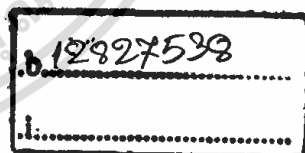




รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรึงไนโตรเจน, การละลายฟอสเฟตและการต้านทานโรค
ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าวพันธุ์หอมนิลและพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่

นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา



เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 145191
ณ.เดือน.ปี. 31 ส.ค. 2560

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย

ประจำปีงบประมาณ 2559

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

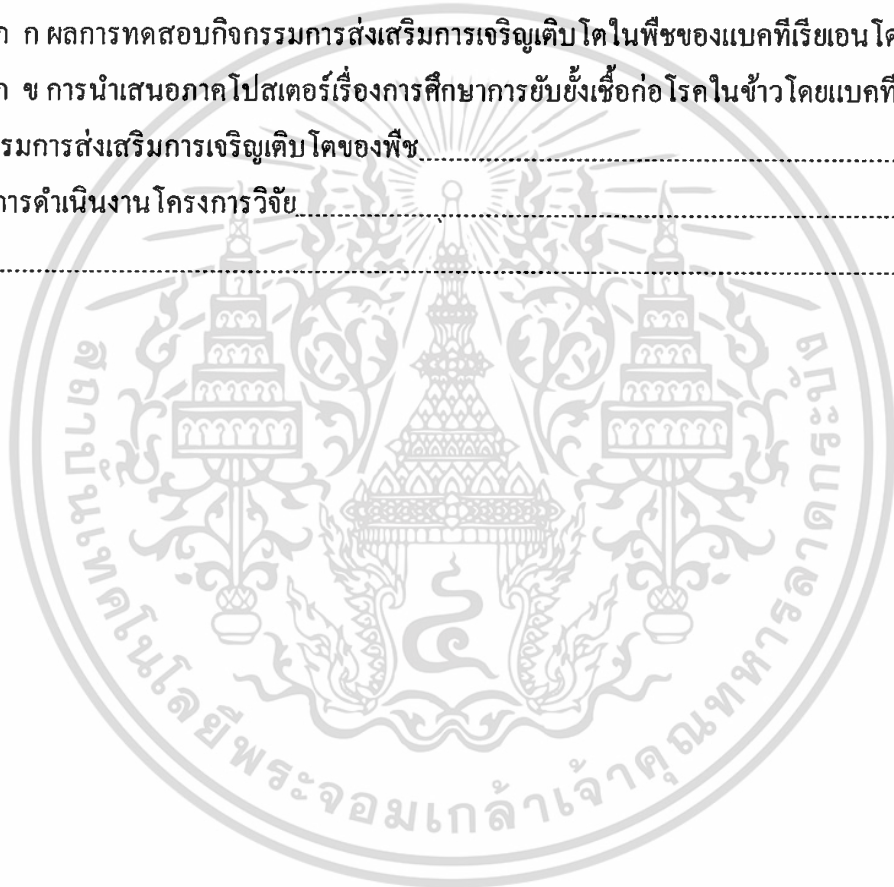
สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	2
1.5 สมมติฐานงานวิจัย และกรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	2
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	7
3.1 การทดสอบการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟต์.....	7
3.2 การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์.....	7
3.3 การตรวจสอบยีน <i>nifH</i> ที่พบในแบคทีเรียเอนโดไฟต์.....	7
3.4 การตรวจสอบการเพิ่มการละลายฟอสเฟตโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์.....	8
3.5 การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>Xanthomonas oryzae</i>	9
3.6 การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i>	9
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	10
4.1 การตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์.....	10
4.2 การตรวจสอบยีน <i>nifH</i> ในแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้.....	12
4.3 การทดสอบการละลายฟอสเฟต.....	13
4.4 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>X. oryzae</i>	14
4.5 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. grisea</i>	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 กิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์.....	15
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	17
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	17
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	18
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย.....	19
เอกสารอ้างอิง.....	20
ภาคผนวก.....	22
ภาคผนวก ก ผลการทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชของแบคทีเรียเอนโดไฟต์.....	23
ภาคผนวก ข การนำเสนอภาคโปสเตอร์เรื่องการศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์และกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช.....	28
สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย.....	31
ประวัตินักวิจัย.....	34



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1	10
4.2	13
ภาคผนวก ก1	23



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1	11
4.2	12
4.3	14
4.4	16
4.5	17
4.6	20



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การตรึงไนโตรเจน, การละลายฟอสเฟตและการต้านทานโรคของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าวพันธุ์หอมนิลและพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่

แหล่งเงิน เงินงบประมาณรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย

ประจำปีงบประมาณ 2559 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2558 ถึง 30 กันยายน 2559

หัวหน้าโครงการ: นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

แบคทีเรียเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อต่างๆ ของพืชโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับพืช งานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์มีกิจกรรมหลายประเภทที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ งานวิจัยชิ้นนี้ทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญของพืชของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 118 ไอโซเลตที่คัดแยกมาได้จากข้าวสายพันธุ์หอมนิลและข้าวสายพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ที่รวบรวมมาจากกรุงเทพมหานครฯ และจังหวัดชลบุรี การทดสอบกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนบนอาหาร glucose nitrogen-free agar พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 82 ไอโซเลตหรือ 69.5% ที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารดังกล่าว และในจำนวนนี้มีแบคทีเรีย 61 ไอโซเลตที่ตรวจพบยีน *nifH* ด้วยไพรเมอร์ 19F และ 407R การทดสอบการละลายฟอสเฟตด้วยอาหาร national botanical research institute phosphate และอาหาร Pikovskaya's medium พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลตที่สามารถละลายฟอสเฟตในอาหารดังกล่าวได้ การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 2 ชนิดคือ *Xanthomonas oryzae* และ *Pyricularia grisea* ด้วยวิธี dual culture พบว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 1 และ 15 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อโรคดังกล่าวได้ตามลำดับ ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์เหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ในอนาคต

คำสำคัญ : ข้าว, แบคทีเรียเอนโดไฟต์, กิจกรรมการส่งเสริมการเจริญของพืช

Research Title: Nitrogen fixation, phosphate solubilization and biocontrolling activities of endophytic bacteria from Hom Nil and Rice Berry rice

Researcher: Dr.Chokchai Kittiwongwattana

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

ABSTRACT

Endophytic bacteria colonize internal cellular spaces of tissues of the plant host and do not cause any detrimental effects. Previous studies showed that endophytic bacteria displayed several plant-growth-promoting activities. The aim of this study is to examine plant-growth-promoting activities of endophytic bacteria that were isolated from two rice cultivars Homnil and Riceberry collected from Bangkok and Choburi provinces. Determination of nitrogen fixation using glucose nitrogen-free agar showed that 82 bacterial isolates (69.5%) were able to grow on the medium. Among these, 61 isolates were positive for *nifH* detection using the universal primers 19F and 407R. The test for the phosphate-solubilizing activity using national botanical research institute phosphate growth and Pikovskaya's media indicated that 11 isolates were positive. Additionally, on the basis of the dual culture test, one and 15 isolates were found positive for antagonistic activities against *Xanthomonas oryzae* and *Pyricularia grisea*, respectively. The results obtained from this study suggested that endophytic bacteria were potential candidates for future applications as biofertilizers.

Keywords : Rice, endophytic bacteria, plant-growth-promoting activity

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ขอขอบคุณ น.ส.ชนิษฐา ดอกเงิน, น.ส.พนิดา เขาแก้ว, น.ส.สุกฤตา วุฒิธรรมาภรณ์, นายชาญณรงค์ เรืองช่วย, น.ส.วรรณฤดี สดชื่น และ น.ส.อังศนา ดาราสร นักศึกษาโครงการพิเศษสาขาจุลชีววิทยา อุตสาหกรรมสำหรับการทำการทดลองต่างๆ

ขอขอบคุณ ดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์ และ รศ.ดร.จิตติ ท่าไวยที่เอื้อเฟื้อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *Xanthomonas oryzae* และ *Pyricularia grisea*

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน งบประมาณรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียหลายชนิดในธรรมชาติสามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อพัฒนาคุณภาพชีวิตและความเป็นอยู่ของมนุษย์ได้ แบคทีเรียที่เป็นประโยชน์เหล่านี้สามารถถูกพบได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลายทั้งในบริเวณที่อุดมสมบูรณ์ และบริเวณที่มีความเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ถิ่นที่อยู่ของแบคทีเรียอีกแหล่งหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจศึกษาจากนักวิทยาศาสตร์คือภายในต้นพืชซึ่งมีช่องว่างระหว่างเซลล์ภายในเนื้อเยื่อให้แบคทีเรียหลากหลายชนิดอาศัยอยู่ได้ แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในพืชดังกล่าวนี้และไม่ก่อให้เกิดอันตรายหรือชักนำให้เกิดโรคกับพืชเจ้าบ้าน (host) เรียกว่าแบคทีเรีย endophytes การศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรีย endophytes เหล่านี้มีประโยชน์ต่อพืชในแง่ของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promotion) โดยแบคทีเรีย endophytes มีความสามารถในการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารที่สำคัญ เช่น ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัสให้แก่พืชได้ ความสามารถดังกล่าวของแบคทีเรีย endophytes ส่งผลให้พืชที่ดำรงชีวิตร่วมกับแบคทีเรียชนิดนั้นมีผลผลิตและชีวมวลที่สูงขึ้น นอกจากนี้แบคทีเรีย endophytes หลายชนิดสามารถชักนำให้พืชมีความต้านทานต่อศัตรูพืชทั้งชนิดที่เป็นแบคทีเรีย (pathogenic bacteria) และ เชื้อรา (pathogenic fungi) โดยแบคทีเรีย endophytes เหล่านี้อาศัยกลไกการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคพืช ด้วยคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่างๆ ดังกล่าว แบคทีเรีย endophytes จึงจัดได้ว่าเป็นแหล่งทรัพยากรทางธรรมชาติที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาความสามารถของแบคทีเรีย endophytes ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชผ่านทางกลไกการตรึงไนโตรเจน การเพิ่มการละลายของฟอสเฟต และการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช โดยแบคทีเรีย endophytes เหล่านี้ถูกคัดแยกมาจากส่วนรากและลำต้นของต้นข้าวที่ถูกเพาะปลูกในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย ผลการศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่าจะได้รับความรู้เพิ่มมากขึ้นในแง่ของความสามารถของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ตลอดจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอื่นๆ และลดการพึ่งพาการใช้ปุ๋ยเคมีที่ส่งผลเสียต่อสภาพดินและสิ่งแวดล้อมได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 การศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย endophytes

1.2.2 การศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย endophytes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.3 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Xanthomonas oryzae* และ *Pyricularia grisea*

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต และการต้านทานเชื้อก่อโรคของพืชสองชนิด ได้แก่ *X. oryzae* และ *P. grisea* ของแบคทีเรีย endophytes จำนวน 192 ไอโซเลต

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1.4.1 การตรวจสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยการเลี้ยงบนอาหาร glucose-nitrogen-free agar

1.4.2 การตรวจสอบยีน *nifH* ในแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แสดงผลบวกกับการทดสอบการตรึงไนโตรเจน

1.4.3 การตรวจสอบความสามารถในการละลายสารประกอบฟอสเฟตของแบคทีเรียเอนโดไฟต์

1.4.4 การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

1.4.5 การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pyricularia grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

1.5 สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อยืนยันว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. L7-75 เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ คีโมไทป์ และลำดับเบสของยีน 16S rRNA ในการวิเคราะห์

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต และการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 2 ชนิดคือ *Xanthomonas oryzae* และ *Pyricularia grisea*

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้าวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่จัดอยู่ในวงศ์ Poaceae ประโยชน์หลักของข้าวคือการนำมาใช้ในรูปของอาหาร โดยเมล็ดข้าวเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของมนุษย์ในพื้นที่ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียง 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 รองจกมูลค่าการส่งออกยางธรรมชาติ โดยในปี พ.ศ. 2553 มูลค่าการส่งออกของข้าวและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องมีมูลค่าสูงถึง 180,727 ล้านบาท ข้อมูลเบื้องต้นเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการพัฒนาเทคโนโลยีในด้านต่างๆ เกี่ยวกับการเพาะปลูกข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิตซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งต่อเกษตรกรผู้ผลิต ประชาชนทั่วไปที่เป็นผู้บริโภค ตลอดจนสภาพเศรษฐกิจฐานะทางการคลังของประเทศด้วย

เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะปลูกมีอยู่ด้วยกันหลากหลายด้านครอบคลุมตั้งแต่การปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวให้มีจำนวนเมล็ดต่อต้นเพิ่มขึ้น เพิ่มความสามารถในการทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือด้านทานศัตรูพืช การพัฒนาเทคโนโลยีการกลั่นแกล้งทั้งในแง่ของการให้ปุ๋ยแร่ธาตุอาหารให้เหมาะสมต่อความต้องการของพืช ตลอดจนการปรับปรุงเทคโนโลยีการเก็บเกี่ยวและการรักษาคุณภาพของเมล็ดข้าวภายหลังการเก็บเกี่ยวให้มีคงสภาพได้นาน นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการประยุกต์ใช้ประโยชน์จุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promotion) ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรีย ที่อาศัยอยู่ภายในต้นพืชโดยไม่ก่อโทษใดๆ กับพืชที่เรียกว่าแบคทีเรีย endophytes (Mei and Flinn, 2010) แหล่งที่อยู่ที่เหมาะสมต่อการศึกษาเพื่อค้นหาแบคทีเรีย endophytes ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์มีอยู่ 5 แหล่งด้วยกัน ได้แก่ 1. พืชที่เจริญเติบโตในพื้นที่ที่อุดมสมบูรณ์ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง 2. พืชที่เจริญเติบโตในพื้นที่ที่มีลักษณะเฉพาะ เช่น พื้นที่ที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ หรือพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารเคมีหรือโลหะหนัก พื้นที่รูปแบบนี้เปรียบได้กับกลไกการคัดเลือกทางธรรมชาติรูปแบบหนึ่ง พืชที่สามารถเจริญอยู่ได้จึงอาจมีการพึ่งพาแบคทีเรีย endophytes ให้สามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมดังกล่าวได้ 3. พืชที่ถูกปลูกใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พื้นที่ที่มีการบุกรุกของเชื้อโรคแต่ไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่แบคทีเรีย endophytes ที่อยู่ในพืชนั้นอาจส่งเสริมให้เกิดกลไกการป้องกันตัวเองของพืชจากศัตรูพืชได้ดังนี้ 4. พืชที่มีการนำมาประยุกต์ใช้เป็นยาสมุนไพรโดยมนุษย์ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชเหล่านี้อาจมีแบคทีเรีย endophytes ที่มีการผลิตสารที่เป็นประโยชน์ต่อพืชและมนุษย์อยู่ด้วย และ 5. พืชที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในพื้นที่จำกัดพื้นที่หนึ่งมาเป็นช่วงระยะเวลายาวนาน ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะพบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีการวิวัฒนาการที่จำเพาะเจาะจงร่วมกันกับพืชชนิดนั้นๆ (Yu *et al.*, 2010)

ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรีย endophytes ในข้าวอย่างกว้างขวาง รายงานจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes จากข้าว โดยในข้าวสปีชีส์ *Oryza sativa* นั้นเป็นแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus* และ *Acidobacteria* (Mano and Morisaki, 2008)

ไนโตรเจนเป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อพืชเป็นอย่างมาก โดยเป็นองค์ประกอบสำคัญที่พืชใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน กรดนิวคลีอิก และสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ภายในเซลล์ ไนโตรเจนส่วนใหญ่ในธรรมชาติถูกพบอยู่ในรูปของแอมโมเนียมไนโตรเจนที่พืชไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยตรง พืชได้รับธาตุไนโตรเจนได้จากกระบวนการตรึงแอมโมเนียมไนโตรเจนของแบคทีเรียซึ่งจะเปลี่ยนแร่ธาตุไนโตรเจนให้มาอยู่ในรูปที่ละลายน้ำและพืชสามารถดูดซับมาใช้ประโยชน์ได้ (Ji *et al.*, 2014) นอกจากนี้ไนโตรเจนยังจัดได้ว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช และมีการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนกันอย่างกว้างขวางในการเพาะปลูกพืชต่างๆ เช่นข้าว (Ji *et al.*, 2014) อย่างไรก็ตามการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณที่มากเกินไปอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนี้การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณมากยังส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการเพาะปลูกพืชเพิ่มขึ้นอีกด้วย ดังนั้นแล้วจึงมีความพยายามนำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนมาใช้ประโยชน์ในแง่ของการเป็นปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียที่แยกได้จากพืชหลายชนิดถูกคัดเลือกเพื่อนำมาศึกษาศักยภาพในการตรึงแอมโมเนียมไนโตรเจนและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ตัวอย่างเช่นแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในสกุล *Pseudomonas* spp. สามารถตรึงไนโตรเจนได้และส่งเสริมให้เกิดปมรากในถั่ว chickpea (Parma and Dadarwal, 1999) งานวิจัยอีกจำนวนมากยังแสดงให้เห็นด้วยว่าการใส่เชื้อแบคทีเรีย *Azospirillum* ที่ตรึงไนโตรเจนได้ลงไปบนดินข้าวส่งผลให้ปริมาณแร่ธาตุไนโตรเจนในข้าวสูงขึ้น (Chodhury and Kennedy, 2004)

ฟอสฟอรัสเป็นแร่ธาตุอาหารหลักของพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชเป็นอย่างมาก โดยเป็นองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในเซลล์พืชเช่น กรดนิวคลีอิก ไขมัน เป็นต้น และปริมาณแร่ธาตุฟอสฟอรัสที่เหมาะสมยังจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาอย่างถูกต้องของต้นพืชตั้งแต่การพัฒนาของลำต้น ราก ดอก ผล และเมล็ด (Ji *et al.*, 2014) ถึงแม้ว่าแร่ธาตุฟอสฟอรัสจะถูกพบปริมาณมาก

ในดิน ทว่าฟอสฟอรัสมักจะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ส่งผลให้พืชไม่สามารถนำแร่ธาตุฟอสฟอรัสไปใช้ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชยังประสบปัญหาที่สำคัญ อีกประการหนึ่งด้วยคือปุ๋ยฟอสฟอรัสนั้นถูกชะล้างไปจากดินได้ค่อนข้างง่าย (Glick, 2012) ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการ พยายามศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียที่สามารถเพิ่มอัตราการละลายของแร่ธาตุฟอสฟอรัส ในดิน โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งจะเข้าไปละลายฟอสฟอรัสออกมาจากดินและทำ ให้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำและพืชนำไปใช้ได้ดี กรดอินทรีย์เหล่านี้ได้แก่กรดซิตริก, กรด ออกซาลิก, กรดกลูโคนิก และกรด 2-ketogluconic (Marciano Marra *et al.*, 2012; Wagh *et al.*, 2014) งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งได้แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของยีนใน citrate operon ที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้ แบคทีเรีย *Herbaspirillum seropedicae* สามารถละลายฟอสฟอรัสได้ดีขึ้น (Wagh *et al.*, 2014) แบคทีเรียที่ สามารถละลายฟอสฟอรัสได้ถูกพบว่าจัดอยู่ในสกุล *Bacillus*, *Rhizobium* และ *Flavobacterium* (Khan *et al.*, 2007) นอกจากนี้งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ละลายฟอสฟอรัสได้จากต้นข้าว แบคทีเรีย เหล่านี้จัดอยู่ในสกุล *Herbaspirillum* และ *Burkholderia* และเมื่อทำการใส่เชื้อแบคทีเรียลงไปในต้นข้าว พบว่าผลผลิตที่ได้จากต้นข้าวสูงขึ้น 14-26 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวกลุ่มที่ไม่ได้ใส่เชื้อแบคทีเรีย ลงไป (Estrada *et al.*, 2012)

ประโยชน์อีกอย่างหนึ่งที่พบจากการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่แยกได้จากต้นพืชคือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค และการลดความรุนแรงของโรคพืชที่เกิดขึ้น โดยเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ทั้งนี้เนื่องมาจากการที่แบคทีเรียทั้งสองกลุ่มจำเป็นต้องแข่งขันกัน (Lindow and Brandl, 2003) ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการพยายามศึกษาการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการเป็น ตัวควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol agents) เพื่อลดความเสียหายที่เกิดจากโรคพืช ข้อดีของการควบคุมโรคโดย ใช้ตัวควบคุมทางชีวภาพคือผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับการใช้สารเคมีในการควบคุม กำจัดจุลินทรีย์โรคพืช ตัวอย่างของการควบคุมการเกิดโรคโดยการใช้แบคทีเรียจากพืชเช่นการควบคุมการ เกิดโรค fire blight ในต้นแพร์และแอปเปิ้ลที่ก่อโดยเชื้อ *Erwinia amylovora* โดยการใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* A506 และ *Pantoea agglomerans* ใส่ลงไปที่ยอดเกสรตัวเมีย (Pusey, 2002) โรคที่ ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงในข้าวได้แก่โรคขอบใบแห้งที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ซึ่งสามารถทำให้เกิดความเสียหายได้มากถึง 50% ของผลผลิตข้าวทั้งหมด (Mew, 1987) และโรคใบไหม้ที่ก่อโดยเชื้อรา *Pyricularia grisea* (Velusamy *et al.*, 2006) การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า แบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในสกุล *Pseudomonas* ที่ถูกคัดแยกมาจากรากของพืชหลากหลายชนิดสามารถยับยั้ง การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ กลไกการยับยั้งคือการผลิตสาร 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) (Velusamy, *et al.*, 2006) งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสาย

พันธุ์หนึ่งของ *Lysobacter antibiolicus* ที่ถูกคัดแยกมาจากพื้นผิวของรากต้นข้าวสามารถลดความรุนแรงของโรคขอบใบแห้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ji *et al.*, 2008) โรคใบไหม้ที่เกิดขึ้นโดยเชื้อรา *P. grisea* สามารถทำให้เกิดความสูญเสียของผลผลิตได้มากถึง 18 เปอร์เซ็นต์ (Dean *et al.*, 2005) การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมีมีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำทั้งนี้เนื่องมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสูงที่พบในเชื้อราชนิดนี้ (Miah *et al.*, 2013) การใช้ตัวควบคุมทางชีวภาพจัดได้ว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมการเกิดโรคใบไหม้ในต้นข้าว *Bacillus polymixa* VLB16 ที่คัดแยกได้จากรากข้าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค โดยแบคทีเรียชนิดนี้สร้างโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราออกมา (Kavitha *et al.*, 2005)



บทที่ 3

๑. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การทดสอบการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟต์

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์บริสุทธิ์ที่แยกलगบนอาหาร glucose nitrogen – free agar โดยวิธี simple streak จากนั้นทำการบ่มเชื้อนาน 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30°C ตรวจสอบและบันทึกผลเชื้อแต่ละไอโซเลตที่เจริญบนอาหารโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้ทำการถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงบนอาหาร glucose nitrogen – free agar ที่มีการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 3mM โดยแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้จะสามารถเจริญเติบโตบนอาหาร glucose nitrogen-free agar ได้

3.2 การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone soya agar จนกระทั่งเชื้อเจริญเติบโตได้ปริมาณที่มากพอ จากนั้นขูดเชื้อออกมาจากผิวหน้าอาหารด้วยไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ ใส่ลงไปในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออยู่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกและทำการสกัดแยกโปรตีนและผนังเซลล์ออกจากดีเอ็นเอด้วยสารละลายผสมระหว่าง phenol และ chloroform ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนมาเติม chloroform ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาสารละลายดีเอ็นเอด้านบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติมสารละลาย 3M sodium acetate ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอที่แยกได้ และเติม isopropanol ปริมาตรเท่ากันกับสารละลายดีเอ็นเอ ทำการผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาล้างในสารละลาย 70% ethanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงต่อ จากนั้นเทสารละลาย 70% ethanolทิ้งไป แล้วนำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้ง ตะกอนดีเอ็นเอจะถูกนำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-EDTA ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเพื่อในปฏิกิริยา PCR ต่อไป

3.3 การตรวจสอบยีน *nifH* ที่พบในแบคทีเรียเอนโดไฟต์

ดีเอ็นเอที่แยกสกัดออกมาได้จากเชื้อแต่ละชนิดถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *nifH* ด้วยวิธี PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ universal ดังนี้

ไพรเมอร์ 19F: 5'- GCIWTYTAYGGIAARGGIGG-3'

ไพรเมอร์ 407R: 5'- AAICCRCCRCALACIACRTC-3'

ไพรเมอร์คู่ดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ในแบคทีเรียหลากหลายชนิดโดยปฏิกิริยา PCR มีองค์ประกอบต่างๆ เป็นดังนี้

DNA (50 ng/ μ l)	2	ไมโครลิตร
primer 27F (5 μ M)	0.5	ไมโครลิตร
primer 1492R (5 μ M)	0.5	ไมโครลิตร
10X buffer	1	ไมโครลิตร
2mM dNTP	1	ไมโครลิตร
25mM MgCl	0.2	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.05	ไมโครลิตร
H ₂ O	4.75	ไมโครลิตร

ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะถูกนำมาใส่รวมกันในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้

ขั้นที่ 1) 94°C	3	นาที
ขั้นที่ 2) 94°C	1	นาที
ขั้นที่ 3) 50°C	1	นาที
ขั้นที่ 4) 72°C	1	นาที
ย้อนกลับไปขั้นที่ 2 จำนวน 39 รอบ		
ขั้นที่ 5) 72°C	5	นาที

ชิ้นของดีเอ็นเอของยีน *nifH* ที่เพิ่มจำนวนขึ้นมาได้นี้จะถูกนำมาตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis

3.4 การตรวจสอบการเพิ่มการละลายฟอสเฟตโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย endophyte บนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มนาน 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30°C จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อเช็ดแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าของอาหาร NA แทะลงบนอาหาร Pikovskaya's medium (PVK) และ National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP) ซึ่งอาหารทั้งสองชนิดมีส่วนผสมของ Ca_3PO_4 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 7 วัน โดยสังเกตผลทุกวันจนครบ 7 วัน บันทึกผลการเกิดส่วนใสของการละลายฟอสเฟตแต่ละไอโซเลตที่เกิดขึ้นบนอาหารทั้งสองชนิด แบคทีเรียที่สามารถเพิ่มการละลายของฟอสเฟตจะแสดงลักษณะใสบริเวณรอบรอยเชื้อแบคทีเรียบนอาหารทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด

3.5 การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* โดยแบคทีเรีย endophytes ได้โดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย endophytes ลงบนอาหาร nutrient agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ในแนวตั้งฉากกับรอยของเชื้อแบคทีเรีย endophytes โดยฉีดให้ใกล้กับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ให้มากที่สุด จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ต่อเป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อจากการเกิด inhibition zone

3.6 การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia grisea*

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. grisea* ได้โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar เป็นเวลาประมาณ 7 วันแล้วทำการตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเจริญขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร แล้ววางลงบนอาหาร potato dextrose agar เฟลทใหม่ จากนั้นทำการฉีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ลงไปบนอาหารจานเดียวกันแล้วบ่มต่อเป็นระยะเวลา 10 วันแล้วตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อจากการเกิด inhibition zone



บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

แบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดลองนี้คือแบคทีเรียเอนโดไฟต์ซึ่งแยกได้จากข้าวสาลีพันธุ์หอมนิล และสายพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ที่เก็บรวบรวมมาจากแปลงนาในกรุงเทพมหานครฯ และจังหวัดชลบุรี ตามลำดับ แบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 118 ไอโซเลตแบ่งเป็นแบคทีเรียที่เซลล์มีรูปร่างกลมจำนวน 19 ไอโซเลต รูปร่างท่อนจำนวน 98 ไอโซเลต และรูปร่างเส้นสายจำนวน 1 ไอโซเลต เมื่อจัดจำแนกแบคทีเรียเหล่านี้ตามลักษณะการติดสีด้วยการย้อมวิธีแกรมแล้วพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 73 ไอโซเลตที่ติดสีแบบแกรมบวกและจำนวน 45 ไอโซเลตที่ติดสีแบบแกรมลบ แบคทีเรียจากแหล่ง(ตารางที่ 4.1)

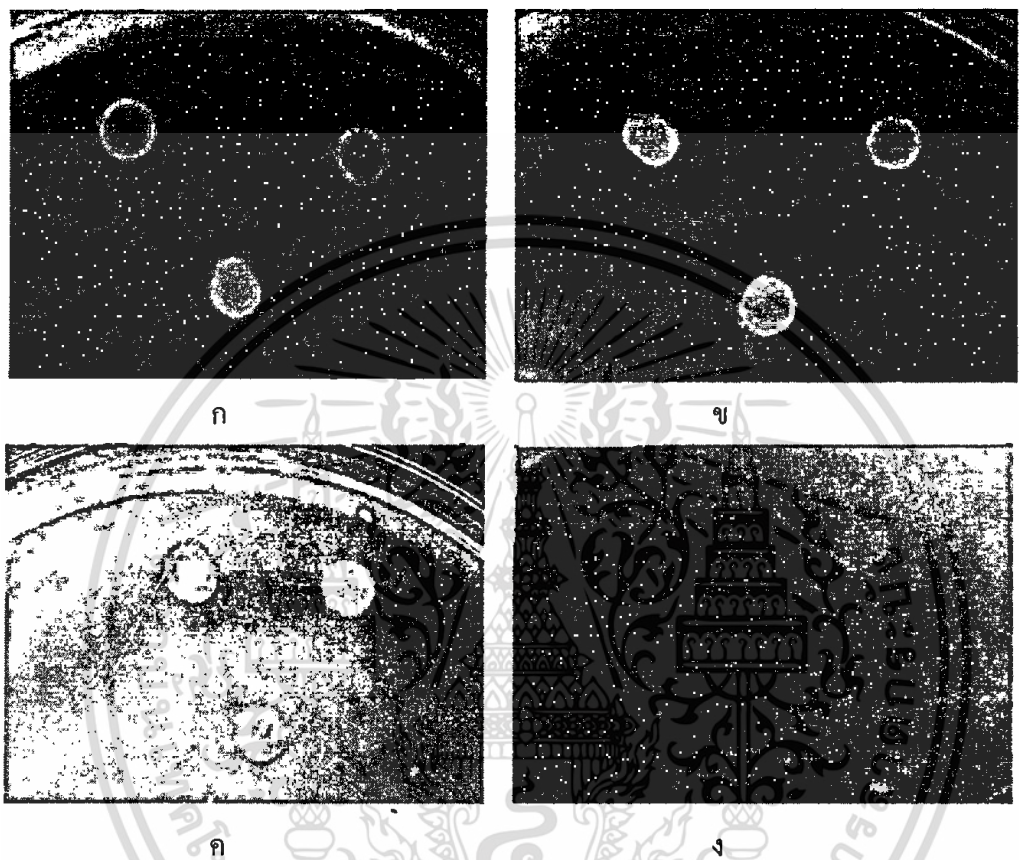
ตารางที่ 4.1 แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ใช้ในการทดลองจัดจำแนกตามการติดสีแกรมและรูปร่างของเซลล์

สายพันธุ์/แหล่งข้าว	จำนวนเชื้อ	แกรม		รูปร่าง			รหัส
		บวก	ลบ	กลม	ท่อน	เส้นสาย	
ข้าวอินทรีย์ สายพันธุ์หอมนิล (กรุงเทพมหานคร)	24	20	4	3	21	-	3001-3024
	13	5	8	4	9	-	4001-4013
ข้าวอินทรีย์ สายพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ (ชลบุรี)	42	33	9	7	34	1	3025-3078
	39	15	24	5	34	-	4014-4056
รวม	118	73	45	19	98	1	

แบคทีเรียทั้ง 118 ไอโซเลตถูกนำมาทดสอบความสามารถในการตรึงแอสไนโตรเจนเบื้องต้นโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเหล่านี้บนอาหาร glucose nitrogen-free agar ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (ภาพที่ 4.1) ดังนั้นแบคทีเรียที่จะสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ได้จึงจำเป็นต้องตรึงแอสไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ในการเจริญเติบโต ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนไม่ได้จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจากไนโตรเจนเป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต โดยเป็นองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลหลายชนิดภายในเซลล์เช่น โปรตีน, ดีเอ็นเอ เป็นต้น ในการทดสอบนี้ใช้อาหาร glucose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

nitrogen-free agar ที่มีส่วนผสมของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เพาะเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตควบคู่ไปด้วยเพื่อเป็นงานควบคุมเชิงบวกที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญเติบโตได้อย่างเป็นปกติ



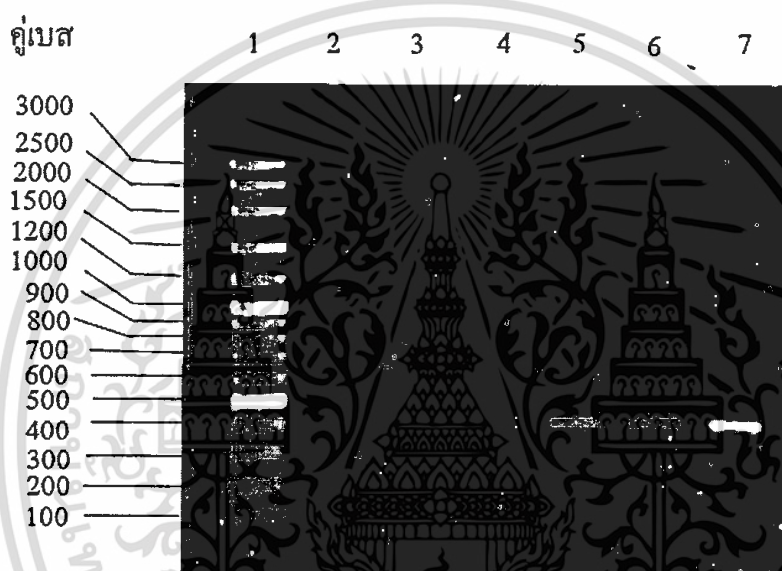
ภาพที่ 4.1 ผลการทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรีย 3039 (ก, ข) ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ และไอโซเลต 2014 (ค, ง) ที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้โดยทดสอบบนอาหาร glucose-nitrogen-free agar ที่เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ก, ค) เพื่อใช้เป็นงานควบคุมเชิงบวก และอาหาร glucose-nitrogen-free agar (ข, ง)

ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 82 ไอโซเลตจากทั้งหมด 118 ไอโซเลตหรือคิดเป็น 69.5% ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยในจำนวนนี้แบ่งเป็นแบคทีเรียจากข้าวสาลีพันธุ์หอมนิลจำนวน 24 ไอโซเลตหรือคิดเป็น 29.3% ของแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรึงไนโตรเจนได้และคิดเป็น 64.9% ของแบคทีเรียที่ถูกคัดแยกจากข้าวสาลีพันธุ์หอมนิล แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้และถูกคัดแยกจากข้าวสาลีพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่จำนวน 58 ไอโซเลตหรือคิดเป็น 70.7% ของแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรึงไนโตรเจนได้และคิดเป็น 81.7% ของแบคทีเรียที่ถูกคัดแยกได้จากข้าวสาลีพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ (ตารางภาคผนวก ก1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การตรวจสอบยีน *nifH* ในแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้

แบคทีเรียจำนวน 82 ไอโซเลตที่แสดงผลบวกในการทดสอบการตรึงไนโตรเจนด้วยอาหาร glucose nitrogen-free agar ถูกนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนและสกัดดีเอ็นเอเพื่อนำมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *nifH* ภายในจีโนมของแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer 2 ชนิดคือไพรเมอร์ 19F และ 407R ด้วยวิธี polymerase chain reaction และ agarose gel electrophoresis โดยขึ้นดีเอ็นเอของยีน *nifH* ที่ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นมามีขนาดประมาณ 390 คู่เบส (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 การตรวจสอบยีน *nifH* ในแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยไพรเมอร์ 19F และ 407R ช่องที่ 1 คือ DNA marker ช่องที่ 2 และ 3 คือแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรวจสอบไม่พบยีน *nifH* ช่องที่ 4 – 7 คือแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรวจสอบพบยีน *nifH*

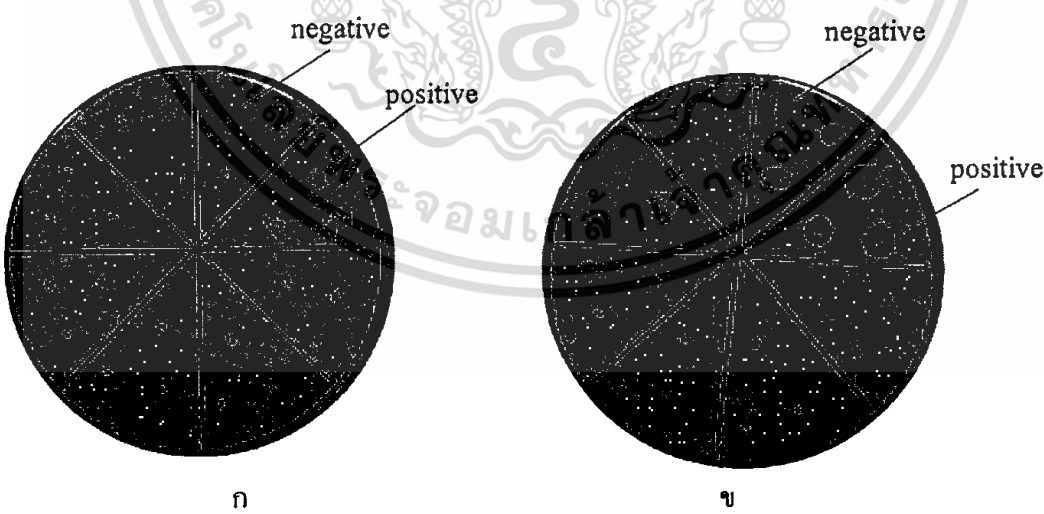
แบคทีเรียที่แสดงผลบวกกับการตรวจหายีน *nifH* มีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 61 ไอโซเลต (ตารางภาคผนวก ก1) โดยคิดเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าวสาลีพันธุ์หอมนิลจำนวน 17 ไอโซเลตหรือ 27.9% ของแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียจากข้าวสาลีพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่จำนวน 44 ไอโซเลตหรือคิดเป็น 72 % จากแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียที่แสดงลักษณะการตรึงไนโตรเจนเมื่อทดสอบด้วยอาหาร glucose nitrogen-free agar แต่ตรวจไม่พบยีน *nifH* มีทั้งหมด 21 ไอโซเลตซึ่งแบ่งเป็นแบคทีเรียจากข้าวสาลีพันธุ์หอมนิลจำนวน 7 ไอโซเลตและแบคทีเรียจากข้าวสาลีพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่จำนวน 14 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจสอบยีน *nifH* ในแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรึงไนโตรเจนได้

แหล่งที่มา	แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน บนอาหาร glucose nitrogen-free agar	จำนวนแบคทีเรียที่ ตรวจพบยีน <i>nifH</i>	จำนวนแบคทีเรียที่ตรวจ ไม่พบยีน <i>nifH</i>
ข้าวสาลีพันธุ์ หอมนิล	24	17	7
ข้าวสาลีพันธุ์ ไรซ์เบอร์รี่	58	44	14
รวม	82	61	21

4.3 การทดสอบการละลายฟอสเฟต

แบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 118 ไอโซเลตถูกนำมาทดสอบการละลายฟอสเฟตด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดคืออาหาร Pikovskaya’s medium (PVK) และอาหาร National botanical research institute phosphate growth medium (NBRIP) โดยองค์ประกอบที่สำคัญของอาหาร 2 ชนิดนี้คือ $Ca_3(PO_4)_2$ ที่เป็นสารประกอบฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นอาหารทั้งสองชนิดนี้จึงมีลักษณะขุ่น ถ้าหากแบคทีเรียสามารถละลายสารประกอบนี้ได้จะทำให้บริเวณรอบๆ ของเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะเปลี่ยนแปลงจากขุ่นเป็นใส (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 ผลการทดสอบการละลายฟอสเฟตโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์บนอาหาร NBRIP (ก) และอาหาร PVK (ข) โดยแบคทีเรียที่แสดงผลบวก (positive) เกิดบริเวณใสรอบๆ เชื้อและแบคทีเรียที่แสดงผลลบ (negative) ไม่เกิดบริเวณใส

ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลตที่ให้ผลบวกกับการทดสอบอาหารอย่างน้อย 1 ชนิด แบคทีเรียเหล่านี้ได้แก่ไอโซเลตหมายเลข 4003 ที่แยกได้จากข้าวสาลีพันธุ์หอมนิลและไอโซเลต 3027, 3028, 3039, 3045, 3068 4015, 4016, 4025, 4028 และ 4035 ที่แยกได้จากข้าวสาลีพันธุ์ไรซ์เบอ

4.4 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae*

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ที่ก่อโรคขอบใบแห้งในข้าวด้วยวิธี dual culture พบว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 1 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ คือไอโซเลตหมายเลข 4045 โดยเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อก่อโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแบคทีเรียเอนโดไฟต์กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียเอนโดไฟต์อยู่จะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคถูกยับยั้งในบริเวณที่อยู่ใกล้กับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 4045 และเรียกบริเวณที่เชื้อก่อโรคไม่เจริญนี้ว่าบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในทางตรงกันข้ามการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคกับแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตอื่นๆ ไม่พบบริเวณยับยั้ง (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ จำนวนควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ (ก) จำนวนทดสอบที่มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต 4045 ซึ่งแสดงบริเวณยับยั้ง (ข) และจำนวนทดสอบที่มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต 4042 ซึ่งไม่แสดงบริเวณยับยั้ง (ค)

4.5 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. grisea*

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมด 118 ไอโซเลตถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ที่ก่อโรคใบไหม้ในข้าวด้วยวิธี dual culture พบว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 15 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยมีแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ได้แก่ ไอโซเลต 3003 และ 3004 ที่คัดแยกได้จากข้าวสายพันธุ์หอมนิลและไอโซเลต 3033, 3038, 3047, 3048, 3052, 3077, 3078, 4015, 4028, 4035, 4039, 4040 และ 4041 ที่คัดแยกได้จากข้าวสายพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถสังเกตได้จากการเกิดบริเวณยับยั้งที่อยู่ระหว่างเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยที่ในบริเวณดังกล่าวจะไม่พบการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา ในทางตรงกันข้ามเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราเพียงอย่างเดียวบนอาหารพบว่าเส้นใยของเชื้อราสามารถเจริญเติบโตและแผ่ขยายขนาดออกไปได้ในทุกทิศทาง เช่นเดียวกันกับเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราร่วมกับแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตอื่นๆ ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้



ภาพที่ 4.5 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ จานควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ (ก) ตัวอย่างบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ (ข) และตัวอย่างที่ไม่มีบริเวณยับยั้งเกิดขึ้นระหว่างเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟต์ (ค)

4.6 กิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

ผลการทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งหมดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 118 ไอโซเลตแสดงในตารางภาคผนวก ก1 เมื่อพิจารณาผลการทดสอบทั้งหมดแล้วพบว่าไม่มีแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตใดที่แสดงลักษณะการตรึงไนโตรเจน การตรวจพบยีน *nifH* การละลายฟอสเฟต การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามก็พบว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 2 ไอโซเลตคือไอโซเลต 3003 และ 4028 ที่แสดงลักษณะทุกลักษณะยกเว้นการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *P.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

grisea นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 12 ไอโซเลตที่แสดงลักษณะการตรึงไนโตรเจน ตรวจพบยีน *nifH* และการละลายฟอสเฟต มีแบคทีเรียอีก 6 ไอโซเลตที่แสดงลักษณะการตรึงไนโตรเจน ตรวจพบยีน *nifH* และการยับยั้งเชื้อก่อโรค *P. grisea* มีแบคทีเรีย 39 ไอโซเลตที่แสดงลักษณะการตรึงไนโตรเจนและตรวจพบยีน *nifH* มีแบคทีเรีย 1 ไอโซเลตที่ตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสเฟตและยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* มีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลตที่ตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟต มีแบคทีเรีย 1 ไอโซเลตที่ตรึงไนโตรเจนและยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *X. oryzae* มีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลตที่ตรึงไนโตรเจนและยับยั้งเชื้อก่อโรค *P. grisea* มีแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 13 ไอโซเลตที่ตรึงไนโตรเจนได้ มีแบคทีเรีย 1 ไอโซเลตที่ละลายฟอสเฟตและยับยั้งเชื้อก่อโรค *P. grisea* มีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลตที่ยับยั้งเชื้อก่อโรค *P. grisea* และมีแบคทีเรีย 34 ไอโซเลตที่ไม่แสดงผลบวกกับลักษณะต่างๆ ที่ทดสอบ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยเกี่ยวกับความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการตรึงไนโตรเจน เพิ่มการละลายฟอสเฟตและการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพบว่า จุลินทรีย์ทั้งหมดที่นำมาทดสอบจำนวน 118 ไอโซเลตมีแบคทีเรียจำนวน 82 ไอโซเลตที่แสดงความสามารถการตรึงไนโตรเจนเมื่อทดสอบบนอาหาร glucose nitrogen-free agar โดยในจำนวนนี้ประกอบไปด้วยแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวสาลีพันธุ์หอมนิลคิดเป็น 29.3% และแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวสาลีพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่คิดเป็น 70.7% นอกจากนี้ผลการวิจัยยังแสดงให้เห็นด้วยว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวสาลีพันธุ์หอมนิลมีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้คิดเป็น 64.9% ของแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวสาลีพันธุ์นี้ทั้งหมดและน้อยกว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวสาลีพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่และมีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้นั้นมีมากถึง 81.7% ของจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวสาลีพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ และเมื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้มาตรวจสอบยีน *nifH* ซึ่งเป็นยีนกำหนดการสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์ nitrogenase แล้วพบว่ามีแบคทีเรียเพียง 61 ไอโซเลตที่ตรวจพบยีน *nifH* โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียจากข้าวสาลีพันธุ์หอมนิลจำนวน 17 ไอโซเลตและจากข้าวสาลีพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่จำนวน 44 ไอโซเลต ในส่วนของการทดสอบการละลายฟอสเฟตนั้นผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟต์เพียง 11 ไอโซเลตหรือคิดเป็น 9.3% ของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้งหมดที่แสดงลักษณะการละลายฟอสเฟต นอกจากนี้แบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลตยังถูกแยกมาได้จากข้าวสาลีพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ การใช้วิธี dual culture เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าว 2 ชนิดคือ *X. oryzae* และ *P. grisea* ให้ผลการทดลองคือมีแบคทีเรียเอนโดไฟต์เพียง 1 ไอโซเลตจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* และมีแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 15 ไอโซเลตที่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *P. grisea* โดยที่ในจำนวนนี้แบ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวสาลีพันธุ์หอมนิลและสายพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่จำนวน 2 และ 13 ไอโซเลตตามลำดับ เมื่อกล่าวโดยสรุปแล้วแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้าวสาลีพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ ผลการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ของข้าวอาจมีผลต่อจำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ภายในพืชและมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟตและการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้แบคทีเรียที่แสดงลักษณะการส่งเสริมการเจริญของพืชมากที่สุดคือแบคทีเรียไอโซเลตหมายเลข 3003 และ 4028 ซึ่งแสดงลักษณะทุกลักษณะที่ทดสอบ ยกเว้นการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *X. oryzae*

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้อาจแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียจำนวนมากที่แสดงลักษณะต่างๆ ที่มีประโยชน์ในทางส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ดังนั้นแล้วจึงควรนำแบคทีเรียเอนโคไฟต์เหล่านี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซเลต 3003 และ 4028 มาทำการทดลองวิจัยกับต้นข้าวทั้งในสภาพควบคุมและในสภาพแปลงปลูกจริงเพื่อประเมินศักยภาพของแบคทีเรียเอนโคไฟต์เหล่านี้เพื่อปรับปรุงและพัฒนาให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะปลูกข้าวต่อไป



บทที่ 6

สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้

6.1.1 การนำเสนอผลงานรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง “การศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวโดยแบคทีเรียเอนโคไฟต์และกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช” ในการประชุมวิชาการ “การบริหารจัดการความหลากหลายทางชีวภาพแห่งชาติ (Biological and Cultural Diversity: Living in Harmony)” ณ โรงแรมดิ อิมเพรส น่าน จ.น่าน ระหว่างวันที่ 15-17 มิถุนายน 2559 (ภาคผนวก ข)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2554). สถิติการเกษตรของประเทศไทยปี 2554. ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. หน้า 176, นนทบุรี.
- 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.
- Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J. & other authors (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434, 980-986.
- 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.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica (Cairo)*, 963401.
- Ji, G. H., Wei, L. F., He, Y. Q., Wu, Y. P. & Bai, X. H. (2008). Biological control of rice bacterial blight by *Lysobacter antibioticus* strain 13-1. *Biological Control* 45, 288-296.
- 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.
- Kavitha, S., Senthilkumar, S., Gnanamanickam, S., Inayathullah, M. & Jayakumar, R. (2005). Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. *Process Biochemistry* 40, 3236-3243.
- 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.
- Lindow, S. E. & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied Environmental Microbiology* 69, 1875-1883.
- 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.

- Marciano Marra, L., Fonsca Sousa Soares, C., de Oliveira, S., Avelar Ferreira, P., Lima Soares, B., de Frguas 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.
- Mei, C., and Flinn, B. (2010).** The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. *Rec Pat Biotech* **4**, 81-95.
- 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.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P., and Qin, L. (2010).** Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol Res* **165**, 437-449.
- Mano, H. and Morisaki, H. (2008)** Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes Environ* **23**, 109-117.
- 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

ภาคผนวก ก

ตารางภาคผนวก ก1 ผลการทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชของแบคทีเรียเอนโดไฟต์

รหัสเชื้อ	กิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช				
	การตรึงไนโตรเจน	การตรวจสอบ	การเพิ่มการ	Dual Culture	
	บนอาหาร glucose nitrogen-free agar	ยีน <i>nifH</i>	ละลายฟอสเฟต	<i>X. oryzae</i>	<i>P. griseae</i>
3001	+	-	+	-	-
3002	+	+	+	-	-
3003	+	+	+	-	+
3004	+	-	+	-	+
3005	+	+	+	-	-
3006	-	-	+	-	-
3007	+	+	+	-	-
3008	+	+	+	-	-
3009	+	-	+	-	-
3010	+	+	+	-	-
3011	+	+	+	-	-
3012	+	+	+	-	-
3013	-	-	-	-	-
3014	+	-	-	-	-
3015	-	-	-	-	-
3016	+	+	-	-	-
3017	-	-	-	-	-
3018	-	-	-	-	-
3019	-	-	-	-	-
3020	-	-	-	-	-
3021	+	+	-	-	-
3022	-	-	-	-	-
3023	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัสเชื้อ	กิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช				
	การตรึงไนโตรเจน บนอาหาร glucose nitrogen-free agar	การตรวจสอบ ยีน <i>nifH</i>	การเพิ่มการ ละลายฟอสเฟต	Dual Culture	
				<i>X. oryzae</i>	<i>P. grisea</i>
3024	+	+	-	-	-
3025	-	-	-	-	-
3026	-	-	-	-	-
3027	+	+	+	-	-
3028	+	+	+	-	-
3029	+	+	-	-	-
3030	+	+	-	-	-
3031	+	+	-	-	-
3032	-	-	-	-	-
3033	+	+	-	-	+
3034	-	-	-	-	-
3035	-	-	-	-	-
3036	-	-	-	-	-
3037	-	-	-	-	-
3038	+	+	-	-	+
3039	+	+	+	-	-
3040	-	-	-	-	-
3041	-	-	-	-	-
3042	+	+	-	-	-
3044	-	-	-	-	-
3045	+	+	+	-	-
3046	+	+	-	-	-
3047	-	-	-	-	+
3048	+	-	-	-	+
3049	+	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัสเชื้อ	กิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช				
	การตรึงไนโตรเจน บนอาหาร glucose nitrogen-free agar	การตรวจสอบ ยีน <i>nifH</i>	การเพิ่มการ ละลายฟอสเฟต	Dual Culture	
				<i>X. oryzae</i>	<i>P. griseae</i>
3050	-	-	-	-	-
3051	-	-	-	-	-
3052	+	+	-	-	+
3053	+	-	-	-	-
3054	+	+	-	-	-
3055	-	-	-	-	-
3056	+	+	-	-	-
3065	+	+	-	-	-
3067	+	+	-	-	-
3068	+	+	+	-	-
3069	+	+	-	-	-
3071	+	+	-	-	-
3072	+	+	-	-	-
3074	-	-	-	-	-
3075	-	-	-	-	-
3076	+	-	-	-	-
3077	+	-	-	-	+
3078	-	-	-	-	+
4001	-	-	-	-	-
4002	+	-	-	-	-
4003	-	-	+	-	-
4004	+	+	-	-	-
4005	-	-	-	-	-
4006	+	-	-	-	-
4007	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัสเชื้อ	กิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช				
	การตรึงไนโตรเจน บนอาหาร glucose nitrogen-free agar	การตรวจสอบ ยีน <i>nifH</i>	การเพิ่มการ ละลายฟอสเฟต	Dual Culture	
				<i>X. oryzae</i>	<i>P. griseae</i>
4008	-	-	-	-	-
4009	+	+	-	-	-
4010	+	+	-	-	-
4011	+	+	-	-	-
4012	+	-	-	-	-
4013	-	-	-	-	-
4014	+	+	-	-	-
4015	+	+	-	-	+
4016	+	+	-	-	-
4017	+	+	-	-	-
4018	+	-	-	-	-
4020	+	+	-	-	-
4024	+	+	-	-	-
4025	+	-	-	-	-
4026	+	+	-	-	-
4027	+	-	-	-	-
4028	+	+	+	-	+
4029	+	+	-	-	-
4030	+	+	-	-	-
4031	+	-	-	-	-
4032	+	+	-	-	-
4033	+	+	-	-	-
4034	+	+	-	-	-
4035	-	-	+	-	+
4036	+	+	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัสเชื้อ	กิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช				
	การตรึงไนโตรเจน บนอาหาร glucose nitrogen-free agar	การตรวจสอบ ยีน <i>nifH</i>	การเพิ่มการ ละลายฟอสเฟต	Dual Culture	
				<i>X. oryzae</i>	<i>P. grisae</i>
4037	+	-	-	-	-
4038	+	+	-	-	-
4039	-	-	-	-	+
4040	+	+	-	-	+
4041	+	+	-	-	+
4042	-	-	-	-	-
4043	-	-	-	-	-
4044	+	+	-	-	-
4045	+	-	-	+	-
4046	-	-	-	-	-
4047	+	+	-	-	-
4048	+	+	-	-	-
4049	-	-	-	-	-
4050	+	+	-	-	-
4051	-	-	-	-	-
4052	+	+	-	-	-
4053	+	+	-	-	-
4054	+	+	-	-	-
4055	-	-	-	-	-
4056	+	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาวิจัยยังเชื่อก่อโรคในข้าวโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์และกิจกรรมการส่งเสริม การเจริญเติบโตของพืช

ชวณรงค์ เรืองช่วย, วรรณฤดี สดชื่น, อังศนา ดาราสร, ชนิษฐา ดอกเงิน, พนิดา เขาแก้ว,
สุกฤตา วุฒิธรรมาภรณ์, โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา
ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

แบคทีเรียเอนโดไฟต์คือแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชโดยที่ไม่ก่อให้เกิดโรคหรืออันตรายกับต้นพืช การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์หลายสายพันธุ์สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ทั้งในทางตรงและทางอ้อม งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 192 ไอโซเลตที่แยกได้จากข้าวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว 2 ชนิดได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ที่ก่อโรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight disease) และเชื้อรา *Pyricularia grisea* ที่ก่อโรคใบไหม้ (leaf blast disease) ในข้าว การทดสอบด้วยวิธีการ Dual culture แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 3 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* และมีแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 24 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *P. grisea* ได้ นอกจากนี้ยังพบด้วยว่ามีแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งได้ทั้งการเจริญเติบโตของ *X. oryzae* และ *P. grisea* เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ถูกนำมาศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญของพืชเพิ่มเติมคือความสามารถในการตรึงไนโตรเจน, การเพิ่มการละลายของฟอสเฟต และการสร้างสารซิเดอโรฟออร์ ผลการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 31 ไอโซเลตมีแบคทีเรียจำนวน 24 ไอโซเลตที่แสดงกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญของพืชอย่างน้อย 1 กิจกรรม งานวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพและตัวควบคุมทางชีวภาพในนาข้าวโดยธรรมชาติอย่างยั่งยืนในอนาคต

EP-08

Study of endophytic bacteria with antagonistic activities against rice pathogens and their plant-growth-promoting activities

Channarong Ruengchuey, Wanrudée Sodcheun, Angsana Daraorn, Khanittha

Dokngoen, Parida Khaokaew, Sukritta Wuttitummaporn,

Chokchai Kittiwongwattana

Department of Biology, Faculty of Science,

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Endophytic bacteria colonize the internal tissues of a plant host without causing any detrimental effects or diseases to the host. Several strains of endophytic bacteria demonstrated both direct and indirect plant-growth-promoting activities. The main objective of this research was to study the growth inhibition of rice pathogens by 192 isolates of endophytic bacteria isolated from rice. The rice pathogens used in this study were *Xanthomonas oryzae* and *Pyricularia grisea* that cause bacterial leaf blight and leaf blast diseases. The dual culture test showed that three bacterial isolates were able to inhibit growth of *X. oryzae* whereas 24 isolates inhibited growth of *P. grisea*. Additionally, four isolates displayed antagonistic effects against both *X. oryzae* and *P. grisea*. These 31 isolates were subsequently studied for other plant-growth-promoting activities that included nitrogen fixation, phosphate solubilization and siderophore production. All tests were performed on minimal media, and 24 isolates displayed at least one activity. Taken together, the results obtained from this research demonstrated the potential of endophytic bacteria for future use as biofertilizers and biocontrol agents.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งทุน: เงินรายได้ประเภทส่งเสริมวิจัย
ชื่อโครงการ : การตรึงไนโตรเจน, การละลายฟอสเฟตและการต้านทานโรคของแบคทีเรียแอโนโตไฟด์จากข้าวพันธุ์หอมมะลิและไรซ์เบอร์รี่
ชื่อหัวหน้าโครงการ: ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

ว/ด/ป	รายการ	เลขอ้างอิง	รายการรับ - จ่าย			รายการรับ	รายการจ่าย					รวม
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	ดอกเบี้ยรับ	งบบุคลากร		งบดำเนินงาน	งบลงทุน	รวม	
	รวมครั้งที่ 1						-		13,540.11	-	13,540.11	
ครั้งที่ 2												
17 ต.ค. 59	No. GBB100 Presto Mini gDNA Bacteria kit,	114006							12,454.80		12,454.80	
	100 preps/kit										-	
27 ต.ค. 59	No.GZR100 GeneZol Reagent	7265							7,265.30		7,265.30	
31 ต.ค. 59	No.20F Primer 16 bases, Purified Salt Free	115607							635.58		635.58	
	No.1541R Primer 17 bases, Purified Salt Free										-	
31 ต.ค. 59	R2A Broth "Hi-media" India, Cat. M1687	59-08-3420							2,675.00		2,675.00	
	(500 gm/bot)										-	
5 ก.ย. 59	Pseudomonas CFC supplement, 10 Vial,	QT590900013							3,984.68		3,984.68	
	Oxoid										-	
14 ก.ย. 59	Sp DNA sequencing	59090329							6,291.60		6,291.60	
22 ก.ย. 59	Hicromebacillus agar Cat.M 1651	59-09-3760							3,049.50		3,049.50	
	"Hi-media" 500gqm.										-	
30 ก.ย. 59	กระดาษ	1469							130.00		130.00	
30 ก.ย. 59	กระดาษ	1470							150.00		150.00	
	ปกรายงาน											
	รวมครั้งที่ 2						-		6,291.60		30,344.86	
										-		36,636.46

ลงชื่อหัวหน้าโครงการ วันที่

ประวัตินักวิจัย

- 1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chokchai Kittiwongwattana
- 2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผศ.ดร.
- 3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก 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 การทำลายพืชมดืเอนเอ การทำพันธุ์วิศวกรรม เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในการถ่ายฝากยีน
- 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย
 - 3.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :-
 - 3.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :-

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

-การศึกษาการผลิตเอทานอลจาก *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: ผู้ร่วมวิจัยระหว่างการศึกษาในระดับปริญญาเอก

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

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

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

-การศึกษาการผลิตเอทานอลจาก *Spirodela polyrrhiza*

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: ทุนวิจัย วช. ประจำปีงบประมาณ 2556

ระยะเวลาโครงการวิจัย: 1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556

