รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว (*Oryza sativa*)

นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2560
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การประยุกต์ใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว (*Oryza sativa*)

แหล่งเงิน เงินงบประมาณรายได้ ประเภทงานวิจัยเชิงวิชาการ

ประจำปีงบประมาณ 2560 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 320,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2559 ถึง 30 กันยายน 2560

หัวหน้าโครงการ: นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

แบคทีเรียเอนโดไฟต์เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในพืชโดยที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายหรือโรคพืช งานวิจัยนี้ศึกษาประโยชน์ของแบคทีเรียเอนไฟต์ในการเพิ่มน้ำหนักสดและแห้งของพืชในสภาวะต่างๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันแต่ไม่ได้รับแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 0.04% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแบคทีเรียไอโซเลต 4017 และ 3047 ส่งผลให้ต้นข้าวมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นสูงที่สุด โดยมีค่าเพิ่มขึ้น 2.99±0.50 และ 1.40±0.10 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในสภาวะที่มีสารประกอบ $Ca_3(PO_4)$ พบว่าไอโซเลต 4014 ช่วยให้พืชมีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นสูงที่สุดคือ 1.38±0.44 เท่า ในขณะที่ไอโซเลต 3028 และ 3045 ช่วยให้พืชมีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นสูงที่สุดใกล้เคียงกันคือ 1.28±0.14 และ 1.28±0.05 เท่าตามลำดับ การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 17 ไอโซเลตที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *Xanthomonas oryzae* และ *Pyricularia grisea* บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion และ agar disc diffusion นั้นพบว่าไม่ประสบผลสำเร็จคือไม่สามารถแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารละลายเชื้อได้ อย่างไรก็ดีพบว่าแบคทีเรียจำนวน 14 และ 4 ไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนสได้ นอกจากนี้การทดสอบการยับยั้งการก่อโรคในข้าว *(in vivo)* ยังพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลตคือ 2004 และ 4045 ที่ยับยั้งการเกิดโรคขอบใบแห้งโดยเชื้อ *X. oryzae* ในต้นข้าวได้ และมีแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลตคือ 3004, 3038, 4028 และ 4035 ที่ยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้โดยเชื้อ *P. grisea* ได้

คำสำคัญ : ข้าว, แบคทีเรียเอนโดไฟต์, การส่งเสริมการเจริญของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: **Applications of endophytic bacteria for growth promotion in rice (*Oryza sativa*)**

Researcher: Dr.Chokchai Kittiwongwattana

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

ABSTRACT

Endophytic bacteria colonized intercellular spaces of the plant host without causing diseases. In the present study, the promotion of fresh and dry weight of rice seedlings by endophytic bacteria was determined and compared with mock-inoculated, control groups under various stress conditions. When grown in water agar containing NaCl at the 0.04% (w/v) concentration, seedlings that were treated with isolates 4017 and 3047 displayed the highest increase of fresh and dry weight. The increases were 2.99±0.50 และ 1.40±0.10 folds compared to the control groups. When grown in water agar containing $Ca_3(PO_4)_2$, seedlings that were inoculated with isolate 4014 exhibited the highest increase of fresh weight (1.38±0.44 folds). In contrast, the highest increase of dry weight was observed when seedlings were treated with isolates 3028 (1.28±0.14 folds) and 3045 (1.28±0.05 folds). In this study, endophytic bacteria that inhibited growth of phytopathogens *Xanthomonas oryzae* and *Pyricularia grisea* were grown in liquid medium for extraction of bioactive compounds. However, the results obtained from the agar well and agar disc diffusion assays with all isolates yielded negative results. When tested for the activity of lytic enzymes, 14 and four isolates displayed the activity of protease and chitinase, respectively. These antagonistic bacteria were also tested for their antagonism against the pathogens *in vivo*. The results showed that isolates 2004 and 4045 were able to suppress the bacterial leaf blight disease while isolates 3004, 3038, 4028 and 4035 inhibited the leaf blast disease.

Keywords : rice, endophytic bacteria, plant growth promotion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณรศ.ดร.จิตติ ท่าไว และ ผศ.ดร.นงลักษณ์ เภรินทาวงค์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* และ *Pyricularia grisea* มา ณ ที่นี้

โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น 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 สมมติฐานงานวิจัย และกรอบแนวความคิดในการวิจัย 3

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 8

3.1 การทำความสะอาดเมล็ดข้าวเพื่อใช้ทดสอบ 8

3.2 การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์เพื่อใช้ทดสอบ 8

3.3 การทดสอบผลการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยแบคทีเรียในข้าวภายใต้สภาวะเค็ม 8

3.4 การทดสอบผลการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยแบคทีเรียในข้าวในสภาพที่มีสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ 9

3.5 การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของ *X. oryzae* โดยวิธี agar well diffusion 9

3.6 การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของ P. grisea โดยวิธี agar well diffusion 10

3.7 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 10

3.9 การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 11

3.10 การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสในแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 11

3.11 การทดสอบผลการยับยั้งการเกิดโรคขอบใบแห้งและใบไหม้ในข้าวโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัย 12
4.1 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาวะที่มีเกลือโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 12
4.2 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาวะที่มีสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ 14
4.3 การตรวจสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค *X. oryzae* และ *P. grisea* ด้วยวิธี agar well diffusion 16
4.4 การตรวจสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค *X. oryzae* และ *P. grisea* ด้วยวิธี agar disc diffusion 16
4.5 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนสในแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 17
4.6 การยับยั้งการเกิดโรคขอบใบแห้งและใบไหม้ในข้าวโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 18
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 20
5.1 สรุปผลการวิจัย 20
5.2 ข้อเสนอแนะ 20
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย 22
เอกสารอ้างอิง 23
สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย 25
ประวัตินักวิจัย 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1	13
4.2	14
4.3	15
4.4	16
4.5	18
4.6	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่ถูกพบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย ทั้งในดิน, น้ำ และอากาศ ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามค้นหาแบคทีเรียที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นทางการเกษตรกรรม, อุตสาหกรรม และการแพทย์ แบคทีเรียเอนโดไฟต์ (endophytic bacteria) เป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่ถูกพบว่ามีการดำรงชีวิตอยู่ภายในช่องว่างระหว่างเซลล์ในเนื้อเยื่อของพืชต่างๆ โดยที่ไม่ก่อให้เกิดโทษแก่พืชแต่อย่างใด การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียกลุ่มนี้โดยละเอียดส่งผลให้นักวิทยาศาสตร์พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์มีความหลากหลายเป็นอย่างมาก และมีแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวนหลายสายพันธุ์ที่ไม่เพียงแต่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชเท่านั้น แต่ยังมีประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญให้กับต้นพืชด้วย แบคทีเรียที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช (plant-growth-promoting bacteria) สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชผ่านทางกลไกต่างๆ ที่มีความหลากหลาย ตัวอย่างเช่นการตรึงแกสไนโตรเจนในอากาศโดยแบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโตได้, การสร้างสารประกอบ indole-3-acetic acid (IAA) ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของฮอร์โมนออกซินซึ่งจำเป็นต่อการกระตุ้นการแบ่งและการขยายขนาดของเซลล์ตลอดจนการพัฒนาของอวัยวะต่างๆ พืช, การสร้างเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase ที่ย่อยสลายสารประกอบ ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอธิลีนในพืชและช่วยควบคุมปริมาณฮอร์โมนเอธิลีนในพืชให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม, การเพิ่มการละลายของสารประกอบฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำได้ยากช่วยให้พืชได้รับแร่ธาตุฟอสฟอรัสซึ่งเป็นแร่ธาตุหลักของพืชอย่างเพียงพอ กลไกต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้นนี้ล้วนเป็นกลไกที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยตรง อย่างไรก็ดีแบคทีเรียเอนโดไฟต์นั้นมีความสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยทางอ้อมด้วย โดยกลไกดังกล่าวนี้คือการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์นั่นเอง ในปีงบประมาณ 2558 ผู้วิจัยได้รับทุนวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินในการทำวิจัยเรื่อง "การคัดแยกและการศึกษาการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรีย endophytes จากข้าว (*Oryza sativa*)" ซึ่งช่วยให้ผู้วิจัยสามารถคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากส่วนต่างๆ ของต้นข้าวและทำการทดสอบกิจกรรมการสร้างฮอร์โมน IAA และการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ต่อมาในปีงบประมาณ 2559 ผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนประเภทส่งเสริมนักวิจัยเพื่อทำการวิจัยเรื่อง "การตรึงไนโตรเจน, การละลายฟอสเฟตและการต้านทานโรคของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าวพันธุ์หอมนิลและพันธุ์ไรซ์เบอรี่" เพื่อศึกษากิจกรรมอื่นๆ ของแบคทีเรีย **ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมุ่งศึกษาการ**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประยุกต์ใช้ประโยชน์แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีกิจกรรมที่โดดเด่นในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว โครงงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็นสองส่วนคือการทดสอบผลของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการเจริญเติบโตของข้าวในสภาวะที่มีเกลือและสภาวะที่มีสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ และการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเกิดโรคขอบใบแห้งและใบไหม้ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* และเชื้อรา *Pyricularia grisea* ตามลำดับ ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลต่อยอดจากงานวิจัยที่ผ่านมาเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizers) และตัวควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol agents) ซึ่งผู้วิจัยคาดหวังว่าจะช่วยลดต้นทุนและการใช้สารเคมีในการปลูกข้าวของเกษตรกรตลอดจนมีผลในการลดการปนเปื้อนของสารเคมีในแหล่งน้ำและสภาพแวดล้อมอันจะส่งผลดีต่อสุขภาพของเกษตรกร, ผู้บริโภค และประเทศต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาพที่มีเกลือ

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่เพิ่มการละลายของสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำต่อการเจริญเติบโตของพืช

1.2.3 เพื่อศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว

1.2.4 เพื่อศึกษาการยับยั้งการเกิดโรคขอบใบแห้งและใบไหม้ในต้นข้าวโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นมาแล้วว่ามีกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่สำคัญและมีความเป็นไปได้ในการช่วยคงการเจริญเติบโตของต้นข้าวในสภาพที่มีเกลือและส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาพที่มีสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ อีกด้านหนึ่งโครงการวิจัยนี้ทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวโดยมุ่งศึกษากลไกที่สำคัญ 2 กลไกคือการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและโปรตีเอส นอกจากนี้แบคทีเรียเอนโดไฟต์เหล่านี้ยังจะถูกทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคในต้นข้าวโดยตรงด้วย

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1.4.1 การทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาพที่มีเกลือโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.2 การทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในอาหารที่มีสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

1.4.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. oryzae* และ *P. grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยวิธี dual culture

1.4.4 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. oryzae* และ *P. grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยวิธี agar well diffusion

1.4.5 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. oryzae* และ *P. grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยวิธี agar disc diffusion

1.4.6 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนสในแบคทีเรียเอนโดไฟต์

1.4.7 การทดสอบการยับยั้งการก่อโรคในข้าวโดยเชื้อ *X. oryzae* และ *P. grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

1.5 สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางและพบว่ามีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเจ้าบ้านได้ เนื่องจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มีที่มาจากต้นข้าวที่เพาะปลูกในนาแบบอินทรีย์ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้จึงน่าที่จะสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวได้ด้วย

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่นำมาทดสอบว่ามีความสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตในสภาพที่ไม่เหมาะสมได้แก่สภาพเกลือและการเจริญในสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้ยังทราบถึงความสามารถของแบคทีเรียเหล่านี้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวสองชนิดได้แก่ *X. oryzae* และ *P. grisea* ทั้งในจานทดลองและในต้นข้าวตลอดจนสามารถคัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคหรือทราบถึงกิจกรรมของเอนไซม์ที่อาจมีบทบาทยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างพืชและแบคทีเรีย (plant-microbe interactions) เป็นสาขาที่สำคัญของการศึกษาทางด้านพฤกษศาสตร์และจุลชีววิทยา แบคทีเรียจำนวนหนึ่งถูกพบว่าส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยก่อให้เกิดโรคพืชต่างๆ แบคทีเรียกลุ่มนี้ถูกจัดว่าเป็นแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) และเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางการเกษตรและเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ดีแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืชได้และถูกเรียกว่าแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (plant-growth-promoting bacteria) แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชอาศัยอยู่ในบริเวณต่างๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับต้นพืชทั้งในดินที่อยู่บริเวณรอบๆ รากของพืช, พื้นผิวภายนอกของอวัยวะต่างๆ ของพืช และภายในช่องว่างระหว่างเซลล์ของเนื้อเยื่อของพืช แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในพืชและไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติหรือความเสียหายแก่ต้นพืชนั้นถูกเรียกว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ (endophytic bacteria) แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชมีหลายสายพันธุ์ การศึกษาพิสูจน์ลักษณะต่างๆ ของแบคทีเรียเหล่านี้ทำให้ทราบเกี่ยวกับความหลากหลายของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช โดยแบคทีเรียเหล่านี้ถูกจัดอยู่ในสกุลที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น สกุล *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus* เป็นต้น (Luduena et al., 2012)

กลไกการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียมีความหลากหลายแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์ โดยกลไกเหล่านี้ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มด้วยกันได้แก่ กลไกทางตรงและกลไกทางอ้อม แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชในทางตรงได้โดยเพิ่มปริมาณแร่ธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์กับต้นพืชหรือสร้างสารที่มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นพืช ตัวอย่างของกลไกเหล่านี้เช่น การตรึงไนโตรเจน, การเพิ่มการละลายของสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ, การสร้างฮอร์โมน IAA, การสร้างเอนไซม์ ACC deaminase เป็นต้น กลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางอ้อมโดยแบคทีเรียนั้นมีความแตกต่างออกไปโดยผลของกลไกในรูปแบบนี้จะมีลักษณะที่สำคัญคือเป็นการยับยั้งหรือกำจัดปัจจัยภายนอกที่มีผลเสียต่อการเจริญเติบโตของพืชเช่นการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค การย่อยสลายสารประกอบภายในดินที่เป็นพิษต่อต้นพืช เป็นต้น (Glick, 2012)

ธาตุไนโตรเจนถูกจัดว่าเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยมีส่วนสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลประเภทต่างๆ ของพืชเช่น โปรตีน, กรดนิวคลีอิก เป็นต้น ธาตุไนโตรเจนมีอยู่ในปริมาณมากในชั้นบรรยากาศของโลกในรูปของแกสไนโตรเจน (N_2) ทว่าพืชไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถดูดซับแกสไนโตรเจนมาใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโตได้โดยตรง (Ji et al., 2014) หากแต่จำเป็นต้องอาศัยกลไกการตรึงไนโตรเจนในธรรมชาติโดยแบคทีเรียในกลุ่ม "diazotrophic bacteria" ซึ่งสามารถเปลี่ยนแกสไนโตรเจนให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำและพืชสามารถดูดซับมาใช้งานได้ เช่น NH_3 NO_3 เป็นต้น (Ji et al., 2014) อย่างไรก็ดีการทำเกษตรกรรมนิยมใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของข้าวซึ่งส่งผลให้เกษตรกรมีค่าใช้จ่ายเพิ่มมากขึ้นและยังเกิดปัญหามลพิษเป็นเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนมาประยุกต์ใช้ในการเป็นปุ๋ยอินทรีย์ ตัวอย่างเช่นการใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในสกุล *Pseudomonas* เพื่อเพิ่มปริมาณปมรากในต้นถั่ว chickpea (Parma and Dadarwal, 1999) งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งแสดงให้เห็นว่าการใส่แบคทีเรียในสกุล *Azospirillum* spp. ในต้นข้าวมีผลดีทำให้ต้นข้าวมีปริมาณแร่ธาตุไนโตรเจนเพิ่มมากขึ้น (Chodhury and Kennedy, 2004)

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักอีกชนิดหนึ่งนอกเหนือไปจากไนโตรเจนและโพแทสเซียมที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นพืช การขาดฟอสฟอรัสส่งผลให้การเจริญเติบโตและพัฒนาของราก, ลำต้น, ดอก และเมล็ดหยุดชะงักลง (Ji et al., 2014) ฟอสฟอรัสที่จำเป็นต่อการทำเกษตรกรรมมีปัญหาคล้ายคลึงกันกับไนโตรเจน ฟอสฟอรัสมีอยู่มากภายในดินโดยอยู่ในรูปของสารประกอบที่ละลายน้ำได้ยากหรือไม่ละลายน้ำ สาเหตุนี้ส่งผลให้ต้นพืชอาจได้รับฟอสฟอรัสไม่เพียงพอ การเติมปุ๋ยเคมีฟอสฟอรัสลงไปในดินแก้ไขปัญหานี้ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้นเนื่องจากปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ใส่ลงไปจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำได้อย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน (Glick, 2012) แนวทางหนึ่งในการใช้แบคทีเรียแก้ปัญหาดังกล่าวคือการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเพิ่มการละลายของสารประกอบฟอสฟอรัสในดินเพื่อให้พืชได้รับแร่ธาตุอย่างเพียงพอ งานวิจัยชิ้นหนึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีกลไกการสร้างกรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น citric, oxalic, gluconic และ 2-ketogluconic ขึ้นมาเพื่อใช้ในการละลายฟอสฟอรัส (Marciano Marra et al., 2012) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรด citric ในแบคทีเรีย *Herbaspirillum seropedicae* ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นการละลายฟอสฟอรัสก็เพิ่มขึ้นตาม (Wagh et al., 2014) ตัวอย่างของสกุลแบคทีเรียที่สามารถเพิ่มการละลายของฟอสฟอรัสได้เช่น*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* และ *Flavobacterium* เป็นต้น (Khan et al., 2007) Estrada et al. (2007) คัดแยกแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในสกุล *Herbaspirillum* และ *Burkholderia* ที่มีความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสได้จากต้นข้าว แล้วทำการทดสอบผลของแบคทีเรียเหล่านี้ต่อการเจริญเติบโตของข้าวที่ปลูกในดินที่มีสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียเหล่านี้ทำให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 14% ถึง 26% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชหลายสายพันธุ์สามารถเพิ่มหรือลดปริมาณฮอร์โมนบางชนิดในพืชได้ ตัวอย่างเช่นแบคทีเรียที่สังเคราะห์เอนไซม์ ACC deaminase ที่มีผลต่อปริมาณฮอร์โมนเอธิลีนในพืช ฮอร์โมนชนิดนี้มีความจำเป็นต่อการทำลายระยะพักตัวของเมล็ดพืชเพื่อให้เมล็ดเกิดการงอก อย่างไรก็ดีเมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะที่ทำให้เกิดความเครียดเช่น ดินเค็ม, ภาวะแล้ง, การถูกบุรุกโดยศัตรูพืชฮอร์โมนเอธิลีนจะถูกสร้างขึ้นมาในปริมาณมากและส่งผลให้การเจริญเติบโตของรากพืชหยุดชะงัก และกระตุ้นการหลุดร่วงของใบ (Saleem et al., 2007; Alonso et al., 1999; Penrose and Glick, 2003) เอนไซม์ ACC deaminase ที่ถูกสร้างขึ้นมาโดยแบคทีเรียและสามารถย่อยสลายสารประกอบ ACC ที่เป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอธิลีนในพืชให้เป็น alpha-ketobutyrate และแอมโมเนียได้ การใส่แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase จึงมีผลในการลดปริมาณฮอร์โมนเอธิลีนในพืช (Glick, 2005; Glick et al., 1998) งานวิจัยโดย Nadeem et al. (2007) ทดสอบเกี่ยวกับแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase ได้แก่ *Pseudomonas syringae* S5, *Enterobacter aerogenes* S14 and *Pseudomonas fluorescens* S20 โดยใส่แบคทีเรียเข้าไปในต้นข้าวโพดที่ปลูกอยู่ในดินเค็ม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าต้นพืชสามารถทนสภาพดินเค็มได้ดีขึ้น

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในทางอ้อมโดยแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชคือการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช ดังนั้นจึงได้มีการประยุกต์ใช้แบคทีเรียเหล่านี้ในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อป้องกันการเกิดโรคในพืช การจัดการควบคุมโรคพืชในลักษณะนี้มีข้อได้เปรียบบางประการเมื่อเทียบกับการใช้สารเคมีเนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสารเคมีที่อาจก่อให้เกิดอันตรายกับเกษตรกร ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างของการควบคุมโรคพืชโดยการใช้แบคทีเรียเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเช่นการควบคุมการเกิดโรค fire blight ในการเพาะปลูกเพร์และแอปเปิล โรค fire blight เกิดขึ้นโดยแบคทีเรีย *Erwinia amylovora* การใส่สายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Psedomonas fluorescens* and *Pantoea agglomerans* ให้กับต้นพืชและปล่อยให้แบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่ในบริเวณเกสรตัวเมียสามารถช่วยยับยั้งการบุกรุกของแบคทีเรียก่อโรคอย่างได้ผล (Pusey, 2002) โรคพืชที่เป็นปัญหาในการเพาะปลูกข้าวคือโรคขอบใบแห้งที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Xanthomonase oryzae* และก่อให้เกิดความเสียหายกับการเพาะปลูกข้าวได้มากถึง 50% (Mew, 1987) งานวิจัยชิ้นหนึ่งทำการศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *X. oryzae* และพบว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในสกุล *Pseudomonase* สามารถสร้างสาร 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ (Velusamy et al., 2006) ในงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งแบคทีเรีย *Lysobacter antibioticus* ที่ถูกคัดแยกจากรากพืชสามารถลดอาการของโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ji et al., 2008) โรคใบไหม้เป็นอีกโรคหนึ่งที่ก่อให้เกิดการสูญเสียในการเพาะปลูกข้าวสูงถึง 18% (Dean et al., 2005) เชื้อรา *Pyricularia grisea* เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคดังกล่าว อย่างไรก็ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การป้องกันโรคจากเชื้อราชนิดนี้โดยการใช้สารเคมีทำได้ค่อนข้างยากเนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมในสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อรา (Miah et al., 2013) การศึกษาหาตัวควบคุมทางชีวภาพสำหรับเชื้อราและโรคนี้จึงได้รับความสนใจเพื่อใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันความเสียหายจากโรค ตัวอย่างเช่น การคัดแยกแบคทีเรียจากรากข้าวในงานวิจัยชิ้นหนึ่งพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus polymyxa* VLB16 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สร้างโปรตีนที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การทำความสะอาดเมล็ดข้าวเพื่อใช้ทดสอบ

นำเมล็ดข้าวมาแกะเปลือกออกให้หมดโดยระมัดระวังไม่ให้เอมบริโอหลุดออกมา จากนั้นทำความสะอาดพื้นผิวภายนอกของเมล็ดข้าวโดยการแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% นานเป็นระยะเวลา 10 นาทีแล้วปล่อยให้เมล็ดแห้งบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำเมล็ดข้าวมาแช่ในน้ำกลั่นที่หยดสารละลาย providone-iodine ความเข้มข้น 10% จำนวน 8-10 หยดโดยแช่เอาไว้ข้ามคืน นำเมล็ดข้าวมาล้างน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีกสองครั้งเพื่อเตรียมใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2 การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์เพื่อใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขูดเอาเซลล์แบคทีเรียออกมาใส่ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยเติมเชื้อลงไปจนกระทั่งสารละลายเชื้อมีความขุ่นใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 สารละลายเชื้อนี้ถูกใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3 การทดสอบผลการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยแบคทีเรียในข้าวภายใต้สภาวะเค็ม

นำเมล็ดข้าวจำนวน 10 เมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวภายนอกแล้วมาแช่ในสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้โดยแช่ทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดข้าวทั้ง 10 เมล็ดวางลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอาหารแข็งที่มีวุ้นความเข้มข้น 0.4% และ NaCl ความเข้มข้น 0.04% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วบ่มเอาไว้ในที่มืดนาน 3 วันเพื่อให้เมล็ดข้าวงอกแล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงต่อภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ต้นพืชได้รับแสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงต้นข้าวเป็นระยะเวลา 16 วัน บันทึกจำนวนเมล็ดของข้าวที่งอกในแต่ละขวด จากนั้นนำต้นข้าวออกมาแล้วกำจัดรุ้นที่ติดอยู่ตามรากออกให้หมดพร้อมทั้งซับน้ำส่วนเกินที่ติดอยู่ตามต้นข้าวแล้วชั่งน้ำหนักสดของต้นข้าว จากนั้นนำต้นข้าวทั้งหมดไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 วันแล้วนำต้นข้าวมาชั่งน้ำหนักแห้ง คำนวณหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งและน้ำหนักสดของข้าวในแต่ละขวด โดยทำการทดลองเชื้อละ 3 ซ้ำ กลุ่มควบคุมทำได้โดยแช่เมล็ดข้าวในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ คำนวณการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ได้โดยหาอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การส่งเสริมการเจริญเติบโต = น้ำหนักสด (แห้ง) ของกลุ่มทดลอง/น้ำหนักสด (แห้ง) เฉลี่ยของกลุ่มควบคุม

3.4 การทดสอบผลการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยแบคทีเรียในข้าวในสภาพที่มีสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ

นำเมล็ดข้าวจำนวน 10 เมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวภายนอกแล้วมาแช่ในสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้โดยแช่ทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดข้าวทั้ง 10 เมล็ดวางลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอาหารแข็งที่มีวุ้นความเข้มข้น 0.6% และ $Ca_3(PO_4)_2$ ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วบ่มเอาไว้ในที่มืดนาน 3 วันเพื่อให้เมล็ดข้าวงอกแล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงต่อภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ต้นพืชได้รับแสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงต้นข้าวเป็นระยะเวลา 16 วัน บันทึกจำนวนเมล็ดของข้าวที่งอกในแต่ละขวด จากนั้นนำต้นข้าวออกมาแล้วกำจัดวุ้นที่ติดอยู่ตามรากออกให้หมดพร้อมทั้งซับน้ำส่วนเกินที่ติดอยู่ตามต้นข้าวแล้วชั่งน้ำหนักสดของต้นข้าว จากนั้นนำต้นข้าวทั้งหมดไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 วันแล้วนำต้นข้าวมาชั่งน้ำหนักแห้ง คำนวณหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งและน้ำหนักสดของข้าวในแต่ละขวด โดยทำการทดลองเชื้อละ 3 ซ้ำ กลุ่มควบคุมทำได้โดยแช่เมล็ดข้าวในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ คำนวณการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ได้โดยหาอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมดังนี้

การส่งเสริมการเจริญเติบโต = น้ำหนักสด (แห้ง) ของกลุ่มทดลอง/น้ำหนักสด (แห้ง) เฉลี่ยของกลุ่มควบคุม

3.5 การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของ *X. oryzae* โดยวิธี agar well diffusion

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นดูดสารละลายเชื้อมาปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วดูดส่วนใสลงในหลอดใหม่แล้วปั่นเหวี่ยงซ้ำเพื่อตกตะกอนเชื้อ เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ปริมาตร 20 มิลลิลิตรและเทลงในจานเพาะเชื้อ เมื่ออาหารแข็งตัวดีแล้วทำการเจาะหลุมด้วย cork borer แล้วหยอดส่วนใสปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงไปในหลุมของอาหาร จากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ใส่ลงไปในอาหารโดยลากเชื้อจากปากหลุมออกไปเป็นระยะประมาณ 7 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 วัน ตรวจผลการยับยั้งโดยสังเกตจากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. grisea* โดยวิธี agar well diffusion

นำส่วนใสที่เตรียมได้ในขั้นตอน 14.5 มาใช้ในการทดสอบ เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ปริมาตร 20 มิลลิลิตรและเทลงในจานเพาะเชื้อ เมื่ออาหารแข็งตัวดีแล้วทำการเจาะหลุมด้วย cork borer แล้วหยอดส่วนใสปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงไปในหลุมของอาหาร จากนั้นใช้มีดกรีดวุ้นอาหารที่มีเส้นใยเชื้อราเจริญเติบโตอยู่ออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร วางชิ้นวุ้นดังกล่าวลงไปบนอาหาร potato dextrose agar โดยวางให้มีระยะห่างจากปากหลุมประมาณ 1.5 เซนติเมตรแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 7 วัน ตรวจผลการยับยั้งโดยสังเกตจากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

3.7 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

นำสารละลายเชื้อที่เหลือจากการทดสอบ agar well diffusion มาเติม ethyl acetate ปริมาตรที่เท่ากันแล้วย้ายลงในกรวยแยก เขย่ากรวยแยกให้สารละลายเข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้บนขาตั้งเพื่อให้สารละลายแยกชั้นออกจากกัน จากนั้นไขเอาส่วนใสด้านล่างออกมา นำส่วนใสไปใส่ในขวดรูปแพร์แล้วนำไประเหย ethyl acetate ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เมื่อระเหย ethyl acetate ออกหมดแล้วละลายสารสกัดออกมาด้วย ethyl acetate จากนั้นบรรจุใส่ขวดสีชาที่ชั่งน้ำหนักขวดไว้แล้ว ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยออกจนหมดแล้วชั่งน้ำหนักรวมเพื่อนำไปคำนวณหาน้ำหนักของสารสกัดที่เตรียมได้

3.8 การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของ *X. oryzae* และ *P. grisea* โดยวิธี agar disc diffusion

เติม methanol ลงไปในขวดที่มีสารสกัดอยู่จนกระทั่งได้สารละลายของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วหยดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนแผ่นกระดาษทดสอบแล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar จากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ใส่ลงไปในอาหารโดยลากเชื้อจากขอบแผ่นกระดาษทดสอบประมาณ 7 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 วัน ตรวจผลการยับยั้งโดยสังเกตจากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

การทดสอบกับเชื้อรา *P. grisea* ทำโดยนำแผ่นกระดาษทดสอบที่หยดสารละลายของสารสกัดแล้วไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar จากนั้นใช้มีดกรีดวุ้นอาหารที่มีเส้นใยเชื้อราเจริญเติบโตอยู่ออกเป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร วางชิ้นวุ้นดังกล่าวลงไปบนอาหาร potato dextrose agar โดยวางให้มีระยะห่างจากแผ่นกระดาษทดสอบประมาณ 1.5 เซนติเมตรแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 7 วัน ตรวจผลการยับยั้งโดยสังเกตจากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในแบคทีเรียเอนโดไฟต์

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์บนอาหาร skim milk agar แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสจะแสดงลักษณะของบริเวณใส โดยรอบโคโลนีของแบคทีเรีย

3.10 การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสในแบคทีเรียเอนโดไฟต์

เพาะเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA ที่มีองค์ประกอบของ colloidal chitin ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 วัน แล้วสังเกตกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากการเกิดบริเวณใส โดยรอบโคโลนีของแบคทีเรีย

3.11 การทดสอบผลการยับยั้งการเกิดโรคขอบใบแห้งและใบไหม้ในข้าวโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ผลบวกในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* และเชื้อรา *P. grisea* คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase และแบคทีเรียที่เพิ่มการละลายของสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ ทำการเพาะเชื้อในอาหาร Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขูดเอาเซลล์แบคทีเรียออกมาใส่ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยเติมเชื้อลงไปจนกระทั่งสารละลายเชื้อมีความขุ่นใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐาน McFarland หมายเลข 0.5 จากนั้นนำต้นข้าวอายุประมาณ 2 เดือนมาทำให้เกิดแผลบนใบจำนวน 10 แผลด้วยการแทงด้วยเข็มโดยที่แต่ละแผลมีระยะห่างกันประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาจุ่มลงในสารละลายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์แล้วทาลงไปบนใบให้ทับรอยแผลทั้งหมด จากนั้นทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 5 วัน เตรียมสารละลายเชื้อก่อโรคโดยการใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ย *X. oryzae* ใส่ลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจนกระทั่งได้สารละลายที่มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland หมายเลข 0.5 และใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *P. grisea* ใส่ลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้ไม้พันสำลีชุบสารละลายเชื้อก่อโรคแล้วทาทับลงไปยังใบที่ผ่านการทาสารละลายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์แล้ว ทิ้งต้นข้าวไว้นานประมาณ 14 วันแล้วสังเกตการเกิดโรคบนใบของข้าว ในการทดลองนี้มีกลุ่มควบคุม 3 กลุ่มคือใบข้าวที่ถูกทำให้เกิดแผลเพียงอย่างเดียว, ใบข้าวที่ถูกทำให้เกิดแผลและทาสารละลายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์, ใบข้าวที่ถูกทำให้เกิดแผลและทาสารละลายเชื้อ *X. oryzae* และใบข้าวที่ถูกทำให้เกิดแผลและทาสารละลายเชื้อ *P. grisea*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาวะที่มีเกลือโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ที่นำมาใช้ในงานวิจัยชิ้นนี้มีทั้งสิ้น 25 ไอโซเลต กิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ถูกนำมาใช้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียในการทดสอบเนื่องจากสภาวะที่มีเกลือชักนำให้ต้นพืชสร้างฮอร์โมนเอธิลีนเพิ่มมากขึ้น ฮอร์โมนชนิดนี้ส่งผลให้ต้นพืชมีการเจริญเติบโตที่ลดลง เนื่องจากสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอธิลีนคือ ACC ดังนั้นการใช้แบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase จึงน่าที่จะช่วยลดปริมาณของสารประกอบ ACC ในพืชได้เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้จะเปลี่ยน ACC ให้เป็น alpha-ketobutyrate และแอมโมเนีย ส่งผลให้พืชมีสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอธิลีนน้อยลงนั่นเอง เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ใช้ในการเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 เมล็ดข้าวที่แช่ในสารละลายเชื้อถูกนำมาทดสอบการเจริญเติบโตในอาหารวุ้นที่มีเกลือผสมอยู่ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.04% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อครบระยะเวลา 16 วันแล้วนำต้นข้าวในแต่ละชุดการทดลองมาวัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของพืชพร้อมๆ กับวัดน้ำหนักดังกล่าวในชุดควบคุมที่เป็นเมล็ดข้าวแช่ในน้ำกลั่น ผลการทดลองที่ได้ถูกนำมาคำนวณหาค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การวิเคราะห์น้ำหนักสดของต้นข้าวพบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียเอนโดไฟต์ออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1) แบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 8 ไอโซเลตที่ให้ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตน้อยกว่า 1.00 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์เหล่านี้ไม่มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

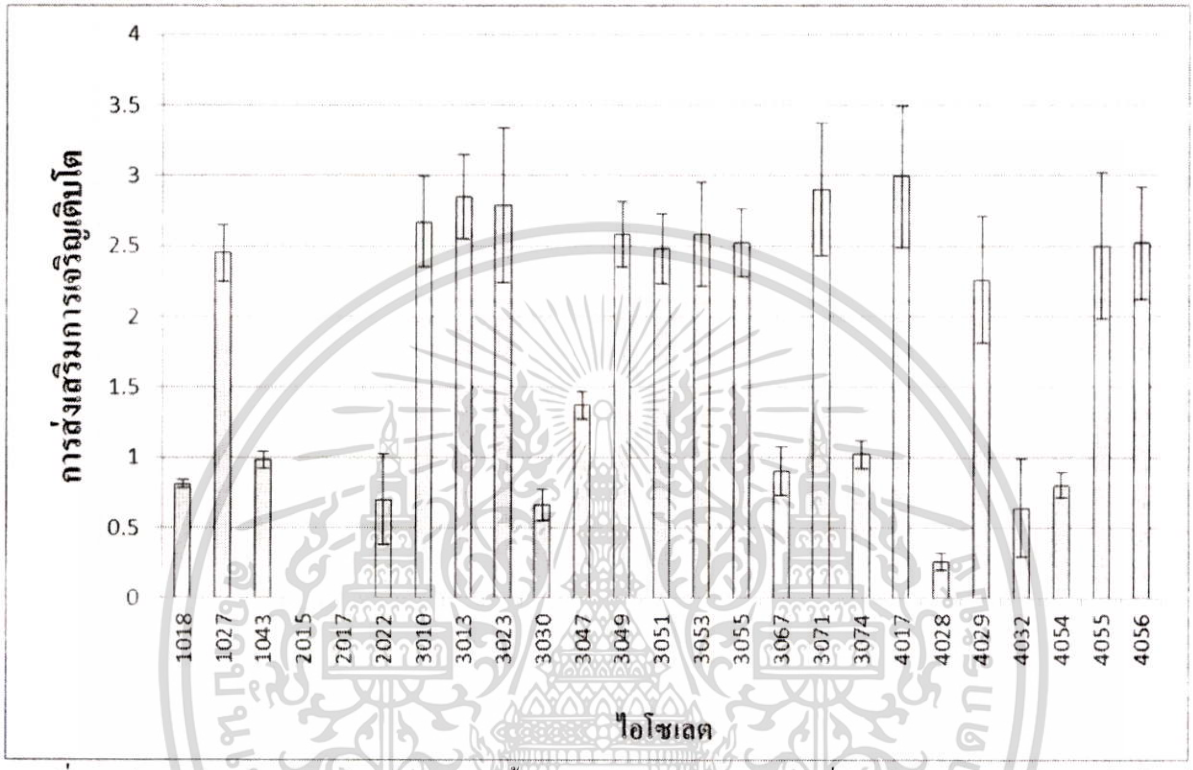
2) แบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 2 ไอโซเลตให้ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตอยู่ระหว่า 1.00-1.50 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าาในสภาวะที่มีเกลือเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

3) แบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 13 ไอโซเลตให้ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสูงกว่า 1.50 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ส่งเสริมให้ต้นข้าวมีการเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 0.04% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลตแสดงในภาพที่ 4.1 โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ให้ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตในส่วนของน้ำหนักสดของข้าวสูงที่สุดคือไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4017 ซึ่งให้ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตเท่ากับ 2.99±0.5 นอกจากนี้ยังพบด้วยว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 2 ไอโซเลตได้แก่ไอโซเลต 2015 และ 2017 ที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวและเมล็ดข้าวไม่งอก



ภาพที่ 4.1 ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำหนักสดของข้าวในสภาวะที่มีเกลือโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตต่างๆ

การวิเคราะห์การส่งเสริมการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนักแห้งของต้นข้าวในสภาวะที่มีเกลือโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 25 ไอโซเลตนี้พบว่าแบ่งแบคทีเรียออกได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้

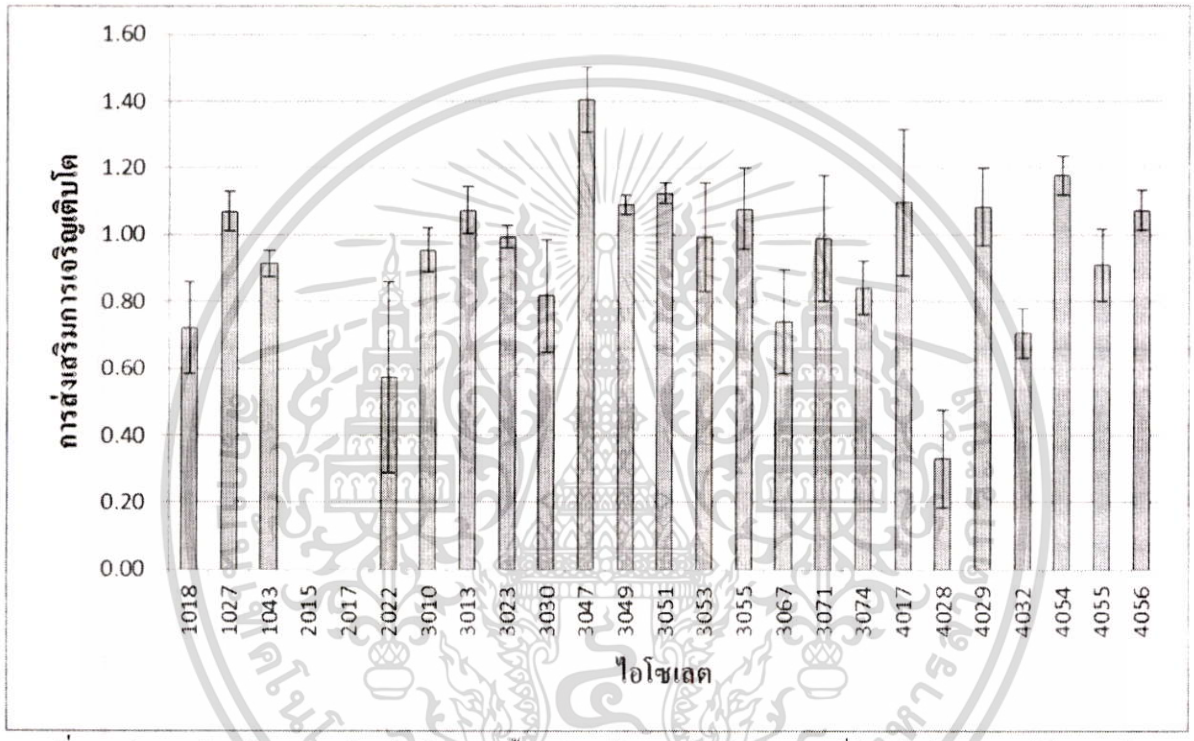
1) แบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 15 ไอโซเลตที่ให้ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตน้อยกว่า 1.00 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่มีผลในการเพิ่มน้ำหนักแห้งในต้นข้าวในสภาพที่มีเกลือ

2) แบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 10 ไอโซเลตให้ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำหนักแห้งของต้นข้าวในสภาพที่มีเกลืออยู่ระหว่าง 1.00 ถึง 1.50 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ส่งเสริมให้ต้นข้าวมีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นได้เล็กน้อยในสภาพการเพาะเลี้ยงที่มีเกลือเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ค่าส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำหนักแห้งของต้นข้าวในสภาวะที่มีเกลือโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 25 ไอโซเลตแสดงไว้ในภาพที่ 4.2 โดยแบคทีเรียที่ให้ค่าส่งเสริมการเจริญเติบโตสูงที่สุดได้แก่แบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต 3047 โดยมีค่าส่งเสริมการเจริญเติบโตเท่ากับ 1.40±0.10 ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลตนี้ส่งเสริมให้ต้นข้าวมีชีวมวลเพิ่มขึ้นได้ดีกว่าไอโซเลต 4017 ซึ่งให้ผลสูงที่สุดในการวิเคราะห์น้ำหนักสด ความแตกต่างนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากไอโซเลต 4017 ทำให้ต้นพืชสะสมน้ำมากขึ้นจึงมีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้น เมื่อต้นพืชถูกนำมาอบแห้งน้ำจึงระเหยไปและแสดงให้เห็นถึงชีวมวลที่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น



ภาพที่ 4.2 ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำหนักแห้งของข้าวในสภาวะที่มีเกลือโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตต่างๆ

4.2 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาวะที่มีสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำ

แบคทีเรียที่ถูกนำมาทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาวะที่มีสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำคือแบคทีเรียที่ให้ผลบวกในการเพิ่มการละลายของสารประกอบดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya และ National Botanical Research Insitute's Phosphate Growth Medium เนื่องจากพืชจะได้รับแร่ธาตุฟอสฟอรัสผ่านทางการดูดซึมน้ำที่มีฟอสเฟตละลายอยู่เท่านั้น การใช้แบคทีเรียที่เพิ่มการละลายของฟอสฟอรัสจึงน่าที่จะช่วยให้พืชได้รับแร่ธาตุฟอสฟอรัสซึ่งเป็นแร่ธาตุหลักของพืชได้ดีขึ้น ในการทดลองนี้มีแบคทีเรียที่นำมาทดสอบจำนวน 21 ไอโซเลตและสารประกอบฟอสฟอรัสที่ใช้คือ $Ca_3(PO_4)$

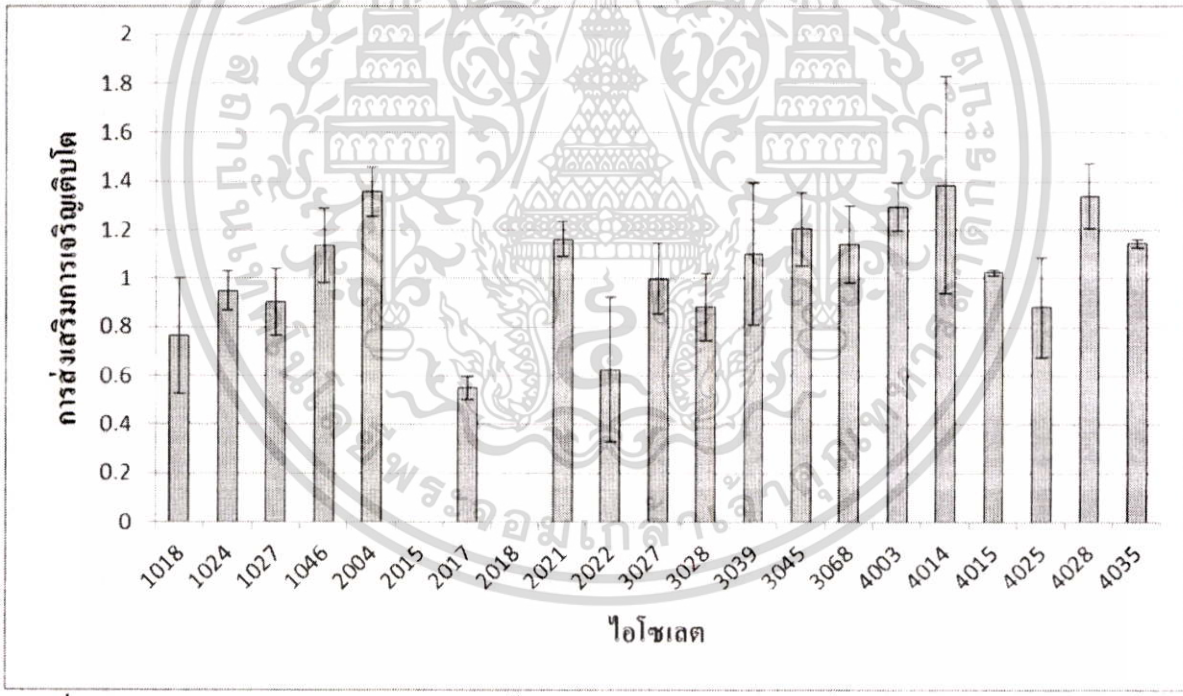
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นคำนวณหาค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นข้าวในสภาวะดังกล่าว ผลการวิเคราะห์น้ำหนักสดของต้นข้าวที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียเทียบกับต้นข้าวกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อแบคทีเรียแสดงให้เห็นว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียเอนโดไฟต์ออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ

1) แบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลตให้ผลส่งเสริมการเจริญของน้ำหนักสดของต้นข้าวเพียงเล็กน้อย โดยมีค่าส่งเสริมการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 1.00 ถึง 1.50

2) แบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลตไม่มีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำหนักสดของพืชเนื่องจากมีค่าส่งเสริมการเจริญเติบโตต่ำกว่า 1.00

ค่าส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำหนักสดของพืชโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีกิจกรรมส่งเสริมการละลายของสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำแสดงในภาพที่ 4.3 โดยพบว่าแบคทีเรียไอโซเลตที่ให้ค่าเฉลี่ยของค่าส่งเสริมการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือไอโซเลต 4014 โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 1.38±0.44 และในจำนวนนี้แบคทีเรียไอโซเลต 2015 และ 2018 มีผลยับยั้งไม่ให้เมล็ดข้าวงอกด้วย



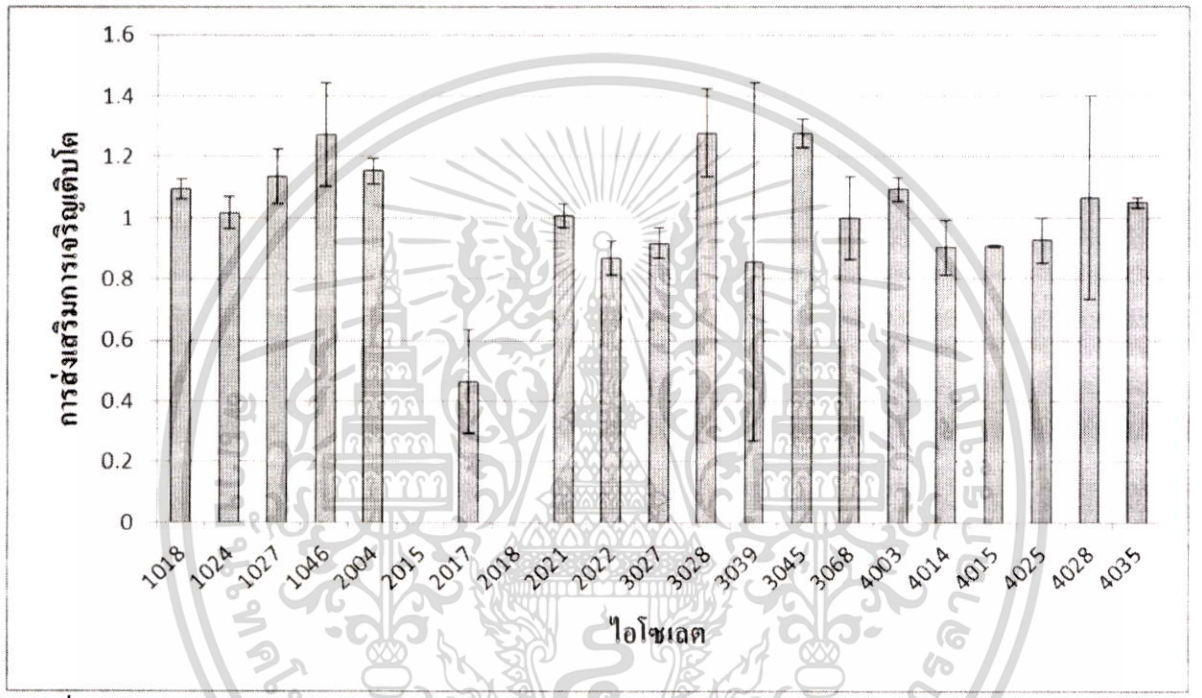
ภาพที่ 4.3 ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำหนักสดของข้าวในสภาวะที่มีสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตต่างๆ

การวิเคราะห์การส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำหนักแห้งของต้นข้าวโดยแบคทีเรียกลุ่มนี้แสดงผลในภาพที่ 4.4 โดยสามารถแบ่งแบคทีเรียออกได้เป็น 2 กลุ่มได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) แบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 11 ไอโซเลตที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำหนักแห้งของพืชเล็กน้อยและให้ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตอยู่ในช่วงระหว่าง 1.00-150 โดยแบคทีเรียไอโซเลต 3028 และ 3045 ให้ค่าส่งเสริมการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือ 1.28±0.14 และ 1.28±0.05 ตามลำดับ

2) แบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 10 ไอโซเลตที่ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำหนักแห้งของพืช โดยมีค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตต่ำกว่า 1.00



ภาพที่ 4.4 ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำหนักแห้งของข้าวในสภาวะที่มีสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตต่างๆ

4.3 การตรวจสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค *X. oryzae* และ *P. grisea* ด้วยวิธี agar well diffusion

แบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 5 ไอโซเลตได้แก่ 1036, 2004, 2017, 2022 และ 4045 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค *X. oryzae* และมีเชื้อ 14 ไอโซเลตได้แก่ 1025, 2017, 2021, 2022, 3004, 3033, 3038,3048, 3052, 3078, 4015, 4028, 4035 และ 4041 ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *P. grisea* เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแล้วนำส่วนใสของสารละลายเชื้อมาทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิดนี้ด้วยวิธี agar well diffusion แล้วพบว่าไม่มีส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลตใดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิดเลย

4.4 การตรวจสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค *X. oryzae* และ *P. grisea* ด้วยวิธี agar disc diffusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 5 ไอโซเลตได้แก่ 1036, 2004, 2017, 2022 และ 4045 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค *X. oryzae* และมีเชื้อ 14 ไอโซเลตได้แก่ 1025, 2017, 2021, 2022, 3004, 3033, 3038,3048, 3052, 3078, 4015, 4028, 4035 และ 4041 ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *P. grisea* ถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว แล้วนำสารละลายเชื้อมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย ethyl acetate แล้วละลายสารสกัดด้วย methanol จากนั้นนำมาทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion แล้วพบว่าไม่มีสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลตใดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิดนี้ได้

4.5 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนสในแบคทีเรียเอนโดไฟต์

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 17 ไอโซเลตถูกนำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลตที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสได้แก่ไอโซเลต 1025, 1036, 2004, 2017, 2021, 2022, 3004, 3033, 3038, 3048, 3078, 4028, 4035 และ 4045 และมีแบคทีเรีย 4 ไอโซเลตที่สร้างเอนไซม์ไคติเนส ได้แก่ไอโซเลต 1036, 2017, 2022 และ4045 (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนสในแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 19 ไอโซเลต

ไอโซเลต	โปรตีเอส	ไคติเนส
1025	+	-
1036	+	+
2004	+	-
2017	+	+
2021	+	-
2022	+	+
3004	+	-
3033	+	-
3038	+	-
3048	+	-
3052	-	-
3078	+	-
4015	-	-
4028	+	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต	โปรตีเอส	ไคติเนส
4035	+	-
4041	-	-
4045	+	+

4.6 การยับยั้งการเกิดโรคขอบใบแห้งและใบไหม้ในข้าวโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ 17 ไอโซเลตถูกนำมาทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคขอบใบแห้งในต้นข้าว ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการทาใบข้าวด้วยสารละลายเชื้อเอนโดไฟต์ไอโซเลต 2004 และ 4045 ก่อนทาด้วยสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* สามารถยับยั้งการเกิดโรคขอบใบแห้งได้ โดยใบข้าวที่ทดสอบมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรงแตกต่างจากใบข้าวที่ทาด้วยสารละลายเชื้อโรคเพียงอย่างเดียวที่รอยแผลสีเหลืองหรือสีน้ำตาลเข้มบนใบมีขนาดใหญ่ขึ้นและแผ่กระจายออกไปตามความยาวของใบ นอกจากนี้ยังพบด้วยว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลตนี้เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคโดยสังเกตได้จากลักษณะของใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์แต่ไม่ทาเชื้อ *X. oryzae* มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรงเช่นกัน (รูปที่ 4.5)

รูปที่ 4.5 การยับยั้งการเกิดโรคขอบใบแห้งในข้าวโดยเชื้อก่อโรค *X. oryzae* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อก่อโรคเพียงอย่างเดียว (ก), ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรีย 2004 และเชื้อก่อโรค (ข), ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรีย 2004 เพียงอย่างเดียว (ค), ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4045 และเชื้อก่อโรค (ง), ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4045 เพียงอย่างเดียว (จ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 16 ไอโซเลตได้แก่ 1025, 2017, 2021, 2022, 3004, 3033, 3038, 3048, 3052, 3078, 4015, 4028, 4035 และ 4041 ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ในข้าวโดยเชื้อรา *P. grisea* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียเพียง 4 ไอโซเลตได้แก่ 3004, 3038, 4028 และ 4035 ที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ โดยใบข้าวที่ทาด้วยสารละลายเชื้อเหล่านี้แล้วทาทับด้วยสารละลายเชื้อ *P. grisea* นั้นมีลักษณะสมบูรณ์แตกต่างจากใบข้าวที่ทาด้วยสารละลายเชื้อก่อโรคเพียงอย่างเดียวและมีอาการของโรคคือใบมีลักษณะแห้ง ขอบใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือสีน้ำตาล รอยแผลขยายขนาดและมีสีน้ำตาล นอกจากนี้การทดสอบการก่อโรคโดยแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตนี้ยังพบด้วยว่าแบคทีเรียเหล่านี้ไม่ก่อให้เกิดโรคเนื่องจากใบข้าวที่ทาด้วยสารละลายเชื้อเหล่านี้เพียงอย่างเดียวมีลักษณะสมบูรณ์ (รูปที่ 4.6)

รูปที่ 4.6 การยับยั้งการเกิดโรคขอบใบแห้งในข้าวโดยเชื้อก่อโรค *P. grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อก่อโรคเพียงอย่างเดียว (ก), ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรีย 3004 และเชื้อก่อโรค (ข), ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรีย 3004 เพียงอย่างเดียว (ค), ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรีย 3038 และเชื้อก่อโรค (ง), ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรีย 3038 เพียงอย่างเดียว (จ) , ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4028 และเชื้อก่อโรค (ฉ), ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4028 เพียงอย่างเดียว (ค), ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4035 และเชื้อก่อโรค (ง), ใบข้าวที่ทาด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4035 เพียงอย่างเดียว (จ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยบทบาทของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวพบว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 15 ไอโซเลตที่ให้ผลการเพิ่มน้ำหนักสดของต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติมเกลือความเข้มข้น 0.04% น้ำหนักต่อปริมาตร โดยไอโซเลตที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำหนักสดได้ดีที่สุดคือไอโซเลต 4017 ที่ให้ค่าส่งเสริมการเจริญเติบโตเท่ากับ 2.99±0.50 ในขณะที่การวิเคราะห์การเพิ่มน้ำหนักแห้งโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์นั้นพบว่ามีแบคทีเรีย 10 ไอโซเลตที่ส่งเสริมให้ต้นข้าวมีน้ำหนักแห้งเพิ่มมากขึ้นและไอโซเลต 3047 ให้ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือมีค่าเท่ากับ 1.40±0.10 นอกจากนี้การทดสอบครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต 2015 และ 2017 นั้นเป็นแบคทีเรียที่มีผลเสียต่อข้าวโดยเมล็ดข้าวที่แช่ในสารละลายเชื้อดังกล่าวไม่มีการงอกตลอดการทดลอง

การวิเคราะห์น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นข้าวที่เพาะในอาหารวุ้นที่เติมสารประกอบ $Ca_3(PO_4)$ พบว่ามีแบคทีเรีย 11 ไอโซเลตที่ทำให้น้ำหนักสดของต้นข้าวในสภาวะดังกล่าวมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยไอโซเลตที่ให้ค่าการส่งเสริมการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือไอโซเลต 4014 โดยมีค่าอยู่ที่ 1.38±0.44 ในส่วนของน้ำหนักแห้งนั้นพบว่ามีแบคทีเรีย 11 ไอโซเลตเช่นกันที่ส่งผลให้น้ำหนักแห้งของต้นข้าวเพิ่มขึ้น โดยไอโซเลตที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือไอโซเลต 3028 และ 3045 ซึ่งให้ค่าส่งเสริมการเจริญเติบโตเท่ากับ 1.28±0.14 และ 1.28±0.05 ตามลำดับ นอกจากนี้ในการทดลองนี้พบว่าไอโซเลต 2015 และ 2018 ยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าวด้วย

การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 19 ไอโซเลตที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในข้าว 2 ชนิดคือ *X. oryzae* และ *P. grisea* ด้วยวิธี agar well diffusion และ agar disc diffusion พบว่าไม่สามารถตรวจพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีดังกล่าว และการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนสพบว่ามีแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ดังกล่าวจำนวน 14 และ 4 ไอโซเลต ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

ผลการทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาวะที่มีเกลือและสารประกอบฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำพบว่ามีแบคทีเรียหลายไอโซเลตที่ควรนำมาทดสอบในสภาวะการปลูกในดินต่อไปเพื่อยืนยันผลการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ในส่วนของการทดสอบและสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียเอนโดไฟต์นั้นอาจจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นซึ่งอาจจะมีความเหมาะสมกว่า ethyl acetate นอกจากนี้ยังเป็นไปได้ว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวอาจมีผลลดการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้

6.1.1 การนำเสนอผลงานรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "Plant growth promotion of endophytic bacteria isolated from rice (*Oryza sativa*)" ในงานประชุมวิชาการ Plant Biology 2017 ระหว่างวันที่ 23-28 มิถุนายน 2560 ณ เมือง Honolulu ประเทศสหรัฐอเมริกา

Title: Suppression of rice diseases by endophytic bacteria

Presenter: Chokchai Kittiwongwattana

Abstract:

In the present study, endophytic bacteria were screened for their antagonism against phytopathogens *Xanthomonas oryzae* and *Pyricularia grisea* by the dual-culture test. Five and 14 endophytic bacteria were found to inhibit growth of *X. oryzae* and *P. grisea*, rescpectively. Growth suppression ranged from 24% to 45% in *X. oryzae* and from 35% to 100% in *P. grisea*. Additionally, several isolates displayed the activity of two lytic enzymes including protease and chitinase. The pairwise analysis of the 16S rRNA gene of these bacteria indicated that they belonged to six different genera including *Bacillus*, *Citrobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus*. However, only two and four isolates were able to prevent leaf blight and leaf blast diseases in rice plants. This result indicated that other factors may influence the establishment of endophytic bacteria and their effectiveness in disease suppression.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. & Ecker, J. R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. Science 284, 2148-2152.

Beneduzi, A., Ambrosini, A. & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. Genetics and Molecular Biology 35, 1044-1051.

Choudhury, A. T. M. A. & Kennedy, I. R. (2004). Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. Biology and Fertility of Soils 39, 219-227.

Glick, B. R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. FEMS Microbiology Letters 251, 1-7.

Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica (Cairo), 963401.

Glick, B. R., Penrose, D. M. & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant-growth-promoting bacteria. Journal of Theoretical Biology 190, 63-68.

Estrada, G., Baldani, V., de Oliveira, D., Urquiaga, S. & Baldani, J. (2012). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. Plant and Soil 369, 115-129.

Ji, S. H., Gururani, M. A. & Chun, S. C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. Microbiological Research 169, 83-98.

Khan, M. S., Zaidi, A. & Wani, P. A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. Agronomy for Sustainable Development 27, 29-43.

Luduena, L. M., Taurian, T., Tonelli, M. L., Angelini, J. G., Anzuay, M. S., Valetti, L., Munoz, V. & Fabra, A. I. (2012). Biocontrol bacterial communities associated with diseased peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants. European Journal of Soil Biology 53, 48-55.

Marciano Marra, L., Fonsca Sousa Soares, C., de Oliveira, S., Avelar Ferreira, P., Lima Soares, B., de Freitas Carvalho, R., de Lima, J. & de Souza Moreira, F. (2012). Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. Plant and Soil 357, 289-307.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mew, T. W. (1987). Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. Annual Review of Phytopathology 25, 359-382.

Miah, G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Puteh, A. B., Rahim, H. A., Asfaliza, R. & Latif, M. A. (2013). Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches. Molecular Biology Reports 40, 2369-2388.

Nadeem, S. M., Zahir, Z. A., Naveed, M. & Arshad, M. (2007). Preliminary investigations on inducing salt tolerance in maize through inoculation with rhizobacteria containing ACC deaminase activity. Canandian Journal of Microbiology 53, 1141-1149.

Penrose, D. M. & Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiologia Plantarum 118, 10-15.

Parmar, N. & Dadarwal, K. R. (1999). Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid-like compounds by rhizobacteria. Journal of Applied Microbiology 86, 36-44.

Pusey, P. L. (2002). Biological control agents for fire blight of apple compared under conditions limiting natural dispersal. Plant Disease 86, 639-644.

Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S. & Bhatti, A. S. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34, 635-648.

Velusamy, P., Immanuel, J. E., Gnanamanickam, S. S. & Thomashow, L. (2006). Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. Canadian Journal of Microbiology 52, 56-65.

Wagh, J., Bhandari, P., Shah, S., Archana, G. & Kumar, G. N. (2014). Overexpression of citrate operon in *Herbaspirillum seropedicae* Z67 enhances organic acid secretion, mineral phosphate solubilization and growth promotion of *Oryza sativa*. Plant and Soil, 1-14.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย

รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
1. งบประมาณที่ได้รับการอนุมัติ	
1.1 จำนวนเงินที่ได้รับงวดที่ 1	272,000
1.2 จำนวนเงินที่ได้รับงวดที่ 2	48,000
1.3 ดอกเบี้ยรายรับ	77.50
รวม	**50075.50**
2. ค่าใช้จ่าย	
2.1 ค่าใช้สอย	1,078.56
2.2 ค่าวัสดุ	48,999.65
รวม	**50078.21**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chokchai Kittiwongwattana

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผศ.ดร.

3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (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 การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การทำพันธุวิศวกรรม เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในการถ่ายฝากยีน

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

   3.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

   3.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-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 :

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: ผู้ร่วมวิจัยระหว่างการศึกษาระดับปริญญาเอก

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 3rd International Conference on Engineering, Applied Sciences, and Technology (ICEAST). (Accepted)

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2014). *Rhizobium lemae* 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:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้