สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการใช้ประโยชน์แบคทีเรีย endophytes ที่สร้างฮอร์โมน indole-3-acetic acid (IAA) ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b. 12783006
i.

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่
เลขทะเบียน 142892
รับเดือน.ปี - 6 มิ.ย. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา 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 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 8

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้จากแหน *L. punctata* และ *Lem. aequinoctialis* 8

3.2 การตรวจสอบการสร้างฮอร์โมน IAA โดยแบคทีเรีย endophytes 8

3.3 การตรวจสอบและเปรียบเทียบระดับการสร้างฮอร์โมน IAA โดยแบคทีเรีย endophytes 8

3.4 การเตรียมต้นอ่อนข้าวในสภาพปลอดเชื้อ 9

3.5 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโดยแบคทีเรีย endophytes ที่สร้างฮอร์โมน IAA 9

บทที่ 4 ผลการวิจัย 10

4.1 การกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย endophytes 10

4.2 การตรวจสอบการสร้างฮอร์โมน IAA 12

4.3 การศึกษาระดับการสร้างฮอร์โมน IAA ในแบคทีเรีย endophytes 14

4.4 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโดยแบคทีเรีย endophytes 17

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 21

5.1 สรุปผลการวิจัย 21

5.2 ข้อเสนอแนะ 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง 23
ภาคผนวก 25
ประวัตินักวิจัย 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 11

4.2 13

4.3 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1	10
4.2	16
4.3	17
4.4	18
4.5	18
4.6	19
4.7	19
4.7	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรีย enodphytes ที่สร้างฮอร์โมน indole-3-acetic acid (IAA) ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

ประจำปีงบประมาณ 2557 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2556 ถึง 30 กันยายน 2557

หัวหน้าโครงการ: นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย endophytes คือแบคทีเรียกลุ่มที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืช แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้รับการศึกษาเบื้องต้นแล้วว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ในการวิจัยครั้งนี้แบคทีเรีย endophytes จำนวน 19 ไอโซเลตที่ถูกแยกจากเนื้อเยื่อของพืช *Landoltia punctata* และจำนวน 17 ไอโซเลตที่ถูกแยกจากพืช *Lemna aequinoctialis* ถูกนำมาศึกษาความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช indole-3-acetic acid ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 21 ไอโซเลตที่สามารถสร้างฮอร์โมน IAA ได้ และเมื่อเปรียบเทียบระดับของฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรียทั้ง 21 ไอโซเลตสร้างขึ้นพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต L1-14 ที่แยกได้จากพืช *L. punctata* มีระดับการสร้างฮอร์โมนที่สูงกว่าแบคทีเรียไอโซเลตอื่นๆ โดยสร้างฮอร์โมน IAA ได้มากถึง 79.9$\pm$8.52 µg/ml และเมื่อนำต้นอ่อนข้าวที่แช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต L1-14 ก็พบว่าต้นข้าวมีความสูงของลำต้น น้ำหนักสดของลำต้น และน้ำหนักสดของรากสูงกว่าต้นข้าวในกลุ่มควบคุมที่แช่ในน้ำกลั่นเท่ากับ 1.12, 1.17 และ 1.28 เท่าตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต L1-14 ซึ่งแยกได้จาก *L. punctata* นั้นสามารถนำมาใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตในต้นอ่อนของข้าวได้

คำสำคัญ : *Landoltia punctata, Lemna aequinoctialis,* endophytes, ข้าว, indole-3-acetic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Study of plant growth promotion by endophytic bacteria producing indole-3-acetic acid (IAA)

Researcher: Dr.Chokchai Kittiwongwattana

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

ABSTRACT

Endophytic bacteria colonize the internal tissues of a plant host without causing symptoms or damages. This group of bacteria is also recognized for their plant growth promotion. In the present study, the production of the plant hormone indole-3-acetic acid (IAA) of 19 and 17 isolates of endophytic bacteria isolated from *Landoltia punctata* and *Lemna aequinoctialis*, respectively, were examined. The result showed that 21 isolates were able to produce IAA. The levels of IAA production in these bacteria were also measured. The highest level of IAA (79.9±8.52 μg/ml) was observed in the culture medium of *Bacillus* sp. L1-14 that was isolated from *L. punctata*. Rice seedlings that were inoculated with *Bacillus* sp. L1-14 displayed the increase in stem length, shoot fresh weight and root fresh weight when compared to that of the control group that was inoculated with distilled water. Average stem length, shoot fresh weight and root fresh weight of the inoculated group were 1.12, 1.17 and 1.28 times higher than the control group. This result showed that the best IAA producer *Bacillus* sp. L1-14 was able to promote growth in rice seedlings.

Keywords : *Landoltia punctata, Lemna aequinoctialis,* endophytes, rice, indole-3-acetic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียหลายชนิดถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตของมนุษย์ทั้งในแง่ของการผลิตอาหาร การกำจัดของเสีย การเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นต้น แบคทีเรียหลายชนิดถูกเรียกว่า endophytes เนื่องจากดำรงชีวิตโดยอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืช โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่พืชที่เป็นเจ้าบ้าน (host) และถูกพบว่ามีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promotion) โดยการสร้างสารประกอบหรือเอนไซม์ที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ตัวอย่างเช่น ฮอร์โมนไซโตไคนิน และฮอร์โมนออกซิน ที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของยอดและราก ตามลำดับ เอนไซม์ ACC-deaminase ที่ดึงหมู่ amino ของ aminocyclopropane 1-carboxylic acid (ACC) ที่เป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมนเอธิลีนที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช หรือสารปฏิชีวนะที่แบคทีเรีย enophyte บางชนิดสร้างขึ้นและมีผลต่อการควบคุมยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช ดังนั้นแล้วในปัจจุบันจึงมีความสนใจศึกษาแบคทีเรีย endophytes เป็นอย่างมากเพื่อที่จะสามารถนำความรู้ที่ได้นี้มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรมซึ่งจัดได้ว่ามีความสำคัญอย่างมากต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย ในปีที่ผ่านมาผู้วิจัยได้รับทุนวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในแหน 2 ชนิดคือ ***Lemna aequinoctialis*** และ ***Landoltia punctata*** โดยงานวิจัยดังกล่าวมุ่งศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพื่อเป็นการต่อยอดใช้ประโยชน์จากสิ่งที่ได้รับจากโครงการวิจัยดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในแหนในแง่ของการสร้างฮอร์โมน indole-acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินและความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์แบคทีเรียเหล่านี้ในการเกษตรกรรม โดยโครงการวิจัยนี้ครอบคลุมตั้งแต่การทดสอบและคัดแยกแบคทีเรีย endophytes จากแหนที่มีความสามารถในการสร้างฮอร์โมน IAA การศึกษาเปรียบเทียบระดับการสร้างฮอร์โมน IAA ระหว่างแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต ตลอดจนการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมน IAA ในระดับสูงในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชทั้งในแง่ของการเจริญของราก ความสูงของต้นพืช และชีวมวลของพืช โดยโครงการวิจัยนี้จะทำการทดสอบกับข้าว (***Oryza sativa***) ที่จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยทั้งในแง่ของการใช้บริโภคภายในประเทศ และส่งออกไปยังต่างประเทศ ผู้วิจัยคาดหวังว่าผลของการวิจัยครั้งนี้จะนำไปสู่การค้นพบแบคทีเรียไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างฮอร์โมน IAA และมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าว เพื่อที่ว่าจะสามารถนำแบคทีเรียไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประยุกต์ใช้ในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่สามารถนำไปใช้การเพาะปลูกข้าวเพื่อพัฒนาขีดความสามารถในการเพาะปลูกของเกษตรกรต่อไปได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความสามารถของแบคทีเรีย endophytes ไอโซเลตต่างๆ ที่พบในแหน *L. punctata* และ *Lem. aequinocitalis* ในการสร้างฮอร์โมน IAA

1.2.2 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับการสร้างฮอร์โมน IAA ของแบคทีเรีย endophytes

1.2.3 เพื่อศึกษาความสามารถของแบคทีเรีย endophytes ไอโซเลตที่สร้างฮอร์โมน IAA ในระดับสูงที่สุดในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าว

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรีย endophytes จากแหนทั้งหมด 34 ไอโซเลตในการสร้างฮอร์โมน IAA และเปรียบเทียบระดับของฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรียแต่ละไอโซเลตผลิตได้

1.3.2 ตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรีย endophytes ไอโซเลตที่สร้างฮอร์โมน IAA ได้สูงที่สุดในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าวในสภาวะควบคุม โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือการให้ฮอร์โมน IAA โดยตรง (positive control) และน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ (negative control)

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1.4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้จากแหน *L. punctata* และ *Lem. aequinoctialis*

1.4.2 การตรวจสอบการสร้างฮอร์โมน IAA โดยแบคทีเรีย endophytes

1.4.3 การตรวจสอบและเปรียบเทียบระดับการสร้างฮอร์โมน IAA ของแบคทีเรีย endophytes

1.4.4 การเตรียมต้นอ่อนข้าวในสภาพปลอดเชื้อ

1.4.5 การศึกษาประสิทธิภาพของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโดยแบคทีเรีย endophytes ที่สร้างฮอร์โมน IAA

1.5 สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ตั้งอยู่บนความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยฮอร์โมน IAA ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน ดังนั้นแล้วจึงมีความเป็นไปได้ว่าการใส่แบคทีเรียที่สามารถสร้างฮอร์โมน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังกล่าวลงไปในต้นพืชน่าที่จะเพิ่มระดับปริมาณฮอร์โมนออกซินที่พืชได้รับ และส่งผลไปสู่การเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตต่อไป

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทราบถึงความสามารถของจุลินทรีย์ endophytes ไอโซเลตต่างๆ ที่แยกได้จากแหน *L. aequinoctialia* และ *L. punctata* ในการสร้างฮอร์โมน IAA

1.6.2 ทราบถึงความแตกต่างของระดับการสร้างฮอร์โมน IAA ระหว่างแบคทีเรีย endophytes ไอโซเลตต่างๆ

1.6.3 ทราบถึงประสิทธิภาพของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรีย endophytes ที่สังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ได้ในระดับที่สูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้าวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่จัดอยู่ในวงศ์ Poaceae ประโยชน์หลักของข้าวคือการนำมาใช้ในรูปของอาหาร โดยเมล็ดข้าวเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของมนุษย์ในพื้นที่ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณเอเชียตะวันออก 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 นอกจากนี้ยังได้มีความพยายามศึกษาการประยุกต์ใช้ประโยชน์จุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promotion) ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรีย (Plant-growth promoting bacteria) ซึ่งมีคุณสมบัติที่หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ แบคทีเรียเหล่านี้อาจมีแหล่งที่อยู่ในดิน (soil bacteria) พื้นที่โดยรอบของรากพืช (rhizosphereic bacteria) และแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับเซลล์และต้นพืชที่เรียกว่า endophytic bacteria โดยในโครงการวิจัยนี้จะมุ่งเน้นศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม endophytes ที่แยกได้จากต้นพืชในวงศ์ Lemnaceae หรือที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่าแหน (duckweed) ซึ่งจัดเป็นพืชมีดอก (Angiosperm) ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Monocotyledon) โดยแบ่งเป็น 5 สกุล (genus) ประกอบไปด้วย 38 ชนิด (species) (Wang et al. 2010) พืชในวงศ์นี้มีการวิวัฒนาการปรับเปลี่ยนและลดขนาดรูปร่างของส่วนต่างๆ ของพืชลงไปเป็นอย่างมาก โดยมีการสร้างโครงสร้างที่มีความซับซ้อนน้อยลง พืชต้นหนึ่งประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างคล้ายใบขนาดเล็กที่เรียกว่า frond ซึ่งอาจจัดได้ว่าเป็นทั้งส่วนของลำต้นและส่วนของใบ เนื่องจากการทำหน้าที่ในการสืบพันธุ์ และสังเคราะห์แสงของ frond ในส่วนของรากของพืชในวงศ์นี้นั้นมีความแตกต่างไปจากพืชมีดอกอื่นๆ รากของพืชในวงศ์ Lemnaceae ไม่มีการสร้างขนราก ไม่มีการแตกแขนง และไม่มีการเจริญเติบโตขั้นที่สอง โดยรากทำหน้าที่ช่วยในการทรงตัวของ frond บนผิวน้ำมากกว่าการทำหน้าที่ในการลำเลียงน้ำไปยัง frondนอกจากนี้พืชในสกุล *Wolffia* ยังเป็นพืชสกุลเดียวในวงศ์ Lemnaceae ที่ไม่มีการสร้างรากอีกด้วย การแพร่พันธุ์ของแหนนั้นเกิดขึ้นได้ทั้งในแบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) และอาศัยเพศ (sexual reproduction) โดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นโดยการสร้างต้นลูก daughter frond ขึ้นที่บริเวณปลายของต้นแม่ (mother frond) ต้นลูกนี้จะเกาะติดอยู่กับ frond แม่และทำการสร้าง frond ลูกต่อๆ ไปเกิดเป็นลักษณะของโคโลนีขึ้น ในส่วนของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของพืชในวงศ์นี้นั้นเกิดขึ้นโดยการสร้างดอกในบางโอกาสและบางสภาพแวดล้อมเท่านั้น แหนที่เป็นแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรีย endophytes ที่ใช้ศึกษาในโครงการวิจัยนี้คือแหนในสกุล *Lemna* และ *Landoltia* ได้แก่ สปีชีส์ *Lemna aequinoctialis* และ *Landoltia punctata*

แบคทีเรีย endophytes สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ด้วยกลไกที่หลกาหลาย ตัวอย่างเช่น การสร้างสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช (Glick et al., 1999) การสร้างเอนไซม์ aminocyclopropane-1-carboxylic acid (acc) deaminase ที่เร่งปฏิกิริยาการดึงหมู่ amino จากสารประกอบ acc ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่พืชใช้ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอธิลีนที่มีฤทธิ์กระตุ้นการแก่และยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Glick et al., 1998; Glick, 2005) นอกจากนี้แบคทีเรีย endophytes ยังมีอีกกลไกหนึ่งที่สามารถส่งเสริมอัตราการเจริญเติบโตของพืชได้คือการสร้างฮอร์โมน indole-3-acetic acid ซึ่งจัดเป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินที่มีความสำคัญในแง่ของการกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์พืช การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการ inoculate เชื้อแบคทีเรียที่สังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ในรากพืชสามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชโดยส่งผลให้พืชมีการสร้างขนรากและรากแขนงเพิ่มมากขึ้นซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของพื้นที่ผิวโดยรวมของระบบรากพืช ทำให้พืชมีความสามารถในการดูดซับน้ำและแร่ธาตุที่สำคัญต่อพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นนั่นเอง ในขณะที่แบคทีเรียกลายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ได้ โดยแบคทีเรียพันธุ์กลายนี้ไม่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้เหมือนกับแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild-type) ผลการศึกษานี้จึงเป็นการยืนยันถึงความสำคัญของฮอร์โมน IAA ของแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Spaepen and Vanderleyden, 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการตอบสนองของข้าวต่อฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นโดยเป็นการใช้ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่มีโปรโมเตอร์ของยีน *DR5* ต่ออยู่กับยีนรายงานผล GUS โปรโมเตอร์ของยีน *DR5* นั้นจัดเป็นโปรโมเตอร์ที่มีความไวในการตอบสนองต่อฮอร์โมน IAA สูง ซึ่งพืชที่ถูก inoculate ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมน IAA ก็มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงออกของยีนรายงานผล 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 อย่างไรก็ดีกลไกต่างๆ เหล่านี้ส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกันกับกลไกการสังเคราะห์ IAA ของพืช (Spaepen and Vanderleyden, 2010) ดังนั้นแล้วการตรวจสอบความสามารถในการสร้างฮอร์โมนชนิดนี้ของแบคทีเรียจึงทำได้โดยเติมกรดอะมิโน L-tryptophan ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจสอบปริมาณของฮอร์โมน IAA ได้ด้วยการใช้น้ำยาตรวจสอบ Salkowskis ร่วมกับการวัดการดูดกลืนแสงด้วยวิธี spectrophotometry (Bric et al., 1991)

การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย endophyte หลายชนิดมีประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ตัวอย่างเช่น งานวิจัยที่ศึกษาผลของแบคทีเรีย endophytes ที่ผลิตฮอร์โมน IAA และเอนไซม์ ACC deaminase ต่อการยืดยาวของรากพืช canola ซึ่งพบว่าเมล็ดพืช canola ที่นำมา inoculate ด้วยแบคทีเรีย endophytes ดังกล่าวมีการเจริญเติบโตของรากที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการ inoculate ด้วยเชื้อแบคทีเรีย endophytes (Rashid et al., 2011) งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในต้นพืช poplar ที่เจริญเติบโตในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนตัวทำละลายอินทรีย์ในกลุ่ม BTEX (Benzene, Toluene, Ethylbenzene และ Xylene) โดยแบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้จำนวนหนึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวและน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการที่ต้นพืช poplar สามารถเจริญเติบโตในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนนี้ได้ (Moore et al., 2006) และในงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งที่ศึกษาผลของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SLS18 ที่แยกได้จากพืช pokeweed (*Phytolacca acinosa*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมน IAA และเอนไซม์ ACC deaminase ได้ การทดสอบผลของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ต่อการเจริญเติบโตของพืชแสดงให้เห็นว่าพืชที่ถูก inoculate ด้วยแบคทีเรียชนิดนี้มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นในดินที่มีการปนเปื้อนของแมงกานีสและแคดเมียม (Luo et al., 2012) นอกจากนี้แบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้จากพืชชนิดหนึ่งนั้นสามารถนำไปใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย ดังตัวอย่างงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถของแบคทีเรีย *B. phytofirmans* สายพันธุ์ PsJN ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อในส่วนต่างๆ ของต้นองุ่นและสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตขององุ่นรวมทั้งพืชชนิดอื่นๆ ได้แก่ มันฝรั่ง และมะเขือเทศ (Lazarovits and Nowak, 1997; Sharma and Nowak, 1998; Nowak et al., 1999; Ait Barka et al., 2006) แต่อย่างไรก็ดีก็มีการค้นพบว่าความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย endophyte บางชนิดหรือบางสายพันธุ์นั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อลักษณะจีโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไทป์ของพืชด้วย ตัวอย่างเช่น มันสำปะหลังพันธุ์ปลูกบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีการตอบสนองต่อแบคทีเรีย endophyte *B. phytofirmans* สายพันธุ์ PsJN (Bensalim et al., 1998; Nowak et al., 1998) ด้วยเหตุนี้การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรีย endophytes ที่มีประโยชน์เหล่านี้รวมไปถึงการค้นหาแบคทีเรีย endophytes ชนิดและสายพันธุ์ใหม่ๆ จึงมีความจำเป็นอย่างมากต่อการนำทรัพยากรจุลินทรีย์เหล่านี้มาประยุกต์ใช้ในเชิงการเกษตรกรรมอย่างรอบด้านเพื่อเพิ่มผลผลิตของพืชเศรษฐกิจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้จากแหน *L. punctata* และ *Lem. aequinoctialis*

เชื้อแบคทีเรีย endophytes ทั้งหมด 34 ไอโซเลตในสกุลต่างๆ ได้แก่ *Bacillus, Caulobacter, Sphingomonas, Microbacterium, Rhizobium, Acinetobacter* และ *Staphylococcus* ที่ถูกเก็บอยู่ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 50% จะถูกนำมากระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตอีกครั้งโดยการใช้ลูปเขี่ยเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) ความเข้มข้น 1/10 เท่าด้วยเทคนิค cross-streak และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อเจริญเติบโตและได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำเชื้อนี้ไปใช้ทดสอบการสร้างฮอร์โมนออกซินต่อไป

3.2 การตรวจสอบการสร้างฮอร์โมน IAA โดยแบคทีเรีย endophytes

โคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย endophytes ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตบนอาหาร TSA ความเข้มข้น 1/10 เท่า ถูกนำมาใช้ในการทดสอบการสร้างฮอร์โมน IAA ของแบคทีเรียโดยการเขี่ยโคโลนีเดี่ยวนั้นลงบนอาหาร TSA ความเข้มข้น 1/10 เท่าที่เติมกรดอะมิโน L-Tryptophan ความเข้มข้น 5 mM ลงไป จากนั้นวางแผ่น nitrocellulose membrane ทับลงไปบนผิวหน้าของอาหาร แล้วทำการบ่มเชื้อให้เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง จากนั้นดึบเอาแผ่น nitrocellulose membrane ที่มีเชื้อแบคทีเรีย endophytes เจริญอยู่มาทำการตรวจสอบการสร้างฮอร์โมน IAA โดยเตรียมสารละลาย Salkowski reagent ที่ประกอบด้วย 0.5M $FeCl_3$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 35% $HClO_4$ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการหยอดสารละลาย Salkowski reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปบนจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวางกระดาษกรองรูปวงกลมลงไปบนจานเลี้ยงเชื้อ แล้ววางแผ่น nitrocellulose membrane ข้างต้นทับลงไปบนแผ่นกระดาษกรอง แบคทีเรียที่มีการสร้างฮอร์โมน IAA จะแสดงลักษณะของวงกลมสีชมพูขึ้นบนแผ่น nitrocellulose membrane แบคทีเรีย endophytes ทุกไอโซเลตที่มีการสร้างฮอร์โมน IAA จะถูกนำไปตรวจสอบระดับของฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นต่อไป

3.3 การตรวจสอบและเปรียบเทียบระดับการสร้างฮอร์โมน IAA ของแบคทีเรีย endophytes

เตรียมเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตรซึ่งเตรียมได้จากการเพาะเชื้อแบคทีเรียในอาหาร nutrient broth และวัดความเข้มข้นด้วยวิธี spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในขวด Erlenmeyer ที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร ที่เติมสารละลาย 10% L-Tryptophan ลงไปจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2% โดยปริมาตร จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นาน 2 วัน บนเครื่องเขย่า จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อแล้วนำส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปเติมน้ำยา Salkowski reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนผสมไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร แล้วทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากการใช้สารละลาย IAA ความเข้มข้นในช่วง 0 – 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยการผสมสารละลาย IAA มาตรฐานปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับน้ำยา Salkowski reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร แบคทีเรีย endophytes ที่มีระดับการสร้างฮอร์โมน IAA สูงที่สุดจะถูกนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในการทดลองขั้นต่อไป

3.4 การเตรียมต้นอ่อนข้าวในสภาพปลอดเชื้อ

ต้นอ่อนของข้าวในสภาพปลอดเชื้อสามารถเตรียมได้โดยทำการแกะเปลือกข้าวออกจากเมล็ด โดยระมัดระวังไม่ให้เกิดความเสียหายกับบริเวณที่เป็นเอมบริโอของเมล็ดข้าว จากนั้นนำเมล็ดข้าวที่ได้ไปฟอกทำความสะอาดในสารละลาย hypochlorite ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พร้อมทั้งหยดสารลดแรงตึงผิว Tween-20 ลงไป 2-3 หยดในขวดรูปชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าเป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นย้ายเมล็ดข้าวลงไปในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าเพื่อล้างสารละลายฆ่าเชื้อออกเป็นเวลานานประมาณ 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นคีบเอาเมล็ดข้าวที่ผ่านการทำความสะอาดพื้นผิวแล้วมาวางลงบนวุ้นความเข้มข้น 0.7% ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ แล้วปล่อยให้เมล็ดข้าวงอกและเจริญเป็นระยะเวลาประมาณ 7 วัน ต้นอ่อนข้าวที่ได้จะถูกนำมาใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย endophytes ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าว

3.5 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโดยแบคทีเรีย endophytes ที่สร้างฮอร์โมน IAA

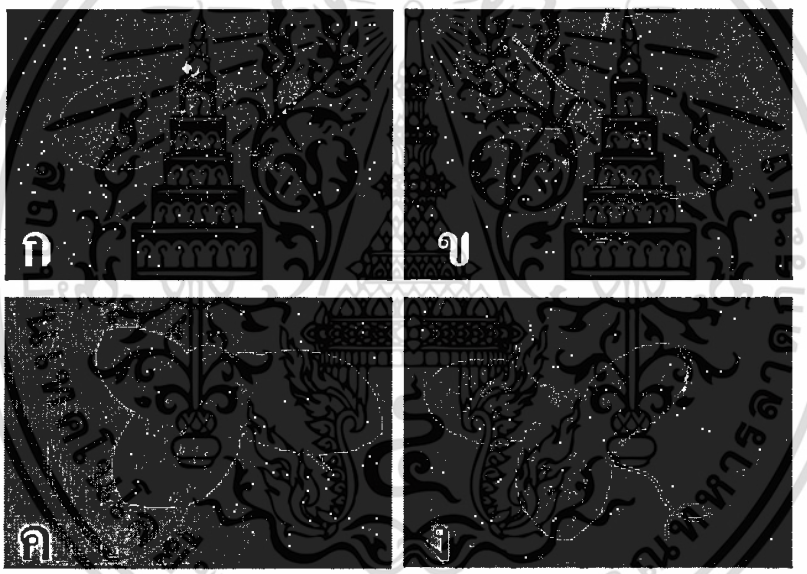
ต้นอ่อนข้าวอายุ 7 วันถูกนำมาทดสอบได้โดยแบ่งต้นอ่อนข้าวออกเป็น 3 กลุ่มการทดลองเพื่อมาแช่ในสารละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลุ่มที่ 1 แช่ในน้ำกลั่น กลุ่มที่ 2 แช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย endophytes ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^7- 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร กลุ่มที่ 3 แช่ในสารละลาย IAA ความเข้มข้น 10 mM เป็นเวลานานประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นคีบต้นอ่อนข้าวมาเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มี vermiculite และน้ำกลั่นในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนานเป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นนำต้นข้าวออกมาวัดการเจริญเติบโตด้านต่างๆ ได้แก่ความสูง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความยาวราก และจำนวนราก โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำสำหรับแต่ละกลุ่มการทดลอง จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างแต่ละกลุ่มด้วยวิธีการทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย endophytes

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นเชื้อที่แยกได้จากพืชสองชนิดคือ *L. punctata* และ *Lem. aequinoctialis* (ภาพที่ 4.1) โดยมีเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 36 ไอโซเลต เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดถูกเก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 25% ในสภาพแช่แข็งที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงต้องมีการกระตุ้นให้เชื้อเจริญเติบโตโดยการเขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน เชื้อที่เจริญเติบโตขึ้นมานี้จะถูกนำมาแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวด้วยวิธี cross streak ก่อนนำมาใช้ทดสอบการสร้างฮอร์โมน IAA ต่อไป



ภาพที่ 4.1 พืช *L. punctata* (ก, ค) และ *Lem. aequinoctialis* (ข, ง) ที่เป็นแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรีย endophytes

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีทั้งหมด 36 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็น 19 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างแหนที่อยู่ในสปีชีส์ *L. punctata* และ 17 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากแหนในสปีชีส์ *Lem. aequinoctialis* ผลการศึกษาการจัดจำแนกแบคทีเรียทั้ง 36 ไอโซเลตนี้โดยการใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียตัวอย่างทั้งหมดนี้มีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 3 ไฟลัม (phylum) 8 สกุล (genus) ดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 เชื้อแบคทีเรีย endophytes ทั้ง 36 ไอโซเลตที่ใช้ในการศึกษา

ไอโซเลต	Phylum	สกุล	แหล่งที่มา
L1-1	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-2	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-3	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-10	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-13	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-14	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-17	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-21	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-S1	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-S3	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-S4	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-S9	*Proteobacteria*	*Caulobacter*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-S10	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-S12	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-S11	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-S17	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-S18	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-S20	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-S22	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-S26	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L1-S31	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *L. punctata*
L6-2	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-3	*Firmicutes*	*Sphingomonas*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-4	*Actinobacteria*	*Microbacterium*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-5			เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-6	*Proteobacteria*	*Acinetobacter*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-8	*Firmicutes*	*Staphylococcus*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
	Proteobacteria	*Rhizobium*	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต	Phylum	สกุล	แหล่งที่มา
L6-9	*Proteobacteria*	*Rhizobium*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-13	*Actinobacteria*	*Microbacterium*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-24	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-25	*Actinobacteria*	*Microbacterium*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-30	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-32	*Proteobacteria*	*Rhizobium*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-S1	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-S4	*Proteobacteria*	*Rhizobium*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-S6	*Actinobacteria*	*Microbacterium*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-S9	*Proteobacteria*	*Sphingomonas*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*
L6-S11	*Firmicutes*	*Bacillus*	เนื้อเยื่อพืช *Lem. aequinoctialis*

4.2 การตรวจสอบการสร้างฮอร์โมน IAA

โคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย endophytes แต่ละไอโซเลตถูกนำมาทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA โดยการเขี่ยโคโลนีเดี่ยวที่ได้ลงในอาหาร Tryptic soy broth agar (TSA) ที่ความเข้มข้น 1 ใน 10 (1/10 TSB) ซึ่งเติมกรดอะมิโน L-tryptophan ลงไปเพื่อให้แบคทีเรียใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA จากนั้นวางแผ่น nitrocellulose membrane ทับลงไปบนผิวหน้าของอาหาร แล้วทำการบ่มเชื้อให้เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง จากนั้นคีบเอาแผ่น nitrocellulose membrane ที่มีเชื้อแบคทีเรีย endophytes เจริญอยู่มาทำการตรวจสอบการสร้างฮอร์โมน IAA ในช่วงระยะเวลาที่แบคทีเรียเจริญเติบโต ฮอร์โมน IAA จะถูกสร้างขึ้นและถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียและถูกดูดซับไว้โดยแผ่น nitrocellulose membrane การตรวจสอบฮอร์โมน IAA บนแผ่น nitrocellulose membrane ทำได้โดยเตรียมสารละลาย Salkowski reagent ที่ประกอบด้วย 0.5M $FeCl_3$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 35% $HClO_4$ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการหยอดสารละลาย Salkowski reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปบนจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวางกระดาษกรองรูปวงกลมลงไปบนจานเลี้ยงเชื้อ แล้ววางแผ่น nitrocellulose membrane ข้างต้นทับลงไปบนแผ่นกระดาษกรอง แบคทีเรียที่มีการสร้างฮอร์โมน IAA จะแสดงลักษณะของวงกลมสีชมพูขึ้นบนแผ่น nitrocellulose membrane โดยจากการตรวจสอบเบื้องต้นนี้พบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 21 ไอโซเลตที่ให้ผลเป็นบวกต่อการสร้างฮอร์โมน IAA คิดเป็น 58.3 เปอร์เซนต์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 4.2) โดยพบว่าสกุลของแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมน IAA ได้มีดังนี้ *Bacillus, Microbacterium, Staphylococcus, Rhizobium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ *Sphingomonas* ส่วนแบคทีเรียสกุลที่ไม่พบการสร้างฮอร์โมน IAA ได้แก่สกุล *Caulobacter* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างฮอร์โมนส่วนใหญ่คือแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* โดยมีทั้งหมด 10 ไอโซเลตคิดเป็น 47.6 เปอร์เซนต์ของแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมน IAA ทั้งหมด แบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมด 21 ไอโซเลตจะถูกนำไปตรวจสอบปริมาณฮอร์โมน IAA ต่อไป

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบการสร้างฮอร์โมน IAA โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 36 ไอโซเลต

ไอโซเลต	สกุล	ผลการทดสอบการสร้างฮอร์โมน IAA
L1-1	*Bacillus*	-
L1-2	*Bacillus*	-
L1-3	*Bacillus*	+
L1-10	*Bacillus*	-
L1-13	*Bacillus*	+
L1-14	*Bacillus*	+
L1-17	*Bacillus*	+
L1-21	*Bacillus*	-
L1-S1	*Bacillus*	+
L1-S3	*Bacillus*	-
L1-S4	*Bacillus*	+
L1-S9	*Caulobacter*	-
L1-S10	*Bacillus*	+
L1-S12	*Bacillus*	+
L1-S11	*Bacillus*	-
L1-S17	*Bacillus*	+
L1-S18	*Bacillus*	-
L1-S20	*Bacillus*	+
L1-S22	*Bacillus*	-
L1-S26	*Bacillus*	-
L1-S31	*Bacillus*	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต	สกุล	ผลการทดสอบการสร้างฮอร์โมน IAA
L6-2	*Bacillus*	-
L6-3	*Sphingomonas*	-
L6-4	*Microbacterium*	+
L6-5	*Acinetobacter*	-
L6-6	*Staphylococcus*	+
L6-8	*Rhizobium*	+
L6-9	*Rhizobium*	+
L6-13	*Microbacterium*	+
L6-24	*Bacillus*	+
L6-25	*Microbacterium*	+
L6-30	*Bacillus*	+
L6-32	*Rhizobium*	+
L6-S1	*Bacillus*	-
L6-S4	*Rhizobium*	-
L6-S6	*Microbacterium*	+
L6-S9	*Sphingomonas*	+
L6-S11	*Bacillus*	-

4.3 การศึกษาระดับการสร้างฮอร์โมน IAA ในแบคทีเรีย endophytes

แบคทีเรีย endophytes ทั้ง 21 ไอโซเลตที่ให้ผลบวกในการตรวจสอบการสร้างฮอร์โมน IAA ถูกนำมาศึกษาเปรียบเทียบระดับการสร้างฮอร์โมน IAA โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร ในขวด Erlenmeyer ที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลาย 10% L-Tryptophan ลงไปจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2% โดยปริมาตร จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นาน 2 วัน บนเครื่องเขย่า แล้วทำการแยกส่วนใสด้วยการปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนใสไปตรวจสอบปริมาณฮอร์โมน IAA โดยการเติมน้ำยา Salkowski reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปในส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้จะเปลี่ยนสีเป็นสีชมพู ซึ่งความเข้มของสีนั้นจะแปรผันตรงกับปริมาณของฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรียสร้างได้ จากนั้นนำส่วนผสมไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

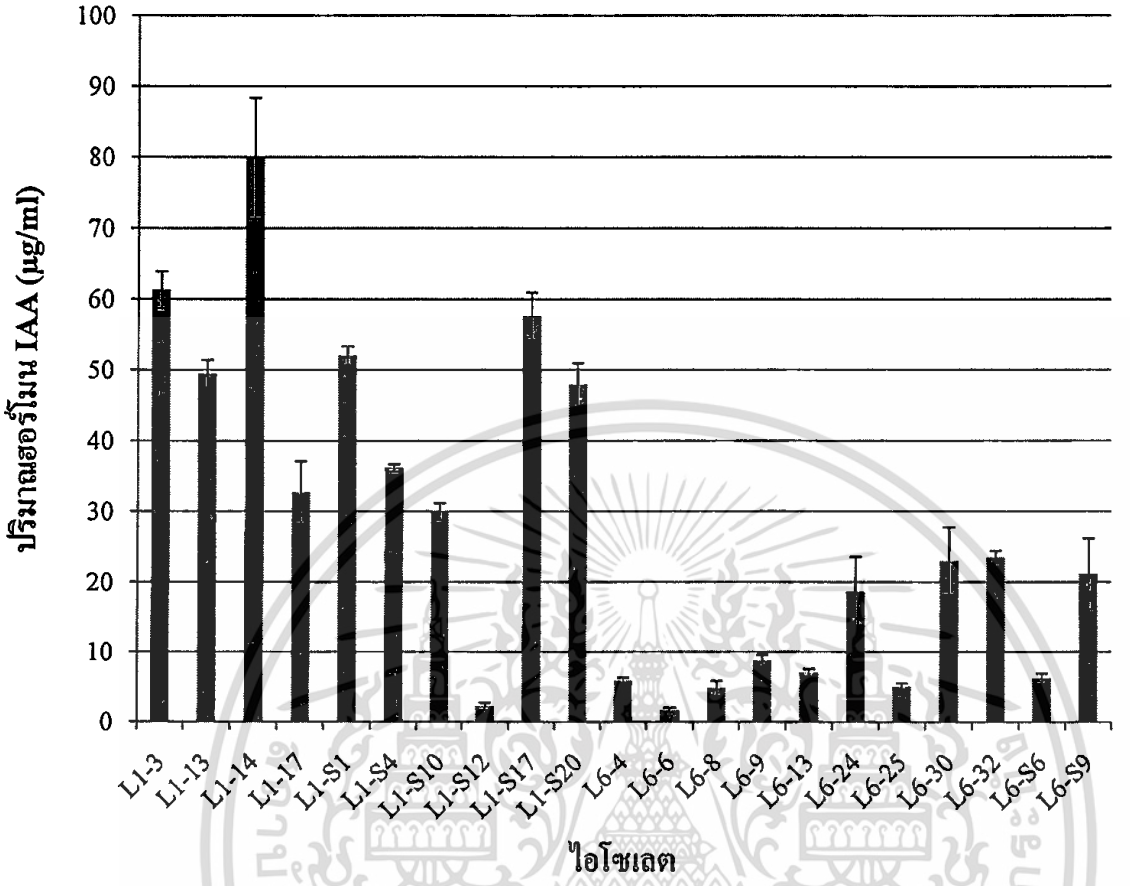
นาโนเมตร แล้วทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากการใช้สารละลาย IAA ความเข้มข้นในช่วง 0 – 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยการผสมสารละลาย IAA มาตรฐานปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับน้ำยา Salkowski reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรีย endophytes แต่ละไอโซเลตสร้างขึ้น

ไอโซเลต	สกุล	ปริมาณฮอร์โมน IAA (µg/ml) (ค่าเฉลี่ย ± S.E.)
L1-3	*Bacillus*	61.33 ± 2.56
L1-13	*Bacillus*	49.47 ± 1.93
L1-14	*Bacillus*	79.90 ± 8.52
L1-17	*Bacillus*	32.76 ± 4.40
L1-S1	*Bacillus*	52.02 ± 1.29
L1-S4	*Bacillus*	36.22 ± 0.49
L1-S10	*Bacillus*	29.99 ± 1.17
L1-S12	*Bacillus*	2.23 ± 0.55
L1-S17	*Bacillus*	57.63 ± 3.29
L1-S20	*Bacillus*	47.95 ± 3.05
L6-4	*Microbacterium*	5.95 ± 0.39
L6-6	*Staphylococcus*	1.72 ± 0.35
L6-8	*Rhizobium*	4.83 ± 1.01
L6-9	*Rhizobium*	8.69 ± 0.87
L6-13	*Microbacterium*	7.04 ± 0.53
L6-24	*Bacillus*	18.65 ± 4.9
L6-25	*Microbacterium*	5.09 ± 0.7
L6-30	*Bacillus*	23.02 ± 4.74
L6-32	*Rhizobium*	23.51 ± 0.91
L6-S6	*Microbacterium*	6.24 ± 0.73
L6-S9	*Sphingomonas*	21.15 ± 5.03

หมายเหตุ S.E. = standard error of mean

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ปริมาณฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรีย endophytes ผลิตขึ้น

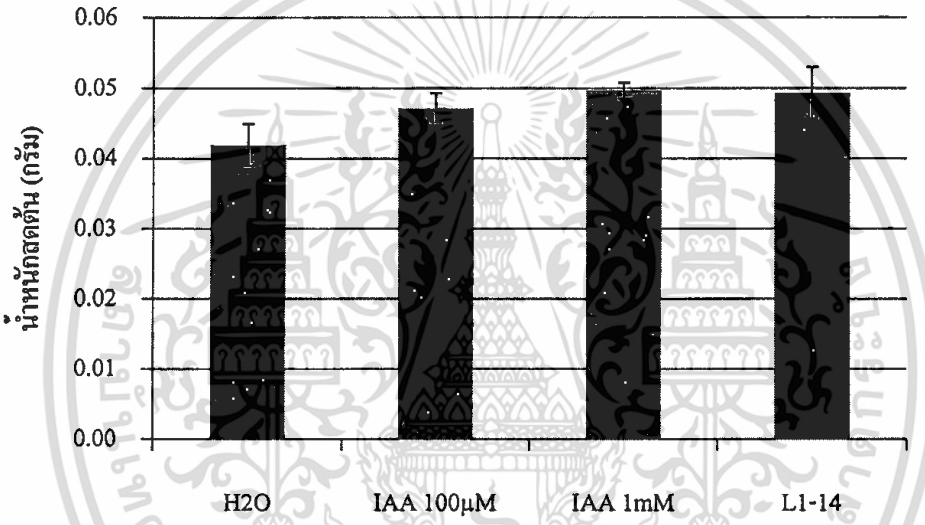
ผลการศึกษาปริมาณฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรีย endophytes ผลิตขึ้นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ผลิตฮอร์โมน IAA ได้ดีกว่าแบคทีเรียในสกุลอื่นๆ โดยมีระดับการผลิตฮอร์โมน IAA ไม่ต่ำกว่า 18.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่แบคทีเรียที่อยู่ในสกุลอื่นๆ นั้นผลิตฮอร์โมน IAA ได้ไม่เกิน 8.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ยกเว้นแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. L6-32 ที่สามารถผลิตฮอร์โมน IAA ได้ 23.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นด้วยว่าแบคทีเรีย endophytes ที่ผลิตฮอร์โมน IAA ได้สูงที่สุดคือ *Bacillus* sp. L1-14 โดยสามารถผลิตฮอร์โมนได้ถึง 79.90 ± 8.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นแบคทีเรีย *Bacillus* sp. L1-14 จึงถูกคัดเลือกไปศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตในต้นข้าวต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

4.4 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโดยแบคทีเรีย endophytes

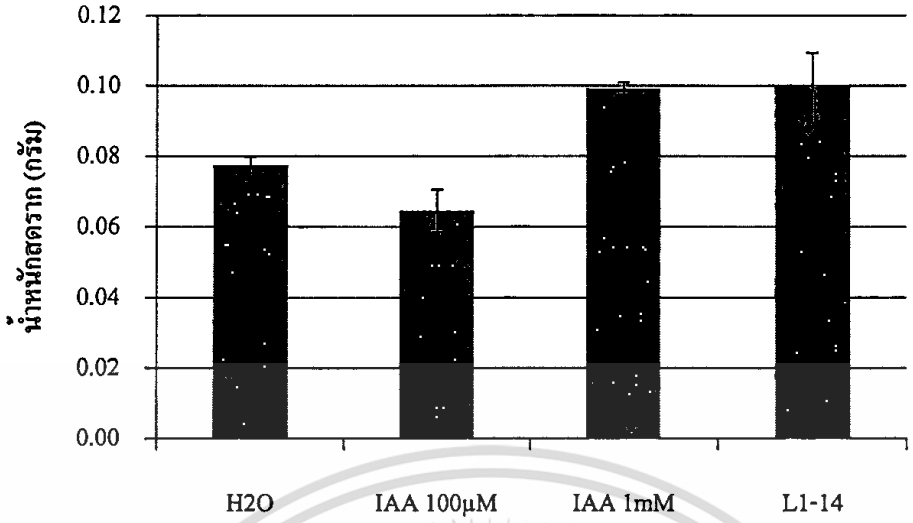
ต้นอ่อนของข้าวอายุ 7 วันที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อถูกนำมาแช่ในสารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. L1-14 เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับต้นอ่อนข้าวที่แช่ในน้ำกลั่น สารละลายฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 1 mM และสารละลายฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 100 μM การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสดต้น น้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งต้น น้ำหนักแห้งราก ความยาวต้น และความยาวรากถูกนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของต้นอ่อนข้าวทั้ง 4 กลุ่ม ผลการทดลองที่ได้ถูกแสดงในภาพที่ 4.3 – 4.8



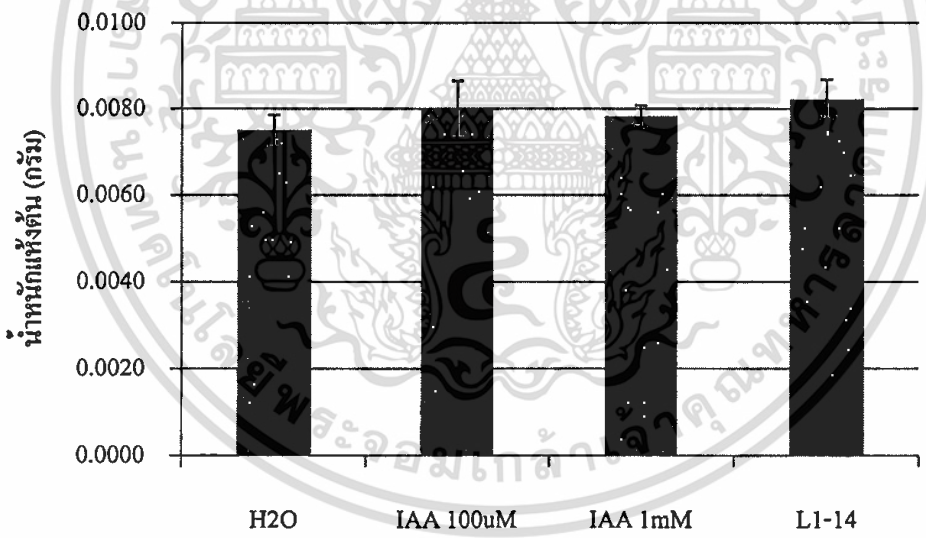
ภาพที่ 4.3 น้ำหนักสดต้นของต้นอ่อนข้าวที่แช่ในน้ำกลั่น สารละลายฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 100 μM และสารละลายเชื้อ *Bacillus* sp. L1-14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

142892

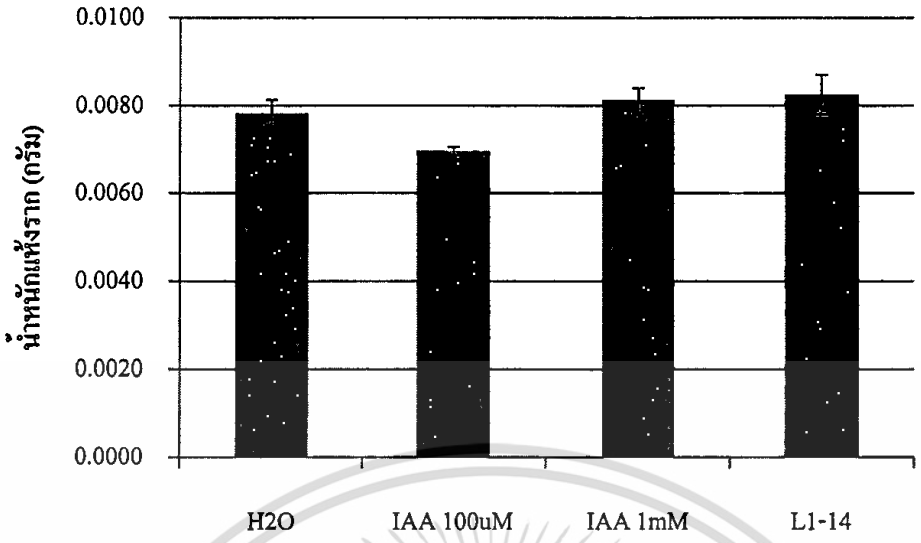


ภาพที่ 4.4 น้ำหนักสดรากของต้นอ่อนข้าวที่แช่ในน้ำกลั่น สารละลายฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 100 µM และสารละลายเชื้อ *Bacillus* sp. L1-14

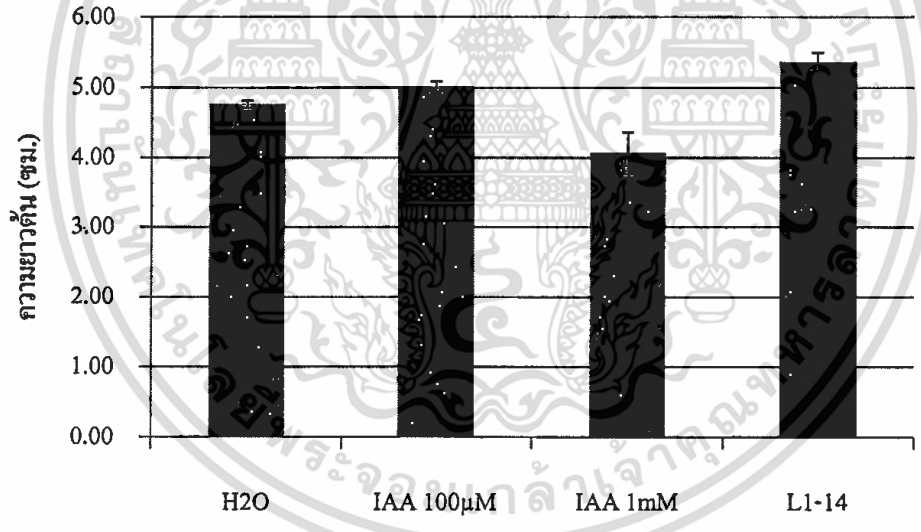


ภาพที่ 4.5 น้ำหนักแห้งต้นของต้นอ่อนข้าวที่แช่ในน้ำกลั่น สารละลายฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 100 µM และสารละลายเชื้อ *Bacillus* sp. L1-14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

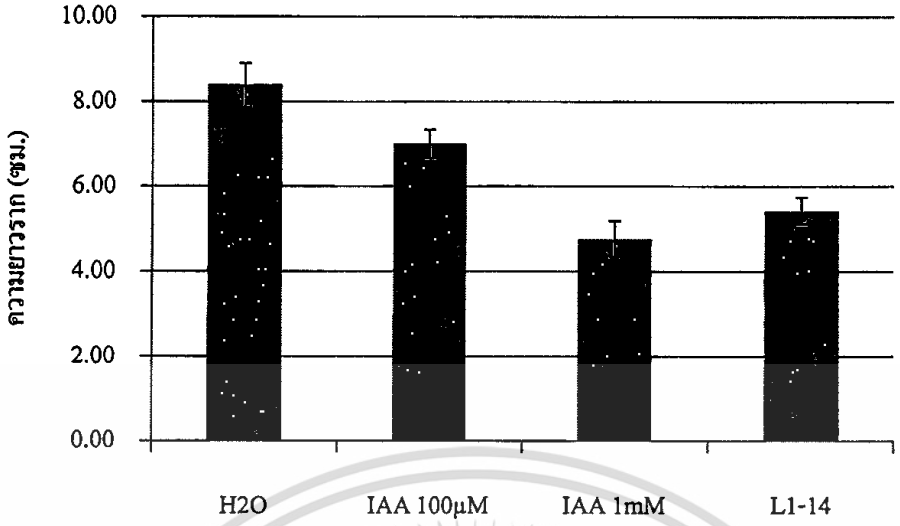


ภาพที่ 4.6 น้ำหนักแห้งรากของต้นอ่อนข้าวที่แช่ในน้ำกลั่น สารละลายฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 100 µM และสารละลายเชื้อ *Bacillus* sp. L1-14



ภาพที่ 4.7 ความยาวต้นของต้นอ่อนข้าวที่แช่ในน้ำกลั่น สารละลายฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 100 µM และสารละลายเชื้อ *Bacillus* sp. L1-14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 ความยาวรากของต้นอ่อนข้าวที่แช่ในน้ำกลั่น สารละลายฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 100 µM และสารละลายเชื้อ *Bacillus* sp. L1-14

ผลการทดลองการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อนข้าวโดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. L1-14 แสดงให้เห็นว่าต้นอ่อนข้าวที่แช่ในสารละลายเชื้อ *Bacillus* sp. L1-14 ให้ต้นอ่อนข้าวมีอัตราการเจริญในแง่ของน้ำหนักสดต้นสูงกว่าต้นอ่อนข้าวที่แช่ในน้ำกลั่น และมีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันกับต้นอ่อนข้าวที่แช่ในสารละลายฮอร์โมน IAA ทั้งสองความเข้มข้น เมื่อพิจารณาจากน้ำหนักสดรากพบว่าต้นอ่อนข้าวที่แช่ในสารละลายเชื้อ *Bacillus* sp. L1-14 มีอัตราการเจริญที่สูงกว่ากลุ่มที่แช่ในน้ำกลั่นและสารละลายฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 100 µM แต่ใกล้เคียงกับกลุ่มที่แช่ในสารละลายฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 1 mM เมื่อพิจารณาจากน้ำหนักแห้งต้นและน้ำหนักแห้งรากแล้วพบว่าต้นอ่อนข้าวทั้งสี่กลุ่มมีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันยกเว้นกลุ่มที่แช่ในสารละลายลายฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 100 µM ที่มีน้ำหนักแห้งรากที่น้อยกว่ากลุ่มอื่น เมื่อพิจารณาความยาวต้นพบว่ากลุ่มที่แช่ในสารละลายเชื้อ *Bacillus* sp. L1-14 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด ในทางตรงกันข้ามความยาวรากของต้นอ่อนข้าวที่แช่ในสารละลายเชื้อ *Bacillus* sp. L1-14 มีอัตราการเจริญน้อยกว่ากลุ่มที่แช่ในน้ำกลั่นและสารละลายฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 100 µM อย่างไรก็ดีเมื่อวิเคราะห์ด้วย ANOVA และ Tukey's test แล้วพบว่า อัตราการเจริญเติบโตของต้นอ่อนข้าวทั้งสี่กลุ่มในแง่ของน้ำหนักสดต้น น้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งต้น น้ำหนักแห้งราก และความยาวต้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย endophytes จำนวน 21 ไอโซเลตเลตที่แยกได้จาก *L. punctata* และ *Lem. aequinoctialis* มีความสามารถในการสร้างฮอร์โมน IAA โดยแบคทีเรียเหล่านี้ส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุลของ *Bacillus* แบคทีเรียสกุลอื่นที่สามารถสร้างฮอร์โมน IAA ได้ได้แก่ *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Rhizobium* และ *Sphingomonas* เมื่อนำแบคทีเรียที่ให้ผลบวกกับการสร้างฮอร์โมน IAA ไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี Spectrophotometry แล้วพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. L1-14 เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮอร์โมน IAA ได้สูงสุดคือ 79.90 $\pm$ 8.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำแบคทีเรียนี้ไปทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ่อนข้าวอายุ 7 วัน โดยเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นและสารละลายฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 100 µM และ 1 mM พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. L1-14 สามารถกระตุ้นให้ต้นอ่อนข้าวมีอัตราการเจริญเติบโตในแง่ของน้ำหนักสดต้น น้ำหนักสดราก และความยาวต้นได้ ถึงแม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่สามารถสร้างฮอร์โมน IAA มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืชได้ เช่นงานวิจัยโดย Idris *et al.* (2007) ที่แสดงให้เห็นว่า *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ FZB42 สามารถผลิตฮอร์โมน IAA และส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ E101 และ E102 ที่เกิดการกลายพันธุ์ในยีน *trpBA* และ *trpED* ตามลำดับ โดยทั้งสองยีนนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมที่เปลี่ยนกรดอะมิโน tryptophan ให้กลายเป็นฮอร์โมน IAA งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งก็แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BPR7 สามารถสร้างฮอร์โมน IAA และยังแสดงกิจกรรมของการเพิ่มการละลายฟอสเฟต การสร้าง siderophore การสร้างเอนไซม์ ACC deaminase และการเป็นปรปักษ์กับเชื้อโรคพืช *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum, Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* และ *Colletotricum* sp. (Kumar *et al.*, 2012) ผลการวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพหลากหลายด้านในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. L1-14 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อนข้าวได้ในระดับหนึ่ง ถ้าหากว่าทำการเพาะเลี้ยงต้นข้าวต่อไปความแตกต่างในแง่ของอัตราการเจริญเติบโตน่าที่จะเห็นได้ชัดเจนมากขึ้น นอกจากนี้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. L1-14 น่าที่จะนำมาศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญของพืชในด้านอื่นๆ เช่น การเพิ่มการละลายฟอสเฟต การตรึงไนโตรเจน การสร้างเอนไซม์ ACC deaminase และการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.2554 . สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี .2554 ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัดหน้า 176 นนทบุรี ,

Barka E.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.

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.

Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G. and Penrose, D.M. (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press.

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. Journal of Theoretical Biology 190, 63-68.

Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M. and Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Mol Plant Microbe Interact 20, 619-626.

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.

Kumar, P., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. Microbiol Res 167, 493-499.

Lazarovits, G., and Nowak, J. (1997). Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. Hort Science 32, 188-192.

Luo, S., Xu, T., Chen, L., Chen, J., Rao, C., Xiao, X., Wan, Y., Zeng, G., Long, F., Liu, C., and Liu, Y.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(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.

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.

Moore, F.P., Barac, T., Borremans, B., Oeyen, L., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., Campbell, C.D., and Moore, E.R. (2006). Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. Syst Appl Microbiol 29, 539-556.

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.

Rashid, S., Charles, T.C., and Glick, B.R. (2011). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. Applied Soil Ecology.

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.

Spaepen, S., and Vanderleyden, J. (2010). Auxin and Plant-Microbe Interactions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.

Wang W, Wu Y, Yan Y, Ermakova M, Kerstetter R, Messing J (2010) DNA barcoding of the lemnaceae, a family of aquatic monocots. BMC Plant Biol 10:205.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Plant growth promotion by IAA-producing endophytic bacteria isolated from duckweed

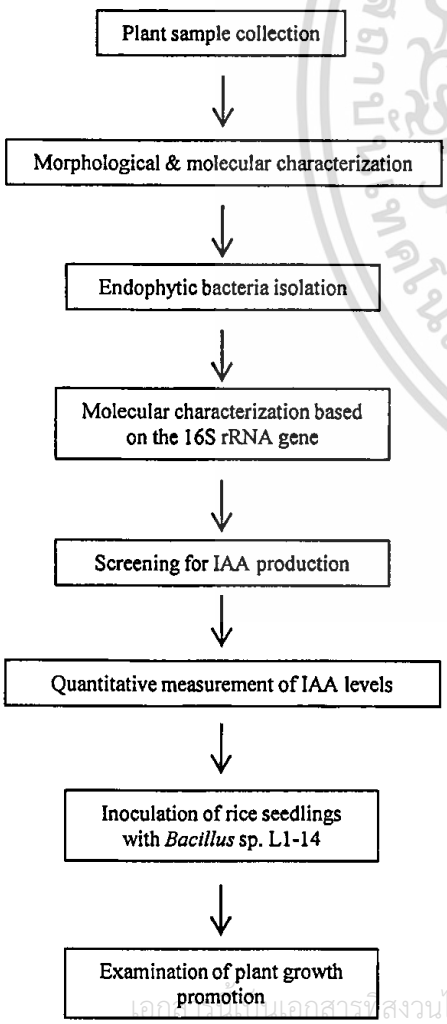
Chokchai Kittiwongwattana
Department of Biology, Faculty of Science,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand

KMITL
พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Abstract

Landoltia punctata strain A1 and *Lemna aequinoctialis* strain A6 were identified using the morphological characteristics and the sequence analysis of the *atpF-atpH* intergenic region. The two strains were the sources of 70 bacterial isolates. Based on the 16S rRNA gene sequence analysis, these isolates were members of 8 genera and can be classified into phyla *Firmicutes, Proteobacteria* and *Actinobacteria*. When measured for the level of IAA production, *Bacillus* sp. strain L1-14 displayed the highest IAA level. Additionally, after cultivated in 0.6% of agar, rice seedlings inoculated with strain L1-14 exhibited the significant increase in stem length, shoot fresh weight and root fresh weight compared to the negative control group that was inoculated with water, suggesting the potential benefit of strain L1-14 in promoting growth of the non-host plant through its IAA production ability.

Method



Results

1. Morphological & molecular characterization of duckweed plants

The morphological characteristics and sequence analysis of the *atpF-atpH* intergenic region indicated duckweed strains A1 and A6 were a member of *L. punctata* and *Lem. Equinoctialis* (Fig. 1-2).

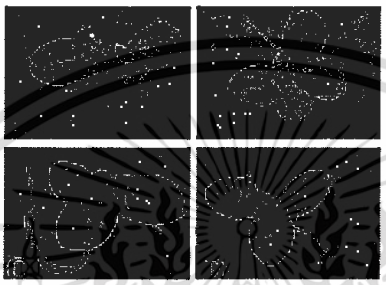


Fig.1 Morphological characteristic on the adaxial (A, B) and abaxial (C,D) of duckweed strains A1 (A, C) and A6 (B, D)

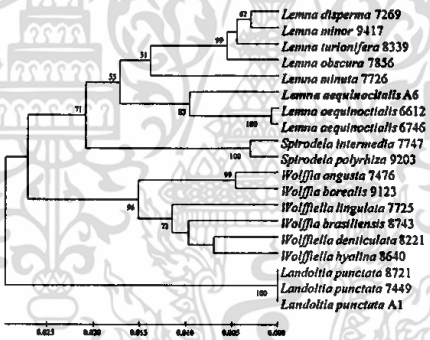


Fig.2 Phylogenetic positions of duckweed strains A1 and A6 based on the *atpF-atpH* intergenic region sequences using the UPGMA method.

2. Isolation and characterization of endophytic bacteria

70 bacterial isolates were obtained and classified based on the 16S rRNA gene sequence analysis. They were members of seven different genera and three phyla (Table 1).

Table1. Endophytic bacteria isolated from *L. punctata* A1 and *Lem. aequinoctialis* A6

No. of isolates	Phylum	Species
50	*Firmicutes*	*Bacillus, Staphylococcus*
13	*Proteobacteria*	*Sphingomonas, Actinetobacter, Rhizobium*
7	*Actinobacteria*	*Microbacterium*

3. Screening for IAA production and measurement of IAA production level

At least 30% of isolates from each genus were screened for the IAA producing ability. 21 isolates were found positive for IAA production, and their IAA production levels were measured. The highest level of IAA production (79.90 µg/mL) was found in *Bacillus* sp. L1-14) (Fig. 3).

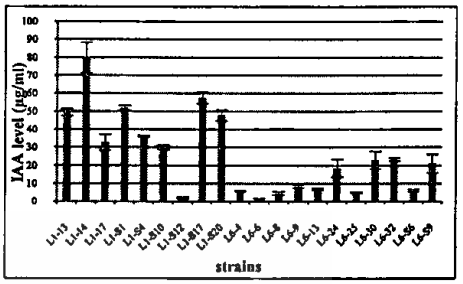


Fig.3 IAA productions levels of endophytic bacteria

3. Plant growth promotion by *Bacillus* sp. L1-14

Bacillus sp. L1-14 was able to increase the stem length, shoot and root fresh weight of 5 days old rice seedlings during 10-day cultivation on water-based agar.

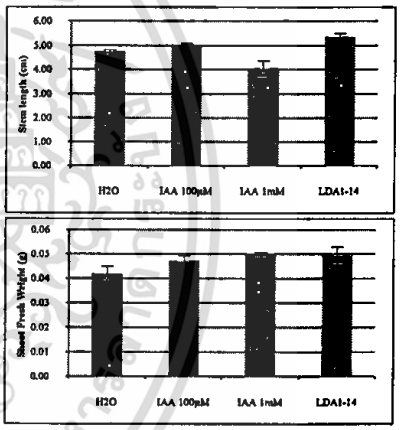


Fig. 4 Plant growth promotion by *Bacillus* sp. L1-14

Conclusion

The results showed that *Bacillus* sp. L1-14 isolated from *L. punctata* A1 displayed the highest IAA production level and it was able to promote growth of non-host rice seedlings.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Faculty of Science, KMITL research grant.

References

1. **Kim, S. et al. (2012).** Biotechnology for Biofuels 5, 37
2. **Perley, J. E. & Stowe, B. B.** (1966). Physiologia Plantarum 19, 683-690.
3. **Wang, W. et al.** (2010). BMC Plant Biol, 10, 205.

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chokchai Kittiwongwattana

2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

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:

-การคัดแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในพืชวงศ์ Lemnaceae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

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

-การศึกษาการผลิตเอธานอลจาก *Spirodela polyrrhiza*

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: ทุนวิจัย วช. ประจำปีงบประมาณ 2556

ระยะเวลาโครงการวิจัย: 1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้