, K. 2015. Current status of orchid production in Thailand, pp. 25-34. In: II Abstract book of International Orchid Symposium 27 March 2015. Bangkok, Thailand.

The Plant List. 2013. *Vanda*. Available: http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Vanda. Accessed Dec.21, 2022.

Tsao, C-W.V., J.D. Postman, and B.M. Reed. 2000. Virus infections reduce *in vitro* multiplication of "Malling Landmark" raspberry. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant. 36: 65-68.