



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตัดแยกและการศึกษาการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรีย  
endophytes จากข้าว (*Oryza sativa*)

นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน  
ประจำปีงบประมาณ 2558  
คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่ 142665  
เลขทะเบียน 23 พ.ศ. 2559

0.0211505

สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
หรือเพื่อวัตถุประสงค์อื่นใดที่ห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การคัดแยกและการศึกษาการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรีย endophytes จากข้าว (*Oryza sativa*)

ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 300,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558

หัวหน้าโครงการ: นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

### บทคัดย่อ

แบคทีเรีย endophytes เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรคหรือผลเสียกับต้นพืช งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการคัดแยกแบคทีเรีย endophytes จำนวน 192 ไอโซเลตจากลำต้นและรากของข้าวที่ถูกปลูกอยู่ในแปลงนาในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี, กรุงเทพมหานคร และชลบุรี การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ทำได้สำเร็จกับแบคทีเรีย endophytes จำนวน 183 ไอโซเลต ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวถูกนำไปใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยวิธี amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบส ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย endophytes เหล่านี้สามารถถูกจัดอยู่ในไฟลัมที่แตกต่างกัน 4 ไฟลัมได้แก่ *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* และ *Bacteroidetes* โดยพบว่าแบคทีเรียในไฟลัม *Firmicutes* เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด การจัดจำแนกในระดับจิ้นสพบว่าแบคทีเรีย endophytes ถูกจัดอยู่ในจิ้นสต่างๆ 32 จิ้นสโดยจิ้นส *Bacillus* เป็นจิ้นสที่มีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท 1017, 1048 และ 3037 มีแนวโน้มว่าจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่เนื่องจากค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน 16S rRNA ต่ำกว่าร้อยละ 98.5 เมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่ได้รับการศึกษาแล้ว การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลท 1017, 1048 และ 3037 จัดอยู่ในจิ้นส *Pedobacter*, *Sphingomonas* และ *Paenibacillus* แบคทีเรีย endophytes ทุกไอโซเลทถูกนำมาวิเคราะห์การสร้างฮอร์โมน IAA และเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งเป็นกิจกรรมที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ โดยพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 45 ไอโซเลทและ 42 ไอโซเลทตามลำดับที่สามารถสร้างฮอร์โมนและเอนไซม์ดังกล่าวได้ โดยแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมน IAA ได้คือแบคทีเรียในจิ้นส *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Chryseobacterium*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudacidovorax*, *Pseudomonas* และ *Sphingomonas* และแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase ได้คือแบคทีเรียในจิ้นส *Micrococcus*, *Bacillus*, *Fictibacillus*, *Halobacillus*, *Dickeya*, *Enhydrobacter* และ *Burkholderia*

คำสำคัญ : แบคทีเรียเอนโดไฟท์, ACC deaminase, indole-3-acetic acid, *Oryza sativa*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Research Title:** Isolation and study of plant growth promotion by bacterial endophytes from rice (*Oryza sativa*)

**Researcher:** Dr. Chokchai Kittiwongwattana

**Faculty:** Faculty of Science      **Department:** Department of Biology

## ABSTRACT

Endophytic bacteria are recognized as those that colonize the internal tissues of a plant host without causing detrimental effects or diseases to the plant host. In the present study, 192 isolates of endophytic bacteria were isolated from roots and stems of rice plants that were collected from rice paddies in Supanburi, Bangkok, and Chonburi provinces. Amplification of the 16S rRNA gene fragment was obtained only from 183 isolates. The gene fragment was used for partial characterization using amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and the sequence analysis. The result showed that these isolates belonged to four different phyla including *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*. The majority of the isolates were affiliated with the phylum *Firmicutes*. These bacteria were also classified into 32 different genera with the genus *Bacillus* as the predominant group. Additionally, isolates 1017, 1048 and 3037 were likely novel bacterial species because they displayed low levels of sequence similarity (<98.5%) when compared to other known bacterial species. The phylogenetic analysis showed that isolates 1017, 1048 and 3037 were potentially members of the genera *Pedobacter*, *Sphingomonas* and *Paenibacillus*, respectively. The production of IAA and ACC deaminase was also examined in all isolates. The result indicated that 45 and 42 isolates were able to synthesize the phytohormone IAA and the ACC deaminase enzyme, respectively. IAA-producing isolates were members in the genera *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Chryseobacterium*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudacidovorax*, *Pseudomonas* and *Sphingomonas*. Isolates that produced ACC deaminase belonged to the genera *Micrococcus*, *Bacillus*, *Fictibacillus*, *Halobacillus*, *Dickeya*, *Enhydrobacter* and *Burkholderia*.

**Keywords :** ACC deaminase, endophytic bacteria indole-3-acetic acid, *Oryza sativa*

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 ผู้วิจัยขอขอบคุณเกษตรกรเจ้าของแปลงนาที่ให้ ความอนุเคราะห์ต้นข้าวที่นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	2
1.5 สมมุติฐานงานวิจัย และกรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	2
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	8
3.1 การคัดแยกจุลินทรีย์ endophyte ที่พบในรากและลำต้นของข้าว.....	8
3.2 การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย endophytes.....	8
3.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย endophytes ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล.....	8
3.4 การจัดจำแนกกลุ่มชนิดแบคทีเรียของ isolate ต่างๆ โดยใช้เทคนิค ARDRA.....	9
3.5 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย endophyte ในสารละลายกลีเซอรอล.....	10
3.6 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย endophyte ในสารละลายกลีเซอรอลและวิธี lyophilization.....	10
3.7 การตรวจสอบการสร้างฮอร์โมน IAA โดยแบคทีเรีย endophytes.....	10
3.8 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase.....	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	12
4.1 การคัดแยกแบคทีเรีย endophytes จากข้าว.....	12
4.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย endophytes.....	12
4.3 ผลการจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรีย endophytes ด้วยวิธี Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA).....	13
4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย endophytes.....	14
4.5 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย endophytes.....	17
4.6 การทดสอบการสร้างฮอร์โมน IAA ในแบคทีเรีย endophytes.....	20
4.7 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase.....	21
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	22
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ.....	22
เอกสารอ้างอิง.....	24
ภาคผนวก ก.....	27
ภาคผนวก ข.....	35
การนำเสนอผลงานวิจัยใน 2 <sup>nd</sup> International Symposium on Agricultural Technology.....	36
การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมการบริหารจัดการความหลากหลายทางชีวภาพแห่งชาติครั้งที่ 2.....	41
การเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสาร Thammasat International Journal of Science and Technology..	44
ประวัตินักวิจัย.....	56



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 .....	12
4.2 .....	16
ภาคผนวก ก1 .....	29



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1	13
4.2	14
4.3	19
4.4	20
4.5	21



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียหลายชนิดถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตของมนุษย์ทั้งในแง่ของการผลิตอาหาร การกำจัดของเสีย การเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นต้น นอกเหนือไปจากแบคทีเรียที่เป็นที่รู้จักในปัจจุบันแล้ว ยังมีแบคทีเรียอีกหลายชนิดในธรรมชาติที่ยังไม่ได้รับการศึกษาและอาจสามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อพัฒนาคุณภาพชีวิตและความเป็นอยู่ของมนุษย์ได้ แบคทีเรียที่เป็นประโยชน์เหล่านี้สามารถถูกพบได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลายทั้งในบริเวณที่อุดมสมบูรณ์ และบริเวณที่มีความเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ถิ่นที่อยู่ของแบคทีเรียอีกแหล่งหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจศึกษาจากนักวิทยาศาสตร์คือภายในต้นพืชซึ่งมีช่องว่างระหว่างเซลล์ภายในเนื้อเยื่อให้แบคทีเรียหลากหลายชนิดอาศัยอยู่ได้ แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในพืชดังกล่าวนี้และไม่ก่อให้เกิดอันตรายหรือชักนำให้เกิดโรคกับพืชเจ้าบ้าน (host) เรียกว่าแบคทีเรีย endophytes การศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรีย endophytes เหล่านี้มีประโยชน์ต่อพืชในแง่ของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promotion) โดยแบคทีเรีย endophytes บางชนิดมีการสร้างสารที่กระตุ้นให้พืชมีการเจริญเติบโตที่สูงขึ้น เช่น ฮอโมนในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน หรือมีความสามารถในการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารที่สำคัญ เช่น ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัสให้แก่พืชได้ ความสามารถดังกล่าวของแบคทีเรีย endophytes ส่งผลให้พืชที่ดำรงชีวิตร่วมกับแบคทีเรียชนิดนั้นมีผลผลิตและชีวมวลที่สูงขึ้น นอกจากนี้แบคทีเรีย endophytes บางชนิดสามารถส่งเสริมให้พืชสามารถเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ดินเค็ม ดินปนเปื้อนสารเคมีที่เป็นพิษได้ดีขึ้นโดยการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ที่ขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ฮอโมนเอทิลีนที่ยับยั้งการเจริญของพืช รวมไปถึงแบคทีเรีย endophytes ที่สามารถชักนำให้พืชมีความต้านทานต่อศัตรูพืชทั้งชนิดที่เป็นแบคทีเรีย (pathogenic bacteria) และ เชื้อรา (pathogenic fungi) โดยแบคทีเรีย endophytes เหล่านี้อาศัยกลไกการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคพืช ด้วยคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่างๆ ดังกล่าว แบคทีเรีย endophytes จึงจัดได้ว่าเป็นแหล่งทรัพยากรทางธรรมชาติที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ นอกจากนี้การศึกษาค้นคว้าความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ยังนำไปสู่การค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่ๆ ที่ไม่เคยได้รับการค้นพบมาก่อน แบคทีเรียเหล่านี้อาจมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชสูงกว่าแบคทีเรียชนิดหรือสายพันธุ์อื่นๆ ที่ได้รับการค้นพบมาก่อนหน้า กอปรกับประเทศไทยมีพื้นที่ตั้งอยู่ในบริเวณที่จัดได้ว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพที่สูงแห่งหนึ่งของโลก ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่อาศัยอยู่ภายในรากและลำต้นของข้าว (*Oryza sativa*) ซึ่งเป็นพืชที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อเศรษฐกิจของประเทศ และงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นแล้วว่าข้าวเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของแบคทีเรียที่มีประโยชน์หลากหลายชนิด รวมไปถึงมีการค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่ๆ จำนวนมากจากข้าวด้วย โครงการวิจัยนี้ครอบคลุมตั้งแต่การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรีย endophytes ที่พบในรากและลำต้นของข้าวโดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุลตลอดจนการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ การสร้างฮอโมนพืช indole acetic acid (IAA) และการเพิ่มอัตราการละลายน้ำของสารประกอบฟอสเฟต (phosphate solubilization) ผลการศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่าจะได้รับความรู้เพิ่มมากขึ้นในแง่ของความหลากหลายทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่อาศัยอยู่ในข้าว ตลอดจนอาจนำไปสู่การค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่ๆ หรือแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอื่นๆ และลดการพึ่งพาการใช้ปุ๋ยเคมีที่ส่งผลเสียต่อสภาพดินและสิ่งแวดล้อมได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาความหลากหลายของชนิดแบคทีเรีย endophytes ที่พบในราก และ ลำต้นของข้าว
- 1.2.2 เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียซึ่งอาจเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ไม่เคยได้รับการศึกษามาก่อน
- 1.2.3 เพื่อศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรีย endophytes ที่มีประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของ

พืช

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในราก และ ลำต้นของต้นข้าว โดยจะทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชจากแหล่งเพาะปลูกในประเทศมาคัดแยกให้ได้แบคทีเรีย เพื่อใช้จำแนกกลุ่มด้วยวิธี Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของ isolate ตัวอย่างอย่างน้อย 30% ของแต่ละกลุ่ม ARDRA เพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรีย ตลอดจนศึกษาคุณสมบัติในการสร้างฮอร์โมน IAA และการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรีย isolate ตัวอย่าง

## 1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

- 1.4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้จากข้าวที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ
- 1.4.2 การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย endophytes ด้วยการใช้เทคนิคในระดับโมเลกุล
- 1.4.3 การตรวจสอบการสร้างฮอร์โมน IAA โดยแบคทีเรีย endophytes
- 1.4.4 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ในแบคทีเรีย endophytes

## 1.5 สมมติฐานและกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ตั้งอยู่บนองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางชีวภาพและประโยชน์ของแบคทีเรีย endophytes และผู้วิจัยได้เลือกข้าวมาใช้ในการศึกษาเนื่องจากมีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานถึงการค้นพบแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่จากข้าว และความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรียเหล่านี้ การศึกษาครั้งนี้จะนำมาซึ่งความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในราก และลำต้นของข้าว และยังสามารถแยกได้แบคทีเรีย isolate ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไปได้ในอนาคต

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.6.1 ทราบถึงความหลากหลายของแบคทีเรีย endophyte ที่อาศัยร่วมกับต้นข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6.2 ทราบถึงกิจกรรมการสร้างฮอริโมน IAA

1.6.3 ทราบถึงกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้าวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่จัดอยู่ในวงศ์ Poaceae ประโยชน์หลักของข้าวคือการนำมาใช้ในรูปของอาหารโดยเมล็ดข้าวเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของมนุษย์ในพื้นที่ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย จีน กัมพูชา พม่า ฟิลิปปินส์ เป็นต้น ประเทศไทยนับได้ว่าเป็นผู้ผลิตข้าวรายสำคัญของโลก โดยมีพื้นที่เพาะปลูกทั้งประเทศประมาณ 80.676 ล้านไร่ซึ่งคิดเป็นพื้นที่เกือบครึ่งหนึ่งของพื้นที่เพาะปลูกทั้งประเทศ (151.923 ล้านไร่) (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ในปี พ.ศ. 2553 ประเทศไทยมีผลผลิตข้าวต่อไร่เท่ากับ 35.584 ล้านตันเป็นอันดับที่ 7 ของโลก และข้าวยังถูกจัดเป็นสินค้าส่งออกทางการเกษตรที่มีความสำคัญอย่างมากต่อเศรษฐกิจของประเทศโดยมีมูลค่าการส่งออกเป็นอันดับ 2 รองจากมูลค่าการส่งออกยางธรรมชาติ โดยในปี พ.ศ. 2553 มูลค่าการส่งออกของข้าวและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องมีมูลค่าสูงถึง 180,727 ล้านบาท ข้อมูลเบื้องต้นเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการพัฒนาเทคโนโลยีในด้านต่างๆ เกี่ยวกับการเพาะปลูกข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิตซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งต่อเกษตรกรผู้ผลิต ประชาชนทั่วไปที่เป็นผู้บริโภค ตลอดจนสภาพเศรษฐกิจฐานะทางการคลังของประเทศด้วย

เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะปลูกมีอยู่ด้วยกันหลากหลายด้าน ครอบคลุมตั้งแต่การปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวให้มีจำนวนเมล็ดต่อต้นเพิ่มขึ้น เพิ่มความสามารถในการทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือต้านทานศัตรูพืช การพัฒนาเทคโนโลยีการกสิกรรมทั้งในแง่ของการให้ปุ๋ยแร่ธาตุอาหารให้เหมาะสมต่อความต้องการของพืช ตลอดจนการปรับปรุงเทคโนโลยีการเก็บเกี่ยวและการรักษาคุณภาพของเมล็ดข้าวภายหลังการเก็บเกี่ยวให้มีคงสภาพได้นาน นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการประยุกต์ใช้ประโยชน์จุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promotion) ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรีย ที่อาศัยอยู่ภายในดินพืชโดยที่ไม่ก่อโทษใดๆ กับพืชที่เรียกว่าแบคทีเรีย endophytes (Mei and Flinn, 2010) แหล่งที่อยู่ที่เหมาะสมต่อการศึกษาเพื่อค้นหาแบคทีเรีย endophytes ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์มีอยู่ 5 แหล่งด้วยกัน ได้แก่ 1. พืชที่เจริญเติบโตในพื้นที่ที่อุดมสมบูรณ์ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง 2. พืชที่เจริญเติบโตในพื้นที่ที่มีลักษณะเฉพาะ เช่นพื้นที่ที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ หรือพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารเคมีหรือโลหะหนัก พื้นที่รูปแบบนี้เปรียบได้กับกลไกการคัดเลือกทางธรรมชาติรูปแบบหนึ่ง พืชที่สามารถเจริญอยู่ได้จึงอาจมีการพึ่งพาแบคทีเรีย endophytes ให้สามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมดังกล่าวได้ 3. พืชที่ถูกปลูกในพื้นที่ที่มีการบุกรุกของเชื้อโรคแต่ไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่แบคทีเรีย endophytes ที่อยู่ในพืชนั้นอาจส่งเสริมให้เกิดกลไกการป้องกันตัวเองของพืชจากศัตรูพืชได้ดีขึ้น 4. พืชที่มีการนำมาประยุกต์ใช้เป็นยาสมุนไพรโดยมนุษย์ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชเหล่านี้อาจมีแบคทีเรีย endophytes ที่มีการผลิตสารที่เป็นประโยชน์ต่อพืชและมนุษย์อยู่ด้วย และ 5. พืชที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในพื้นที่จำกัดพื้นที่หนึ่งมาเป็นช่วงระยะเวลายาวนาน ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะพบแบคทีเรีย endophytes ที่มีการวิวัฒนาการที่จำเพาะเจาะจงร่วมกันกับพืชชนิดนั้นๆ (Yu et al., 2010)

ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรีย endophytes ในข้าวอย่างกว้างขวาง รายงานจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes จากข้าว โดยในข้าวสปีชีส์ *Oryza sativa*

นั้นเป็นแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรียในกลุ่ม Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Bacteroidetes, firmicutes, Deinococcus-Thermus และ Acidobacteria (Mano and Morisaki, 2008) แบคทีเรียสปีชีส์ใหม่หลายสปีชีส์ ถูกพบในข้าวทั้งที่เป็นข้าวปลูกและข้าวป่า ตัวอย่างการค้นพบแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุลต่างๆ เช่น *Actinobolus oryzae*, *Sphingomonas azotifigens*, *Azospirillum oryzae*, *Paenibacillus hunanensis*, *Rheinheimera tangshanensis* ที่พบในข้าวปลูก และ *Rhizobium oryzae*, *Ochrobactrum oryzae*, *Enterobacter oryzae* ที่พบในข้าวป่า เป็นต้น โดยแบคทีเรียเหล่านี้เกือบทั้งหมดถูกพบในรากของต้นข้าว

กลไกหนึ่งของแบคทีเรีย endophytes ในการส่งเสริมอัตราการเจริญเติบโตของพืชคือการสร้างฮอร์โมน IAA ซึ่งจัดเป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินที่มีความสำคัญในแง่ของการกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์พืช การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการ inoculate เชื้อแบคทีเรียที่สังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ในรากพืชสามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชโดยส่งผลให้พืชมีการสร้างขนรากและรากแขนงเพิ่มมากขึ้นซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของพื้นที่ผิวโดยรวมของระบบรากพืช ทำให้พืชมีความสามารถในการดูดซับน้ำและแร่ธาตุที่สำคัญต่อพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นนั่นเอง ในขณะที่แบคทีเรียกลายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ได้ โดยแบคทีเรียพันธุ์กลายนี้ไม่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้เหมือนกับแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild-type) ผลการศึกษานี้จึงเป็นการยืนยันถึงความสำคัญของฮอร์โมน IAA ของแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Spaepen and Vanderleyden, 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการตอบสนองของข้าวต่อฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นโดยเป็นการใช้ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่มีโปรโมเตอร์ของยีน DR5 ต่ออยู่กับยีนรายงานผล GUS โปรโมเตอร์ของยีน DR5 นั้นจัดเป็นโปรโมเตอร์ที่มีความไวในการตอบสนองต่อฮอร์โมน IAA สูงซึ่งพืชที่ถูก inoculate ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมน IAA ก็มีการแสดงออกของยีนรายงานผล GUS ในปริมาณที่สูง แสดงให้เห็นว่าพืชนั้นมีการตอบสนองในระดับโมเลกุลต่อฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรียผลิตขึ้น (Mattos et al., 2008) กลไกการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA นั้นถูกค้นพบและศึกษาในแบคทีเรียหลายชนิด โดยมีการประมาณการเอาไว้ว่าประมาณ 80% ของแบคทีเรียกลุ่มที่เรียกว่า rhizosphere bacteria ที่อาศัยอยู่รอบๆ รากพืชนั้นสามารถสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ได้ (Patten and Glick, 1996; Khalid et al., 2004) แบคทีเรียใช้กรดอะมิโน tryptophan เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA การศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่ากลไกการสังเคราะห์ IAA จากกรดอะมิโน tryptophan ในแบคทีเรียนั้นมีอยู่ด้วยกันอย่างน้อย 5 รูปแบบที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามกลไกต่างๆ เหล่านี้ส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกันกับกลไกการสังเคราะห์ IAA ของพืช (Spaepen and Vanderleyden, 2010) ดังนั้นแล้วการตรวจสอบความสามารถในการสร้างฮอร์โมนชนิดนี้ของแบคทีเรียจึงทำได้โดยเติมกรดอะมิโน L-tryptophan ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจสอบการเกิดขึ้นของ IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการใช้ยา Salkowski (Bric et al., 1991) งานวิจัยหลายชิ้นที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้จากข้าวมีความสามารถในการสร้างฮอร์โมน IAA ตัวอย่างเช่น งานวิจัยชิ้นหนึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย endophytes หลายสายพันธุ์ในสกุล *Pantoea*, *Ochrobactrum* และ *Pseudomonas* ที่แยกได้จากข้าวมีกิจกรรมการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA (Verma et al, 2001) แบคทีเรีย *Pantoea agglomerans* สายพันธุ์ YS19 ที่แยกได้จากรากข้าวสามารถสร้างฮอร์โมน IAA ได้และการ inoculation ต้นข้าวด้วยเชื้อดังกล่าวส่งผลให้พืชมีมวลเพิ่มขึ้น 1.64 เท่าของพืชในกลุ่มควบคุม (Song et al., 2006) งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งค้นพบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ RRE25 ซึ่งเป็น endophyte ที่แยกได้จากข้าว สามารถผลิตฮอร์โมน IAA ได้เช่นกัน และแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถนำมาปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีการสร้างฮอร์โมน IAA สูงขึ้นได้ด้วยการใช้สาร nitrous acid โดยแบคทีเรียที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์มาแล้วมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้รากข้าวมีการเจริญเติบโตมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งการเจริญเติบโตของรากที่เพิ่มขึ้นนี้ส่งผลให้พืชสามารถดูดซึมแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ดียิ่งขึ้น (Singh et al., 2013) งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งได้ทำการคัดแยกแบคทีเรีย endophytes จากข้าวที่ปลูกในประเทศเกาหลี แบคทีเรีย endophytes หลายชนิดสามารถสร้างฮอร์โมน IAA ได้ โดยแบคทีเรียเหล่านี้จัดอยู่ในสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Paenibacillus* และ *Microbacterium* ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าวได้ด้วย (Ji et al., 2013)

เอธิลีน (ethylene) เป็นฮอร์โมนพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช โดยเอธิลีนนั้นเป็นฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อลดการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะเครียดที่เกิดจากปัจจัยภายนอกต่างๆ ดังนั้นแล้วการยับยั้งการสร้างฮอร์โมนชนิดนี้ในพืชจึงมีผลในทางคงอัตราการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะเครียดได้อีกทางหนึ่ง แบคทีเรีย endophytes หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมในการเปลี่ยน 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่พืชใช้ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอธิลีนให้เป็น  $\alpha$ -ketobutyrate และ แอมโมเนีย ทำให้พืชไม่สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนเอธิลีนได้ (Glick et al., 1998; Glick, 2005) และการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรีย *Burkholderia phytofirmans* สายพันธุ์ PsJN ที่ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ถูกทำให้หายไป (deletion mutation) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียพันธุ์กลายนี้สูญเสียความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชไปด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้ยืนยันให้เห็นถึงความสำคัญของเอนไซม์ ACC deaminase จากแบคทีเรีย (Sun et al., 2009b) การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase สามารถทำได้โดยการทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหาร minimal medium ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย endophyte ที่แยกได้จากข้าวมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase และแบคทีเรียเหล่านี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ตัวอย่างเช่น การศึกษาในระดับจีโนมของแบคทีเรีย endophyte ในสกุล *Azospirillum* สายพันธุ์ B510 ที่แยกได้จากข้าว แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมียีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase และยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA อยู่ด้วย (Kaneko et al., 2010) ในงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งที่ศึกษาผลของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SLS18 ที่แยกได้จากพืช pokeweed (*Phytolacca acinosa*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมน IAA และเอนไซม์ ACC deaminase ได้ การทดสอบผลของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ต่อการเจริญเติบโตของพืชแสดงให้เห็นว่าพืชที่ถูก inoculate ด้วยแบคทีเรียชนิดนี้มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นในดินที่มีการปนเปื้อนของแมงกานีสและแคดเมียม (Luo et al., 2012)

นอกเหนือไปจากการนำแบคทีเรีย endophytes จากข้าวสามารถไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวเองแล้ว แบคทีเรียที่แยกได้ยังมีศักยภาพที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ได้ด้วยเช่นกัน ดังตัวอย่างงานวิจัยที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้จากพืชชนิดหนึ่งนั้นสามารถนำไปใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย ดังตัวอย่างงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถของแบคทีเรีย *B. phytofirmans* สายพันธุ์ PsJN ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อในส่วนของรากของต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องุ่นและสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตขององุ่นรวมทั้งพืชชนิดอื่นๆ ได้แก่ มันฝรั่ง และมะเขือเทศ (Lazarovits and Nowak, 1997; Sharma and Nowak, 1998; Nowak et al., 1999; Ait Barka et al., 2006) แต่อย่างไรก็ดีก็มีการค้นพบว่าความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย endophyte บางชนิดหรือบางสายพันธุ์นั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อลักษณะจีโนมไทป์ของพืชด้วย ตัวอย่างเช่น มันสำปะหลังพันธุ์ปลูกบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีการตอบสนองต่อแบคทีเรีย endophyte *B. phytofirmans* สายพันธุ์ PsJN (Bensalim et al., 1998; Nowak et al., 1998) ด้วยเหตุนี้การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรีย endophytes ที่มีประโยชน์เหล่านี้รวมไปถึงการค้นหาแบคทีเรีย endophytes ชนิดและสายพันธุ์ใหม่ๆ จึงมีความจำเป็นอย่างมากต่อการนำทรัพยากรจุลินทรีย์เหล่านี้มาประยุกต์ใช้ในเชิงการเกษตรกรรมอย่างรอบด้านเพื่อเพิ่มผลผลิตของพืชเศรษฐกิจ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 การคัดแยกจุลินทรีย์ endophyte ที่พบในรากและลำต้นของข้าว

นำต้นข้าวที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่จากแหล่งเพาะปลูกมาใช้ในการศึกษา โดยทำการแยกชิ้นส่วนของพืช ออกเป็นราก และลำต้น จากนั้นทำการฟอกทำความสะอาดบริเวณผิวนอกของแต่ละชิ้นส่วนของพืชโดยใช้ สารละลาย 10% คลอโรกซ์ และ Tween-20 เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการล้างพืชในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อนาน 1 นาที 5 ครั้ง ย้ายชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชไปยังโถงที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ใส่ในน้ำกลั่นสะอาดที่ปราศจากเชื้อลงไป ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร และบดชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชแยกกัน แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่แตกต่างกันสองชนิดคือ tryptone soya agar ความเข้มข้น 1/10 เท่า จากนั้นบ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนานเป็นระยะเวลา 7 วันแล้วทำการสุ่มคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มีลักษณะที่แตกต่างกันมา เพาะเลี้ยงบนอาหาร tryptone soya agar ความเข้มข้น 1/10 เท่า จากนั้นแบคทีเรียแต่ละ isolate จะถูกนำมา ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single-colony streak เพื่อให้แน่ใจว่าได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์พร้อมกับทำการตรวจสอบ ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย และการติดสี Gram's ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้ น้ำกลั่นที่ได้จากการล้าง ชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชในครั้งสุดท้ายจะถูกนำมาเพาะเชื้อด้วยเช่นกันเพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมแสดงให้เห็นว่าขั้นตอน การฟอกทำความสะอาดสามารถกำจัดแบคทีเรียที่อยู่ภายนอกต้นพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพและแบคทีเรียที่แยกได้ คือแบคทีเรีย endophyte เท่านั้น

### 3.2 การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย endophytes

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone soya agar ความเข้มข้น 1/10 เท่า จนกระทั่งเชื้อเจริญเติบโตได้ ปริมาณที่มากพอ จากนั้นชุดเชื้อออกมาจากผิวน้ำอาหารด้วยไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ ใส่ลงไปในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออยู่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกและทำการสกัดแยกโปรตีน และผนังเซลล์ออกจากดีเอ็นเอด้วยสารละลายผสมระหว่าง phenol และ chloroform ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลาย ส่วนใสด้านบนมาเติม chloroform ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาสารละลายดีเอ็นเอด้านบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติมสารละลาย 3M sodium acetate ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอที่แยกได้ และเติม isopropanol ปริมาตรเท่ากับ สารละลายดีเอ็นเอ ทำการผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาล้างในสารละลาย 70% ethanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงต่อ จากนั้นเทสารละลาย 70% ethanol ที่ทิ้งไปแล้วนำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้ง ตะกอนดีเอ็นเอจะถูกนำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-EDTA ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเพื่อในปฏิกิริยา PCR ต่อไป

### 3.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย endophytes ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าการฉ้อโกงใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอที่แยกสกัดออกมาได้จากเชื้อแต่ละชนิดถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ universal ดังนี้

ไพรเมอร์ 41F: 5'- GCTCAGATTGAACGCTGGCG-3'

ไพรเมอร์ 1492R: 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

ไพรเมอร์คู่ดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ในแบคทีเรียหลากหลายชนิด โดยปฏิกิริยา PCR มีองค์ประกอบต่างๆ เป็นดังนี้

DNA (50 ng/ $\mu$ l)	2	ไมโครลิตร
primer 41F (5 $\mu$ M)	0.5	ไมโครลิตร
primer 1492R (5 $\mu$ M)	0.5	ไมโครลิตร
10X buffer	1	ไมโครลิตร
2mM dNTP	1	ไมโครลิตร
25mM MgCl	0.2	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.05	ไมโครลิตร
H2O	4.75	ไมโครลิตร

ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะถูกนำมาใส่รวมกันในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้

94°C	3	นาที	
94°C	0.5	นาที	
52°C	0.5	นาที	40 รอบ
72°C	0.5	นาที	
72°C	5	นาที	

ชิ้นของดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ที่เพิ่มจำนวนขึ้นมาได้นี้จะถูกนำมาตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis

### 3.4 การจัดจำแนกกลุ่มชนิดแบคทีเรียของ isolate ต่างๆ โดยการใช้เทคนิค ARDRA

สารละลายที่มีชิ้นดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA อยู่จะถูกนำมาวิเคราะห์จัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรีย เพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรีย isolate ใดน่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันโดยการใช้เทคนิค ARDRA ร่วมกับการใช้เอนไซม์ AluI โดยปฏิกิริยามีดังนี้

สารละลายดีเอ็นเอ	8	ไมโครลิตร
10X Buffer	1	ไมโครลิตร
AluI	0.1	ไมโครลิตร
H2O	5.9	ไมโครลิตร

นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ AluI โดยการใช้วิธี Agarose gel electrophoresis ซึ่งผลที่ได้จะเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากนั้นทำการจัดกลุ่มของ isolate ที่มีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันให้เป็นกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ARDRA กลุ่มเดียวกัน จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่าง isolate อย่างน้อยร้อยละ 30 ของแต่ละกลุ่ม ARDRA ไปทำการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ 16S rRNA อีกครั้งหนึ่งด้วยวิธี PCR จากนั้นทำความสะอาดสารละลายดีเอ็นเอเพื่อกำจัดไพรมอร์และเกลือต่างๆ ออกไปโดยการใช้น้ำยาสำเร็จรูป นำชิ้นดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์แล้วนี้ไปหาลำดับเบสโดยใช้ไพรมอร์ 1492 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของ isolate ตัวอย่างจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EzTaxon เพื่อจำแนกจีโนมของแบคทีเรีย

### 3.5 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย endophyte ในสารละลายกลีเซอรอล

แบคทีเรียที่แสดงค่าความคล้ายคลึงต่ำกว่าร้อยละ 98.5 จะถูกนำหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA เพิ่มเติมโดยใช้ไพรมอร์ 41F, 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') และ 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้ถูกนำมาใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของแบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ถูกจัดจำแนกแล้วด้วยการวิเคราะห์ multiple alignment โดยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ClustalW ช่องว่างและเบสที่ไม่ถูกต้องถูกปรับแก้ไขให้ถูกต้อง จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbour-joining และวิเคราะห์ค่าระยะห่างเชิงวิวัฒนาการด้วย Kimura 2-parameter model ความเชื่อมั่นของผลการทดลองถูกวิเคราะห์โดยใช้วิธี Bootstrap analysis โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง

### 3.6 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย endophyte ในสารละลายกลีเซอรอลและวิธี lyophilization

แบคทีเรีย endophyte ที่แยกได้จะนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารที่เหมาะสมในรูป slant agar เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จากนั้นใช้ลูบเปียเชื้อเชื้อเอาแบคทีเรียมาละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตรในหลอด eppendorf แล้วเติมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 50 % ลงไปผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -80°C

การเก็บรักษาแบคทีเรียด้วยวิธี lyophilization ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย endophyte ที่น่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ไม่เคยได้รับการรายงานมาก่อนบนอาหารเหมือนกับในข้อ 13.5 จากนั้นเตรียมสารละลาย skim milk ความเข้มข้น 10% และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้เป็น lyophilization medium จากนั้นดูดเอาเชื้อแบคทีเรียมาละลายในสารละลาย skim milk ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันดีแล้วนำสารละลายเชื่อนี้ไปเข้าเครื่อง lyophilizer เพื่อทำให้เซลล์แห้ง และเก็บไว้ในหลอดแก้วที่อุณหภูมิ 4°C

### 3.7 การตรวจสอบการสร้างฮอร์โมน IAA โดยแบคทีเรีย endophytes

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย endophyte ที่น่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ไม่เคยได้รับการรายงานมาก่อนบนอาหารเหมือนกับในข้อ 13.5 จากนั้นเตรียมสารละลาย skim milk ความเข้มข้น 10% และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้เป็น lyophilization medium จากนั้นดูดเอาเชื้อแบคทีเรียมาละลายในสารละลาย skim milk ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันดีแล้วนำสารละลายเชื่อนี้ไปเข้าเครื่อง lyophilizer เพื่อทำให้เซลล์แห้ง และเก็บไว้ในหลอดแก้วที่อุณหภูมิ 4°C

### 3.8 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร tryptic soy broth ปริมาตร 15 มิลลิลิตรข้ามคืน แล้วทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ จากนั้นล้างเซลล์ด้วยอาหาร DF salt minimal medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเชื้อเพื่อเก็บเซลล์อีกครั้งหนึ่ง เป็นเวลา 10 นาที แล้วกระจายเซลล์ใน DF salt minimal medium จากนั้นทำการหยดสารละลายเชื้อลงบนอาหารแข็ง DF salt minimal medium ที่แตกต่างกันสามชนิดคือ ชนิดแรกเติม  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้น 0.1M ชนิดที่สองเติม ACC และชนิดที่สามไม่เติมอะไร โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase จะสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารชนิดแรกและชนิดที่สองเท่านั้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 การคัดแยกแบคทีเรีย endophytes จากข้าว

ในงานวิจัยชิ้นนี้ทำการคัดแยกแบคทีเรีย endophytes จากข้าวที่เก็บรวบรวมมาจากนาข้าวในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี, กรุงเทพมหานครฯ และชลบุรี แบคทีเรียถูกคัดแยกจากส่วนของรากและลำต้นของข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวภายนอกแล้ว โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียจากข้าวจากจังหวัดสุพรรณบุรีจำนวน 74 ไอโซเลต แยกได้จากชิ้นส่วนของราก 48 ไอโซเลตและจากชิ้นส่วนของลำต้น 26 ไอโซเลต จากกรุงเทพมหานครจำนวน 37 ไอโซเลต โดยแยกได้จากชิ้นส่วนของราก 24 ไอโซเลต และ จากชิ้นส่วนของลำต้น 13 ไอโซเลต และจากจังหวัดชลบุรีจำนวน 81 ไอโซเลต โดยแยกได้จากชิ้นส่วนของราก 42 ไอโซเลต และ จากชิ้นส่วนของลำต้น 39 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.1) โดยที่แต่ละไอโซเลตมีรายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะโคโลนีดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1 (ภาคผนวก ก)

ตารางที่ 4.1 แบคทีเรีย endophytes ที่คัดแยกได้จากข้าวที่เก็บรวบรวมมาจากจังหวัดต่างๆ

จังหวัด	ชิ้นส่วน	จำนวน เชื้อ	รหัส
สุพรรณบุรี	ราก	48	1002-1051
	ลำต้น	26	2001-2027
กรุงเทพมหานครฯ	ราก	24	3001-3024
	ลำต้น	13	4001-4013
ชลบุรี	ราก	42	3025-3078
	ลำต้น	39	4014-4056
รวม		192	-

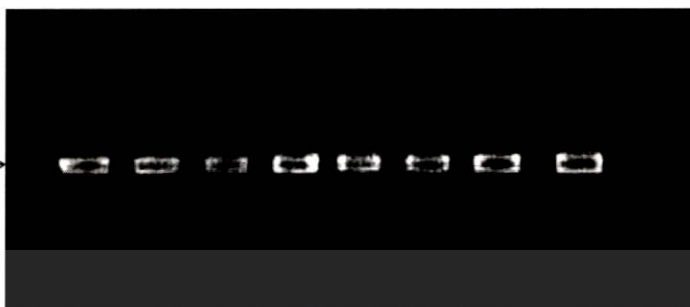
### 4.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย endophytes

แบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้จากข้าวทั้งหมด 192 ไอโซเลตถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 1500 คู่เบสด้วยเทคนิค PCR จากนั้นวิเคราะห์ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และอ่านผลแถบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล ดังในรูปที่ 4.1 ซึ่งปรากฏผลแถบดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอ็นเอของยีน 16S rRNA ขนาดประมาณ 1500 คู่เบส โดยสามารถเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ได้ 183 ไอโซเลต จากทั้งหมด 192 ไอโซเลต

1,500 คู่เบส →



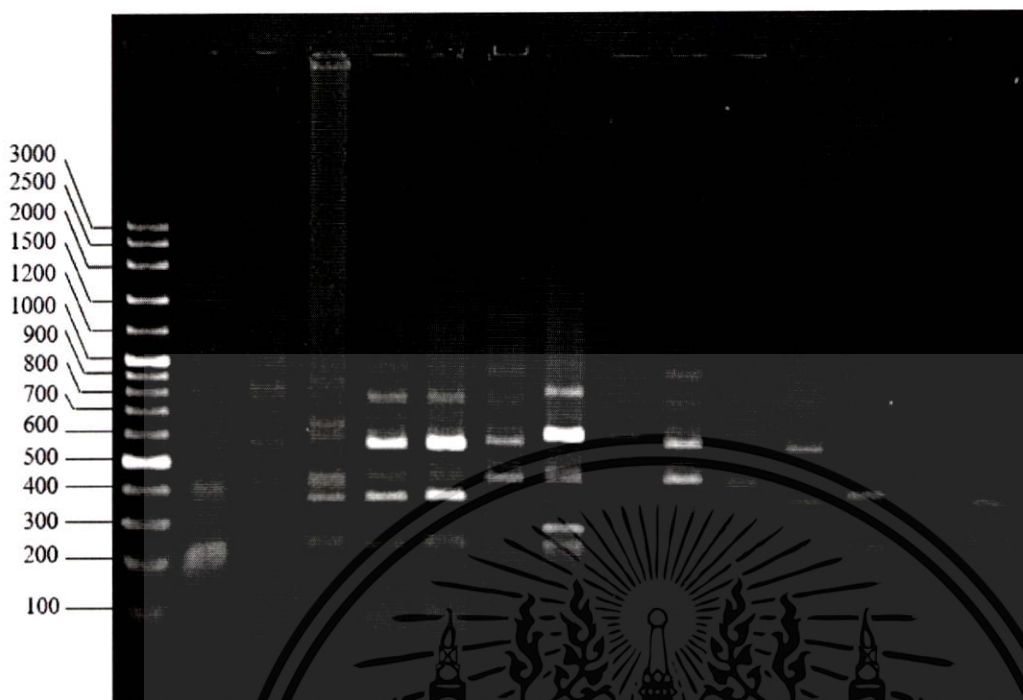
ภาพที่ 4.1 ซีนดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย endophytes ที่ถูกเพิ่มจำนวนโดยวิธี polymerase chain reaction

#### 4.3 ผลการจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรีย endophytes ด้วยวิธี Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

ซีนดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั้ง 183 ไอโซเลตถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* ทำให้ได้ซีนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต และความแตกต่างนี้เป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างของลำดับเบสที่พบบนซีนดีเอ็นเอของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต การตรวจผลของเทคนิค ARDRA ทำได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และอ่านผลแถบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล ดังในภาพที่ 4.2 โดยนำแถบดีเอ็นเอของแต่ละไอโซเลตมาเปรียบเทียบกันเพื่อดูความเหมือนหรือต่างกันของรูปแบบการตัด แล้วทำการจัดกลุ่มของแบคทีเรียออกเป็นกลุ่ม ARDRA กลุ่มต่างๆ จากนั้นทำการเลือกตัวแทนไอโซเลตของแต่ละกลุ่มไปหาลำดับเบส โดยพบว่าแบคทีเรียทั้ง 183 ไอโซเลตสามารถถูกจัดกลุ่มแบบคร่าวๆ ได้เป็น 159 กลุ่ม และมีไอโซเลตตัวแทนจากแต่ละกลุ่มจำนวนทั้งหมด 159 ไอโซเลตที่ถูกนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



ภาพที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ ARDRA ของแบคทีเรียตัวอย่างจำนวน 14 ไอโซเลต โดยช่องที่ 1 คือ DNA Marker ขนาด 1 kb ช่องที่ 2-15 คือแบคทีเรียไอโซเลตตัวอย่าง โดย ช่องที่ 5 และ 6 มีจำนวนและขนาดของแถบดีเอ็นเอเหมือนกันจะจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และช่องที่ 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 และ 15 มีจำนวนและขนาดของแถบดีเอ็นเอต่างกันจึงถูกจัดให้อยู่คนละกลุ่ม

#### 4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย endophytes

ลำดับเบสของแบคทีเรียไอโซเลตตัวแทนของกลุ่ม ARDRA ทั้ง 159 ไอโซเลตถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับ genus โดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูล EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) ซึ่งเป็นการจัดจำแนกโดยอาศัยความคล้ายคลึงของลำดับเบสด้วยวิธี pairwise alignment ผลที่ได้จะถูกแสดงออกมาในรูปของค่าร้อยละความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในฐานข้อมูลซึ่งหากมีค่ามากก็แสดงว่าไอโซเลตที่นำมาวิเคราะห์มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในฐานข้อมูลมาก จากไอโซเลตตัวแทนจำนวน 159 ไอโซเลตพบว่าได้มีแบคทีเรียตัวแทนจำนวน 126 ไอโซเลตจากกลุ่ม ARDRA 126 กลุ่มที่ได้ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่น่าเชื่อถือ โดยพบว่ามีแบคทีเรียที่มีค่าร้อยละของความคล้ายคลึงเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์จำนวน 77 ไอโซเลต แบคทีเรียที่มีค่าร้อยละของความคล้ายคลึงอยู่ระหว่าง 99.99-98.5 จำนวน 46 ไอโซเลต และแบคทีเรียที่มีค่าร้อยละของความคล้ายคลึงต่ำกว่า 98.5 จำนวน 3 ไอโซเลต และเมื่อรวมผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี ARDRA กับการวิเคราะห์ลำดับเบสจึงทำให้สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้ทั้งหมด 143 ไอโซเลตหรือคิดเป็นร้อยละ 74.48 ของแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้ แบคทีเรียจำนวน 143 ไอโซเลตนี้ถูกจัดจำแนกอยู่ใน 4 ไฟลัม และ 32 จีนัส (ตารางที่ 4.2) โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่จัดจำแนกจำนวน 75 สายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในไฟลัม Firmicutes โดยแบ่งเป็น 7 จีนัสได้แก่ *Bacillus* จำนวน 52 สายพันธุ์, *Fictibacillus* จำนวน 7 สายพันธุ์,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Halobacillus* จำนวน 1 สายพันธุ์, *Lactococcus* จำนวน 2 สายพันธุ์, *Lysinibacillus* จำนวน 1 สายพันธุ์, *Paenibacillus* จำนวน 2 สายพันธุ์ และ *Staphylococcus* จำนวน 10 สายพันธุ์ แบคทีเรียกลุ่มที่มีจำนวนมากเป็นลำดับที่สองถูกจัดอยู่ในไฟลัม *Proteobacteria* ประกอบด้วยแบคทีเรีย 52 สายพันธุ์แบ่งเป็น 16 จีนัส ได้แก่ *Acinetobacter* จำนวน 11 สายพันธุ์, *Aeromonas* จำนวน 2 สายพันธุ์, *Burkholderia* จำนวน 11 สายพันธุ์, *Cronobacter* จำนวน 1 สายพันธุ์, *Dickeya* จำนวน 1 สายพันธุ์, *Enhydrobacter* จำนวน 1 สายพันธุ์, *Enterobacter* จำนวน 2 สายพันธุ์, *Escherichia* จำนวน 2 สายพันธุ์, *Klebsiella* จำนวน 1 สายพันธุ์, *Moraxella* จำนวน 1 สายพันธุ์, *Novosphingobium* จำนวน 2 สายพันธุ์, *Ochrobactrum* จำนวน 2 สายพันธุ์, *Pantoea* จำนวน 5 สายพันธุ์, *Pseudacidovorax* จำนวน 1 สายพันธุ์, *Pseudomonas* จำนวน 7 สายพันธุ์ และ *Sphingomonas* จำนวน 2 สายพันธุ์ ไฟลัมของแบคทีเรียที่มีจำนวนสายพันธุ์มากเป็นลำดับที่สามคือไฟลัม *Bacteroidetes* ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ แบ่งเป็น 5 จีนัส ได้แก่ *Chryseobacterium* จำนวน 8 สายพันธุ์, *Flavobacterium* จำนวน 1 สายพันธุ์, *Mucilaginibacter* จำนวน 1 สายพันธุ์, *Myroides* จำนวน 1 สายพันธุ์ และ *Pedobacter* จำนวน 1 สายพันธุ์ ไฟลัม *Acinobacteria* มีจำนวนแบคทีเรียน้อยที่สุดคือ 4 สายพันธุ์ แบ่งเป็น 3 จีนัส ได้แก่ *Curtobacterium* จำนวน 1 สายพันธุ์, *Micrococcus* จำนวน 1 สายพันธุ์ และ *Microbacterium* จำนวน 2 สายพันธุ์ งานวิจัยที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย endophytes ที่มีการดำรงชีวิตร่วมกันกับข้าวที่ถูกเก็บมาจากนาในประเทศจีนส่วนใหญ่อยู่ในไฟลัม *Proteobacteria* โดยแบคทีเรียกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดจัดอยู่ในจีนัส *Gallionella* และ *Burkholderia* (Sun et al., 2008) ในขณะที่งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย endophytes ของข้าวที่เก็บมาจากนาในประเทศบราซิลส่วนใหญ่ก็อยู่ในไฟลัม *Proteobacteria* เช่นกันแต่ส่วนใหญ่จะถูกจัดอยู่ในจีนัส *Enterobacter* และ *Rhizobium* (Sessitsch et al., 2012) ผลการทดลองของงานวิจัยทั้ง 2 ชิ้นข้างต้นแตกต่างกันไปจากผลการทดลองในโครงการวิจัยนี้ที่พบว่าแบคทีเรียในไฟลัม *Firmicutes* เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ ในอดีตได้มีการศึกษาและพบว่าปัจจัยหลายๆ อย่าง มีผลต่อความหลากหลายของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในพืชเป็นอย่างมาก โดยปัจจัยเหล่านี้ได้แก่ สภาวะแวดล้อม, ชนิดของพืช, สายพันธุ์ของพืช และเชื้อก่อโรคในพืช (Mocali et al., 2003; Araújo, et al., 2002; Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Kinkel et al., 2000; Dalmastri et al., 1999) เนื่องจากข้าวที่นำมาใช้ศึกษาในโครงการวิจัยนี้เป็นข้าวที่เก็บรวบรวมมาจากนาข้าวในประเทศไทย ผลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมจึงน่าที่จะมีบทบาทสำคัญต่อความแตกต่างระหว่างความหลากหลายของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในโครงการวิจัยนี้กับงานวิจัยชิ้นอื่นๆ ในอดีต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงการจัดจำแนกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ออกเป็นกลุ่มๆตามจีนัส

ไฟลัม	จีนัส	ไอโซเลต
Actinomycetes	<i>Curtobacterium</i>	2006
	<i>Micrococcus</i>	3010
	<i>Microbacterium</i>	2002, 2020
Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium</i>	1026, 2027, 1002, 1003, 1014, 3024, 3045, 3077
	<i>Flavobacterium</i>	1051
	<i>Mucilaginibacter</i>	2001
	<i>Myroides</i>	3041
	<i>Pedobacter</i>	1017
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	1010, 1018, 1019, 1031, 1033, 1047, 2007, 2009, 2012, 3002, 3003, 3004, 3005, 3006, 3007, 3008, 3011, 3012, 3013, 3015, 3016, 3017, 3020, 3022, 3023, 3026, 3027, 3028, 3029, 3031, 3032, 3035, 3040, 3042, 3048, 3049, 3051, 3052, 3056, 3065, 3067, 3068, 3069, 3075, 4009, 4017, 4018, 4024, 4043, 4046, 4047, 4048
	<i>Fictibacillus</i>	1004, 1005, 3071, 4016, 4020, 4042, 4055
	<i>Halobacillus</i>	3047
	<i>Lactococcus</i>	4003, 4007
	<i>Lysinibacillus</i>	4005
	<i>Paenibacillus</i>	3025, 3037
	<i>Staphylococcus</i>	1023, 2011, 2014, 1036, 1039, 3009, 3034, 2025, 3053, 3054
Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	1009, 1038, 2026, 1041, 1042, 3014, 4002, 4006, 4008, 4010, 4040
	<i>Aeromonas</i>	4001, 4011
	<i>Burkholderia</i>	2004, 2015, 2017, 2021, 2022, 3074, 3076,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฟล์	จีโนม	ไอโซเลต
		3078, 4032, 4045, 4033
	<i>Cronobacter</i>	1013
	<i>Dickeya</i>	1027
	<i>Enhydrobacter</i>	1043
	<i>Enterobacter</i>	1046, 4035
	<i>Escherichia</i>	1024, 1030
	<i>Klebsiella</i>	4052
	<i>Moraxella</i>	3030
	<i>Novosphingobium</i>	1022, 4030
	<i>Ochrobactrum</i>	4039, 4051
	<i>Pantoea</i>	4004, 4025, 4037, 4014, 4015
	<i>Pseudacidovorax</i>	4044
	<i>Pseudomonas</i>	1025, 2008, 4026, 4034, 4041, 4036, 4038
	<i>Sphingomonas</i>	1048, 4053

#### 4.5 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย endophytes

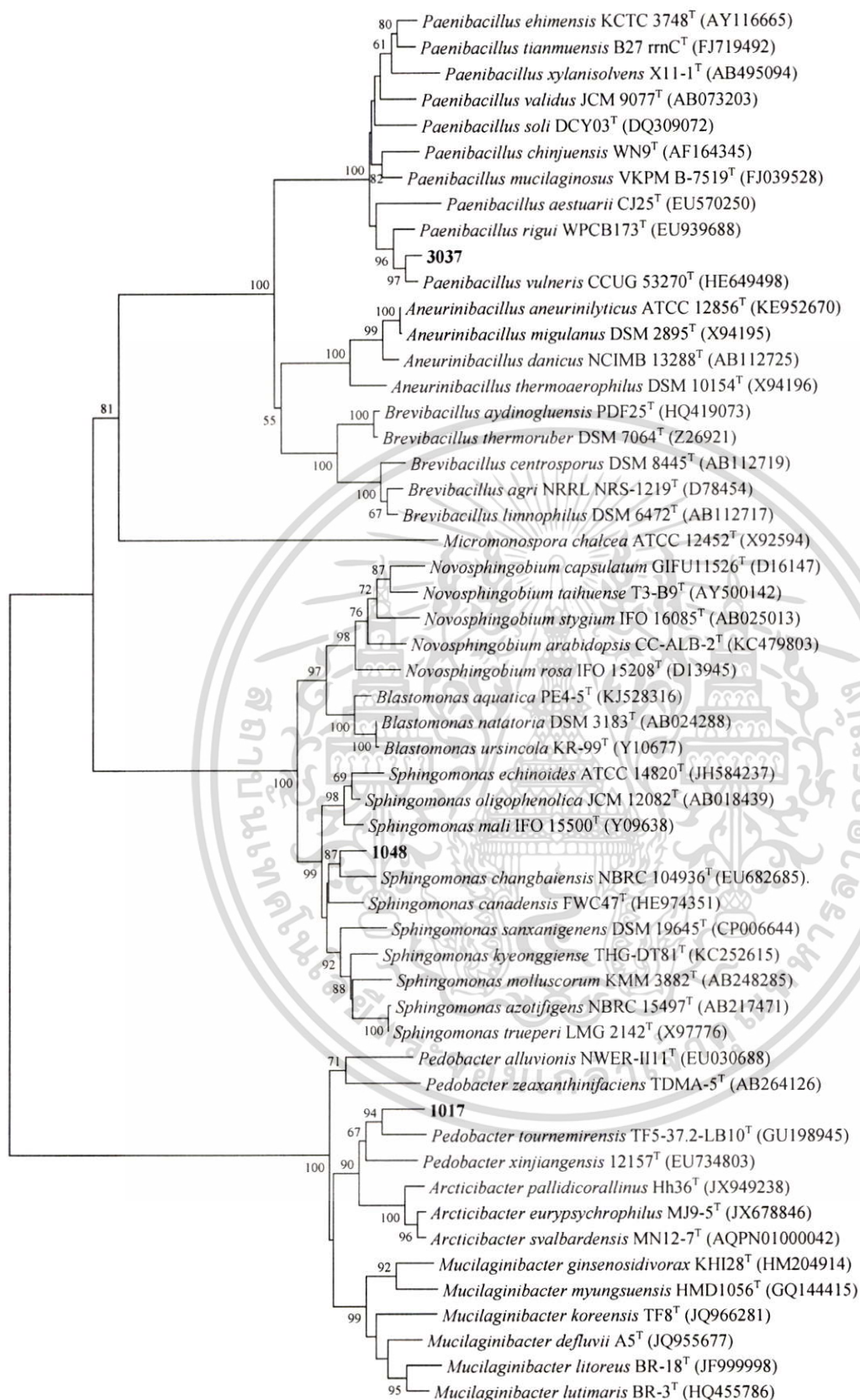
ผลการวิเคราะห์ pairwise alignment แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน 16S rRNA กับแบคทีเรียในฐานข้อมูลเกินกว่าร้อยละ 98.5 ยกเว้นแบคทีเรีย 3 ไอโซเลตได้แก่ 1017, 1048 และ 3037 ซึ่งแสดงค่าความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Pedobacter turnerimensis* TF5-37.2-LB10<sup>T</sup> (ร้อยละ 96.6), *Sphingomonas changbaiensis* NBRC 104936<sup>T</sup> (ร้อยละ 97.4) และ *Paenibacillus vulneris* CCUG 53270<sup>T</sup> (ร้อยละ 98.2) ตามลำดับ Stackebrandt และ Ebers (2006) ได้รายงานว่แบคทีเรียคู่ที่แสดงค่าความคล้ายคลึงต่ำกว่าร้อยละ 98.7 มีแนวโน้มว่าจะมีค่าความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอต่ำกว่าร้อยละ 70 ซึ่งเป็นระดับที่ใช้ในการแบ่งแยกแบคทีเรียออกเป็นสปีชีส์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นแบคทีเรียไอโซเลต 1017, 1048 และ 3037 จึงอาจเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่เคยได้รับการรายงานมาก่อน เพื่อให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตนี้และแบคทีเรียในจีโนม *Pedobacter*, *Sphingomonas* และ *Paenibacillus* จึงมีความจำเป็นต้องสร้าง Phylogenetic tree ขึ้นมาโดยการวิเคราะห์ multiple alignment และ phylogenetic analysis ของลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตและแบคทีเรียในสปีชีส์อื่น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลต 1017 มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรียสปีชีส์อื่น ๆ ใน จี นั ส *Pedobacter* โดยมีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *P. turnerimensis* TF5-37.2-LB10<sup>T</sup> และ *Pedobacter xinjiangensis* 12157<sup>T</sup> มากที่สุดโดยมีค่า bootstrap เท่ากับร้อยละ 67 แบคทีเรียไอโซเลต 1048 ก็ถูกจัดอยู่ในแขนงเดียวกันกับแบคทีเรียในจีโนม *Sphingomonas* โดยมีแบคทีเรีย *S. changbaiensis* NBRC 104936<sup>T</sup> เป็นแบคทีเรียที่ใกล้เคียงมากที่สุดและมีค่า bootstrap เท่ากับร้อยละ 87 ส่วนแบคทีเรียไอโซเลต 3037 นั้นก็ถูกจัดอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในแขนงเดียวกันกับแบคทีเรียในจีนัส *Paenibacillus* โดยมีแบคทีเรีย *P. vulneris* CCUG 53270<sup>T</sup> และ *Paenibacillus rigui* WPCB173<sup>T</sup> เป็นแบคทีเรียที่ใกล้เคียงมากที่สุดโดยมีค่า bootstrap เท่ากับร้อยละ 96 เนื้อเยื่อภายในต้นพืชจัดเป็นแหล่งที่ถูกรพบแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่เป็นจำนวนมาก ตัวอย่างของแบคทีเรียในจีนัส *Pedobacter* และ *Sphingomonas* ที่ถูกรพบว่าเป็นแบคทีเรีย endophytes เช่น *Pedobacter trunci*, *Pedobacter daejeonensis* และ *Pedobacter silvilitoris* ถูกรพบว่าเป็นแบคทีเรีย endophytes ของพืชที่มีการสร้างเนื้อไม้ (Du et al., 2015) *Sphingomonas roseiflava*, *Sphingomonas rosa* และ *Sphingomonas gei* เป็นแบคทีเรียที่ถูกรพบในพืชต่างๆ เช่นเดียวกัน (Yun et al., 2000; Akeuchi et al., 1995; Zhu et al., 2015) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีกรค้นพบแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในจีนัส *Pedobacter* และ *Sphingomonas* ที่ดำรงชีวิตเป็น endophytes ของต้นข้าวเลย ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรีย *Paenibacillus hunanensis* เป็นแบคทีเรียเพียงสปีชีส์เดียวในจีนัส *Paenibacillus* ที่ถูกรค้นพบเป็นครั้งแรกในเนื้อเยื่อของเมล็ดข้าว (Liu et al., 2010) ผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห่นว่ายังคงมีแบคทีเรียในจีนัสต่างๆ เหล่านี้ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของข้าว และยังคงรอการถูกรค้นพบต่อไปในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



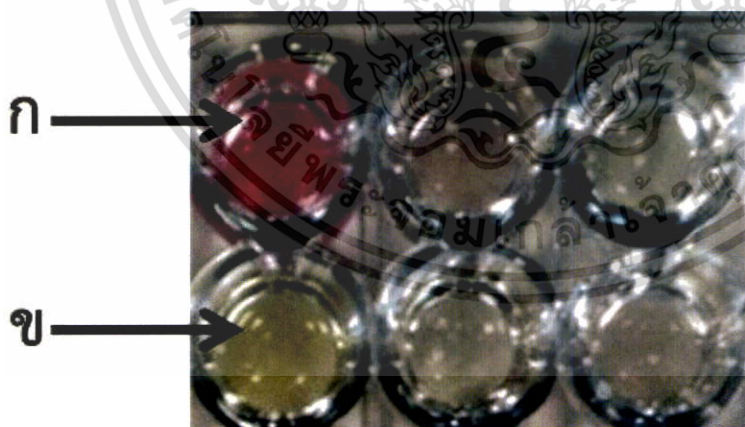
0.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลต 1017, 1048 และ 3037 ด้วยวิธี Neighbour-joining ค่า bootstrap ถูกแสดงเฉพาะค่าที่เกินร้อยละ 60 ขึ้นไปเท่านั้น

#### 4.6 การทดสอบการสร้างฮอร์โมน IAA ในแบคทีเรีย endophytes

การทดสอบความสามารถในการสร้างฮอร์โมน IAA ของเชื้อแบคทีเรีย endophytes ที่คัดแยกได้จากข้าวทำได้โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีกรดอะมิโน L-tryptophan ผสมอยู่แล้วนำอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาทดสอบการมีอยู่ของฮอร์โมน IAA โดยทดสอบกับสารละลาย Salkowski's reagent ถ้าแบคทีเรียมีการสร้างฮอร์โมนดังกล่าว สีของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการหยดสารละลาย Salkowski's reagent จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู ส่วนแบคทีเรียที่ไม่มีการสร้างฮอร์โมนจะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสี (ภาพที่ 4.3) ในการทดสอบครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียจำนวน 45 ไอโซเลต คือ 1006, 1007, 1022, 1024, 1030, 1038, 1046, 2002, 2025, 1003, 1008, 1013, 1014, 1015, 1041, 1042, 2003, 2013, 2018, 3010, 3021, 3049, 3072, 4005, 4012, 4014, 4015, 4025, 4030, 4033, 4034, 4040, 4041, 4044, 4050, 4052, 4053, 4049, 4056, 3045, 4004, 4011, 4035, 4037 และ 4054 เมื่อนำผลการจัดจำแนกเชื้อด้วยยีน 16S rRNA มาประกอบการพิจารณาผลการสร้างฮอร์โมน IAA แล้วพบว่าแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมนนี้แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือกลุ่มที่ยังไม่สามารถระบุจีโนมได้จำนวน 14 ไอโซเลต และกลุ่มที่ระบุจีโนมได้จำนวน 31 ไอโซเลต ในกลุ่มที่ระบุจีโนมได้พบว่ามีแบคทีเรียเหล่านี้จัดอยู่ในจีโนมต่างๆ ได้แก่ *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Chryseobacterium*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudacidovorax*, *Pseudomonas* และ *Sphingomonas*



ภาพที่ 4.4 ผลการตรวจสอบการสร้างฮอร์โมน IAA โดยแบคทีเรีย endophyte ผลบวก (ก) แสดงให้เห็นการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีชมพู และผลลบ (ข) ไม่แสดงการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.7 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อแบคทีเรีย endophytes ที่คัดแยกได้จากข้าวตัวอย่างต่างๆ ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร DF salt minimal agar ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว แบคทีเรีย endophytes ที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase สามารถใช้ ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะย่อย ACC ให้ได้เป็นแอมโมเนีย และ alpha-ketobutyrate และใช้แอมโมเนียในการเจริญเติบโตต่อไป ส่งผลให้แบคทีเรีย endophytes เหล่านี้สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวได้ นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ DF salt minimal medium และ DF salt minimal medium ที่เติม  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  อาหารเลี้ยงเชื้อสองชนิดนี้ถูกใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบและตัวควบคุมเชิงบวกตามลำดับ (ภาพที่ 4.5) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียจำนวน 42 ไอโซเลต คือ 1027, 1043, 2015, 2017, 2022, 1018, 3010, 3013, 3023, 3030, 3047, 3049, 3051, 3053, 3055, 3067, 3071, 3074, 3075, 4017, 4028, 4029, 4032, 4054, 4055, 4056, 1012, 1023, 2011, 2023, 3036, 3050, 3077, 4016, 4018, 4033, 4042, 4043, 4044, 4045, 4046 และ 4049 ที่แสดงความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase เมื่อนำผลการทดลองนี้มาวิเคราะห์ร่วมกับผลการจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยยีน 16S rRNA แล้วพบว่าแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase จำนวน 32 ไอโซเลตถูกจัดอยู่ในจีนัสต่างๆ ดังนี้ *Micrococcus*, *Bacillus*, *Fictibacillus*, *Halobacillus*, *Dickeya*, *Enhydrobacter* และ *Burkholderia*



ภาพที่ 4.5 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรียไอโซเลต 3051 (ปลายลูกศร) ซึ่งเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ DF salt minimal medium ที่เติม ACC (ก) และ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (ข) แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DF salt minimal medium ได้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้จากลำต้นและรากของข้าวที่เก็บรวบรวมมาจากนาในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี, กรุงเทพมหานคร และชลบุรี จำนวน 192 ไอโซเลตสามารถถูกนำมาจัดจำแนกเป็นกลุ่มด้วยวิธี ARDRA ได้จำนวน 183 ไอโซเลตโดยแบ่งออกเป็นกลุ่ม ARDRA 159 กลุ่ม เมื่อนำตัวแทนของแต่ละกลุ่ม ARDRA จำนวน 159 ไอโซเลตไปหาลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA โดยมีแบคทีเรียเพียง 126 ไอโซเลตเท่านั้นที่ให้ผลการหาลำดับเบสที่มีคุณภาพเพียงพอในการนำมาวิเคราะห์ pairwise alignment บนฐานข้อมูล EzTaxon พบว่ามีแบคทีเรียที่มีค่าร้อยละของความคล้ายคลึงเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์จำนวน 77 ไอโซเลต แบคทีเรียที่มีค่าร้อยละของความคล้ายคลึงอยู่ระหว่าง 99.99-98.5 จำนวน 46 ไอโซเลต และแบคทีเรียที่มีค่าร้อยละของความคล้ายคลึงต่ำกว่า 98.5 จำนวน 3 ไอโซเลต เมื่อนำผลที่ได้นี้มาพิจารณาประกอบร่วมกับวิธี ARDRA เพื่อจัดจำแนกไฟลัมและจีนัสของแบคทีเรียแล้วพบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรีย endophytes ออกได้เป็น 4 ไฟลัมได้แก่ *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* และ *Bacteroidetes* โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จัดอยู่ในไฟลัม *Firmicutes* ในส่วนของการจัดจำแนกในระดับจีนัสพบว่าแบ่งออกได้เป็น 32 จีนัสโดยจีนัสที่มีจำนวนไอโซเลตมากที่สุดคือจีนัส *Bacillus*

แบคทีเรียไอโซเลท 1017, 1048 และ 3037 เป็นแบคทีเรียที่มีแนวโน้มว่าจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ซึ่งไม่เคยได้รับการศึกษามาก่อน เนื่องจากมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน 16S rRNA ต่ำกว่าร้อยละ 98.5 เมื่อทำการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทนี้กับแบคทีเรียที่ได้รับการจัดจำแนกแล้วพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท 1017 จัดอยู่ในจีนัส *Pedobacter* และมีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *P. tournerimensis* TF5-37.2-LB10<sup>T</sup> และ *P. xinjiangensis* 12157<sup>T</sup> มากที่สุด แบคทีเรียไอโซเลท 1048 ถูกจัดอยู่ในจีนัส *Sphingomonas* โดยมีแบคทีเรีย *S. changbaiensis* NBRC 104936<sup>T</sup> เป็นแบคทีเรียที่ใกล้เคียงมากที่สุด ส่วนแบคทีเรียไอโซเลท 3037 นั้นถูกจัดอยู่ในจีนัส *Paenibacillus* โดยมีแบคทีเรีย *P. vulneris* CCUG 53270<sup>T</sup> และ *P. rigui* WPCB173<sup>T</sup> เป็นแบคทีเรียที่ใกล้เคียงมากที่สุด

ผลการวิเคราะห์การสร้างฮอร์โมน IAA และเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรีย endophytes พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 45 ไอโซเลตและ 42 ไอโซเลตตามลำดับที่สามารถสร้างฮอร์โมนและเอนไซม์ดังกล่าวได้ โดยแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมน IAA ได้คือแบคทีเรียในจีนัส *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Chryseobacterium*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudacidovorax*, *Pseudomonas* และ *Sphingomonas* และแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase ได้คือแบคทีเรียในจีนัส *Micrococcus*, *Bacillus*, *Fictibacillus*, *Halobacillus*, *Dickeya*, *Enhydrobacter* และ *Burkholderia*

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลทที่มีแนวโน้มว่าจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะนำแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทนี้ไปศึกษาในด้านลักษณะทางฟีโน

ไทป์และซีโมไทป์อื่นๆ ต่อไปเพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่โดยแท้จริง นอกจากนี้แบคทีเรียที่สร้างฮอริโมน IAA และ ACC deaminase ยังเป็นแบคทีเรียที่มีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาถึงผลของแบคทีเรียเหล่านี้ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวและพืชชนิดอื่นๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2554). สถิติการเกษตรของประเทศไทยปี 2554. ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. หน้า 176, นนทบุรี.
- Akeuchi, M., Sakane, T., Yanagi, M., Yamasato, K., Hamana, K. and Yokota A. (1995). Taxonomic study of bacteria isolated from plants: proposal of *Sphingomonas rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., *Sphingomonas asaccharolytica* sp. nov., and *Sphingomonas mali* sp. nov., Int J Syst Bacteriol 45, 334-341.
- Araújo, W.L., Marcon, J., Maccheroni, W. Jr, Van Elsas, J.D., Van Vuurde, J.W.L. and Azevedo, J.L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants, Appl Environ Microbiol 68, 4906-4914.
- Barka, S., Nowak, J. and Clement, C. (2006). Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. Appl Environ Microbiol 72, 7246-7252.
- Bensalim, S., Nowak, J., and Asiedu, S.K. (1998). A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. Am J Potato Res 75, 145-152.
- Bric, J.M., Bostock, R.M., and Silverstone, S.E. (1991). Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl Environ Microbiol 57, 535-538.
- Dalmastri, C., Chiarini, L., Cantale, C., Bevivino, A. and Tabacchioni S. (1999). Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. Micro Ecol 38, 273-284.
- Du, J., Singh, H., Ngo, H.T., Won, K.H., Kim, K.Y. and Yi, T.H. (2015). *Pedobacter daejeonensis* sp. nov. and *Pedobacter trunci* sp. nov., isolated from an ancient tree trunk, and emended description of the genus *Pedobacter*. International Journal of Systematic and Evo Microbiol 65, 1241-1246.
- Glick, B.R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. FEMS Microbiol Lett 251, 1-7.
- Glick, B.R., Penrose, D.M., and Li, J. (1998). A Model For the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-promoting Bacteria. J of Theoret Biol 190, 63-68.
- Ji, S., Gururani, M.A. and Chun, S.C. (2013) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. Microbiol Res. doi: 10.1016/j.micres.2013.06.003.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kaneko, T., Minamisawa, K., Isawa, T., Nakatsukasa, H. et al. (2010). Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. *DNA Res* 17, 37-50.
- Khalid, A., Tahir, S., Arshad, M., and Zahir, Z.A. (2004). Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non rhizosphere soils. *Aus J Soil Res* 42, 921-926.
- Kinkel, L.L., Wilson, M. and Lindow, S.E. (2000). Plant species and plant incubation conditions influence variability in epiphytic bacterial population size. *Micro Ecol* 39, 1-11.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W.L., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A. and Azevedo, J.L. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiology* 6, 1244-1251.
- Lazarovits, G., and Nowak, J. (1997). Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *Hort Science* 32, 188-192.
- Liu, Y., Liu L., Qiu F., Schumann, P., Shi, Y., Zou, Y., Zhang, X. and Song, W. (2010). *Paenibacillus hunanensis* sp. nov., isolated from rice seeds. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 1266-1270.
- Luo, S., Xu, T., Chen, L., Chen, J., Rao, C., Xiao, X., Wan, Y., Zeng, G., Long, F., Liu, C., and 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.
- Mano, H. and Morisaki, H. (2008) Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes Environ* 23, 109-117.
- Mattos, K.A., Padua, V.L., Romeiro, A., Hallack, L.F., Neves, B.C., Ulisses, T.M., Barros, C.F., Todeschini, A.R., Previato, J.O., and Mendonca-Previato, L. (2008). Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. *An Acad Bras Cienc* 80, 477-493.
- Mei, C., and Flinn, B. (2010). The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. *Rec Pat Biotech* 4, 81-95.
- Mocali, S., Bertelli, E., Di Cello, F., Mengoni, A., Sfalanga, A., Viliani, F., Caciotti, A., Tegli, S., Surico, G. and Fani, R. (2003). Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Res Microbiol*, 154, 105-114.
- Nowak, J., Asiedu, S.K., and Bensalim, S. (1998). From laboratory to applications: challenges and progress with in vitro dual cultures of potato and beneficial bacteria. *Plant Cell Tiss Org Cult* 52, 97-103.
- Nowak, J., Bensalim, S., and Smith, C.D. (1999). Behaviour of plant material issued from in vitro tuberization. *Potato Res* 42, 505-519.
- Patten, C.L., and Glick, B.R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42, 207-220.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sessitsch, A., Hardoimm, P., Doring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., van Overbeek, L., Brar, D., van Elsas, J.D. and Reinhold-Hurek, B. (2012). Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol Plant Microbe Interact* 25, 28-36.
- Sharma, V.K., and Nowak, J. (1998). Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Can J Microbiol* 44, 528-536.
- Singh, S., Malik, N. and Singh, R. (2013). Improved nutrient use efficiency increases plant growth of rice with the use of IAA-overproducing strains of endophytic *Burkholderia cepacia* strain RRE25. *Plant Microbe Interaction* 66, 375-384.
- Song, W., Shen, D. and Feng, Y. (2006). Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *J App Microbiol* 100, 938-945.
- Spaepen, S., and Vanderleyden, J. (2010). Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Stackebrandt, E. and Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 33, 152-155.
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X. and Song, W. (2008). Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Micro Ecol* 55, 415-424.
- Sun, Y., Cheng, Z., and Glick, B.R. (2009). The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growthpromoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *FEMS Microbiol Lett* 296, 131-136.
- Verma, S.C., Ladha, J.K. and Triathi, A.K. (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J Biotechnol* 91, 127-141.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P., and Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol Res* 165, 437-449.
- Yun, N.R., Shin, Y.K., Hwang, S.Y., Kuraishi, H., Sugiyama, J. and Kawahara, K. (2000). Chemotaxonomic and phylogenetic analyses of *Sphingomonas* strains isolated from ears of plants in the family *Gramineae* and a proposal of *Sphingomonas roseoflava* sp. nov. *J Gen Appl Microbiol* 46, 9-18.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. and Truper, H.G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37, 463-464.
- Zhu, L., Si, M., Li, C., Xin, K., Chen, C., Shi, X., Huang, R., Zhao, L., Shen, X. and Zhang, L. (2015). *Sphingomonas gei* sp. nov., isolated from roots of *Geum aleppicum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 65, 1160-1166.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 การติดสีและรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ

ไอโซเลท	แกรม	รูปร่าง
1002	-	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
1003	-	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
1004	+	ท่อนยาว
1005	+	ท่อนยาว
1006	-	ท่อนสั้น
1007	-	ท่อนสั้น
1008	-	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
1009	-	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
1010	+	ท่อนสั้น
1011	+	ท่อนยาว
1012	+	ท่อนสั้น
1013	-	ท่อนสั้น
1014	-	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
1015	+	เส้นสาย
1017	-	ท่อน
1018	+	กลม
1019	+	ท่อนสั้น
1020	-	เส้นสาย
1021	-	ท่อน เรียงต่อกันเป็นสาย
1022	-	ท่อน
1023	+	กลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
1024	-	ท่อนสั้น
1025	-	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นคู่
1026	-	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
1027	-	ท่อน
1029	-	กลม เรียงต่อกันเป็นสาย
1028	-	ท่อนยาว
1030	-	ท่อนสั้น
1031	+	ท่อนสั้น
1032	-	ท่อนสั้น
1033	+	ท่อน
1034	-	ท่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต	แกรม	รูปร่าง
1035	+	ท่อน
1036	+	กลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
1037	+	ท่อนยาว
1038	-	ท่อนสั้น
1039	+	กลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
1040	-	ท่อนใหญ่
1041	-	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
1042	-	ท่อนสั้น
1043	-	ท่อนสั้น
1044	-	ท่อน
1045	-	ท่อนสั้น
1046	-	ท่อนสั้น
1047	+	ท่อน
1048	-	ท่อนยาว
1050	-	ท่อนสั้น
1051	-	ท่อนสั้น
2001	-	ท่อนยาว
2002	+	ท่อนสั้น
2003	-	กลม
2004	-	ท่อนสั้น เรียงต่อเป็นสาย
2006	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
2007	+	ท่อน
2008	-	ท่อนสั้น
2009	+	ท่อนสั้น
2010	+	กลม เรียงต่อเป็นสาย
2011	+	กลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
2012	+	ท่อนยาว
2013	-	กลม ขนาดเล็ก
2014	+	กลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
2015	-	ท่อนสั้น
2016	+	กลมเล็ก เรียงต่อเป็นสาย
2017	-	ท่อน
2018	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต	แกรม	รูปร่าง
2019	+	กลมเล็ก
2020	+	ท่อนสั้น เรียงต่อเป็นสาย
2021	-	ท่อนสั้น
2022	-	ท่อนสั้น
2023	-	ท่อนยาว
2024	-	ท่อน
2025	+	กลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
2026	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
2027	-	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
3001	-	ท่อนสั้น เรียงตัวเป็นกลุ่ม
3002	+	ท่อนยาว กระจัดกระจาย
3003	+	ท่อนยาว เรียงตัวเป็นกลุ่ม
3004	+	ท่อนสั้น เรียงตัวเป็นกลุ่ม
3005	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3006	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3007	+	ท่อนสั้น เรียงตัวเป็นกลุ่ม
3008	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3009	+	กลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
3010	+	กลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
3011	+	ท่อนยาว เรียงต่อกันเป็นสาย
3012	+	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
3013	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3014	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3015	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3016	+	ท่อนสั้น เรียงตัวเป็นกลุ่ม
3017	+	ท่อนยาว กระจัดกระจาย
3018	+	กลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
3019	-	ท่อนสั้น เรียงตัวเป็นกลุ่ม
3020	+	ท่อนยาว เรียงต่อกันเป็นสาย
3021	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3022	+	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
3023	+	ท่อน กระจัดกระจาย
3024	-	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต	แกรม	รูปร่าง
4001	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4002	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4003	+	กลม
4004	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4005	+	ท่อน
4006	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4007	+	กลม
4008	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4009	+	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
4010	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4011	-	ท่อน
4012	-	กลม
4013	+	กลม เรียงต่อกันเป็นคู่
3025	+	ท่อนยาว กระจัดกระจาย
3026	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3027	+	ท่อน กระจัดกระจาย
3028	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3029	+	ท่อนสั้น
3030	-	กลม กระจัดกระจาย
3031	+	ท่อนยาว กระจัดกระจาย
3032	+	ท่อน กระจัดกระจาย
3033	-	เส้นสาย
3034	+	กลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
3035	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3036	+	ท่อน กระจัดกระจาย
3037	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3038	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3039	+	ท่อน กระจัดกระจาย
3040	+	ท่อนยาว กระจัดกระจาย
3041	-	กลม กระจัดกระจาย
3042	+	ท่อน กระจัดกระจาย
3044	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3045	-	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต	แกรม	รูปร่าง
3046	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3047	+	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
3048	+	ท่อน เรียงต่อกันเป็นสาย
3049	+	ท่อนสั้น
3050	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3051	+	ท่อน กระจัดกระจาย
3052	+	ท่อน
3053	+	กลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
3054	+	กลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
3055	+	กลม กระจัดกระจาย
3056	+	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
3065	+	ท่อน กระจัดกระจาย
3067	+	ท่อน กระจัดกระจาย
3068	+	ท่อน กระจัดกระจาย
3069	+	ท่อน กระจัดกระจาย
3071	+	ท่อน กระจัดกระจาย
3072	+	กลม กระจัดกระจาย
3074	-	ท่อนสั้น เรียงตัวเป็นกลุ่ม
3075	+	ท่อน กระจัดกระจาย
3076	-	ท่อน กระจัดกระจาย
3077	-	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
3078	-	ท่อนสั้น เรียงตัวเป็นกลุ่ม
4014	-	ท่อน เรียงตัวเป็นกลุ่ม
4015	-	ท่อน กระจัดกระจาย
4016	+	ท่อน กระจัดกระจาย
4017	+	ท่อน กระจัดกระจาย
4018	+	ท่อนสั้น เรียงต่อกันเป็นสาย
4020	+	ท่อน กระจัดกระจาย
4024	+	ท่อน กระจัดกระจาย
4025	-	ท่อน กระจัดกระจาย
4026	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4027	+	กลมใหญ่ กระจัดกระจาย
4028	+	กลม กระจัดกระจาย

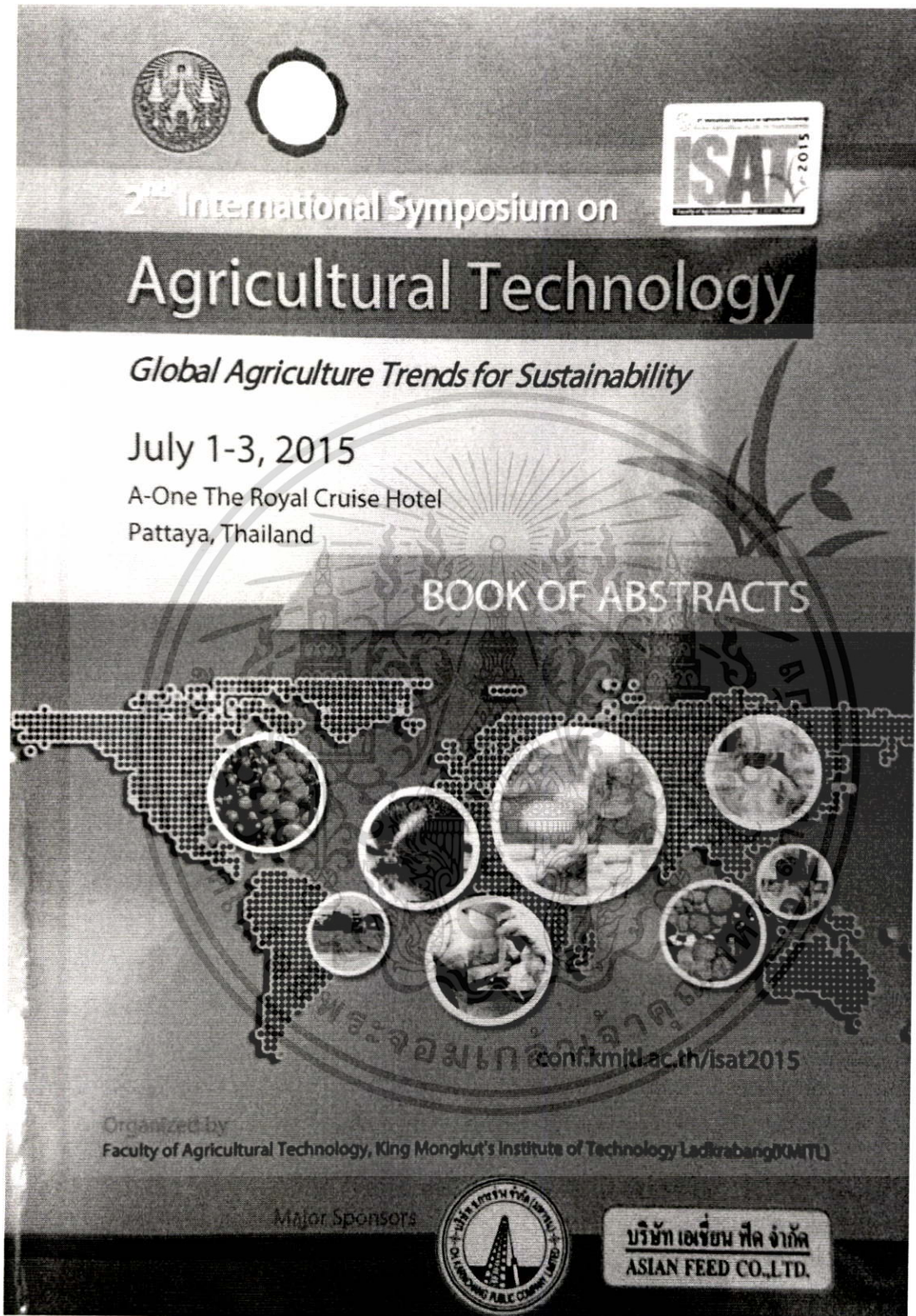
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต	แกรม	รูปร่าง
4029	+	ท่อนยาว กระจัดกระจาย
4030	-	ท่อน กระจัดกระจาย
4031	+	ท่อนยาว กระจัดกระจาย
4032	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4033	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4034	-	ท่อน กระจัดกระจาย
4035	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4036	-	ท่อน กระจัดกระจาย
4037	-	ท่อน เรียงต่อกันเป็นสาย
4038	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4039	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4040	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4041	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4042	+	ท่อน กระจัดกระจาย
4043	+	ท่อน
4044	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4045	-	ท่อน กระจัดกระจาย
4046	+	ท่อน กระจัดกระจาย
4047	+	ท่อน กระจัดกระจาย
4048	+	ท่อน กระจัดกระจาย
4049	-	กลม กระจัดกระจาย
4050	-	กลม กระจัดกระจาย
4051	-	ท่อนสั้น กระจัดกระจาย
4052	-	ท่อน กระจัดกระจาย
4053	-	ท่อน กระจัดกระจาย
4054	-	ท่อน กระจัดกระจาย
4055	+	ท่อน กระจัดกระจาย
4056	-	กลม เรียงตัวกระจัดกระจาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### Advisory Committee

Prof.Dr. Suchatvee Suwansawat	President, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Assoc.Prof.Dr.Chamroon Laosinwattana	Executive Vice President for Research and Innovation, KMITL
Prof.Dr.Julian Wiseman	School of Bioscience, University of Nottingham, United Kingdom
Prof.Dr.Gray Williams	School of Biological Science, University of Hongkong, Sar China
Prof.Dr.Metha Wanapat	Director, Tropical Feed Resource Research and Development Center, Khon Kaen University, Thailand

### Steering Committee

Assoc.Prof. Sakehai Choochote	KMITL	<i>Chairman</i>
Assoc.Prof.Srisakul Vorachantra	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Paveena Taweekijakarn	KMITL	
Asst.Prof.Peerachai Kullachai	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Kanya Jirajaroenrat	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Nutthakorn Songkram	KMITL	
Asst. Prof.Dr.Ammorn Insung	KMITL	
Asst. Prof.Dr.Monthon Ganmanee	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Thamrong Mekhora	KMITL	
Ms.Sumnao Pattararatnant	KMITL	<i>Secretary</i>

### Organizing Committee

Asst.Prof.Dr.Monthon Ganmanee	KMITL	<i>Chairman</i>
Assoc.Prof.Dr.Taninnun Jaenaksorn	KMITL	
Assoc.Prof.Dr.Chamroon Laosinwattana	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Paveena Taweekijakarn	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Kanjana Saetiew	KMITL	
Asst. Prof.Dr.Ammorn Insung	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Nutthakorn Songkram	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Nittaya Phakamas	KMITL	
Ms.Sumnao Pattararatnant	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Kanya Jirajaroenrat	KMITL	<i>Secretary</i>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### Scientific Committee

Assoc.Prof.Dr.Tanimnun Jaenaksorn	KMITL	<i>Chairman</i>
Assoc.Prof.Dr.Chamroon Laosinwattana	KMITL	
Assoc.Prof.Dr.Ronachai Sitthigripong	KMITL	
Assoc.Prof.Dr.Tippawan Limunggura	KMITL	
Assoc.Prof.Dr.Suneerat Ruangsomboon	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Kanjana Saetiew	KMITL	
Asst. Prof.Dr.Ammorn Insung	KMITL	
Asst.Prof.Dr. Teerawat Sarutayophat	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Nittaya Phakamas	KMITL	
Dr. Nonglak Parinthawong	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Lampan Khurnpoon	KMITL	
Dr. Sukunya Yampracha	KMITL	<i>Secretary</i>

### International Scientific Committee

Prof.Dr.Julian Wiseman	School of Bioscience, University of Nottingham, United Kingdom
Prof.Dr.Gray Williams	School of Biological Science, University of Hongkong, Sar China
Prof.Dr.Metha Wanapat	Director, Tropical Feed Resource Research and Development Center, Khon Kaen University, Thailand
Prof.Dr.Hideo Ishii	School of Agricultural Regional Vitalization, Kibi International University, Japan
Prof.Dr. Abdul Salam Babji	School of Chemical Science and Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM)
Assoc.Prof.Dr. Rajeev Bhat	Food Technology Division, School of Industrial Technology, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia
Assoc.Prof.Dr. Janine Croser	Centre for Plant Genetics and Breeding, The University of Western Australia, Australia
Dr.Thierry Tran	French Agricultural Research Centre for International Development (CIATRA), France

### Ceremony and Reception Committee

Asst.Prof.Dr.Kanya Jirajaroenrat	KMITL	<i>Chairwoman</i>
Asst.Prof.Dr. Sarayut Phonpho	KMITL	
Asst.Prof.Dr. Montinee Teerarak	KMITL	
Dr.Rutcharin Limsupavanich	KMITL	
Lect. Dusit Aue-umneoy	KMITL	
Assist.Prof.Dr.Komkhae Pilasombut	KMITL	
Assist.Prof.Dr.Kanjana Saetiew	KMITL	
Dr.Duangkamol Parrositp Thunmatiwat	KMITL	
Dr.Suneeporn Suwanmaneepong	KMITL	
Miss Montha Suwanrath	KMITL	<i>Secretary</i>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Registration and Financial Committee**

Asst.Prof.Dr.Nittaya Phakamas	KMITL	<i>Chairman</i>
Asst.Prof.Dr.Komkhae Pilasombut	KMITL	
Patrrarat Teamkao	KMITL	
Phatchara Eamkijakarn	KMITL	
Mrs.Pacharee Keadchoom	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Lampan Khurnpoon	KMITL	<i>Secretary</i>

**Public Relations and Technical Committee**

Asst.Prof.Dr.Paveena Taweekijakarn	KMITL	<i>Chairman</i>
Asst.Prof.Dr.Kanok Lertpanich	KMITL	
Miss Wilai Punpitanusorn	KMITL	
Mr.Apsit Sanla	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Nutthakorn Songkram	KMITL	<i>Secretary</i>

**Welfare Committee**

Asst. Prof.Dr.Ammorn Insung	KMITL	<i>Chairman</i>
Asst.Prof.Peerachai Kullachai	KMITL	
Asst.Prof.Dr. Teerawat Sarutayophat	KMITL	
Asst.Prof.Dr.Prommart Koochakan	KMITL	
Asst. Prof.Pornthiwa Kanyawongha	KMITL	
Dr. Nonglak Parinthawong	KMITL	
Patrrarat Teamkao	KMITL	
Lect. Wanida Duangkongsan	KMITL	
Mr.Jarongsak Pumnuan	KMITL	<i>Secretary</i>

**Coordinating Committee**

Ms.Sumnao Pattararatnant	KMITL	<i>Chairman</i>
Mrs.Pacharee Keadchoom	KMITL	
Mr.Chatre Vijitrotai	KMITL	
Buppha Jongput	KMITL	
Mr.Panurat Jantup	KMITL	
Mrs.Lamead Sumrittisut	KMITL	<i>Secretary</i>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Isolation of ACC-Deaminase-Producing Endophytic Bacteria from Rice (*Oryza sativa*)

Chokchai KITTIWONGWATTANA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand

\*Corresponding email: kkchokch@kmitl.ac.th

### ABSTRACT

Endophytic bacteria are valuable natural resources because of their plant-growth-promoting activities. One mechanism by which endophytic bacteria promote plant growth is the production of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase which lowers the amount of the phytohormone ethylene. In the present study, endophytic bacteria were isolated from stems and roots of rice collected from Suphanburi, Bangkok and Chonburi provinces, Thailand. One hundred and sixty bacterial isolates were obtained and screened for their ACC-deaminase activity. ACC deaminase production was determined based on bacterial growth on basal medium supplemented with ACC as the sole nitrogen source. The results showed that there were 20 isolates that produced the enzyme. Based on the 16S rRNA gene sequences, ACC-deaminase producers were members of genera *Bacillus* (6 isolates), *Burkholderia* (5 isolates), *Fictibacillus* (2 isolates), *Dickeya* (1 isolate), *Enhydrobacter* (1 isolate), *Micrococcus* (1 isolate), *Moraxella* (1 isolate), *Halobacillus* (1 isolate), *Staphylococcus* (1 isolate) and *Ancylobacter* (1 isolate). These bacteria are candidates for further study and application as biofertilizers.

**Keywords:** Rice, Endophytes, ACC-deaminase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

National Conference on Conservation Status, Present and Future of Biodiversity  
10-12 June 2015, Trang, Thailand



**คณะกรรมการอำนวยการ (ที่ปรึกษา)**

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| 1. รศ.ดร. ศักรินทร์ ภูมิรัตน์ | อธิการบดี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี              |
| 2. ผศ. รุจา ทิพย์วารี         | อธิการบดี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย                |
| 3. รศ. มุกดา สุขสวัสดิ์       | รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ มทร.ศรีวิชัย           |
| 4. ผศ. กฤษญา พรหมณ์ชูเอม      | รองอธิการประจำวิทยาเขตตรัง มทร.ศรีวิชัย                      |
| 5. ผศ.ดร. ประเสริฐ ทองหนู้อย  | คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มทร.ศรีวิชัย         |
| 6. ผศ.ดร. อภิวิทย์ สงรักษ์    | ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา มทร.ศรีวิชัย                  |
| 7. ผศ. โกสินทร์ พัฒนเมธี      | ผู้อำนวยการสถาบันทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มทร.ศรีวิชัย |
| 8. นายสุชาติ อินทล้ำ          | ผู้อำนวยการวิทยาลัยการโรงแรมและการท่องเที่ยว มทร.ศรีวิชัย    |
| 9. นางเพ็ญพร เกิดสุข          | ผู้อำนวยการสำนักงานวิทยาเขต มทร.ศรีวิชัย                     |
| 10. ศ.ดร. มรกต ดันดีเจริญ     | ที่ปรึกษาลำดับงานพัฒนามหาวิทยาลัยและเทคโนโลยีแห่งชาติ        |
| 11. คุณ. วันเชิญ โพรหาเจริญ   | ที่ปรึกษาคณะผู้บริหารความและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ          |

**คณะกรรมการอำนวยการจัดประชุมวิชาการ**

- |                                  |  |
|----------------------------------|--|
| 1. รศ. บุญยา บุญนาค              | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี        |
| 2. Assoc.Prof.Dr. George A. Gale | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี        |
| 3. Mr. Terence Henry Commins     | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี        |
| 4. ดร. นฤมล ดันดีพิษณุ           | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี        |
| 5. นางกนกวรรณ อ่อนอิน            | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี        |
| 6. นางสาววิชุดา เจริญราษฎร์      | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี        |
| 7. นางสาวเกศินี จันทน์นิม        | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี        |
| 8. นายอรรถวิทย์ วันเกลสิงห์      | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี        |
| 9. ดร. ศุภิต งามประเสริฐ         | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี        |
| 10. ผศ. ปรีภวดี ศรีชัย           | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย          |
| 11. ศร. สมรักษ์ รอดเจริญ         | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย          |
| 12. ดร. วรพร ชารามกูร            | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย          |
| 13. นายสุวรงค์ พรหมเขต           | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย          |
| 14. นายเชิด คงทอง                | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย          |
| 15. นางสาวบุญบรรจง สายมาศ        | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย          |
| 16. นางสาวเกศินี ไหมคง           | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย          |
| 17. นางสาวหทัยรัตน์ ทัศนเกษ      | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย          |
| 18. นางสาวธารทิพย์ สุวรรณเวลา    | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย          |
| 19. นางสาวจริยาภรณ์ ช่วยเรือง    | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย          |
| 20. นางสาวประภาพร หนูคงรักษ์     | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย          |
| 21. นางรังสิมา ชันชเสธา          | สำนักงานพัฒนามหาวิทยาลัยและเทคโนโลยีแห่งชาติ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## Biodiversity of endophytic bacteria isolated from rice and their indole-3-acetic production

Chokchai Kittiwongwattana<sup>1\*</sup> and Supachai Vuttipongchaikij<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

<sup>2</sup>Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

\*Corresponding author, e-mail: kkchokch@yahoo.com

### Abstract

Endophytic bacteria are recognized as bacteria that colonize the internal tissues of the plant body without harming the plant host or causing plant disease. Previous studies have shown their plant growth promoting activities including nitrogen fixation, increase in phosphate solubilization and antagonistic activities against plant pathogens. This study was focused on isolation of endophytic bacteria from roots and stems of rice plants (*Oryza sativa*) that were grown in organic farms. All bacterial isolates were purified on nutrient agar and primarily identified using the pairwise alignment analysis of partial 16S rRNA gene sequences on the EzTaxon database. The result showed that 70 isolates belonging to 14 different genera that could be classified into four different phyla namely *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria*. These isolates were also tested for their indole-3-acetic acid (IAA) production using the Salkowski's reagent. The result showed that the majority of IAA-producing bacteria were members of the phylum *Firmicutes*. Based on the results obtained from this study, these bacteria are potential candidates for further study and application as biofertilizers.

**Keywords:** 16S rRNA/ biofertilizer/ *Firmicutes*/ *Actinobacteria*/ *Bacteroidetes*/ *Proteobacteria*/ Thailand

P-20

p.132

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# Plant Growth Promotion by Endophytic Bacteria Isolated from Rice (*Oryza sativa*)

Wilasinee Raweekul, Sukritta Wuttitummaporn,  
Wanrudee Sodchuen and Chokchai Kittiwongwattana\*

Department of Biology, Faculty of Science,  
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

## Abstract

Endophytic bacteria are widely studied because of their plant-growth-promoting benefits. One hundred and twenty-six endophytic bacteria were isolated from rice roots and stems in this study. Based on their partial 16S rRNA gene sequences, they were characterized as members of phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*. Among these, isolates 1017, 1048 and 3037 likely represented novel bacterial species of genera *Pedobacter*, *Sphingomonas* and *Paenibacillus*, respectively, based on their relatively low sequence similarities (<98.5%) with recognized bacterial species. All isolates were tested for their growth promotion in rice seedlings *in vitro*. The increases of fresh weight ranging from 2.30 to 3.18 fold were observed in rice seedlings that were inoculated with twelve bacterial isolates when compared to the water-treated control group. These isolates were members of genera *Bacillus* (ten isolates), *Micrococcus* (one isolate) and *Acinetobacter* (one isolate). The presence of *nifH*, siderophore production, indole-3-acetic acid (IAA) synthesis and ACC-deaminase activity were determined in these twelve isolates. The most common characteristic was the *nifH* gene that was detected in five isolates. The result obtained in our study demonstrated the diversity of endophytic bacteria in rice and their potential application as biofertilizers.

**Keywords:** ACC deaminase; endophytic bacteria; IAA, *nifH*, *Oryza sativa*; plant growth promotion; siderophores

## 1. Introduction

Plant-microbe interactions have been a major area of study in both microbiology and plant biology. While phytopathogenic bacteria detrimentally affect the plant host by causing diseases, a larger number of bacteria have positive effects on plant growth. The latter group is termed plant-growth-promoting bacteria (PGPB). PGPB that colonize intercellular spaces in internal tissues of the plant host are also recognized as endophytic bacteria [1-3].

Increasing the nutrient availability for the plant uptake is one of the direct mechanisms through which endophytic bacteria exert their positive effects on the plant host. Nitrogen is one of the major nutrients and an important limiting factor for plant growth and development [4]. Bacteria produce the nitrogenase enzyme to convert atmospheric nitrogen into nitrogenous compounds that are readily available for the plant uptake. Nitrogenase is composed of the dinitrogenase reductase subunit encoded by *nifH* and the heterotetrameric component

\*Correspondence : chokchai.ki@kmitl.ac.th

DOI 10.14456/tijsat.2016.2

encoded by *nifD* and *nifK* [5]. Because *nifH* is conserved among various groups of bacteria, the presence of the gene is also used to indirectly investigate the nitrogen-fixing activity [4]. Previous studies demonstrated the increase of growth and the nitrogen content of rice plants when the plants were co-cultivated with nitrogen-fixing bacteria [6-7]. Siderophore biosynthesis is another mechanism which bacteria employ to increase the iron uptake by plants because iron is mostly found in the insoluble ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) form [8-9]. In a previous study, inoculation of a siderophore-producing bacterium reduced the symptoms of iron deficiency in mung bean plants that were grown in iron-deficient soil [10].

Another type of plant-growth-promoting mechanism by endophytic bacteria is the modulation of the phytohormones auxin and ethylene. IAA enhanced plant growth and is also produced by bacteria in several genera [8]. Previous studies showed that inoculation of IAA-producing bacteria was able to induce expression of auxin-responsive genes as well as promote plant growth compared to the non-inoculated control group [13-15]. Additionally, strains of endophytic bacteria are capable of producing ACC deaminase that converts 1-aminocyclopropane-1-carboxylic (ACC) acid, the precursor of ethylene biosynthesis, into ammonia and  $\alpha$ -ketobutyrate. This decreases the ethylene level and prevents overproduction of ethylene that leads to growth reduction in plants [11-12]. A report showed that enhancement of salt tolerance in maize was achieved by inoculating the plants with ACC-deaminase-producing endophytic bacteria [16].

We reported here molecular characterization of endophytic bacteria isolated from roots and stems of rice plants. Plant growth promotion was determined in rice seedlings *in vitro*. The presence of the *nifH* gene as well as other plant-growth-promoting activities including production of siderophore, IAA and ACC deaminase were also examined.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Bacterial isolation

Samples of rice plants were collected from Bangkok, Chonburi and Supanburi provinces, Thailand. Roots and stems were cleaned with running tap water and cut into small pieces. Surface sterilization was performed using 10% (v/v) NaHClO that was added with a few drops of Tween-20. Samples were rinsed with sterilized distilled water five times and ground using a mortar and a pestle. Ground tissues were placed in glass bottles containing sterilized distilled water and shaken on a rotary shaker to obtain bacterial suspension. Serial dilutions of the suspension was prepared up to the  $10^{-3}$  concentration and plated on nutrient agar (NA; HiMedia) and tryptone soya agar (TSA; HiMedia) plates. Bacterial isolates were obtained after incubation at 30°C for 7 days. All isolates were purified and further grown on NA plates. Control plates were obtained by plating the water that was used for the final rinse on NA and TSA plates.

### 2.2 DNA extraction and amplification of the 16S rRNA gene

Bacterial cells were grown on NA plates and scraped off for DNA extraction using a GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) according to the manufacturer's protocol. Bacterial DNA was used for amplification of the nearly complete 16S rRNA gene with the universal primers 41F and 1492R [17].

### 2.3 DNA sequencing and pairwise alignment analysis

16S rRNA gene PCR products were purified using a Gel/PCR Purification Kit (Favorgen Biotech Corp, Taiwan) according to the protocol provided by the manufacturer. DNA fragments were partially sequenced with the primer 1492R. The pairwise alignment analysis of partial 16S rRNA gene sequences of all isolates was performed on the EzTaxon database [18].

#### 2.4 Phylogenetic analysis

Almost-complete 16S rRNA gene fragments of isolates 1017, 1048 and 3037 were sequenced using universal primers 41F, 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') and 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). 16S rRNA gene sequences of known bacterial species were obtained from the GenBank database. These sequences were subjected to the multiple alignment analysis using Clustal W. Gaps and ambiguous bases were manually removed and adjusted. The neighbour-joining method [19] was used to reconstruct the phylogenetic tree, and the Kimura 2-parameter model [20] was used to calculate evolutionary distances. The confidence level of each clade was determined using the bootstrap analysis based on 1,000 resamplings [21].

#### 2.5 Plant growth promotion

Endophytic bacteria were grown on NA plates at 30°C for two days. Bacterial cells were scraped off the medium and re-suspended in sterilized distilled water. The cell concentration was adjusted to McFarland standard No. 0.5. Rice seeds were washed thoroughly with soap and rinsed under tap water. Seeds were surface-sterilized with 95% ethanol for 10 minutes and dried on sterilized filter paper. Subsequently, they were soaked in 50 mL of sterilized distilled water supplemented with one mL of 10% providone-iodine for two hours and rinsed with sterilized distilled water again. Ten seeds were inoculated with each bacterial suspension for two hours and then transferred to a glass bottle containing 0.6% agar. Seeds were kept in the dark for three days and subsequently grown in the growth chamber with the growth conditions of 25±2°C and the 16hr/8hr (light/dark) cycle for an additional 16 days. Seedlings were removed from the medium and measured for fresh weight. The control group was prepared by submerging rice seeds in sterilized distilled water. Growth promotion by bacteria was determined as the ratio of the fresh weights of the bacterium-

inoculated group to the control group. All experiments were performed in triplicates. Statistically significant differences between means were determined using Duncan's Multiple Range Test at the significant level of  $P=0.05$ .

#### 2.6 Amplification of partial *nifH*

Amplification of the partial *nifH* gene fragment was carried out with bacterial genomic DNA using the 19F and 407R primers as described by Ji *et al.* [4]. The temperature conditions were as follow: 94°C, 3 min; 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C, and 50 sec at 72°C; 72°C for 5 min. PCR products were examined using electrophoresis in 1.5% agarose gel.

#### 2.7 Production of siderophores

Endophytic bacteria were grown on chrome azurol S (CAS) agar plates [22] and incubated at 30°C for seven days. The presence of yellow or orange halo around bacteria indicated the positive result.

#### 2.8 IAA production

Nutrient broth (NB; HiMedia, India) containing 5mM L-tryptophan was inoculated with bacteria and incubated at 30°C for 48 hours on the rotary shaker. Two hundred  $\mu$ L of the culture supernatant was obtained by centrifugation and tested for IAA production using the Salkowski's reagent [23].

#### 2.9 ACC deaminase production

Bacterial isolates were grown on NA plates at 30°C for 48 hours. Subsequently, cells were scraped off the medium and washed with one mL of Dworkin and Foster (DF) salt minimal medium [24] by resuspension and centrifugation. Bacterial cells were collected and used to prepare bacterial suspension in one mL of DF salt minimal medium. Two  $\mu$ L of the suspension were inoculated on DF salt minimal agar containing 2mM 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as the sole nitrogen source. Plates were incubated at 30°C for four days. Positive bacterial isolates were determined based on their ability to utilize ACC as the nitrogen source. Negative and positive control groups were obtained by inoculating the suspension on DF salt minimal

agar and DF salt minimal agar supplemented with 2mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respectively.

### 3. Results and Discussions

#### 3.1 Bacterial isolation and molecular characterization

A total number of 126 culturable bacterial isolates were obtained from the samples in this study. Seventy-two and 54 isolates were obtained from roots and stems, respectively (Table 1). They were initially characterized based on the pairwise-alignment analysis of the partial 16S rRNA gene sequences using the EzTaxon database. The results showed that they were classified into four phyla and 31 genera. In roots, the majority (66.7%) of the isolates were members in the phylum *Firmicutes*. It consisted of five different genera, and the predominant group (36 isolates) belonged to the genus *Bacillus*. The second largest phylum (19.44%) was *Proteobacteria*. Isolates in this phylum belonged to ten different genera with *Acinetobacter* as the major genus (four isolates). 12.50% and 1.39% of the isolates were members in phyla *Bacteroidetes* (four genera) and *Actinobacteria* (one genus), respectively. In contrast, *Proteobacteria* (eleven genera) and *Firmicutes* (five genera) constituted the largest and the second-largest groups in stems. *Burkholderia* (six isolates), *Acinetobacter* (five isolates), *Pseudomonas* (five isolates) and *Pantoea* (four isolates) were found as the predominant genera of the phylum *Proteobacteria* while *Bacillus* (eleven isolates) was the major genus of the phylum *Firmicutes*. The remaining isolates were composed of bacteria that belonged to phyla *Actinobacteria* (5.56%; two genera) and *Bacteroidetes* (3.70%; two genera).

**Table1.** Affiliation of endophytic bacteria isolated from rice stems and roots. Numbers in parentheses represent the numbers of isolates that were classified as members in each genus.

Phylum	Genus	
	Roots	Stems
<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcus</i> (1)	<i>Curtobacterium</i> (1), <i>Microbacterium</i> (2),
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Chryseobacterium</i> (6), <i>Flavobacterium</i> (1), <i>Myroides</i> (1), <i>Pedobacter</i> (1)	<i>Chryseobacterium</i> (1), <i>Mucilaginibacter</i> (1),
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i> (36), <i>Fictibacillus</i> (3), <i>Halobacillus</i> (1), <i>Paenibacillus</i> (2), <i>Staphylococcus</i> (6)	<i>Bacillus</i> (11), <i>Fictibacillus</i> (3), <i>Lactococcus</i> (2), <i>Lysinibacillus</i> (1), <i>Staphylococcus</i> (3)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i> (4), <i>Citrobacter</i> (1), <i>Cronobacter</i> (1), <i>Dickeya</i> (1), <i>Enhydrobacter</i> (2), <i>Enterobacter</i> (1), <i>Escherichia</i> (1), <i>Novosphingobium</i> (1), <i>Pseudomonas</i> (1), <i>Sphingomonas</i> (1)	<i>Acinetobacter</i> (5), <i>Aeromonas</i> (2), <i>Burkholderia</i> (6), <i>Enterobacter</i> (1), <i>Klebsiella</i> (1), <i>Novosphingobium</i> (1), <i>Ochrobactrum</i> (2), <i>Pantoea</i> (4), <i>Pseudacidovorax</i> (1), <i>Pseudomonas</i> (5), <i>Sphingomonas</i> (1)

Differences in the diversity of endophytic bacteria between previous studies have been observed. Using the culture-independent method, Sun *et al.* reported the composition of endophytic bacteria from rice roots that were collected in China [25]. They found that the majority (59.26%) of the bacteria belonged to the genera *Gallionella* and *Burkholderia* of the phylum *Proteobacteria*. Other phyla including *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Deinococcus-Thermus* and *Acidobacteria* were found as minor groups. Although a metagenomic study indicated that the predominant root colonizers of rice plants collected in Brazil were also members of the phylum *Proteobacteria*, the predominant genera in this study were *Enterobacter* and *Rhizobium* [26]. In our

**Fig.1.** Phylogenetic relationships based on nearly-complete 16S rRNA gene sequences between isolates 1017, 1048 and 3037 and other recognized bacterial species using the neighbour-joining method. The confidence level of each clade was determined by the bootstrap analysis based on 1,000 replicates. Only values higher than 60% are shown. Bar indicates 0.02 nucleotide substitutions.

### 3.2 Plant growth promotion by endophytic bacteria

Plant growth promotion was determined based on the ratio between the fresh weight of rice seedlings that were inoculated with endophytic bacteria and that of the control group. After 16 days of co-cultivation with endophytic bacteria, the fresh-weight ratios higher than two were observed in seedlings that were inoculated with twelve bacterial isolates (Table 2). Ten of the twelve isolates were members of the genus *Bacillus*, while isolates 3010 and 3014 were characterized as *Micrococcus* sp. and *Acinetobacter* sp., respectively. The highest ratio ( $3.18 \pm 0.30$ ) was observed with isolate 3010.

Several bacterial strains belonging to genera *Bacillus*, *Micrococcus* and *Acinetobacter* have been demonstrated as plant-growth-promoting bacteria. For example, inoculation of *Bacillus oryzae* YC7007<sup>T</sup>, isolated from rice roots, increased the germination rates and the number of tillers of rice plants [35]. A bacterial strain that was characterized as *Micrococcus* sp. was found promoting the vegetative growth of cow pea roots, shoots and leaves [43]. *Acinetobacter johnsonii* 3-1 was isolated from sugar beet roots, and inoculation of the bacterium enhanced the growth of sugar beet plants [44]. Additionally, inoculation of several strains of endophytic bacteria isolated from rice landraces was able to significantly increase the growth rate of root length of the commercial rice cultivar by approximately three fold [45]. Taken together, our results and

these examples emphasized the benefits of endophytic bacteria for plant growth.

### 3.3 Plant-growth-promoting activities

The twelve isolates were examined for their plant-growth-promoting traits including the presence of the *nifH* gene, siderophore synthesis, IAA production and ACC-deaminase activity (Table 2). Seven isolates displayed at least one characteristic. The presence of the *nifH* gene was the most common characteristic and detected in isolates 3003, 3008, 3010, 3012 and 3016. Isolate 3014 was able to produce siderophores and IAA. The only trait found in isolate 3013 was the ability to produce ACC-deaminase. Additionally, isolate 3010 that yielded the highest fresh-weight ratio of rice seedlings exhibited all of the tested plant-growth-promoting characteristics. This was consistent with previous studies. Ji *et al.* isolated *nifH*-containing endophytic bacteria from Korean rice cultivars and demonstrated their ability to promote growth in rice plants [4]. These bacteria were also able to produce IAA and siderophores as well as solubilize phosphate. Other previous studies also showed that inoculation of ACC-deaminase-producing bacteria could promote growth, stress tolerance and nutrient uptake in plants [16, 46-47]. However, we found that isolates 3004, 3005, 3006, 3015 and 3022 were tested negative for all the examined traits. This result suggests the involvement of other mechanisms that have also been proposed as plant-growth-promoting activities including phosphate solubilization as well as cytokinin and gibberellin production [4].

study, 66.67% (48 isolates) of endophytic bacteria from roots were affiliated with the phylum *Firmicutes* while the predominant group in stems was related to the phylum *Proteobacteria*. Previous studies have demonstrated the effects of various factors on the number and the diversity of endophytic bacteria in plants. These included environmental conditions, plant species, plant cultivars and phytopathogens [27-31]. We surmised that the discrepancy between endophytic bacterial compositions found in the previous studies and the present study was partly due to the differences in environmental conditions because rice samples were grown in geographically different countries. Almost all isolates showed the similarity values higher than 98.5% with recognized bacterial species. However, relatively low sequence similarities were observed between isolates 1017, 1048 and 3037 and *Pedobacter tournerimensis* TF5-37.2-LB10<sup>T</sup> (96.6% sequence similarity), *Sphingomonas changbaiensis* NBRC 104936<sup>T</sup> (97.4%) and *Paenibacillus vulneris* CCUG 53270<sup>T</sup> (98.2%), respectively. Stackebrandt and Ebers reported that 16S rRNA gene sequence similarities below 98.7% were highly correlated with the DNA-DNA relatedness lower than 70% [32] that has been established as the threshold to assign bacterial strains to different species [33]. The low levels of sequence similarities observed in isolates 1017, 1048 and 3037 suggested that they may represent novel bacterial species in their corresponding genera. In order to understand their phylogenetic relationship with other recognized bacterial species, multiple-alignment and phylogenetic analyses using nearly-complete 16S rRNA gene sequences were carried out. The result obtained from reconstruction of the phylogenetic tree is shown in Fig.1. Isolates 1017 formed a distinct clade with *P. tournerimensis* TF5-37.2-LB10<sup>T</sup> and *Pedobacter xinjiangensis* 12157<sup>T</sup> with the bootstrap value of 67%. Isolate 1048 was placed in the same cluster with other *Sphingomonas* species. It was

phylogenetically related to *S. changbaiensis* NBRC 104936<sup>T</sup>, and this was significantly supported by the high bootstrap value of 87%. Isolate 3037 was found in the cluster consisting of *Paenibacillus* species. Its closest relatives were *P. vulneris* CCUG 53270<sup>T</sup> and *Paenibacillus rigui* WPCB173<sup>T</sup> at the 96% bootstrap value. Our result was consistent with several previous studies that demonstrated isolation of a number of novel bacterial species as endophytes of rice and other plants [34-37]. This suggested that plant internal tissues are an important isolation source for the study of microbial taxonomy.

In a previous study, *Pedobacter trunci*, *Pedobacter daejeonensis* and *Pedobacter silvilitoris* have been recovered from woody plants [38]. *Sphingomonas roseiflava*, *Sphingomonas rosa*, *Sphingomonas gei* are examples of *Sphingomonas* species that were described as endophytic bacteria [39-41]. However, up to the date of the preparation of this manuscript, there were no reports of novel bacterial species in genera *Pedobacter* and *Sphingomonas* that were initially characterized as endophytic bacteria of rice. In contrast, *Paenibacillus humanensis* was the only species of the genus *Paenibacillus* that was isolated from internal tissues of rice seeds [42]. Thus, isolates 1017, 1048 and 3037 that were obtained in our study may represent additional novel bacterial species of genera *Pedobacter*, *Sphingomonas* and *Paenibacillus* that were able to colonize rice plants.



**Table 2.** Growth promotion in rice seedlings by endophytic bacteria and bacterial plant-growth-promoting activities. Different letters indicate significance differences between means (n=3). (+ : positive, - : negative).

Isolates	Affiliation	Fresh-weight Ratio (Mean±S.D.)	Plant-growth-promoting characteristics			
			<i>nifH</i>	Siderophores	ACC-deaminase	IAA
3003	<i>Bacillus</i>	2.30±0.23 <sup>a,b</sup>	+	-	-	-
3004	<i>Bacillus</i>	2.34±0.18 <sup>a,b,c</sup>	-	-	-	-
3005	<i>Bacillus</i>	2.70±0.62 <sup>a,b,c</sup>	-	-	-	-
3006	<i>Bacillus</i>	3.05±0.42 <sup>b,c</sup>	-	-	-	-
3008	<i>Bacillus</i>	2.64±0.19 <sup>a,b,c</sup>	+	-	-	-
3010	<i>Micrococcus</i>	3.18±0.30 <sup>c</sup>	+	+	+	+
3012	<i>Bacillus</i>	3.14±0.22 <sup>b,c</sup>	+	-	-	-
3013	<i>Bacillus</i>	2.94±0.59 <sup>a,b,c</sup>	-	-	+	-
3014	<i>Acinetobacter</i>	2.14±0.42 <sup>a</sup>	-	+	-	+
3015	<i>Bacillus</i>	2.56±0.35 <sup>a,b,c</sup>	-	-	-	-
3016	<i>Bacillus</i>	2.58±0.70 <sup>a,b,c</sup>	+	-	-	-
3022	<i>Bacillus</i>	2.97±0.63 <sup>a,b,c</sup>	-	-	-	-

#### 4. Conclusion

In the present study, we found that endophytic bacteria isolated from rice roots and stems composed of members in phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*. Based on the phylogenetic analysis of nearly-complete 16S rRNA gene sequences, isolates 1017, 1048 and 3037 may represent novel species of genera *Pedobacter*, *Sphingomonas* and *Paenibacillus*, respectively. Phenotypic and chemotaxonomic characterizations are required in order to confirm their taxonomic classification. Significant growth promotion in rice seedlings was observed when they were treated with twelve bacterial isolates. Seven of these isolates displayed some plant-growth-promoting traits. The most common characteristic was the presence of the *nifH* gene. Five other isolates yielded negative results in all tested traits. According to the data obtained in our study, these isolates are potential candidates for future application as biofertilizers.

#### 5. References

- [1] Mei, C. and Flin, B., The Use of Beneficial Microbial Endophytes for Plant Biomass and Stress Tolerance Improvement, Recent Patents on Biotechnology, Vol.4, pp.81-95, 2010.
- [2] Lindow, S.E. and Brandl, M.T., Microbiology of the Phyllosphere, Applied Environmental Microbiology, Vol.69, pp.1875-1883, 2003.
- [3] Nongkhaw, F.M.W. and Joshi, S.R., Distribution Pattern Analysis of Epiphytic Bacteria on Ethnomedicinal Plant Surfaces: A Micrographical and Molecular Approach, Journal of Microscopy and Ultrastructure, Vol.2, pp.34-40, 2014.
- [4] Ji, S.H., Gururani, M.A. and Chun, S.C., Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Endophytic Diazotrophic Bacteria from Korean Rice Cultivars, Microbiological Research, Vol.169, pp.83-98, 2014.
- [5] Gaby, J.C. and Buckley, D.H., A Comprehensive Aligned *nifH* Gene Database: A Multipurpose Tool for

- Studies of Nitrogen-fixing Bacteria, Database Update, Vol.2014, doi: 10.1093/database/bau001, 2014.
- [6] Choudhury, A.T.M.A. and Kennedy, I.R., Prospects and Potentials for Systems of Biological Nitrogen Fixation in Sustainable Rice Production, Biology and Fertility of Soils, Vol.39, pp.219-227, 2004.
- [7] Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackenbruch, F., Reis, V.M., Sicardi, M. and Battiston, F., The Contribution of Nitrogen Fixation to Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the Identification and Characterization of Part of the Associated Diazotrophic Bacterial Community, Plant and Soil, Vol.356, pp.35-49, 2012.
- [8] Glick, B.R., Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications, Scientifica, Vol.2012, doi:10.6064/2012/963401, 2012.
- [9] Osorio, H., Martinez, V., Nieto, P.A., Holmes, D.S. and Quatrini, R., Microbial Iron Management Mechanisms in Extremely Acidic Environments: Comparative Genomics Evidence for Diversity and Versatility, BMC Microbiology, Vol.8, pp.1-23, 2008.
- [10] Sharma, A., Johri, B.N., Sharma, A.K. and Glick, B.R., Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas* sp. Strain GRP3 Influences Iron Acquisition in Mung Bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck), Soil Biology and Biochemistry, Vol.35, pp.887-894, 2003.
- [11] Spaepen, S. and Vanderleyden, J., Auxin and Plant-Microbe Interactions, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, Vol.3, doi: 10.1101/cshperspect.a001438, 2011.
- [12] Mattos, K.A., Padua, V.L., Romeiro, A., Hallack, L.F., Neves, B.C., Ulisses, T.M., Barros, C.F., Todeschini, A.R., Previato, J.O. and Mendonca-Previato, L., Endophytic Colonization of Rice (*Oryza sativa* L.) by the Diazotrophic Bacterium *Burkholderia kururiensis* and its Ability to Enhance Plant Growth. Anais De Academia Brasileira de Ciências, Vol.80, pp.477-493, 2008.
- [13] Bhattacharyya, P.N. and Jha, D.K., Plant Growth-Promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture, World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol.28, pp.1327-1350, 2012.
- [14] Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. and Ecker, J.R., EIN2, a Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in Arabidopsis, Science, Vol.284, pp.2148-2152, 1999.
- [15] Penrose, D.M. and Glick, B.R., Methods for Isolating and Characterizing ACC Deaminase-Containing Plant Growth-Promoting rhizobacteria, Physiologia Plantarum, Vol.118, pp.10-15, 2003.
- [16] Nadeem, S.M., Zahir, Z.A., Naveed, M. and Arshad, M., Preliminary Investigations on Inducing Salt Tolerance in Maize through Inoculation with rhizobacteria Containing ACC Deaminase Activity, Canadian Journal of Microbiology, Vol.53, pp.1141-1149, 2007.
- [17] Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M. and Kudo, T., Evaluation of Primers and PCR Conditions for the Analysis of 16S rRNA Genes from a Natural Environment, FEMS Microbiology Letters, Vol.221, pp.299-304, 2003.
- [18] Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S. and Chun, J., Introducing EzTaxon-e: a Prokaryotic 16S rRNA Gene Sequence Database with Phylotypes that Represent Uncultured Species, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol.62, pp.716-721, 2012.

- [19] Saitou, N. and Nei, M., The neighbor-joining method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees, *Molecular Biology and Evolution*, Vol.4, pp.406-425, 1987.
- [20] Kimura, M., A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences, *Journal of Molecular Evolution*, Vol.16, pp.111-120, 1980.
- [21] Felsenstein, J., Confidence Limits on Phylogenies: An Approach using the Bootstrap, *Evolution*, Vol.39, pp.783-791, 1985.
- [22] Schwyn, B. and Neilands, J.B., Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores, *Analytical Biochemistry*, Vol.160, pp.47-56, 1987.
- [23] Perley, J.E. and Stowe, B.B., An Improvement in the Sensitivity of the Salkowski Reagent for Tryptamine, Tryptophan and Indoleacetic Acid, *Physiologia Plantarum*, Vol.19, pp.683-690, 1966.
- [24] Dworkin, M. and Foster, J., Experiments with Some Microorganisms Which Utilize Ethane and Hydrogen, *Journal of Bacteriology*, Vol.75, pp.592-601, 1958.
- [25] Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X. and Song, W., Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis, *Microbial Ecology*, Vol.55, pp.415-424, 2008.
- [26] Sessitsch, A., Hardoimm, P., Doring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., van Overbeek, L., Brar, D., van Elsas, J.D. and Reinhold-Hurek, B., Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis, *Molecular Plant Microbe Interaction*, Vol.25, pp.28-36, 2012.
- [27] Mocali, S., Bertelli, E., Di Cello, F., Mengoni, A., Sfalanga, A., Viliani, F., Caciotti, A., Tegli, S., Surico, G. and Fani, R., Fluctuation of Bacteria Isolated from Elm Tissues During Different Seasons and from Different Plant Organs, *Research in Microbiology*, Vol.154, pp.105-114, 2003.
- [28] Araújo, W.L., Marcon, J., Maccheroni, W. Jr, Van Elsas, J.D., Van Vuurde, J.W.L. and Azevedo, J.L., Diversity of Endophytic Bacterial Populations and their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.68, pp.4906-4914, 2002.
- [29] Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W.L., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A. and Azevedo, J.L., Isolation and Characterization of Soybean-Associated Bacteria and their Potential for Plant Growth Promotion, *Environmental Microbiology*, Vol.6, pp.1244-1251, 2004.
- [30] Kinkel, L.L., Wilson, M. and Lindow, S.E., Plant Species and Plant Incubation Conditions Influence Variability in Epiphytic Bacterial Population Size, *Microbial Ecology*, Vol.39, pp.1-11, 2000.
- [31] Dalmastrí, C., Chiarini, L., Cantale, C., Bevivino, A. and Tabacchioni, S., Soil Type and Maize Cultivar Affect the Genetic Diversity of Maize Root-Associated *Burkholderia cepacia* Populations, *Microbial Ecology*, Vol.38, pp.273-284, 1999.
- [32] Stackebrandt, E. and Ebers, J., Taxonomic Parameters Revisited: Tarnished Gold Standards, *Microbiology Today*, Vol.33, pp.152-155, 2006.
- [33] Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore,

- W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. and Truper, H.G., Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics, International Journal of Systematic Bacteriology, Vol.37, pp.463-464, 1987.
- [34] Zhang, X.X., Gao, J.S., Cao, Y.H., Sheirdil, R.A., Wang, X.C., and Zhang, L. *Rhizobium oryzicola* sp. nov., Potential Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacteria Isolated from Rice Roots, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol.65, pp.2931-2936, 2015.
- [35] Chung, E.J., Hossain, M.T., Khan, A., Kim, K.H., Jeon, C.O. and Chung, Y.R., *Bacillus oryzicola* sp. nov., an Endophytic Bacterium Isolated from the Roots of Rice with Antimicrobial, Plant Growth Promoting, and Systemic Resistance Inducing Activities in Rice, The Plant Pathology Journal, Vol.31, pp.152-164, 2015.
- [36] Duan, Y.Q., He, S.T., Li, Q.Q., Wang, M.F., Wang, W.Y., Zhe, W., Cao, Y.H., Mo, M.H., Zhai, Y.L. and Li, W.J., *Lysinibacillus tabacifolii* sp. nov., a Novel Endophytic Bacterium Isolated from *Nicotiana tabacum* Leaves, Journal of Microbiology, Vol.51, pp.289-294, 2013.
- [37] Kittiwongwattana, C., Thanaboripat, D., Laosinwattana, C., Koohakan, P., Parinthawong, N. and Thawai, C., *Micromonospora oryzae* sp. nov., Isolated from Roots of Upland Rice, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, doi: 10.1099/ijsem.0.000500, 2015.
- [38] Du, J., Singh, H., Ngo, H.T., Won, K.H., Kim, K.Y. and Yi, T.H., *Pedobacter daejeonensis* sp. nov. and *Pedobacter trunci* sp. nov., Isolated from an Ancient Tree Trunk, and Emended Description of the Genus *Pedobacter*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol.65, pp.1241-1246, 2015.
- [39] Yun, N.R., Shin, Y.K., Hwang, S.Y., Kuraishi, H., Sugiyama, J. and Kawahara, K., Chemotaxonomic and Phylogenetic Analyses of *Sphingomonas* Strains Isolated from Ears of Plants in the Family *Gramineae* and a Proposal of *Sphingomonas roseoflava* sp. nov., Journal General and Applied Microbiology, Vol.46, pp.9-18, 2000.
- [40] Akeuchi, M., Sakane, T., Yanagi, M., Yamasato, K., Hamana, K. and Yokota A., Taxonomic Study of Bacteria Isolated from Plants: Proposal of *Sphingomonas rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., *Sphingomonas asaccharolytica* sp. nov., and *Sphingomonas mali* sp. nov., International Journal of Systematic Bacteriology, Vol.45, pp.334-341, 1995.
- [41] Zhu, L., Si, M., Li, C., Xin, K., Chen, C., Shi, X., Huang, R., Zhao, L., Shen, X. and Zhang, L., *Sphingomonas gei* sp. nov., Isolated from Roots of *Geum aleppicum*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol.65, pp.1160-1166, 2015.
- [42] Liu, Y., Liu L., Qiu F., Schumann, P., Shi, Y., Zou, Y., Zhang, X. and Song, W., *Paenibacillus hunanensis* sp. nov., Isolated from Rice Seeds, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol.60, pp.1266-1270, 2010.
- [43] Dastager, S.G., Deepa, C.K. and Pandey, A., Isolation and Characterization of Novel Plant Growth Promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its Interaction with Cowpea, Plant Physiology and Biochemistry, Vol.48, pp.987-992, 2010.

- [44] Shi, Y., Lou, K. and Li, C. Growth Promotion Effects of the Endophyte *Acinetobacter johnsonii* Strain 3-1 on Sugar Beet, *Symbiosis*, Vol.54, pp.159-166, 2011.
- [45] Rangjaroen, C., Rerkasem, B., Teaumroong, N., Noisangiam, R. and Lumyong, S., Promoting Plant Growth in a Commercial Rice Cultivar by Endophytic Diazotrophic Bacteria Isolated from Rice Landraces, *Annals of Microbiology*, Vol.65, pp.253-266, 2015.
- [46] Glick, B.R., Bacteria with ACC Deaminase Can Promote Plant Growth and Help to Feed the World, *Microbiological Research*, Vol.169, pp.30-39, 2014.
- [47] Safronova, V.I., Stepanok, V.V., Engqvist, G.L., Alekseyev, Y.V. and Belimov, A.A., Root-Associated Bacteria Containing 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase Improve Growth and Nutrient Uptake by Pea Genotypes Cultivated in Cadmium Supplemented Soil, *Biology and Fertility of Soils*, Vol.42, pp.267-272, 2006.

## ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chokchai Kittiwongwattana
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
3. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์  
อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)  
สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง  
ถ.ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520  
โทรศัพท์ 0-2329-8400 ต่อ 3600  
โทรสาร 0-329-8427  
E-mail: kkchokch@kmitl.ac.th

#### 4. ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	ชีววิทยา	ม. เกษตรศาสตร์	2546
วท.ม.	พันธุศาสตร์	ม. เกษตรศาสตร์	2548
Ph.D.	Plant Biology	Rutgers University, USA	2553

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ พันธุศาสตร์ของพืชและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางชีววิทยาของพืชทั้งในเชิงพื้นฐานและเชิงประยุกต์ เช่น การทำลายพืชมพิดีเอ็นเอ การทำพันธุวิศวกรรม เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในการถ่ายฝากยีน
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

3.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :

3.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

-การคัดแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในพืชวงศ์ Lemnaceae (1 กุมภาพันธ์ 2555 - 31 มกราคม 2557; กองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

-การศึกษาการผลิตเอธานอลจาก *Spirodela polyrrhiza* (1 ตุลาคม 2555 - 30 กันยายน 2556; ทุนวิจัย วช. ประจำปีงบประมาณ 2556)

3.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kittiwongwattana C., Lutz K., Clark M., Maliga, P. (2007) Plastid marker gene excision by the phi C31 phage sitespecific recombinase. *Plant Molecular Biology*. 64: 137-143

สถานภาพ: ผู้ร่วมวิจัยระหว่างการศึกษาาระดับปริญญาเอก

Kittiwongwattana C. and Vuttipongchaikij S. (2013). Effects of nutrient media on vegetative growth of *Lemna minor* and *Landoltia punctata*. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 7: 60-69. (impact factor = 0.456)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2013). *Rhizobium paknamense* sp. nov., isolated from lesser duckweed (*Lemna aequinoctialis*). *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*. (impact factor = 2.112)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2013). Biodiversity assessment of endophytic bacteria isolated from duckweed (*Lemna aequinoctialis*). *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Conference on Engineering, Applied Sciences, and Technology (ICEAST)*. (Accepted)

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2014). *Rhizobium lemnae* sp. nov., a bacterial endophyte of *Lemna aequinoctialis*. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*. (impact factor = 2.112)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

#### 3.4 งานวิจัย:

-การคัดแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในพืชวงศ์ Lemnaceae

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาโครงการวิจัย: 1 ก.พ. 2555 - 31 ม.ค. 2557

-การศึกษากาการผลิตเอทานอลจาก *Spirodela polyrrhiza*

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: ทุนวิจัย วช. ประจำปีงบประมาณ 2556

ระยะเวลาโครงการวิจัย: 1 ตุลาคม 2555 - 30 กันยายน 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้