รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากต้นแก่นตะวัน

(*Helianthus tuberosus*)

นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ ประเภทงานวิจัยเชิงวิชาการ

ประจำปีงบประมาณ 2560

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากต้นแก่นตะวัน

(*Helianthus tuberosus*)

นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

b.00266594
i.
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 149113
วัน.เดือน.ปี - 4 ธ.ค. 2561

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ ประเภทงานวิจัยเชิงวิชาการ

ประจำปีงบประมาณ 2560

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 3

1.5 สมมติฐานงานวิจัย และกรอบแนวความคิดในการวิจัย 3

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 10

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่พบในพืชแก่นตะวัน 10

3.2 การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 10

3.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย endophytes ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล 11

3.4 การจัดจำแนกกลุ่มชนิดแบคทีเรียของ isolate ต่างๆ โดยการใช้เทคนิค ARDRA 12

3.5 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในสารละลายกลีเซอรอล 12

3.6 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยวิธี lyophilization 12

3.7 การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียใน pH ต่างๆ 13

3.8 การศึกษาการทนทานของแบคทีเรียต่อความเข้มข้นต่างๆ ของเกลือ 13

3.9 การศึกษา cellular fatty acid 13

3.10 การศึกษาการสร้างเอนไซม์คะตาเลสโดยแบคทีเรีย 14

3.11 การเตรียมสารละลายเชื้อเพื่อทดสอบการสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ 14

3.12 การทดสอบการสร้างกรดด้วยชุดทดสอบ API 50CH 14

3.13 การวิเคราะห์ polar lipid ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 14

3.14 การวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอ 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.15 การวิเคราะห์องค์ประกอบเบสของดีเอ็นเอ 15
3.16 การทดสอบความสามารถในการสร้างฮอร์โมน IAA โดยแบคทีเรีย 15
3.17 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรีย 15
3.18 การตรวจสอบการเพิ่มการละลายฟอสเฟตโดยแบคทีเรีย 16
3.19 การทดสอบการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย 16
บทที่ 4 ผลการวิจัย 17
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากต้นแก่นตะวัน 17
4.2 การจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยวิธี ARDRA 17
4.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี pairwise alignment 22
4.4 กิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 25
4.5 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลต roo10 30
4.6 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และชีวเคมีของแบคทีเรีย *Pseudoxanthomonas* sp. roo10 34
4.7 การวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ 37
4.8 การวิเคราะห์ polar lipid และปริมาณเบสที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ (G+C content) 39
4.9 การวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอ 39
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 41
5.1 สรุปผลการวิจัย 41
5.2 ข้อเสนอแนะ 42
บทที่ 5 สรุปผลผลิตงานวิจัย 44
เอกสารอ้างอิง 45
ภาคผนวก 49
ภาคผนวก ก การเผยแพร่ผลงานวิจัยในรูปแบบบทความวิจัย 50
สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย 56
ประวัตินักวิจัย 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1	17
4.2	19
4.3	23
4.4	28
4.5	36
4.6	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1	18
4.2	26
4.3	26
4.4	27
4.5	28
4.6	31
4.7	32
4.8	33
4.9	34
4.10	36
4.11	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากต้นแก่นตะวัน
(*Helianthus tuberosus*)
แหล่งเงิน เงินงบประมาณรายได้ ประเภทงานวิจัยเชิงวิชาการ
ประจำปีงบประมาณ 2560 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 320,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2559 ถึง 30 กันยายน 2560
หัวหน้าโครงการ: นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

ต้นแก่นตะวันตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งเพาะปลูกในจังหวัดกาญจนบุรีถูกนำมาศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ตลอดจนคุณสมบัติของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ในงานวิจัยครั้งนี้สามารถแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากหัว, ราก, ลำต้น และใบของต้นพืชได้รวมทั้งสิ้น 90 ไอโซเลต การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี amplified ribosomal DNA restriction analysis แบ่งแบคทีเรียออกเป็น 53 กลุ่ม เมื่อนำผลการวิเคราะห์ pairwise alignment ของลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียตัวแทนจากทุกกลุ่มจำนวน 60 ไอโซเลตมาวิเคราะห์ร่วมกันแล้วพบว่าแบคทีเรียทั้ง 90 ไอโซเลตจัดอยู่ในไฟลัมที่แตกต่างกัน 3 ไฟลัมได้แก่ *Proteobacteria* จำนวน 68 ไอโซเลต *Actinobacteria* จำนวน 16 ไอโซเลต และ *Firmicutes* จำนวน 6 ไอโซเลต และแบ่งแยกออกเป็นสกุลที่แตกต่างกันจำนวน 17 สกุล ผลแบคทีเรียตัวแทน 60 ไอโซเลตถูกนำมาตรวจสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในด้านต่างๆ ได้แก่การสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA, เอนไซม์ ACC deaminase, การตรึงไนโตรเจนและการเพิ่มการละลายของสารประกอบฟอสเฟตพบว่ามีแบคทีเรียตัวแทนจำนวน 54 ไอโซเลตที่แสดงกิจกรรมอย่างน้อย 1 กิจกรรม ในจำนวนนี้มีแบคทีเรีย 12 ไอโซเลตที่แสดงกิจกรรมที่แตกต่างกัน 3 กิจกรรม นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ roo10 ยังเป็นแบคทีเรียที่มีความเป็นไปได้ว่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่เนื่องจากมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสยีน 16S rRNA กับแบคทีเรียที่อยู่ในฐานข้อมูลเพียงร้อยละ 97.89 เมื่อนำแบคทีเรียนี้มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการร่วมกับการตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์,ชีวเคมี และองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์แล้วพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ roo10 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Pseudoxanthomonas kalamensis* JA40^{T} , *Pseudoxanthomonas sangjuensis* 5GH38-5^{T} และ *Pseudoxanthomonas daejeonensis* TR6-08 มากที่สุดและยังแสดงลักษณะต่างๆ ที่แตกต่างไปจากแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงเหล่านี้ด้วย

คำสำคัญ : แก่นตะวัน, แบคทีเรียเอนโดไฟต์, กิจกรรมการส่งเสริมการเจริญของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: **Isolation and characterization of endophytic bacteria from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*)**

Researcher: Dr.Chokchai Kittiwongwattana

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

ABSTRACT

Jerusalem artichoke plants were collected from a farm in Kanchanaburi province. Ninety endophytic bacteria were isolated from tubers, roots, stems and leaves and studied for their biodiversity and plant-growth-promoting activities. Amplified ribosomal DNA restriction analysis of the 16S rRNA gene of endophytic bacteria divided them into 53 groups. Sixty isolates were choses as representatives of each group and subject to the pairwise alignment analysis. Taken together, the results showed that 90 endophytic bacteria were members of *Proteobacteria* (68 isolates), *Actinobacteria* (16 isolates) and *Firmicutes* (6 isolates). They were also members of seventeen different genera. Sixty representative bacteria were studied for their plant-growth-promoting activities including IAA sysnthesis, ACC deaminase, nitrogen fixation and phosphate solubilization. The results showed that there were 54 isolates that displayed at least one activity. Among these, there were 12 isolates that exhibited three different activities. Strian roo10 showed a relatively low 16S rRNA gene sequence similarity (97.89%) with those of characterized bacterial species in the database. Phylogenetic analysis and phenotypic, biochemical and chemotypic characterization indicated that strain roo10 was readily distinguishable from its closely related species including *Pseudoxanthomonas kalamensis* JA40^{T}, *Pseudoxanthomonas sangjuensis* 5GH38-5^{T} and *Pseudoxanthomonas daejeonensis* TR6-08^{T}. This result suggested that it might represent a novel species in the genus *Pseudoxanthomonas*.

Keywords : Jerusalem artichoke, endophytic bacteria, plant-growth-promoting activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียหลายชนิดถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตของมนุษย์ทั้งในแง่ของการผลิตอาหาร การกำจัดของเสีย การเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นต้น นอกเหนือไปจากแบคทีเรียที่เป็นที่รู้จักในปัจจุบันแล้ว ยังมีแบคทีเรียอีกหลายชนิดในธรรมชาติที่ยังไม่ได้รับการศึกษาและอาจสามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อพัฒนาคุณภาพชีวิตและความเป็นอยู่ของมนุษย์ได้ แบคทีเรียที่เป็นประโยชน์เหล่านี้สามารถถูกพบได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลายทั้งในบริเวณที่อุดมสมบูรณ์ และบริเวณที่มีความเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ถิ่นที่อยู่ของแบคทีเรียอีกแหล่งหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจศึกษาจากนักวิทยาศาสตร์คือภายในต้นพืชซึ่งมีช่องว่างระหว่างเซลล์ภายในเนื้อเยื่อให้แบคทีเรียหลากหลายชนิดอาศัยอยู่ได้ แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในพืชดังกล่าวนี้และไม่ก่อให้เกิดอันตรายหรือชักนำให้เกิดโรคกับพืชเจ้าบ้าน (host) เรียกว่าแบคทีเรีย endophytes การศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่าช่องว่างภายในเนื้อเยื่อพืชนอกจากจะเป็นแหล่งที่พบแบคทีเรียชนิดใหม่ๆ แล้ว แบคทีเรีย endophytes เหล่านี้เองก็มีความสัมพันธ์ในแง่ของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promotion) ด้วย โดยแบคทีเรีย endophytes บางชนิดมีการสร้างสารที่กระตุ้นให้พืชมีการเจริญเติบโตที่สูงขึ้น เช่น ฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน หรือมีความสามารถในการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารที่สำคัญ เช่น ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัสให้แก่พืชได้ ความสามารถดังกล่าวของแบคทีเรีย endophytes ส่งผลให้พืชที่ดำรงชีวิตร่วมกับแบคทีเรียชนิดนั้นมีผลผลิตและชีวมวลที่สูงขึ้น นอกจากนี้แบคทีเรีย endophytes บางชนิดสามารถส่งเสริมให้พืชสามารถเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่นดินเค็ม ดินปนเปื้อนสารเคมีที่เป็นพิษได้ดีขึ้น โดยการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ที่ขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอธิลีนที่ยับยั้งการเจริญของพืช รวมไปถึงแบคทีเรีย endophytes ที่สามารถชักนำให้พืชมีความต้านทานต่อศัตรูพืชทั้งชนิดที่เป็นแบคทีเรีย (pathogenic bacteria) และ เชื้อรา (pathogenic fungi) โดยแบคทีเรีย endophytes เหล่านี้อาศัยกลไกการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคพืช จากคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่างๆ ดังกล่าว แบคทีเรีย endophytes จึงจัดได้ว่าเป็นแหล่งทรัพยากรทางธรรมชาติที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ ด้วยเหตุนี้การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ในพืชชนิดต่างๆ ที่ยังไม่เคยได้รับการรายงานมาก่อนจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากพืชเหล่านี้มีศักยภาพสูงในการเป็นแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่ไม่เคยได้รับการค้นพบมาก่อน และแบคทีเรียเหล่านี้อาจมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชสูงกว่าแบคทีเรียชนิดหรือสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อื่นๆ ที่ได้รับการค้นพบมาก่อนหน้า กอปรกับประเทศไทยมีพื้นที่ตั้งอยู่ในบริเวณที่จัดได้ว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพที่สูงแห่งหนึ่งของโลก ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่อาศัยอยู่ภายในส่วนต่างๆ ของต้นแก่นตะวัน (Jesusalem artichoke, Sunchoke) ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Helianthus tuberosus* L. แก่นตะวันเป็นพืชที่มีประโยชน์หลากหลายด้านทั้งในแง่ของการใช้หัวเป็นอาหารและเป็นแหล่งสกัดสารให้ความหวานอินูลิน (inulin) และในแง่ของการเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ขับปัสสาวะ กระตุ้นการเจริญอาหารและการหลั่งของน้ำดี โครงการวิจัยนี้ครอบคลุมตั้งแต่การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรีย endophytes ที่พบในส่วนต่างๆ ของพืชแก่นตะวัน ได้แก่ ราก หัว ลำต้น และใบของต้นแก่นตะวันโดยการใช้เทคนิคระดับโมเลกุลตลอดจนการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ การสร้างฮอร์โมนพืช indole acetic acid (IAA), การสร้างเอนไซม์ ACC deaminase, การตรึงไนโตรเจน และการเพิ่มการละลายของฟอสเฟต ผลการศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่าจะได้รับความรู้เพิ่มมากขึ้นในแง่ของความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่อาศัยอยู่ภายในส่วนต่างๆ ของต้นแก่นตะวัน ตลอดจนอาจนำไปสู่การค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่ๆ หรือแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอื่นๆ และลดการพึ่งพาการใช้ปุ๋ยเคมีที่ส่งผลเสียต่อสภาพดินและสิ่งแวดล้อมได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อค้นหาแบคทีเรีย endophyte ที่มีประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในด้านต่างๆ ได้แก่ การสร้างฮอร์โมนพืช, การสร้างเอนไซม์ ACC-deaminase, การตรึงไนโตรเจน และการเพิ่มการละลายของฟอสเฟต

1.2.2 เพื่อศึกษาความหลากหลายของชนิดแบคทีเรีย endophyte ที่พบในราก หัว ลำต้น และใบของต้นแก่นตะวัน

1.2.3 เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียซึ่งอาจเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ไม่เคยได้รับการศึกษามาก่อน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย endophyte ที่พบในเนื้อเยื่อในส่วนของราก หัว ลำต้น และใบของต้นแก่นตะวัน โดยจะทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชจากแหล่งเพาะปลูกในประเทศแล้วมาคัดแยกให้ได้แบคทีเรียประมาณ 100 isolates เพื่อใช้จำแนกกลุ่มด้วยวิธี Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของ isolate ตัวอย่างอย่างน้อย 25% ของแต่ละกลุ่ม ARDRA เพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรีย ตลอดจนศึกษาคุณสมบัติในการสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฮอร์โมน IAA, การสร้างเอนไซม์ ACC-deaminase, การตรึงไนโตรเจน และการเพิ่มการละลายของฟอสเฟต ในแบคทีเรีย isolate ตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม ARDRA

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1.4.1 รวบรวมต้นพืชตัวอย่างจากแหล่งปลูกในจังหวัดกาญจนบุรี

1.4.2 นำต้นพืชตัวอย่างมาทำความสะอาดภายนอกแล้วคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์บนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ แล้วจัดจำแนกด้วยลำดับเบสของยีน 16S rRNA

1.4.3 การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน

1.4.4 การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเพิ่มการละลายสารประกอบฟอสเฟต

1.4.5 การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase

1.4.6 การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการตรึงแกสไนโตรเจน

1.4.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ด้วยวิธีการ polyphasic approach

1.5 สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

แก่นตะวันเป็นพืชที่ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ซึ่งความสามารถนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในต้นพืช ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่แบคทีเรียเหล่านี้จะมีคุณสมบัติต่างๆ ที่สำคัญต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในต้นแก่นตะวันยังมีอยู่น้อยจึงน่าที่จะมีแบคทีเรียชนิดใหม่อาศัยอยู่ในแก่นตะวัน

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบคุณสมบัติต่างๆ ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในต้นพืชแก่นตะวันที่สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ และทราบถึงความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียเหล่านี้ตลอดจนค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรีย endophytes คือแบคทีเรียที่มีแหล่งที่อยู่อาศัยภายในช่องว่างระหว่างเซลล์ภายในเนื้อเยื่อของส่วนต่างๆ ของพืชโดยที่ไม่ก่อให้เกิดอาการของโรค หรือก่อโทษใดๆ กับพืช (Mei and Flinn, 2010) แบคทีเรีย endophytes นั้นแตกต่างจากแบคทีเรียที่เป็น endosymbionts คือแบคทีเรีย endophytes ไม่มีการบุกรุกเข้าไปภายในเซลล์ของพืช การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes สามารถทำได้โดยนำพืชที่จะนำมาใช้คัดแยกแบคทีเรีย endophytes มาทำความสะอาดที่พื้นผิวภายนอก (surface-sterilization) ให้ปราศจากเชื้ออื่นๆ ที่เกาะอยู่ที่พื้นผิวภายนอกเสียก่อน แล้วทำการบดเนื้อเยื่อพืชและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม แบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้สามารถนำไปจัดจำแนกกลุ่มและชนิด (species) ด้วยเทคนิคในระดับโมเลกุลที่เหมาะสมต่อไป ตัวอย่างเช่นงานวิจัยที่ทำการแยกแบคทีเรีย endophytes ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของต้นถั่วเหลือง (*Glycine max*) พันธุ์ปลูก Foscarin และ Cristalina แบคทีเรีย isolate ต่างๆ ที่แยกได้ถูกนำมาจัดจำแนกเป็นกลุ่มย่อยด้วยวิธีการ Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I แบคทีเรีย isolate ที่เป็นชนิดเดียวกันจะมีลำดับเบสของยีนดังกล่าวที่เหมือนกันส่งผลให้มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกันด้วย ซึ่งเมื่อแบ่งกลุ่มได้แล้วแบคทีเรีย isolate อย่างน้อย 30% ถูกนำไปหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA เพื่อจำแนกชนิด ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้ทำให้ทราบว่าแบคทีเรีย endophytes ที่พบในถั่วเหลืองพันธุ์ปลูกทั้งสองพันธุ์นั้นสามารถจัดจำแนกได้เป็นกลุ่มย่อย ARDRA 11 กลุ่ม และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย isolate ตัวอย่างทำให้ทราบว่าแบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้ประกอบไปด้วยแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในกลุ่ม α-, ß-, และ γ-proteobacteria (Kuklinsky-Sobral et al., 2004)

การศึกษาทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophyte ที่คัดแยกได้จากพืชชนิดต่างๆ นำไปสู่การค้นพบแบคทีเรียชนิด (species) ใหม่ๆ จำนวนมากที่ยังไม่เคยได้รับการศึกษามาก่อน ตัวอย่างเช่น การค้นพบแบคทีเรีย *Rhizobium paknamense* และ แบคทีเรีย *Rhizobium lemnae* ในพืชวงศ์ *Lemnaceae* (Kittiwongwattana and Thawai, 2013; Kittiwongwattana and Thawai, 2014) โดยแบคทีเรียในสกุล *Rhizobium* นั้นไม่เคยถูกรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับพืชวงศ์นี้มาก่อน นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียชนิดใหม่ในสกุลอื่นๆ ที่ถูกค้นพบว่าเป็นแบคทีเรีย endophyte ของพืชอื่นๆ ด้วย เช่น *Chryseobacterium soldanellicola*, *Chryseobacterium taeanense*, *Paenibacillus hunanensis* เป็นต้น (Park et al., 2006; Liu et

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

al., 2010) ในปัจจุบันการจัดจำแนกแบคทีเรียนั้นทำได้โดยการศึกษาในลักษณะของ polyphasic study ซึ่งเป็นการศึกษาลักษณะต่างๆ ของแบคทีเรียทั้งลักษณะทางฟีโนไทป์ คีโมไทป์ และลักษณะทางจีโนไทป์ โดยลักษณะทางฟีโนไทป์ที่นิยมใช้ศึกษากันคือการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง และความเข้มข้นของเกลือในระดับต่างๆ นอกจากนี้ยังรวมไปถึงการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีของแบคทีเรีย การเคลื่อนที่ และลักษณะของแฟลกเจลลัมด้วย ในส่วนของการศึกษาลักษณะทางคีโมไทป์นั้นหมายถึงการศึกษา องค์ประกอบเบสของดีเอ็นเอ, ชนิดของ polar lipid, fatty acid และ isoprenoid quinone ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ส่วนการศึกษาทางด้านจีโนไทป์จะประกอบด้วยกันสองส่วน ส่วนแรกคือการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็นสปีชีส์ใหม่กับลำดับเบสของแบคทีเรียที่ได้รับการจัดจำแนกแล้วและถูกเก็บอยู่ในฐานข้อมูลสาธารณะเช่น GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เป็นต้น โดยถ้าหากเปอร์เซนความคล้ายคลึงของลำดับเบสมีค่าต่ำ (น้อยกว่า 98.5%) แบคทีเรียดังกล่าวมีโอกาสที่จะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่สูง ซึ่งสามารถยืนยันได้โดยการศึกษาในส่วนที่สองซึ่งหมายถึงการศึกษาความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสของทั้งจีโนมของแบคทีเรียดังกล่าวเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดกันมากที่สุด ซึ่งถ้าหากความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอของจีโนมมีค่าต่ำกว่า 70% จะถือว่าแบคทีเรียดังกล่าวนั้นเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ (Stackebrandt and Ebers, 2006)

แหล่งที่อยู่ที่เหมาะสมต่อการศึกษาเพื่อค้นหาแบคทีเรีย endophytes ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์มีอยู่ 5 แหล่งด้วยกัน ได้แก่ 1. พืชที่เจริญเติบโตในพื้นที่ที่อุดมสมบูรณ์ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง 2. พืชที่เจริญเติบโตในพื้นที่ที่มีลักษณะเฉพาะ เช่นพื้นที่ที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ หรือพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารเคมีหรือโลหะหนัก พื้นที่รูปแบบนี้เปรียบได้กับกลไกการคัดเลือกทางธรรมชาติรูปแบบหนึ่ง พืชที่สามารถเจริญอยู่ได้จึงอาจมีการพึ่งพาแบคทีเรีย endophytes ให้สามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมดังกล่าวได้ 3. พืชที่ถูกปลูกในพื้นที่ที่มีการบุกรุกของเชื้อโรคแต่ไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่แบคทีเรีย endophytes ที่อยู่ในพืชนั้นอาจส่งเสริมให้เกิดกลไกการป้องกันตัวเองของพืชจากศัตรูพืชได้ดีขึ้น 4. พืชที่มีการนำมาประยุกต์ใช้เป็นยาสมุนไพรโดยมนุษย์ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชเหล่านี้อาจมีแบคทีเรีย endophytes ที่มีการผลิตสารที่เป็นประโยชน์ต่อพืชและมนุษย์อยู่ด้วย และ 5. พืชที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในพื้นที่จำกัดพื้นที่หนึ่งมาเป็นช่วงระยะเวลายาวนาน ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะพบแบคทีเรีย endophytes ที่มีการวิวัฒนาการที่จำเพาะเจาะจงร่วมกันกับพืชชนิดนั้นๆ (Yu et al., 2010)

ต้นแก่นตะวันที่มีชื่อสามัญว่า Jerusalem artichoke และมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus* L. โดยจัดเป็นพืชในวงศ์และสกุลเดียวกันกับต้นทานตะวันคือวงศ์ Asteraceae สกุล *Helianthus* แก่นตะวันมีการสร้างหัวอยู่ใต้ดินซึ่งมีการสะสมคาร์โบไฮเดรตอยู่ในปริมาณสูง (20% โดยน้ำหนัก) โดยที่ 70-90% ของคาร์โบไฮเดรตที่สะสมนี้อยู่ในรูปของอินูลิน (inulin) ที่มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลฟรุคโตสต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันเป็นสายยาวและมีน้ำตาลกลูโคสอยู่ที่ปลายสายของโมเลกุล ในปัจจุบันได้มีการใช้แก่นตะวันเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอธานอลจากจุลินทรีย์, การผลิต single cell protein และการผลิตไขมัน (Sun et al., 2009a) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้หัวแก่นตะวันเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับสาหร่ายเซลล์เดียวในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลอีกด้วย (Cheng et al., 2009) แก่นตะวันจัดเป็นพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และมีความต้านทานต่อโรคพืชหลายชนิด (Sun et al., 2009a) ซึ่งความสามารถในการทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมของต้นแก่นตะวันนี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นผลสืบเนื่องมาจากกิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรีย endophyte ดังนั้นแล้วแก่นตะวันจึงจัดได้ว่ามีความน่าสนใจในการนำมาใช้ศึกษาคัดแยกแบคทีเรีย endophyte ที่มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เมื่อทำการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยทางด้านแบคทีเรีย endophyte ในต้นแก่นตะวันพบว่ามีงานวิจัยรายงานไว้เพียงชิ้นเดียวโดย Meng et al. (2011) ซึ่งรายงานการคัดแยกแบคทีเรีย endophyte ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ และแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังสามารถผลิตฮอร์โมน IAA และส่งเสริมการละลายฟอสเฟตได้ด้วย

กลไกหนึ่งของแบคทีเรีย endophytes ในการส่งเสริมอัตราการเจริญเติบโตของพืชคือการสร้างฮอร์โมน IAA ซึ่งจัดเป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินที่มีความสำคัญในแง่ของการกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์พืช การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการ inoculate เชื้อแบคทีเรียที่สังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ในรากพืชสามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชโดยส่งผลให้พืชมีการสร้างขนรากและรากแขนงเพิ่มมากขึ้นซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของพื้นที่ผิวโดยรวมของระบบรากพืช ทำให้พืชมีความสามารถในการดูดซับน้ำและแร่ธาตุที่สำคัญต่อพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นนั่นเอง ในขณะที่แบคทีเรียกลายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ได้ โดยแบคทีเรียพันธุ์กลายนี้ไม่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้เหมือนกับแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild-type) ผลการศึกษานี้จึงเป็นการยืนยันถึงความสำคัญของฮอร์โมน IAA ของแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Spaepen and Vanderleyden, 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการตอบสนองของข้าวต่อฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นโดยเป็นการใช้ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่มีโปรโมเตอร์ของยีน *DR5* ต่ออยู่กับยีนรายงานผล GUS โปรโมเตอร์ของยีน *DR5* นั้นจัดเป็นโปรโมเตอร์ที่มีความไวในการตอบสนองต่อฮอร์โมน IAA สูง ซึ่งพืชที่ถูก inoculate ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมน IAA ก็มีการแสดงออกของยีนรายงานผล GUS ในปริมาณที่สูง แสดงให้เห็นว่าพืชนั้นมีการตอบสนองในระดับโมเลกุลต่อฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรียผลิตขึ้น (Mattos et al., 2008) กลไกการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA นั้นถูกค้นพบและศึกษาในแบคทีเรียหลายชนิด โดยมีการประมาณการเอาไว้ว่าประมาณ 80% ของแบคทีเรียกลุ่มที่เรียกว่า rhizosphere bacteria ที่อาศัยอยู่รอบๆ รากพืชนั้นสามารถสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ได้ (Patten and Glick, 1996; Khalid et al., 2004) แบคทีเรียใช้กรดอะมิโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

tryptophan เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA การศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่ากลไกการสังเคราะห์ IAA จากกรดอะมิโน tryptophan ในแบคทีเรียนั้นมีอยู่ด้วยกันอย่างน้อย 5 รูปแบบที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ดีกลไกต่างๆ เหล่านี้ส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกันกับกลไกการสังเคราะห์ IAA ของพืช (Spaepen and Vanderleyden, 2010) ดังนั้นแล้วการตรวจสอบความสามารถในการสร้างฮอร์โมนชนิดนี้ของแบคทีเรียจึงทำได้โดยเติมกรดอะมิโน L-tryptophan ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจสอบปริมาณของฮอร์โมน IAA ที่แบคทีเรียปลดปล่อยออกมาด้วยการใช้น้ำยาตรวจสอบ Salkowski's reagent (Bric et al., 1991)

การยับยั้งการสร้างฮอร์โมนเอธิลีน (ethylene) ของพืชจัดเป็นอีกกลไกหนึ่งในการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแบคทีเรีย endophyte โดยเอธิลีนนั้นเป็นฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อลดการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะเครียดที่เกิดจากปัจจัยภายนอกต่างๆ ดังนั้นแล้วการยับยั้งการสร้างฮอร์โมนชนิดนี้ในพืชจึงมีผลในทางคงอัตราการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะเครียดได้อีกทางหนึ่ง แบคทีเรีย endophytes หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมในการเปลี่ยน 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่พืชใช้ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอธิลีนให้เป็น α-ketobutyrate และ แอมโมเนีย ทำให้พืชไม่สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนเอธิลีนได้ และแอมโมเนียที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยาจะเป็นแหล่งไนโตรเจนให้แบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป (Glick et al., 1998; Glick, 2005) การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรีย *Burholderia phytofirmans* สายพันธุ์ PsJN ที่ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ถูกทำให้หายไป (deletion mutation) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียพันธุ์กลายนี้สูญเสียความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชไปด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้ยืนยันให้เห็นถึงความสำคัญของเอนไซม์ ACC deaminase จากแบคทีเรีย (Sun et al., 2009b) การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase สามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น ACC เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นกลุ่มควบคุมบวก และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นกลุ่มควบคุมลบ แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ได้จะสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารชนิดที่ 1 และ 2 แต่ไม่เจริญในอาหารชนิดที่ 3 ในทางตรงกันข้าม แบคทีเรียที่ไม่มีการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase จะสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารชนิดที่ 2 เพียงอย่างเดียว (Penrose and Glick, 2003)

ไนโตรเจนจัดเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก และสารอื่นๆ ที่สำคัญของพืช ปริมาณของธาตุไนโตรเจนเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเช่น ข้าว เป็นอย่างมาก (Ji et al., 2014) ทว่าธาตุไนโตรเจนที่พบในธรรมชาติส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของแกสไนโตรเจน (N_2) ที่พืชไม่สามารถนำมาใช้ได้ในทันที ด้วยเหตุนี้ในการทำเกษตรกรรมจึงมีความนิยมเสริมความสมบูรณ์ของดินด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีลงไปด้วย ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้ส่งผลต่อการเพิ่มต้นทุนในการผลิตพืช และการปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติก็ยังส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมอีกด้วย ดังนั้นแล้วงานวิจัยจำนวนมากจึงมุ่งคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (diazotrophic bacteria) ที่สามารถตรึงแกสไนโตรเจนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งละลายน้ำและพืชสามารถนำไปใช้ได้ และแบคทีเรียหลายชนิดยังถูกพบว่าเป็นแบคทีเรีย endophyte ที่สามารถอาศัยอยู่ร่วมกับพืชได้ด้วย ดังนั้นแล้วพืชจึงได้รับประโยชน์จากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของพืชได้โดยตรง และส่งผลให้การเจริญเติบโตของพืชเพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่นการศึกษาประโยชน์ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Gluconacetobacter diazotrophicus* spp. *Azospirillum* spp. และ *Herbaspirillum* spp. ต่อการเจริญเติบโตของอ้อย เป็นต้น (Taule et al., 2011)

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารอีกชนิดหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช การขาดธาตุฟอสฟอรัสจะยับยั้งการเจริญเติบโตทั้งในรากและลำต้น ตลอดจนการเจริญและพัฒนาของดอก ผล และเมล็ด (Ji et al., 2014) สาเหตุหนึ่งของการขาดฟอสฟอรัสในดินคือการที่ฟอสฟอรัสอยู่ในสภาพที่ไม่ละลายน้ำทั้งในรูปของเกลือ calcium phosphate, aluminium phosphate และ iron phosphate การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียในธรรมชาติทั้งที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช และดำรงชีวิตแบบอิสระมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการละลายน้ำของเกลือฟอสเฟต ซึ่งปริมาณฟอสฟอรัสที่เพิ่มขึ้นนี้จะส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของต้นพืช (Marra et al., 2012) ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถเพิ่มการละลายของฟอสเฟตได้ เช่นแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas, Bacillus, Rhizobium, Flavobacterium* เป็นต้น (Khan et al., 2006) กลไกในการเพิ่มการละลายของฟอสเฟตของแบคทีเรียกลุ่มนี้ถูกพบว่ามีความสัมพันธ์กับการสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาจากเซลล์ของแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น กรด citric, oxalic, gluconi, 2-ketogluconic เป็นต้น (Marra et al., 2012; Wagh et al., 2014) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยว่าแบคทีเรีย *Herbaspirillum seropedicae* ที่มีการแสดงออกของยีนใน citrate operon ที่สูงขึ้นนั้นมีความสามารถในการเพิ่มการละลายของฟอสเฟต และส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวน้อยกว่า (Wagh et al., 2014)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(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) งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งโดย Jasim et al. (2013) ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย endophyte ที่แยกได้จากพืช *Piper nigrum* มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหลายด้านทั้งในแง่ของการสร้างฮอร์โมน IAA, การสร้างเอนไซม์ ACC deaminase และการเพิ่มการละลายของฟอสเฟต โดยผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าการ inoculate เชื้อแบคทีเรีย endophyte ที่มีคุณสมบัติต่างๆ เหล่านี้ลงไปบนต้นพืช *P. nigrum* สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของราก และลำต้นของพืชได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการ inoculate ด้วยเชื้อแบคทีเรีย endophyte งานวิจัยโดย Ji et al. (2014) ก็ได้แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงต้นข้าวร่วมกับแบคทีเรีย endophyte ที่เป็น diazotrophic bacteria ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้นั้นส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวทั้งในแง่ของความสูง และน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้แบคทีเรียกลุ่มนี้ยังแสดงความสามารถอื่นๆ ที่ส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ การสร้างฮอร์โมน IAA การเพิ่มการละลายของฟอสเฟต และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่ก่อโรคในข้าว อีกประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจเกี่ยวกับการศึกษาทางด้านแบคทีเรีย endophyte คือการที่แบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้จากพืชชนิดหนึ่งสามารถนำไปใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชชนิดอื่นๆ 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) ด้วยเหตุนี้การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรีย endophytes ที่แยกได้จากต้นแก่นตะวันจึงมีความเป็นไปได้ว่าเราจะพบแบคทีเรีย endophyte สายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ และยังจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่แสดงให้เห็นว่าการศึกษาความหลากหลายทางชีววิทยาของแบคทีเรีย endophyte นั้นมีความจำเป็นอย่างมากต่อการนำทรัพยากรจุลินทรีย์เหล่านี้มาประยุกต์ใช้ในการเกษตรกรรมอย่างรอบด้านเพื่อเพิ่มผลผลิตของพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆ ของประเทศต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่พบในพืชแก่นตะวัน

นำต้นพืชแก่นตะวันที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่จากแหล่งเพาะปลูกมาใช้ในการศึกษา โดยทำการแยกชิ้นส่วนของพืชออกเป็นส่วนของราก, หัว, ลำต้น และใบ จากนั้นทำการฟอกทำความสะอาดบริเวณผิวนอกของแต่ละชิ้นส่วนของพืชโดยการใช้สารละลาย 10% คลอรอกซ์ และ Tween-20 เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการล้างพืชในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อนาน 1 นาที 5 ครั้ง ย้ายชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชไปยังโกร่งที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ใส่น้ำกลั่นสะอาดที่ปราศจากเชื้อลงไปปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร และบดชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชแยกกัน แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันสองชนิดคือ tryptone soya agar ความเข้มข้น 1/10 เท่า และ starch caesine nitrate agar จากนั้นบ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนานเป็นระยะเวลา 10-14 วันแล้วทำการสุ่มคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มีลักษณะที่แตกต่างกันมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร tryptone soya agar ความเข้มข้น 1/10 เท่า และอาหาร starch casein nitrate agar จากนั้นแบคทีเรียแต่ละ isolate จะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single-colony streak และทำซ้ำเป็นจำนวนอย่างน้อย 5 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์พร้อมกับทำการตรวจสอบลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย และการติดสี Gram's ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้น้ำกลั่นที่ได้จากการล้างชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชในครั้งสุดท้ายจะถูกนำมาเพาะเชื้อด้วยเช่นกันเพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมแสดงให้เห็นว่าขั้นตอนการฟอกทำความสะอาดสามารถกำจัดแบคทีเรียที่อยู่ภายนอกต้นพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพและแบคทีเรียที่แยกได้คือแบคทีเรีย endophyte เท่านั้น

3.2 การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone soya agar หรือ nutrient 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

isopropanol ปริมาตรเท่ากันกับสารละลายดีเอ็นเอ ทำการผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาล้างในสารละลาย 70% ethanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงต่อ จากนั้นเทสารละลาย 70% ethanol ทิ้งไปแล้วนำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้ง ตะกอนดีเอ็นเอจะถูกนำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-EDTA ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเพื่อในปฏิกิริยา PCR ต่อไป

3.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย endophytes ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

ดีเอ็นเอที่แยกสกัดออกมาได้จากเชื้อแต่ละชนิดถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ universal ดังนี้

ไพรเมอร์ 27F: 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

ไพรเมอร์ 1492R: 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

ไพรเมอร์คู่ดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ในแบคทีเรียหลากหลายชนิดโดยปฏิกิริยา PCR มีองค์ประกอบต่างๆ เป็นดังนี้

DNA (50 ng/μl)	2 ไมโครลิตร
primer 27F (5 μM)	0.5 ไมโครลิตร
primer 1492R (5 μM)	0.5 ไมโครลิตร
10X buffer	1 ไมโครลิตร
2mM dNTP	1 ไมโครลิตร
25mM MgCl	0.2 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.05 ไมโครลิตร
H_2O	4.75 ไมโครลิตร

ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะถูกนำมาใส่รวมกันในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชิ้นของดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ที่เพิ่มจำนวนขึ้นมาได้นี้จะถูกนำมาตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis

3.4 การจัดจำแนกกลุ่มชนิดแบคทีเรียของ isolate ต่างๆ โดยการใช้เทคนิค ARDRA

สารละลายที่มีชิ้นดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA อยู่จะถูกนำมาวิเคราะห์จัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรีย เพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรีย isolate ใดน่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันโดยการใช้เทคนิค ARDRA ร่วมกับการใช้เอนไซม์ *Alu*I โดยปฏิกิริยามีดังนี้

สารละลายดีเอ็นเอ	8 ไมโครลิตร
10X Buffer	1 ไมโครลิตร
*Alu*I	0.1 ไมโครลิตร
H_2O	5.9 ไมโครลิตร

นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจผลของปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Alu*I โดยการใช้วิธี Agarose gel electrophoresis ซึ่งผลที่ได้จะเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากนั้นทำการจัดกลุ่มของ isolate ที่มีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันให้เป็นกลุ่ม ARDRA กลุ่มเดียวกัน จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่าง isolate อย่างน้อยร้อยละ 20 ของแต่ละกลุ่ม ARDRA ไปทำการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ 16S rRNA อีกครั้งหนึ่งด้วยวิธี PCR จากนั้นทำความสะอาดสารละลายดีเอ็นเอเพื่อกำจัดไพรเมอร์และเกลือต่างๆ ออกไปโดยการใช้น้ำยาสำเร็จรูป นำชิ้นดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์แล้วนี้ไปหาลำดับเบสโดยการใช้ไพรเมอร์ 27F ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของ isolate ตัวอย่างจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EzTaxon เพื่อจำแนกสกุลของแบคทีเรียเบื้องต้น ลำดับเบสนี้จะถูกนำมาใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของแบคทีเรีย endophyte ที่แยกได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ClustalW

3.5 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในสารละลายกลีเซอรอล

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

3.6 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยวิธี lyophilization

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย endophyte ที่น่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ไม่เคยได้รับการรายงานมาก่อนบนอาหารเหมือนกับในข้อ 16.5 จากนั้นเตรียมสารละลาย skim milk ความเข้มข้น 10% และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้เป็น lyophilization medium จากนั้นขูดเอาเชื้อแบคทีเรียมาละลายในสารละลาย skim milk ปริมาตร 500

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันดีแล้วนำสารละลายเชื้อนี้ไปเข้าเครื่อง lyophilizer เพื่อทำให้เซลล์แห้ง และเก็บไว้ในหลอดแก้วที่อุณหภูมิ 4°C

3.7 การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียใน pH ต่างๆ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone soya broth ที่มีค่า pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 โดยใช้ 1N HCl และ 1N NaOH ในการปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นไปตามที่ต้องการแล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คาดว่าจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่บนอาหาร tryptone soya agar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 2 วันแล้วใช้ลูปเขี่ยเชื้อขูดเชื้อแบคทีเรียออกมาจากผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไปละลายในสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อแล้วใช้ไมโครปิเปตต์ดูดเอาสารละลายเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH ต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 2 วัน แล้วสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ

3.8 การศึกษาการทนทานของแบคทีเรียต่อความเข้มข้นต่างๆ ของเกลือ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone soya broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือต่างๆ ได้แก่ 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% และ 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คาดว่าจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่บนอาหาร tryptone soya agar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 2 วันแล้วใช้ลูปเขี่ยเชื้อขูดเชื้อแบคทีเรียออกมาจากผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไปละลายในสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อแล้วใช้ไมโครปิเปตต์ดูดเอาสารละลายเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 2 วัน แล้วสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ

3.9 การศึกษา cellular fatty acid

แบคทีเรียถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร tryptic soya agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่เจริญเติบโตอยู่บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดหา cellular fatty acid โดยการใช้ methanolic hydrochloric acid ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยก cellular fatty acid โดยการใช้ petroleum ether แล้ววิเคราะห์ชนิดด้วยเครื่อง gas liquid chromatography ตามวิธีการที่กำหนดโดย Microbial Identification System (MIDI) Sherlock เวอร์ชัน 6.0 โดยผลการวิเคราะห์ที่ได้ถูกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล TSBA6 database ของ MIDI ชนิดของกรดไขมันที่พบในเซลล์แบคทีเรียจะถูกรายงานออกมาในรูปของเปอร์เซนต์ของกรดไขมันแต่ละชนิดต่อกรดไขมันทั้งหมดที่เซลล์แบคทีเรียสร้างได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10 การศึกษาการสร้างเอนไซม์คะตาเลสโดยแบคทีเรีย

เพาะเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่ผ่านการเผาไฟจนร้อนแดงแล้วมาเขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงไปบนกระจกสไลด์ แล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3% ลงไปทับเชื้อแบคทีเรียแล้วสังเกตปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์คะตาเลสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้จะเกิดฟองอากาศขึ้นมา

3.11 การเตรียมสารละลายเชื้อเพื่อทดสอบการสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ

เพาะเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแบคทีเรียขูดเอาเซลล์ออกมาใส่ลงไปในสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 3 ml แล้วนำไปผสมให้เข้ากันโดยการใช้เครื่อง vortex สารละลายเชื้อที่ได้จะถูกปรับให้มีความขุ่นใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐาน McFarland หมายเลข 4 จากนั้นใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายเชื้อปริมาตร 1 ml ใส่ลงไปในอาหาร API 50 CHB/E medium ซึ่งมีสีแดงแล้วผสมให้เข้ากันเพื่อนำไปใช้ทดสอบกับแผ่นทดสอบชุด API 50CH

3.12 การทดสอบการสร้างกรดด้วยชุดทดสอบ API 50CH

เตรียมถาดใส่แผ่นทดสอบโดยใส่น้ำกลั่นลงไปในหลุมให้ครบ แกะเอาแผ่นทดสอบ API 50 CH ออกมาใช้พาสเจอร์ปิเปตต์ดูดสารละลายเชื้อที่ผสมกับอาหารเรียบร้อยแล้วใส่ลงไปในช่องของแผ่นทดสอบ API 50 CH โดยใช้ปลายปิเปตต์แตะที่ด้านข้างของช่องแล้วค่อยๆ ปล่อยสารละลายเชื้อลงไปโดยระมัดระวังไม่ให้มีฟองอากาศและเติมให้เต็มช่องแต่ไม่ล้นออกมาที่บริเวณหลุม เมื่อเติมสารละลายครบทุกช่องแล้วใส่แผ่นทดสอบลงไปในถาดจากนั้นปิดฝาเพื่อป้องกันน้ำระเหย นำชุดทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายเชื้อโดยถ้าหากแบคทีเรียสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการสร้างกรดได้สารละลายเชื้อจะเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง ถ้าหากแบคทีเรียไม่สามารถสร้างกรดได้สารละลายเชื้อจะไม่เปลี่ยนสี

3.13 การวิเคราะห์ polar lipid ของแบคทีเรีย endophyte

แบคทีเรีย endophyte ที่คาดว่าจะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA จะถูกนำมาเลี้ยงในอาหาร tryptic soy broth เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ได้จะถูกนำมาทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry ด้วยเครื่อง lyophilizer จากนั้นทำการสกัด polar lipid โดยการใช้ตัวทำละลาย methanol-NaCl-petroleum ether นาน 15 นาที จากนั้นดูดตัวทำละลายที่อยู่ด้านบนทิ้งแล้วทำการสกัดต่อด้วย petroleum ether แล้วดูดตัวทำละลายทิ้งไป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100°C นาน 5 นาที แล้วเติมตัวทำละลาย chloroform-methanol-น้ำ ลงไป แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใส ทำการสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซ้ำจนกระทั่งได้ polar lipid จากนั้นเติม chloroform และน้ำกลั่นในปริมาตรที่เท่ากันลงไป แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสซึ่งจะถูกนำมาทำให้แห้ง เมื่อสารละลายแห้งแล้วทำการละลาย polar lipid ด้วยตัวทำละลาย chloroform-methanol จากนั้นหยดลงบนแผ่น silica gel TLC แล้วนำไปทำ chromatography แบบสองทิศทางด้วยตัวทำละลายสองระบบคือ chloroform-methanol-น้ำ และ chloroform-acetic acid-methanol-น้ำ จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ได้ไปพ่นด้วยสาร Dittmer&Lester reagent, ninhydrin reagent, anisaldehyde reagent, Dragendorf's reagent และ phosphomolybdic acid reagent

3.14 การวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย endophyte และของแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดกันจะถูกนำมาสกัด, ทำให้เสียสภาพและตรึงบน microplate จากนั้นทำการเตรียม probe ซึ่งเชื่อมอยู่กับสาร photobiotin แล้วปล่อยให้ดีเอ็นเอตัวอย่างมีการเข้าจับกันกับดีเอ็นเอที่เป็น probe จากนั้นทำการตรวจสอบการเข้าจับกันของดีเอ็นเอผ่านกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ที่เชื่อมอยู่กับ photobiotin ร้อยละของความเหมือนของดีเอ็นเอ (% Homology) สามารถถูกคำนวณได้ดังนี้

$$\% \text{ Homology} = [(V_{sample} - V_{control})/V_{type\ strain} - V_{control})] \times 100$$

โดยที่ค่าร้อยละความเหมือนจะต้องต่ำกว่า 70% จึงจะจัดว่าแบคทีเรีย endophyte เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่

3.15 การวิเคราะห์องค์ประกอบเบสของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย endophyte กับดีเอ็นเอมาตรฐานจะถูกนำมาทำให้เสียสภาพ และย่อยด้วยเอนไซม์ phosphatase และ nuclease จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณของเบสแต่ละชนิดโดยการใช้เครื่อง HPLC

3.16 การทดสอบความสามารถในการสร้างฮอร์โมน IAA โดยแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 108 CFU/มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมได้จากการเพาะเชื้อแบคทีเรียในอาหาร nutrient broth และวัดความเข้มข้นด้วยวิธี spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในขวด Erlenmeyer ที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลาย 10% L-Tryptophan ลงไปจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2% โดยปริมาตร จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นาน 2 วัน บนเครื่องเขย่า จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อแล้วนำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปเติมน้ำยา Salkowski reagent (0.5M FeCl3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 35% HClO4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และตรวจสอบการเปลี่ยนสีของสารละลายเป็นสีชมพูในกรณีที่แบคทีเรียสามารถสร้างฮอร์โมน IAA ได้

3.17 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร tryptic soy broth ปริมาตร 15 มิลลิลิตรข้ามคืน แล้วทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ จากนั้นล้างเซลล์ด้วยอาหาร DF salt minimal medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเชื้อเพื่อเก็บเซลล์อีกครั้งหนึ่ง เป็นเวลา 10 นาที แล้วกระจายเซลล์ด้วย DF salt minimal medium จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร DF salt minimal medium ที่มี 0.015 M $(NH4)_2SO_4$, อาหาร DF salt minimal medium ที่มี 3 mM ACC และอาหาร DF salt minimal medium ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ได้จะสามารถเจริญได้บนอาหารชนิดที่ 1 และ 2

3.18 การตรวจสอบการเพิ่มการละลายฟอสเฟตโดยแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย endophyte บนอาหาร Nutrient ager (NA) บ่มนาน 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30°C จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อเขี่ยแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าของอาหาร NA แทงลงบนอาหาร Pikovskaya's medium (PVK) และ National Botanical Research Institiute 's phosphate growth medium (NBRIP) ซึ่งอาหารทั้งสองชนิดมีส่วนผสมของ Ca3PO4 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 7 วัน โดยสังเกตผลทุกวันจนครบ 7 วัน บันทึกผลการเกิดส่วนใสของการละลายฟอสเฟสแต่ละไอโซเลตที่เกิดขึ้นบนอาหารทั้งสองชนิด แบคทีเรียที่สามารถเพิ่มการละลายของฟอสเฟตจะแสดงลักษณะใสบริเวณรอบรอยเชื้อแบคทีเรียบนอาหารทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด

3.19 การทดสอบการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์บริสุทธิ์ที่แยกลงบนอาหาร glucose nitrogen – free agar โดยวิธี simple streak จากนั้นทำการบ่มเชื้อนาน 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30°C ตรวจผลและบันทึกผลเชื้อแต่ละไอโซเลตที่เจริญบนอาหาร โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้ทำการถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงบนอาหาร glucose nitrogen – free agar ที่มีการเติม (NH4)2SO4 ความเข้มข้น 3mM โดยแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้จะสามารถเจริญเติบโตบนอาหาร glucose nitrogen-free agar ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากต้นแก่นตะวัน

ต้นแก่นตะวันถูกนำมาแยกเป็นส่วนต่างๆ ได้แก่ ราก หัว ลำต้น และใบ ชิ้นส่วนเหล่านี้ถูกตัดให้เป็นชิ้นที่มีขนาดเล็กลงแล้วนำมาทำความสะอาดผิวภายนอก แล้วนำมาบดในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ สารละลายเชื้อที่ได้นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสองชนิดคือ tryptic soya agar (TSA) ที่เจือจาง 10 เท่า และ starch casein nitrate agar (SCN) แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันถูกคัดแยกมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยในการทดลองนี้คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 90 ไอโซเลตดังรายละเอียดในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากส่วนต่างๆ ของต้นพืชแก่นตะวันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ SCN

ชิ้นส่วนของพืช	อาหารเพาะเชื้อ		รวม
	Tryptone soy agar (TSA)	Starch casein nitrate agar (SCN)	
ราก	19	7	26
หัว	9	5	14
ลำต้น	28	2	30
ใบ	11	9	20
รวม	67	23	90

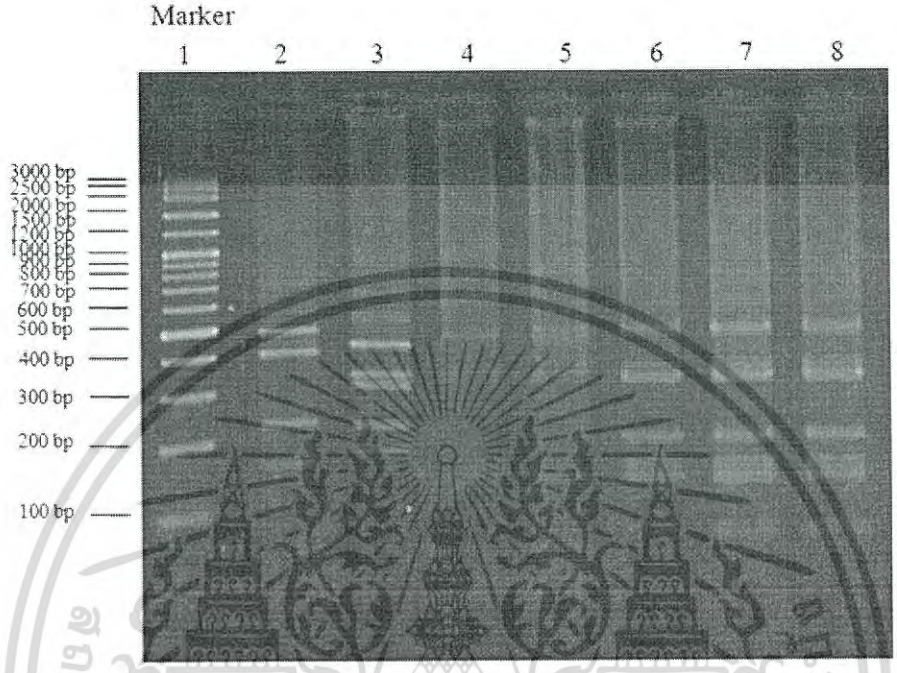
4.2 การจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี ARDRA

จีโนมิกส์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ถูกสกัดและนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR โดยชิ้นส่วนที่เพิ่มปริมาณได้นี้มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ที่เพิ่มปริมาณได้นำมาจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยวิธี ARDRA ซึ่งแสดงผลเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I โดยแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันมีลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ที่คล้ายคลึงกันจึงมีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกันด้วย ตัวอย่างของการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแสดงในภาพที่ 4.1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียตัวอย่างในช่องที่ 2, 3, 4 และ 5 มีลายพิมพ์ดีเอ็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

149113

เอที่แตกต่างกัน และแตกต่างไปจากแบคทีเรียตัวอย่างในช่องที่ 6, 7 และ 8 ซึ่งมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน



ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ ARDRA ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียตัวอย่างจำนวน 7 ไอโซเลต

ผลการวิเคราะห์แบคทีเรีย 90 ไอโซเลตพบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียออกได้เป็น 53 กลุ่มที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยกลุ่มที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดคือกลุ่มที่ 38 ซึ่งมีสมาชิกทั้งหมด 10 ไอโซเลต กลุ่มที่มีจำนวนสมาชิกรองลงมาคือกลุ่มที่ 34 ซึ่งมีสมาชิกจำนวน 6 ไอโซเลต ถัดมาคือกลุ่มที่ 5 มีสมาชิกจำนวน 4 ไอโซเลต และมีกลุ่มที่มีจำนวนสมาชิกเท่ากับ 3 ไอโซเลตจำนวน 7 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 8, 16, 17, 33, 36 และ 47 กลุ่มที่มีจำนวนสมาชิกเท่ากับ 2 ไอโซเลตมีจำนวน 5 กลุ่มได้แก่กลุ่มที่ 21, 23, 24, 37 และ 45 และมีกลุ่ม ARDRA ทั้งหมด 38 กลุ่มที่มีจำนวนสมาชิกเพียงกลุ่มละ 1 ไอโซเลต การจัดจำแนกขั้นถัดไปคือการเลือกตัวแทนอย่างน้อยร้อยละ 33.3 จากแต่ละกลุ่มมาอย่างสุ่ม แล้วนำชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ที่ได้มาหาลำดับเบสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี ARDRA

กลุ่ม ARDRA	ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ARDRA	ไอโซเลตที่แยกได้	ตัวแทนไอโซเลต	จำนวนไอโซเลตรวม*	ร้อยละของตัวแทนไอโซเลต
1	380, 220, 180	lea10-t4-7	lea10-t4-7	1	100
2	450, 250, 220, 190, 180, 150	tub01-s1-8	tub01-s1-8	1	100
3	250, 200, 150, 140	tru10-t8-6	tru10-t8-6	1	100
4	4000, 500, 450, 300, 280, 200, 160	tru10-t6-12	tru10-t6-12	1	100
5	450, 250, 220	roo50-s1-6 tub01-t6-12 tub50-t2-6 tub01-s2-12	roo50-s1-6 tub01-t6-12	4	50
6	400, 350, 320, 220, 90	tru10-t6-6	tru10-t6-6	1	100
7	690, 210, 180, 100	tru50-s4-11	tru50-s4-11	1	100
8	1200, 800, 690, 390, 210, 100	lea10-t7-7 lea10-s6-12 lea10-s7-12	lea10-t7-7	3	33.33
9	900, 480, 300, 150	tub01-t1-12	tub01-t1-12	1	100
10	420, 300, 280, 210, 100	tub01-t7-12	tub01-t7-12	1	100
11	500, 250, 180	roo10-t2-6	roo10-t2-6	1	100
12	700, 500, 320, 250, 200	tru01-t1-12	tru01-t1-12	1	100
13	800, 600, 400, 250, 100	lea10-t1-12	lea10-t1-12	1	100
14	280, 250, 180	tub01-s4-11	tub01-s4-11	1	100
15	350, 250, 180	roo01-t11-12	roo01-t11-12	1	100
16	1200, 750, 600, 350, 200, 100	tru50-t1-12 tru50-t5-12 tru10-t8-13	tru50-t1-12	3	33.33
17	450, 210, 130	roo10-t7-7	roo10-t7-7	3	33.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม ARDRA	ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ARDRA	ไอโซเลตที่แยกได้	ตัวแทนไอโซเลต	จำนวนไอโซเลตรวม*	ร้อยละของตัวแทนไอโซเลต
		roo10-t7(1)-7 roo10-t4-6			
18	400, 210, 150	tub01-t3-12	tub01-t3-12	1	100
19	1200, 510	lea01-t6-12	lea01-t6-12	1	100
20	1300, 800, 600, 210, 180	lea50-s4-13	lea50-s4-13	1	100
21	450, 200, 150	roo10-s3-12 roo01-t3-7	roo10-s3-12	2	50
22	450, 300, 200, 110	lea01-t1-12	lea01-t1-12	1	100
23	550, 500, 400, 320, 290, 200, 180	tru50-t1-8 tru50-t2-8	tru50-t1-8	2	50
24	650, 450, 320, 300, 200, 180	tru01-t4-12 tru01-t3-12	tru01-t4-12	2	50
25	1400, 900, 600, 400, 220, 100	roo01-t2-12 roo01-t2-13	roo01-t2-12	2	50
26	1500, 800, 600, 400	lea10-t6-7	lea10-t6-7	1	100
27	500, 400, 220	roo10-s1-7	roo10-s1-7	1	100
28	440, 300, 220	lea10-s3-12	lea10-s3-12	1	100
29	500, 320, 250, 200	tru10-t5(2)-6	tru10-t5(2)-6	1	100
30	420, 300, 250, 200	tub01-t5-8	tub01-t5-8	1	100
31	450, 400, 200, 130	lea10-t2-7	lea10-t2-7	1	100
32	600, 450	tru10-t2-6	tru10-t2-6	1	100
33	800, 620, 500, 400, 300, 230	tru01-t6-11 tru01-t8-11 tru01-t9-11	tru01-t6-11 tru01-t8-11	3	66.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม ARDRA	ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ARDRA	ไอโซเลตที่แยกได้	ตัวแทนไอโซเลต	จำนวนไอโซเลตรวม*	ร้อยละของตัวแทนไอโซเลต
34	380, 180, 130	lea10-s4-12 tru01-t8-7 tru01-t9-12 lea10-t5-7 tru50-t2-8 tru10-t12-6	lea10-s4-12 tru01-t8-7	6	33.33
35	700, 500, 450, 300, 210, 170	roo01-t3-6	roo01-t3-6	1	100
36	500, 350,250	tru10-t5-6 lea01-t4-12 tub01-s2-12	tru10-t5-6	3	33.33
37	700, 500, 300, 200	roo10-t5-7 roo01-t9-7	roo10-t5-7	2	50
38	400, 250, 200	tub01-t6-8 roo50-s2-6 lea50-s5-13 tru50-s2-11 tru10-t8-12 roo10-t2-7 lea50-s2-13 roo50-s3-5 tru10-t5-12 roo10-t3-8	tub01-t6-8 roo50-s2-6 lea50-s5-13 tru50-s2-11	10	40
39	450, 250, 180	roo01-s2-7 roo10-t6-7 roo01-t3-7	roo01-s2-7	3	33.33
40	1200, 900, 700, 250, 200	lea50-s6-13	lea50-s6-13	1	100
41	620, 420, 200	roo01-t9-12	roo01-t9-12	1	100
42	380, 220	tru01-t4(2)-12	tru01-t4(2)-12	1	100
43	620, 420, 280, 200	roo01-t1-6	roo01-t1-6	1	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม ARDRA	ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ARDRA	ไอโซเลตที่แยกได้	ตัวแทนไอโซเลต	จำนวนไอโซเลตรวม*	ร้อยละของตัวแทนไอโซเลต
44	1500, 280, 250, 200	tru10-t1-12	tru10-t1-12	1	100
45	380, 220, 80	tub01-t8-7 lea10-t8-7	tub01-t8-7	2	50
46	900,700, 240, 190, 80	lea10-t3-7	lea10-t3-7	1	100
47	650, 480, 300, 220	roo01-t3-12 roo01-s6-12 roo01-t6-12	roo01-t3-12 roo01-s6-12	3	66.67
48	400, 220, 180	tru10-t14-6	tru10-t14-6	1	100
49	450, 280, 200, 160	tub01-t8-8	tub01-t8-8	1	100
50	450, 350, 300, 210, 190	tru01-t3-12	tru01-t3-12	1	100
51	700, 420	tru10-t4-6	tru10-t4-6	1	100
52	150, 200, 380	roo01-t5-12	roo01-t5-12	1	100
53	480, 300, 200	tub01-s3-11	tub01-s3-11	1	100

4.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยวิธี pairwise alignment

ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ที่ได้มาถูกนำมาใช้เปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนเดียวกันของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ผ่านการพิสูจน์เอกลักษณ์และจัดจำแนกอย่างเป็นทางการแล้ว โดยข้อมูลลำดับเบสของแบคทีเรียเหล่านี้ถูกเก็บอยู่ในฐานข้อมูล EzTaxon (http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/) การวิเคราะห์ลำดับเบสนี้ใช้วิธี pairwise alignment ซึ่งแสดงผลว่าแบคทีเรียตัวแทนจำนวน 60 ไอโซเลตจากทั้ง 53 กลุ่มนั้นเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในสกุลที่แตกต่างกันจำนวน 17 สกุล โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จำนวน 12 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Acinetobacter* แบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* แบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Bradyrhizobium* แบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Curtobacterium* แบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Enterobactor* แบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Frigobacterium* แบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Janibacter* แบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Labrys* แบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Methylobacterium* แบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Methylobacterium* แบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Microbispora* แบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Pantoea* แบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Rhizobium* แบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จัดอยู่ในสกุล *Sphingobium* และแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Sphingomonas* นอกจากนี้การวิเคราะห์นี้ยังแสดงให้เห็นด้วยว่าแบคทีเรียไอโซเลตที่เป็นตัวแทนมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสปีชีส์ใดมากที่สุด ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียจำนวน 59 ไอโซเลตที่มีค่าร้อยละความคล้ายคลึงอยู่ระหว่างร้อยละ 98.5 ถึงร้อยละ 100 และมีแบคทีเรีย 1 ไอโซเลตคือ roo10-S1-7 ที่มีค่าร้อยละความคล้ายคลึงเพียง 97.89 ซึ่งอยู่ในระดับที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลตนี้อาจเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ไม่เคยถูกรายงานมาก่อน โดยแบคทีเรียที่แสดงค่าความคล้ายคลึงกับไอโซเลต roo10-S1-7 คือแบคทีเรีย *Pseudoxanthomonas kalamensis* JA40^{T} (ตารางที่ 4.3) เมื่อนำผลการวิเคราะห์ ARDRA มาพิจารณาร่วมด้วยแล้วพบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 90 ไอโซเลตแบ่งได้เป็น 3 ไฟลัมคือ *Proteobacteria* จำนวน 68 ไอโซเลต *Actinobacteria* จำนวน 16 ไอโซเลต และ *Firmicutes* จำนวน 6 ไอโซเลต

ตารางที่ 4.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียตัวแทนของกลุ่ม ARDRA ด้วยการวิเคราะห์แบบ pairwise alignment บนฐานข้อมูล EzTaxon

ไอโซเลต	สกุล	สปีชีส์ที่มีความคล้ายคลึงมากที่สุด	ร้อยละความคล้ายคลึง
lea10-t4-7	*Acinetobacter*	*Acinetobacter baumannii* ATCC19606^{T}	99.83
tub01-t1-12	*Acinetobacter*	*Acinetobacter baumannii* ATCC19606^{T}	99.69
lea10-s3-12	*Acinetobacter*	*Acinetobacter baumannii* ATCC19606^{T}	99.85
lea10-s4-12	*Acinetobacter*	*Acinetobacter baumannii* ATCC19606^{T}	99.86
tru01-t8-7	*Acinetobacter*	*Acinetobacter baumannii* ATCC19606^{T}	99.87
tub01-t6-8	*Acinetobacter*	*Acinetobacter baumannii* ATCC19606^{T}	99.87
roo50-s2-6	*Acinetobacter*	*Acinetobacter baumannii* ATCC19606^{T}	99.90
lea50-s5-13	*Acinetobacter*	*Acinetobacter baumannii* ATCC19606^{T}	99.77
tru50-s2-11	*Acinetobacter*	*Acinetobacter baumannii* ATCC19606^{T}	99.76
tub01-t8-7	*Acinetobacter*	*Acinetobacter baumannii* ATCC19606^{T}	99.87
tru01-t4(2)-12	*Acinetobacter*	*Acinetobacter baumannii* ATCC19606^{T}	100
tub01-s4-11	*Acinetobacter*	*Acinetobacter radioresistens* DSM6976^{T}	99.85
roo01-t1-6	*Bacillus*	*Bacillus aerophilus* 28K^{T}	99.15
tru01-t6-11	*Bacillus*	*Bacillus aryabhottai* B8W22^{T}	100
tru01-t8-11	*Bacillus*	*Bacillus aryabhottai* B8W22^{T}	100
roo01-t9-12	*Bacillus*	*Bacillus niacin* IFO15566^{T}	99.00
roo10-t5-7	*Bacillus*	*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* BGSC3A28^{T}	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต	สกุล	สปีชีส์ที่มีความคล้ายคลึงมากที่สุด	ร้อยละความคล้ายคลึง
roo01-t2-12	*Bradyrhizobium*	*Bradyrhizobium irromotense* EK05^{T}	99.78
tru10-t5-6	*Curtobacterium*	*Curtobacterium citreum* DSM20528^{T}	99.68
tru10-t5(2)-6	*Curtobacterium*	*Curtobacterium citreum* DSM20528^{T}	99.68
tru01-t4-12	*Curtobacterium*	*Curtobacterium citreum* DSM20528^{T}	99.68
tru01-t3-12	*Curtobacterium*	*Curtobacterium citreum* DSM20528^{T}	99.74
tru50-s4-11	*Enterobacter*	*Enterobactor cowanii* CIP107300^{T}	100
tru10-t6-6	*Frigoribacterium*	*Frigoribacterium faeni* 801^{T}	98.73
tru50-t1-8	*Frigoribacterium*	*Frigoribacterium faeni* 801^{T}	99.11
tru10-t6-12	*Janibacter*	*Janibacter melinis* CM2104^{T}	99.67
roo10-t7-7	*Labrys*	*Labrys monochus* VKM B-1479^{T}	99.18
roo10-s3-12	*Labrys*	*Labrys monochus* VKM B-1479^{T}	99.31
roo01-t3-6	*Labrys*	*Labrys monochus* VKM B-1479^{T}	99.26
roo01-s2-7	*Labrys*	*Labrys okinawensis* MAFF210191^{T}	99.84
roo10-t2-6	*Labrys*	*Labrys okinawensis* MAFF210191^{T}	99.05
lea10-t6-7	*Methylobacterium*	*Methylobacterium radiotolerans* JCM2831^{T}	99.84
lea10-t2-7	*Methylobacterium*	*Methylobacterium thiocyanatum* DSM11490^{T}	100
tru10-t2-6	*Methylobacterium*	*Methylobacterium thiocyanatum* DSM11490^{T}	100
tru10-t4-6	*Methylobacterium*	*Methylobacterium salsuginis* MR^{T}	100
tub01-t7-12	*Microbacterium*	*Microbacterium thichothecenolylicum* IF015077^{T}	98.56
lea01-t1-12	*Microbacterium*	*Microbacterium testaceum* DSM20166^{T}	99.14
roo01-t3-12	*Microbispora*	*Microbispora amethystogenes* JCM3021^{T}	99.25
roo01-s6-12	*Microbispora*	*Microbispora amethystogenes* JCM3021^{T}	99.01
tub01-s3-11	*Microbispora*	*Microbispora thailandensis* NN276^{T}	99.34
lea01-t6-12	*Pantoea*	*Pantoea anthophila* LMG2558^{T}	98.72
tru50-t1-12	*Pantoea*	*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^{T}	99.82
lea10-t1-12	*Pantoea*	*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^{T}	99.83
lea10-t7-7	*Pantoea*	*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* LMG2715^{T}	99.81
roo01-t11-12	*Pseudomonas*	*Pseudomonas cremoricolorate* NRICO181^{T}	99.66
lea10-t3-7	*Pseudomonas*	*Psedomonas oryzihabitans* IAM1568^{T}	100
lea50-s6-13	*Pseudomonas*	*Pseudomonas psychotolerans* C36^{T}	100
lea50-s4-13	*Pseudomonas*	*Pseudomonas psychotolerans* C36^{T}	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต	สกุล	สปีชีส์ที่มีความคล้ายคลึงมากที่สุด	ร้อยละความคล้ายคลึง
tru10-t14-6	*Pseudomonas*	*Pseudomonas taiwanensis* BCRC17751^T	100
roo10	*Pseudoxanthomonas*	*Pseudoxanthomonas kalamensis* JA40^T	97.89
tub01-t8-8	*Rhizobium*	*Rhizobium alamii* GBro16^T	100
tub01-t5-8	*Rhizobium*	*Rhizobium mesosinicum* CCBAU25010^T	100
roo50-s1-6	*Rhizobium*	*Rhizobium mesosinicum* CCBAU25010^T	100
tub01-t6-12	*Rhizobium*	*Rhizobium mesosinicum* CCBAU25010^T	100
tub01-t3-12	*Rhizobium*	*Rhizobium mesosinicum* CCBAU25010^T	98.62
tub01-s1-8	*Rhizobium*	*Rhizobium mesosinicum* CCBAU25010^T	100
roo01-t5-12	*Sphingobium*	*Sphingobium chlorophenolicum* L-1^T	99.34
tru10-t1-12	*Sphingomonas*	*Sphingomonas thueperi* LMQ2142^T	99.57
tru01-t1-12	*Sphingomonas*	*Sphingomonas trueperi* LMG2142^T	99.57
tru10-t8-6	*Sphingomonas*	*Sphingomonas yabuuchiae* GTC868^T	99.97

4.4 กิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์

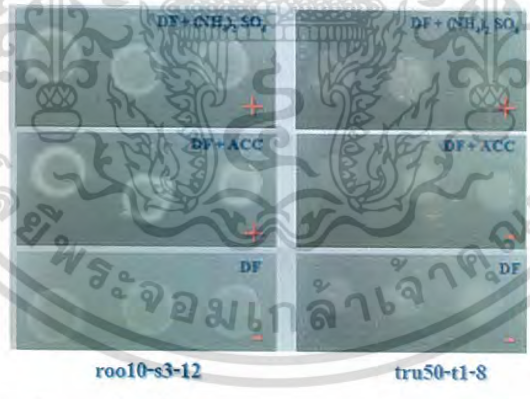
แบคทีเรียเอนโดไฟต์ตัวแทนจากแต่ละกลุ่มทั้ง 60 ไอโซเลตถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) ที่เติมกรดอะมิโน L-tryptophan ซึ่งแบคทีเรียสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตฮอร์โมน IAA ซึ่งอยู่ในกลุ่มออกซินได้ การทดสอบการสร้างฮอร์โมน IAA ทำได้โดยหยดสารละลาย Salkowski reagent ลงไปในส่วนใสที่ปั่นแยกได้จากอาหารที่แบคทีเรียเจริญเติบโตอยู่ เมื่อ IAA ทำปฏิกิริยากับสารละลายทดสอบแล้วทำให้ส่วนใสเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีชมพู (ภาพที่ 4.2) ผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 41 ไอโซเลต หรือร้อยละ 68.3 ที่สามารถสร้างฮอร์โมนดังกล่าวได้ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียตัวแทนทั้งหมดในสกุล *Janibacter*, *Methylobacterium*, *Microbispora* และ *Pseudoxanthomonas* ตรวจไม่พบการสร้างฮอร์โมน IAA

การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์พบว่ามีแบคทีเรียตัวแทนจำนวน 21 ไอโซเลต (ร้อยละ35) ที่สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งบนอาหาร DF salt minimal medium ที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ และอาหารชนิดเดียวกันที่เติม ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่แบคทีเรียเหล่านี้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร DF salt minimal medium ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนใดๆ การเจริญเติบโตในอาหารรูปแบบดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย 21 ไอโซเลตนี้สามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ขึ้นมาย่อยสลายสารประกอบ ACC เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญเติบโตได้ ส่วนแบคทีเรียที่เหลือจำนวน 39 ไอโซเลตเจริญเติบโตได้แต่เพียงบนอาหาร DF salt minimal medium ที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ และไม่เจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนอาหารอีก 2 ชนิด การเจริญเติบโตในรูปแบบนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase เพื่อมาย่อยสลาย ACC ได้ (ภาพที่ 4.3) ผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียตัวแทนในสกุล *Bradyrhizobium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Frigoribacterium*, *Janibacter*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Microbispora* และ *Pseudoxanthomonas* ที่ไม่แสดงกิจกรรม ACC deaminase ในการทดสอบครั้งนี้

ภาพที่ 4.2 การทดสอบการสร้างฮอร์โมน IAA โดยสารทดสอบ Salkowski reagent ตัวอย่างที่ 1 คือฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 10 mg/L ตัวอย่างที่ 2-4 คือแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ให้ผลทดสอบเป็นบวก ตัวอย่างที่ 6 คือแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ให้ผลทดสอบเป็นลบ และตัวอย่างที่ 6 คือน้ำกลั่น



ภาพที่ 4.3 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์บนอาหาร DF salt minimal medium ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (DF), อาหาร DF ที่เติม ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน (DF+ACC) และอาหาร DF ที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน (DF+$(NH_4)_2SO_4$) โดยแบคทีเรียตัวอย่างที่แสดงผลบวกและลบคือไอโซเลต roo10-s3-12 และtru50-t1-8 ตามลำดับ เครื่องหมาย + หมายถึงแสดงการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น เครื่องหมาย – หมายถึงไม่แสดงการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

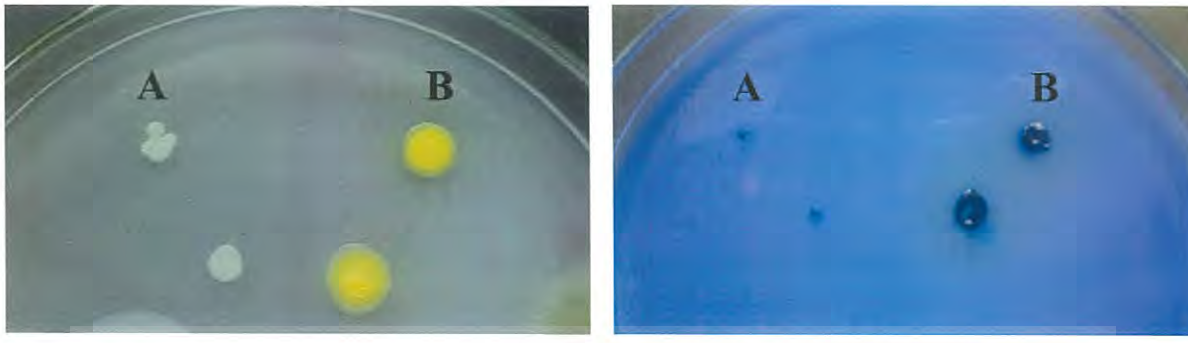
กิจกรรมที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่สำคัญอีกกิจกรรมหนึ่งคือความสามารถในการตรึงแกสไนโตรเจน โดยในการทดลองนี้ตรวจสอบจากความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nitrogen-free glucose medium ที่ไม่เติมสารประกอบไนโตรเจนลงไป และใช้อาหารชนิดเดียวกันที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ เป็นอาหารควบคุมเชิงบวก แบคทีเรียที่ตรึงแกสไนโตรเจนได้จึงเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร nitrogen-free glucose medium ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนลงไป ในขณะที่แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนไม่ได้จะไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารดังกล่าวได้ (ภาพที่ 4.4) ผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตัวแทนเพียง 4 ไอโซเลตที่อยู่ในสกุล *Microbacterium* (2 ไอโซเลต), *Pseudomonas* (1 ไอโซเลต) และ *Rhizobium* (1 ไอโซเลต) เท่านั้นที่แสดงกิจกรรมการตรึงแกสไนโตรเจนบนอาหารทดสอบ

ก ข ค

ภาพที่ 4.4 การทดสอบการตรึงแกสไนโตรเจนบนอาหาร nitrogen-free glucose medium โดยมีจานควบคุมเชิงบวกคืออาหารที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ (ก) แบคทีเรียไอโซเลตที่ให้ผลบวกและลบคือแบคทีเรียที่เจริญเติบโต (ข) และไม่สามารถเจริญเติบโต (ค) ได้บนอาหารที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน

การทดสอบการเพิ่มการละลายของสารประกอบฟอสเฟตโดยอาหาร PVK และอาหาร NBRIP พบว่าแบคทีเรียที่ให้ผลบวกจะทำให้เกิดบริเวณใสโดยรอบโคโลนีบนอาหาร PVK และ/หรือ NBRIP (ภาพที่ 4.5) โดยผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียตัวแทนจำนวน 31 ไอโซเลต หรือร้อยละ 51.7 ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบนี้ โดยแบคทีเรียตัวแทนในสกุล *Microbispora, Pseudomonas, Pseudoxanthomonas* และ *Sphingobium* ที่ให้ผลลบกับการทดสอบนี้ทุกไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข

ภาพที่ 4.5 การทดสอบการเพิ่มการละลายสารประกอบฟอสเฟตโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์บนอาหาร PVK (ก) และอาหาร NBRIP (ข) แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ให้ผลลบกับการทดสอบนี้จะไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงของอาหาร (A) ในขณะที่แบคทีเรียที่ให้ผลบวกแสดงการเกิดบริเวณใสโดยรอบโคโลนี

ผลการวิเคราะห์การสร้างฮอร์โมน IAA, การสร้างเอนไซม์ ACC deaminase, การตรึงแกสไนโตรเจน และการเพิ่มการละลายของสารประกอบฟอสเฟตของแบคทีเรียไอโซเลตตัวแทนทั้ง 60 ไอโซเลตแสดงไว้ในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตัวแทนทั้ง 60 ไอโซเลต เครื่องหมาย + แสดงถึงผลการทดสอบเป็นบวก และเครื่องหมาย – หมายถึงผลการทดสอบเป็นลบในแต่ละกิจกรรมที่ทดสอบ

ลำดับ	ไอโซเลต	สกุล	ผลการทดลอง			
			IAA	ACC	N_2	PO_4
1	lea10-t4-7	*Acinetobacter*	+	-	-	+
2	tub01-t1-12	*Acinetobacter*	+	-	-	-
3	lea10-s3-12	*Acinetobacter*	+	-	-	-
4	lea10-s4-12	*Acinetobacter*	+	-	-	+
5	tru01-t8-7	*Acinetobacter*	+	-	-	+
6	tub01-t6-8	*Acinetobacter*	+	-	-	+
7	roo50-s2-6	*Acinetobacter*	+	-	-	-
8	lea50-s5-13	*Acinetobacter*	+	+	-	-
9	tru50-s2-11	*Acinetobacter*	+	-	-	-
10	tub01-t8-7	*Acinetobacter*	-	-	-	-
11	tru01-t4(2)-12	*Acinetobacter*	+	-	-	-
12	tub01-s4-11	*Acinetobacter*	+	-	-	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับ	ไอโซเลต	สกุล	ผลการทดลอง			
			IAA	ACC	N_2	PO_4
13	roo01-t1-6	*Bacillus*	-	-	-	+
14	tru01-t6-11	*Bacillus*	+	+	-	+
15	tru01-t8-11	*Bacillus*	+	+	-	+
16	roo01-t9-12	*Bacillus*	+	+	-	-
17	roo10-t5-7	*Bacillus*	+	-	-	-
18	roo01-t2-12	*Bradyrhizobium*	+	-	-	+
19	tru10-t5-6	*Curtobacterium*	-	-	-	+
20	tru10-t5(2)-6	*Curtobacterium*	-	-	-	+
21	tru01-t4-12	*Curtobacterium*	+	-	-	+
22	tru01-t3-12	*Curtobacterium*	+	-	-	+
23	tru50-s4-11	*Enterobacter*	+	-	-	+
24	tru10-t6-6	*Frigoribacterium*	+	-	-	-
25	tru50-t1-8	*Frigoribacterium*	-	-	-	+
26	tru10-t6-12	*Janibacter*	-	-	-	+
27	roo10-t7-7	*Labrys*	+	+	-	+
28	roo10-s3-12	*Labrys*	-	+	-	+
29	roo01-t3-6	*Labrys*	+	+	-	+
30	roo01-s2-7	*Labrys*	+	+	-	+
31	roo10-t2-6	*Labrys*	+	+	-	-
32	lea10-t6-7	*Methylobacterium*	-	+	-	-
33	lea10-t2-7	*Methylobacterium*	-	+	-	-
34	tru10-t2-6	*Methylobacterium*	-	+	-	-
35	tru10-t4-6	*Methylobacterium*	-	-	-	+
36	tub01-t7-12	*Microbacterium*	-	-	+	+
37	lea01-t1-12	*Microbacterium*	+	-	+	+
38	roo01-t3-12	*Microbispora*	-	-	-	-
39	roo01-s6-12	*Microbispora*	-	-	-	-
40	tub01-s3-11	*Microbispora*	-	-	-	-
41	lea01-t6-12	*Pantoea*	+	-	-	+
42	tru50-t1-12	*Pantoea*	+	+	-	+
43	lea10-t1-12	*Pantoea*	+	+	-	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับ	ไอโซเลต	สกุล	ผลการทดลอง			
			IAA	ACC	N_2	PO_4
44	lea10-t7-7	*Pantoea*	+	+	-	+
45	roo01-t11-12	*Pseudomonas*	+	-	-	-
46	lea10-t3-7	*Pseudomonas*	+	+	-	-
47	lea50-s6-13	*Pseudomonas*	+	+	-	-
48	lea50-s4-13	*Pseudomonas*	-	+	-	-
49	tru10-t14-6	*Pseudomonas*	-	-	+	-
50	roo10	*Pseudoxanthomonas*	-	-	-	-
51	tub01-t8-8	*Rhizobium*	+	-	+	+
52	tub01-t5-8	*Rhizobium*	+	-	-	-
53	roo50-s1-6	*Rhizobium*	+	-	-	-
54	tub01-t6-12	*Rhizobium*	+	+	-	+
55	tub01-t3-12	*Rhizobium*	+	-	-	-
56	tub01-s1-8	*Rhizobium*	+	-	-	+
57	roo01-t5-12	*Sphingobium*	+	+	-	-
58	tru10-t1-12	*Sphingomonas*	+	-	-	-
59	tru01-t1-12	*Sphingomonas*	-	-	-	-
60	tru10-t8-6	*Sphingomonas*	+	+	-	+

4.5 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลต roo10

การวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต roo10 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลตนี้มีค่าความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่ได้รับการจำแนกเพียงร้อยละ97.89 ดังนั้นชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียนี้จึงถูกนำมาหาลำดับเบสเพิ่มเติมโดยไพรเมอร์ 1492R, 780F และ 350R เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อสร้างลำดับเบสที่สมบูรณ์แล้วได้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่มีความยาวเท่ากับ 1,494 คู่เบส (ภาพที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
   1 tgctcagatt gaacgctggc ggtaggccta acacatgcaa gtcgaacggc agcacagagg
  61 agcttgctcc ttgggtggcg agtggcggac gggtgaggaa tacatcggaa tctaccctgt
 121 cgtgggggat aacgtaggga aacttacgct aataccgcat acgaccttcg ggtgaaagag
 181 ggggatcgca agacctctcg cgattggatg agccgatgtc ggattagcta gttggcgggg
 241 taaaagccca ccaaggcgac gatccgtagc tggtctgaga ggatgatcag ccacactgga
 301 actgagacac ggtccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatattgg acaatgggcg
 361 caagcctgat ccagccatac cgcgtgggtg aagaaggcct tcgggttgta aagccctttt
 421 gttgggaaag aaaagcaatc ggctaatacc cggttgttct gacggtaccc aaagaataag
 481 caccggctaa cttcgtgcca gcagccgcgg taatacgaag ggtgcaagcg ttactcggaa
 541 ttactgggcg taaagcgtgc gtaggtggtc gtttaagtcc gttgtgaaag ccctgggctc
 601 aacctgggaa ttgcagtgga tactgggcga ctagagtgcg gtagagggta gtggaatttc
 661 cggtgtagca gtgaaatgcg tagagatcgg aaggaacatc tgtggcgaag gcgactacct
 721 gggccagcac tgacactgag gcacgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg
 781 tagtccacgc cctaaacgat gcgaactgga tgttgggttc aacttggaac ccagtatcga
 841 agctaacgcg ttaagttcgc cgcctgggga gtacggtcgc aagactgaaa ctcaaaggaa
 901 ttgacggggg cccgcacaag cggtggagta tgtggtttaa ttcgatgcaa cgcgaagaac
 961 cttacctggt cttgacatcc acggaacttt ccagagatgg attggtgcct tcgggaaccg
1021 tgagacaggt gctgcatggc tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg
1081 caacgagcgc aaccccttgtc cttagttgcc agcacgtaat ggtgggaact ctaaggagac
1141 cgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaag tcatcatggc ccttacgacc
1201 agggctacac acgtactaca atggtgggga cagagggctg caaacccgcg agggtgagcc
1261 aatcccagaa accccatctc agtccggatt ggagtctgca actcgactcc atgaagtcgg
1321 aatcgctagt aatcgcagat cagcattgct gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac
1381 accgcccgtc acaccatggg agtttgttgc accagaagca ggtagcttaa ccgcaaggag
1441 ggcgcttgcc acgggtgtggc cgatgactgg ggtgaagtcg taacaaggta acca
```

ภาพที่ 4.6 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต roo10 ความยาว 1,494 คู่เบส

ลำดับเบสที่ได้นี้ถูกนำมาวิเคราะห์ pairwise alignment บนฐานข้อมูล EzTaxon ซ้ำอีก 1 ครั้งและได้ผลที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลต roo10 เป็นแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Pseudoxanthomonas* โดยแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกับไอโซเลต roo10 คือ *Pseudoxanthomonas kalamensis* JA40^{T} (ร้อยละความคล้ายคลึง = 97.8), *Pseudoxanthomonas sangjuensis* 5GH38-5^{T} (ร้อยละความคล้ายคลึง = 97.7) และ *Pseudoxanthomonas daejeonensis* TR6-08 ^{T} (ร้อยละความคล้ายคลึง = 97.1) เพื่อแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ roo10 กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในสกุล *Pseudoxanthomonas* ลำดับเบสของแบคทีเรียทุกชนิดในสกุลนี้ที่จัดเก็บในฐานข้อมูล GenBank จึงถูกนำมาใช้วิเคราะห์ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W แล้วนำผลการเปรียบเทียบมาสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธีคือ neighbor-joining, maximum parsimony และ maximum likelihood (ภาพที่ 4.7 – 4.9) แผนภูมิทั้ง 3 รูปแบบให้ผลการวิเคราะห์ที่คล้ายคลึงกันคือแบคทีเรีย *Pseudoxanthomonas* sp. roo10 มีความใกล้เคียงเชิงวิวัฒนาการกับแบคทีเรีย *P. kalamensis* JA40^{T} มากที่สุด อย่างไรก็ดีความสัมพันธ์นี้มีค่า bootstrap ที่ต่ำกว่าร้อยละ 50

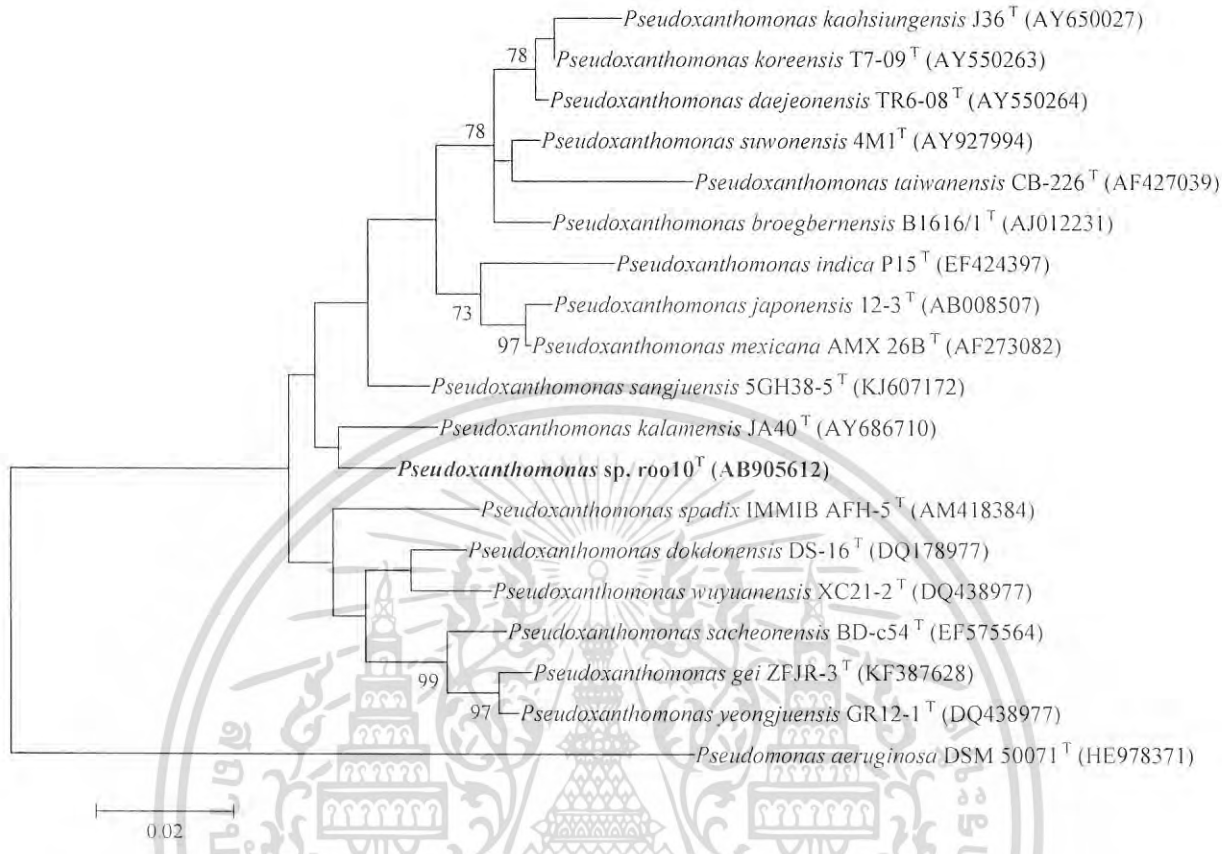
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.7 Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Pseudoxanthomonas* sp. Roo10 และแบคทีเรียอื่นๆ ที่สร้างด้วยวิธี neigbour-joining แสดงค่า bootstrap ที่สูงกว่า 50% เท่านั้น แถบมาตรฐานมีค่าเท่ากับการแทนที่เบส 0.02 เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.8 Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Pseudocanthomonas* sp. roo10 และแบคทีเรียอื่นๆ ที่สร้างด้วยวิธี maximum parsimony

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Pseudocanthomonas* sp. roo10 และแบคทีเรียอื่นๆ ที่สร้างด้วยวิธี maximum likelihood แสดงค่า bootstrap ที่สูงกว่า 50% เท่านั้น แถบมาตรฐานแสดงการแทนที่เบส 0.02 เบส

4.6 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และชีวเคมีของแบคทีเรีย *Pseudoxanthomonas* sp. roo10

แบคทีเรีย *Pseudoxanthomonas* sp. roo10 ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงแล้วถูกนำมาเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบลักษณะโคโลนี การย้อมติดสีแบบแกรม และการศึกษาโครงสร้างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน (ภาพที่ 4.10) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ roo10 มีลักษณะเป็นวงกลมมีสีเหลือง เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ และไม่มีแฟลกเจลลา การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ และการใช้สารประกอบคาร์บอนโดยวิธีมาตรฐานร่วมกับการใช้ชุดทดสอบ API 20 NE แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ และ ม่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส กิจกรรมของเอนไซม์ที่ให้ผลเป็นลบได้แก่เอนไซม์ urease ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ที่ให้ผลเป็นบวกได้แก่ คะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

catalase, cytochrome oxidase, beta-glucosidase และ beta-galactosidase แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ใช้สารประกอบ acetyl-glucosamine, D-glucose, malic acid, D-maltose และ D-mannose และไม่สามารถใช้สารประกอบ adipic acid, L-arabinose, capric acid, D-mannitol, potassium gluconate, phenylacetic acid and trisodium citrate ในการเจริญเติบโตได้ การทดสอบการสร้างกรดจากสารประกอบต่างๆ โดยการใช้ชุดน้ำยาทดสอบ API 50CH แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย roo10 สามารถสร้างกรดได้จาก N-acetylglucosamine, starch, amygdalin, D-arabinose, arbutin, D-cellobiose, erythritol, esculin, D-fructose, D-fucose, L-fucose, D-galactose, gentiobiose, D-glucose, D-lactose, D-mannose, D-maltose, methyl-αD-glucopyranoside, salicin และ L-sorbose และไม่สร้างกรดจาก D-adonitol, L-arabinose, D-arabitol, L-arabitol, dulcitol, glycerol, glycogen, inositol, inulin, D-lyxose, D-mannitol, D-melezitose, D-melibiose, methyl-αD-xylopyranoside, methyl-βD-xylopyranoside, potassium gluconate, potassium 2-ketogluconate and potassium 5-ketogluconate, D-raffinose, L-rhamnose, D-ribose, D-saccharose, D-sorbitol, D-tagatose, D-trehalose, D-turanose, xylitol, D-xylose และ L-xylose การทดสอบการเจริญของสายพันธุ์ roo10 ในอุณหภูมิ สภาพความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นเกลือต่างๆ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส ทนทานความเป็นกรด-ด่างได้ที่ค่า pH ตั้งแต่ 7 – 9 และทนทานความเข้มข้นของเกลือได้ที่ระดับร้อยละ 0.005 – 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญคืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 8 และความเข้มข้นของเกลือเท่ากับร้อยละ 0.005 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลักษณะต่างๆ ทั้งหมดนี้ถูกนำมาทดสอบในแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) ที่มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย roo10 ด้วย แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงได้แก่ *P. kalamensis* JA40^{T}, *P. sangjuensis* 5GH38-5^{T} และ *P. daejeonensis* TR6-08^{T} ซึ่งผลการทดลองและเปรียบเทียบแสดงในตารางที่ 4.5 ตัวอย่างของลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ roo10 กับสายพันธุ์อ้างอิงเช่น ความสามารถในการเคลื่อนที่ การใช้สารประกอบคาร์บอนในการเจริญเติบโต การสร้างกรดจากสารประกอบคาร์บอนต่างๆ และสภาวะการเจริญเติบโต ความแตกต่างเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ roo10 มีความแตกต่างจากสายพันธุ์อ้างอิงอย่างชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.10 เซลล์ของแบคทีเรีย roo10 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบลักษณะทางฟีโนไทป์และชีวเคมีระหว่างแบคทีเรีย *Pseudoxanthomonas* sp. roo10 (1), *P. kalamensis* DSM 18571^{T} (2), *P. sangjuensis* 5GH38-5^{T} (3), และ*P. daejeonensis* DSM 17801^{T}(4) เครื่องหมาย + คือให้ผลการทดลองเป็นบวก, เครื่องหมาย – ให้ผลการทดลองเป็นลบ

ลักษณะ	1	2	3	4
การเคลื่อนที่	—	—	—	+
การรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์	—	—	+	—
Hydrolysis of:				
การเจริญเติบโตที่ pH 9	+	—	+	+
การเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 42 °C	—	—	+	—
การเจริญเติบโตที่เกลือความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	+	+	—	+
การเจริญเติบโตที่เกลือความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	—	—	—	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะ	1	2	3	4
สารประกอบที่ใช้ในการเจริญ:				
L-Arabinose	−	+	+	−
D-Mannose	+	−	+	−
Malic acid	+	−	−	−
สารประกอบที่ใช้สร้างกรด:				
Arbutin	+	−	+	−
L-Arabinose	−	−	+	−
D-Cellobiose	+	+	+	−
Erythritol	+	−	−	−
D-Fructose	+	−	+	−
D-Fucose	+	−	+	+
D-Galactose	+	−	+	−
Glycogen	−	−	+	−
D-Lactose	+	−	+	−
D-Lyxose	−	+	+	+
Potassium 5-ketogluconate	−	+	−	−

4.7 การวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

เซลล์ของแบคทีเรีย roo10 และสายพันธุ์อ้างอิงถูกเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาสกัดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันต่างๆ พบว่ากรดไขมันที่มีปริมาณสูงกว่าร้อยละ 10 ในแบคทีเรีย roo10 ได้แก่ iso-$C_{15:0}$ (ร้อยละ 23.5), iso-$C_{16:0}$ (ร้อยละ 18.9) และ anteiso-$C_{15:0}$ (ร้อยละ 11.5) กรดไขมันที่พบในปริมาณปานกลาง (ร้อยละ 5 – 10) ได้แก่ summed feature 9 (iso-$C_{17:1}$ ω9c และ/หรือ 10-methyl $C_{16:0}$; ร้อยละ 7.9), iso-$C_{11:0}$ 3-OH (ร้อยละ 6.2) และ summed feature 3 ($C_{16:1}$ ω7c/$C_{16:1}$ ω6c; ร้อยละ 5.4) ผลการวิเคราะห์นี้สนับสนุนการจัดจำแนกแบคทีเรีย roo10 ให้อยู่ในสกุล *Pseudoxanthomonas* และสอดคล้องกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA เนื่องจากแบคทีเรียในสกุลนี้มีกรดไขมันประเภท iso-$C_{15:0}$ อยู่ในปริมาณมากเหมือนกันกับสายพันธุ์อ้างอิงอื่นๆ นอกจากนี้การเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของกรดไขมันระหว่างแบคทีเรีย roo10 กับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงยังชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างแบคทีเรีย roo10 และสายพันธุ์อ้างอิงด้วย (ตารางที่ 4.6) ตัวอย่างเช่น iso-$C_{16:0}$ พบใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ roo10, *P. sangjuensis* 5GH38-5^T และ *P. kalamensis* DSM 18571^T ในปริมาณมาก แต่พบในปริมาณปานกลางในสายพันธุ์ *P. daejeonensis* DSM 17801^T หรือกรดไขมัน $C_{16:0}$ ซึ่งไม่พบในแบคทีเรีย roo10 แต่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงทั้งหมดเป็นต้น

ตารางที่ 4.6 ร้อยละของกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่พบในเซลล์แบคทีเรีย *Pseudoxanthomonas* sp. roo10 (1), *P. kalamensis* DSM 18571^T (2), *P. sangjuensis* 5GH38-5^T (3), และ*P. daejeonensis* DSM 17801^T(4) เครื่องหมาย – คือไม่พบกรดไขมันชนิดนั้นๆ

ชนิดกรดไขมัน	1	2	3	4
$C_{16:00}$	—	0.6	0.6	4.4
$C_{17:0}$ cyclo	0.9	—	—	0.3
anteiso-$C_{15:0}$	11.5	6.3	2.0	9.0
anteiso-$C_{17:0}$	—	1.9	0.3	1.6
so-$C_{10:00}$	1.2	0.4	1.8	0.2
iso-$C_{11:00}$	3.4	4.6	4.5	4.0
iso-$C_{14:0}$	4.5	4.3	5.1	0.6
iso-$C_{15:0}$	23.5	26.8	39.8	25.9
iso-$C_{16:0}$	18.9	30.4	15.8	7.0
iso-$C_{17:0}$	2.5	2.1	1.74	10.7
iso-$C_{15:1}$F	0.2	—	1.7	1.0
iso-$C_{16:1}$H	2.3	1.9	0.5	—
iso-$C_{11:0}$ 3-OH	6.2	4.3	6.7	4.2
iso-$C_{12:0}$ 3-OH	0.7	1.4	0.6	0.4
$C_{16:1}$ ω9c	—	—	—	0.8
$C_{16:1}$ ω7c alcohol	—	3.0	—	—
Summed feature 1	1.4	1.0	0.6	—
Summed feature 3	5.4	2.4	1.9	6.4
Summed feature 4	0.4	0.3	—	—
Summed feature 9	7.9	6.3	14.0	19.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

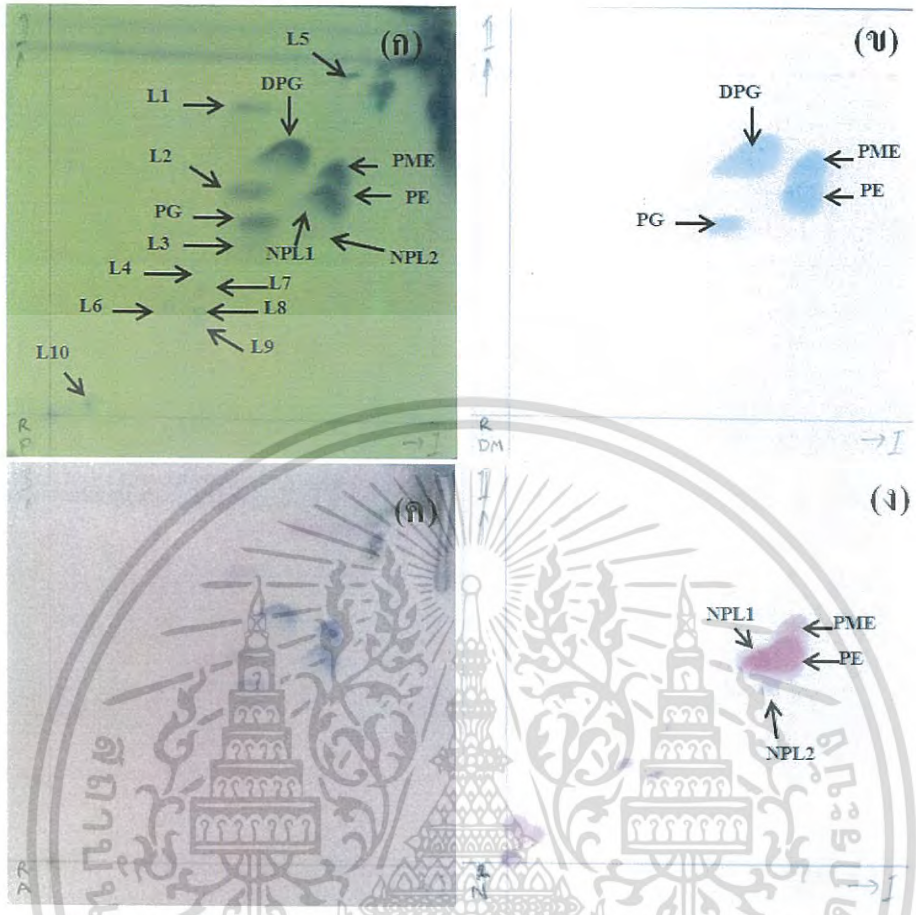
4.8 การวิเคราะห์ polar lipid และปริมาณเบสที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ (G + C content)

ผลการวิเคราะห์ชนิดของ polar lipid ที่พบภายในเซลล์ของแบคทีเรีย roo10 ด้วยวิธี two-dimensional thin layer chromatography พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มี poplar lipid หลายชนิดได้แก่ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) และ phosphatidyl-*N*-methylethanolamine (PME) นอกจากนี้ยังพบ ninhydrin-positive lipid และ polar lipid อีกหลายชนิดที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ด้วย (ภาพที่ 4.11) ในส่วนของการวิเคราะห์ปริมาณเบสบนดีเอ็นเอพบว่าแบคทีเรีย roo10 มีค่า G + C content เท่ากับ 65.7 mol % (T_m) ผลการทดลองนี้ยืนยันว่าแบคทีเรีย roo10 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Pseudoxanthomonas* จริงเนื่องจาก polar lipid ชนิด DPG, PG และ PE พบได้ทั่วไปในแบคทีเรียสกุลดังกล่าว และแบคทีเรียในสกุล *Pseudoxanthomonas* มีปริมาณเบส G+C content อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 60.1 – 71.1

4.9 การวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอ

จีโนมิกส์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย roo10 และแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงถูกเตรียมขึ้นมาเพื่อวิเคราะห์การเข้าจับกันระหว่างดีเอ็นเอของแบคทีเรีย roo10 กับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง ผลการวิเคราะห์พบว่าจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย roo10 มีความคล้ายคลึงกับ *P. kalamensis* DSM 18571^T ร้อยละ 22±0.5, *P. sangjuensis* 5GH38-5^T ร้อยละ 21±0.2 และ *P. daejeonensis* DSM 17801^T ร้อยละ 3±1 ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย roo10 มีลำดับเบสที่แตกต่างไปจากแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงในระดับที่มากเพียงพอที่จะจัดได้ว่าแบคทีเรีย roo10 เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์อ้างอิง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ polar lipid ของแบคทีเรีย roo10 ด้วยวิธี two-dimensional thin layer chromatography เมื่อตรวจสอบด้วยสารละลาย phosphomolybdic acid (ก), Dittmer-Lester reagent (ข), anisaldehyde (ค) และ ninhydrin (ง) DPG, diphosphatidylglycerol; PG, phosphatidyl glycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PME, phosphatidyl-*N*-methylethanolamine; NPL1-2, ninhydrin-positive lipid ที่ไม่ทราบชนิด; L1-10, lipids ที่ไม่ทราบชนิด.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยเกี่ยวกับความหลากหลายของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่พบในหัว, ราก, ลำต้น และใบของต้นแก่นตะวันพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหาร TSA และอาหาร SCN ได้จำนวน 90 ไอโซเลต ผลการวิเคราะห์ชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ด้วยวิธี ARDRA ทำให้สามารถจัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียเหล่านี้ออกได้เป็นจำนวน 53 กลุ่มที่มีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลตตัวแทนของแต่ละกลุ่มรวมจำนวนทั้งสิ้น 60 ไอโซเลตมาวิเคราะห์หาลำดับเบสและเปรียบเทียบกับลำดับเบสของแบคทีเรียที่ทราบชนิดแล้วที่อยู่บนฐานข้อมูล EzTaxon พบว่าแบคทีเรีย 60 ไอโซเลตนี้แบ่งออกได้เป็นแบคทีเรียที่แตกต่างกัน 17 สกุล ได้แก่ *Acinetobacter, Bacillus, Bradyrhizobium, Curtobacterium, Enterobacter, Frigoribacterium, Janibacter, Labrys, Methylobacterium, Microbacterium Microbispora, Pantoea, Pseudomonas, Pseudoxanthomonas, Rhizobium, Sphingobium* และ *Sphingomonas* โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Acinetobacter*

การทดสอบกิจกรรมที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่างๆ ได้แก่ การสร้างฮอร์โมน IAA, การสร้างเอนไซม์ ACC deaminase, การตรึงแกสไนโตรเจน และการเพิ่มการละลายสารประกอบฟอสเฟต พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียเหล่านี้ออกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้ดังนี้

- แบคทีเรีย 10 ไอโซเลตแสดงกิจกรรมการสร้างฮอร์โมน IAA เอนไซม์ ACC deaminase และการเพิ่มการละลายสารประกอบฟอสเฟต โดยแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในสกุล *Bacillus* (2 ไอโซเลต), *Labrys* (3 ไอโซเลต), *Pantoea* (3 ไอโซเลต), *Rhizobium* (1 ไอโซเลต) และ *Sphingomonas* (1 ไอโซเลต)

- แบคทีเรีย 2 ไอโซเลตแสดงกิจกรรมการสร้างฮอร์โมน IAA การตรึงแกสไนโตรเจน และการเพิ่มการละลายสารประกอบฟอสเฟต และเป็นแบคทีเรียในสกุล *Microbacterium* และ *Rhizobium* สกุลละ 1 ไอโซเลต

- แบคทีเรีย 6 ไอโซเลตแสดงกิจกรรมการสร้างฮอร์โมน IAA และเอนไซม์ ACC deaminase แบคทีเรียเหล่านี้ถูกจัดอยู่ในสกุล *Acinetobacter* (1 ไอโซเลต), *Bacillus* (1 ไอโซเลต), *Labrys* (1 ไอโซเลต), *Pseudomonas* (2 ไอโซเลต) และ *Sphingobium* (1 ไอโซเลต)

- แบคทีเรีย 11 ไอโซเลตแสดงกิจกรรมการสร้างฮอร์โมน IAA และการเพิ่มการละลายสารประกอบฟอสเฟต โดยแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในสกุล *Acinetobacter* (5 ไอโซเลต), *Bradyrhizobium* (1 ไอโซเลต),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Curtobacterium (2 ไอโซเลต), *Enterobacter* (1 ไอโซเลต), *Pantoea* (1 ไอโซเลต) และ *Rhizobium* (1 ไอโซเลต)

- แบคทีเรีย 1 ไอโซเลตในสกุล *Labrys* ที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase และการเพิ่มการละลายสารประกอบฟอสเฟต และมีแบคทีเรีย 1 ไอโซเลตในสกุล *Microbacterium* ที่แสดงกิจกรรมการตรึงแกสไนโตรเจนและการเพิ่มการละลายของสารประกอบฟอสเฟต

- แบคทีเรีย 12 ไอโซเลตแสดงกิจกรรมการสร้างฮอร์โมน IAA เพียงอย่างเดียว โดยแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในสกุล *Acinetobacter* (5 ไอโซเลต), *Bacillus* (1 ไอโซเลต), *Frigoribacterium* (1 ไอโซเลต), *Pseudomonas* (1 ไอโซเลต), *Rhizobium* (3 ไอโซเลต) และ *Sphingomonas* (1 ไอโซเลต)

- แบคทีเรีย 4 ไอโซเลตแสดงกิจกรรมเอนไซม์ ACCdeaminase เพียงอย่างเดียว โดยแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในสกุล *Methylobacterium* (3 ไอโซเลต) และ *Pseudomonas* (1 ไอโซเลต)

- แบคทีเรีย 1 ไอโซเลตในสกุล *Pseudomonas* ที่แสดงกิจกรรมการตรึงแกสไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว

- แบคทีเรีย 6 ไอโซเลตแสดงกิจกรรมการเพิ่มการละลายของสารประกอบฟอสเฟตเพียงอย่างเดียว โดยแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในสกุล *Bacillus* (1 ไอโซเลต), *Curtobacterium* (2 ไอโซเลต), *Frigoribacterium* (1 ไอโซเลต), *Janibacter* (1 ไอโซเลต) และ *Methylobacterium* (1 ไอโซเลต)

นอกจากนี้ยังพบด้วยว่ามีแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลตที่ให้ผลลบในทุกกิจกรรมที่ทดสอบในการวิจัยครั้งนี้ โดยแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในสกุล *Acinetobacter* (1 ไอโซเลต), *Microbispora* (3 ไอโซเลต), *Pseudoxanthomonas* (1 ไอโซเลต), *Sphingomonas* (1 ไอโซเลต)

การวิเคราะห์พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ roo10 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้อยู่ในสกุล *Pseudoxanthomonas* โดยมีความคล้ายคลึงกันกับสายพันธุ์อ้างอิง 3 สายพันธุ์ได้แก่ *P. kalamensis* JA40^{T}, *P. sangjuensis* 5GH38-5^{T} และ *P. daejeonensis* TR6-08^{T} ตามแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ การวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์และชีวเคมีต่างๆ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย roo10 มีความแตกต่างจากแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงหลายประการ การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันภายในเซลล์, การวิเคราะห์ polar lipid, การวิเคราะห์ปริมาณเบสบนดีเอ็นเอล้วนให้ผลสอดคล้องกันที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ roo10 เป็นแบคทีเรียที่แตกต่างไปจากแบคทีเรียอื่นๆ ในสกุล *Pseudoxanthomonas* และน่าที่จะเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ในสกุลนี้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวนหลายไอโซเลตที่แยกได้จากต้นแก่นตะวันและแสดงกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช อย่างไรก็ดีการนำแบคทีเรียเหล่านี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปใช้ประโยชน์จำเป็นจะต้องทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อวิเคราะห์ตรวจสอบว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชชนิดใดได้บ้างและเพิ่มในปริมาณเท่าใด นอกจากนี้การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรียเหล่านี้ก็มีความสำคัญเป็นอย่างมากด้วยเช่นกันก่อนที่จะสามารถนำแบคทีเรียเอนโดไฟต์เหล่านี้มาพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้

6.1.1 การตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการเรื่อง *Pseudoxanthomonas helianthi* sp. nov., isolated from roots of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) ในวารสาร International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology เล่มที่ 66 หน้าที่ 5034-5038

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Ait Barka, S., Nowak, J., and Clement, C. (2006). Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth promoting rhizobacterium, Burkholderia phytofirmans strain PsJN. Appl Environ Microbiol 72, 7246-7252.

Bensalim, S., Nowak, J., and Asiedu, S.K. (1998). A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. Am J Potato Res 75, 145-152.

Bric, J.M., Bostock, R.M., and Silverstone, S.E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl Environ Microbiol 57, 535-538.

Cheng, Y., Zhou, W., Gao, C., Lan, K., Gao, Y., and Wu, Q. (2009). Biodiesel production from Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) tuber by heterotrophic microalgae Chlorella protothecoides. J Chem Technol Biotechnol 84, 777-781.

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.

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

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.

Khan, M.S., Zaidi, A., and Wani, P.A. (2006). Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-A review. Agron Sustain Dev 26,1–15.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kittiwongwattana C. and Thawai C. 2013. *Rhizobium paknamense* sp. nov., isolated from lesser duckweeds (*Lemna aequinoctialis*). Int J Syst Evol Microbiol 63, 3823-3828.

Kittiwongwattana C. and Thawai C. 2014. *Rhizobium lemnae* sp. nov., a bacterial endophyte of *Lemna aequinoctialis*. Int J Syst Evol Microbiol 64, 2455-2460.

Kuklinsky-Sobral, J., Araujo, W.L., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A., and Azevedo, J.L. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. Environ Microbiol 6, 1244-1251.

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

Liu, Y., Liu, L., Qiu, F., Schumann, P., Shi, Y., Zou, Y., Zhang, X., and Song, W. (2010) Paenibacillus hunanensis sp. nov., isolated from rice seeds. Int J Syst Evol Microbiol 60, 1266-1270.

Luo, S., Xu, T., Chen, L., Chen, J., Rao, C., Xiao, X., Wan, Y., Zeng, G., Long, F., Liu, C., and Liu, Y. (2012). Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte Bacillus sp. SLS18. Appl Microbiol Biotechnol 93, 1745-1753.

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

Mattos, K.A., Padua, V.L., Romeiro, A., Hallack, L.F., Neves, B.C., Ulisses, T.M., Barros, C.F., Todeschini, A.R., Previato, J.O., and Mendonca-Previato, L. (2008). Endophytic colonization of rice (Oryza sativa L.) by the diazotrophic bacterium Burkholderia kururiensis and its ability to enhance plant growth. An Acad Bras Cienc 80, 477-493.

Mei, C., and Flinn, B. (2010). The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. Rec Pat Biotech 4, 81-95.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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., Asiedu, S.K., and Bensalim, S. (1998). From laboratory to applications: challenges and progress with in vitro dual cultures of potato and beneficial bacteria. Plant Cell Tiss Org Cult 52, 97-103.

Nowak, J., Bensalim, S., and Smith, C.D. (1999). Behaviour of plant material issued from in vitro tuberization. Potato Res 42, 505-519.

Patten, C.L., and Glick, B.R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can J Microbiol 42, 207-220.

Park, M.S., Jung, S.R., Lee, K.H., Lee, M.S., Do, J.O., Kim, S.B., and Bae, K.S. (2006) Chryseobacterium soldanellicola sp. nov. and Chryseobacterium taeanense sp. nov., isolated from roots of sand-dune plants. Int J Syst Evol Microbiol 56, 433-438.

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

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.

Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol Today 33, 152–155.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sun, L., Wang, X., Dai, J., and Xiu, Z. (2009a). Microbial production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by Klebsiella pneumonia. Appl Microbiol Biotechnol 82, 847-852.

Sun, Y., Cheng, Z., and Glick, B.R. (2009b). The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growthpromoting bacterium Burkholderia phytofirmans PsJN. FEMS Microbiol Lett 296, 131-136.

Taule, C., Cintia, M., Barlocco, C., Hackembruch, F., Reis, V., Sicardi, M., and Battistoni, F. (2011). The contribution of nitrogen fixation to sugarcane *(Saccharum officianarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. Plant Soil 356, 35-49.

Meng, X., Long, X., Kang, J., Wang, X., and Liu, Z. (2011). Isolation and identification of endogenic nitrogen-fixing bacteria in the roots of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). Acta Practaculturae Sinica.

Wagh, J., Bhandari, P., Shah, S., Archna, G., and Kumar, G. (2014) Overexpression of citrate operon in *Herbaspirillum seropedicae* Z67 enhances organic acid secretion, mineral phosphate solubilization and growth promotion of *Oryza sativa*. Plant Soil DOI 10.1007/s11104-014-2161-2.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเผยแพร่ผลการวิจัยในรูปแบบบทความวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2016), 66, 5034–5038 DOI 10.1099/ijsem.0.001465

Pseudoxanthomonas helianthi sp. nov., isolated from roots of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*)

Chokchai Kittiwongwattana[1,2] and Chitti Thawai[1,2]

Correspondence
Chokchai Kittiwongwattana
chokchaikit@kmitl.ac.th

[1]Department of Biology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

[2]Actinobacterial Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

A bacterium designated as strain roo10^T was isolated from roots of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). Cells were Gram-stain-negative and non-motile rods. The phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene indicated that it represented a member of the genus *Pseudoxanthomonas*, and its close relatives included *Pseudoxanthomonas kalamensis* JA40^T (97.8 % 16S rRNA gene sequence similarity), *Pseudoxanthomonas sangjuensis* 5GH38-5^T (97.7 %) and *Pseudoxanthomonas daejeonensis* TR6-08^T (97.1 %). Growth of roo10^T occurred at pH 7–9. The temperature for growth ranged from 20 to 37 °C. Tolerance to NaCl was observed from 0.005 to 5 % (w/v) concentration. Predominant fatty acids were iso-$C_{15:0}$ (23.5 %), iso-$C_{16:0}$ (18.9 %) and anteiso-$C_{15:0}$ (11.5 %). Diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and phosphatidyl-*N*-methylethanolamine were the major polar lipids. The predominant quinone was ubiquinone 8 (Q-8). The DNA G+C content was 65.7 mol% [from melting temperature (T_m)]. Comparison of phenotypic and chemotaxonomic characteristics indicated that roo10^T was distinguishable from its close relatives. Additionally, the DNA–DNA relatedness levels between roo10^T and *P. kalamensis* DSM 18571^T (22±0.5 %), *P. sangjuensis* 5GH38-5^T (21±0.2 %) and *P. daejeonensis* DSM 17801^T (3±1 %) were lower than 70 %. These results indicated that roo10^T represented a novel species of the genus *Pseudoxanthomonas*, for which the name *Pseudoxanthomonas helianthi* sp. nov. is proposed. The type strain is roo10^T (=BCC 70700^T=NBRC 110414^T).

The genus *Pseudoxanthomonas* was first described by Finkmann *et al.* (2000) with *Pseudoxanthomonas broegbernensis*, isolated from experimental biofilters, as the type species. Emended descriptions of the genus were later produced by Thierry *et al.* (2004) and Lee *et al.* (2008). Bacteria that are members of the genus *Pseudoxanthomonas* are Gram-stain-negative rods. The major isoprenoid quinone is ubiquinone 8 (Q-8), and iso-$C_{15:0}$ is the predominant fatty acid (Finkmann *et al.*, 2000; Thierry *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2015). The DNA G+C content ranges from 60.1 to 71.1 mol% [by melting temperature (T_m)] among different species (Kim *et al.*, 2015). At the time of writing, 17 species were affiliated to the genus. Members of the genus have been isolated from various sources, for example, greenhouse soil, saline–alkaline soil, polluted sites and hot springs (Kim *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2002). However, *Pseudoxanthomonas gei* was the only species that was originally isolated from plants (*Geum aleppicum* Jacq.) (Zhang *et al.*, 2014). We recently investigated the diversity of endophytic bacteria that colonized internal tissues of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) that were grown in Kanchanaburi province, Thailand. Among isolated bacteria, roo10^T represent a novel species of the genus *Pseudoxanthomonas* on the basis of 16S rRNA gene sequence analysis. The aim of this study was to characterize roo10^T using a polyphasic approach.

Roots, stems and leaves of plant samples were cut into small pieces and surface-sterilized using 10 % sodium hypochlorite solution that was added with a few drops of Tween 20. Excess sterilization solution was washed off the samples three times using sterilized distilled water. Samples were ground with a mortar and pestle. Subsequently, they were placed in glass bottles containing sterilized distilled water

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the partial 16S rRNA gene sequence of strain roo10^T is AB905612.

Four supplementary figures and one supplementary table are available with the online Supplementary Material.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and shaken on a rotary shaker for 30 min. Bacterial suspension was serially diluted up to the 10^{-5} concentration. Diluted bacterial suspensions were plated on tryptone soya agar (TSA; HiMedia) and incubated at 30 °C for 7 days. Bacterial isolates that grew on the medium were purified by cross streaking on TSA plates. To confirm the success of surface sterilization, control plates were obtained by plating 100 µl of the final rinsing water on TSA plates.

Strain roo10^T was isolated from root tissues of Jerusalem artichoke. The bacterium was grown on a TSA plates at 30 °C for 48 h. Cells were scraped off the medium for genomic DNA extraction according to the method described by Araújo *et al.* (2002). Extracted DNA was used for amplification of the nearly complete 16S rRNA gene with the universal primers 27F and 1492R (Lane, 1991). The temperature profile was as follows: 94 °C for 3 min; 40 cycles of 94 °C for 30 s, 56 °C for 30 s, and 72 °C for 90 s; and 72 °C for 5 min. PCR products were purified using Gel/PCR Purification Kit (Favorgen Biotech). The universal primers 27F, 1492R, 780F (5′-GATTAGATACCCTGGTAG-3′) and 350R (5′-CTGCTGCCTCCCGTAG-3′) (Lane, 1991) were used for sequencing of the PCR products. The 16S rRNA gene sequence (1494 bp) of roo10^T was subjected to pairwise alignment analysis using the EzTaxon-e server (Kim *et al.*, 2012). The highest sequence similarity (97.3 %) was observed between roo10^T and *Pseudoxanthomonas kalamensis* JA40^T.

The multiple alignment analysis was carried out with the almost complete 16S rRNA gene sequences of roo10^T and all species of the genus *Pseudoxanthomonas* with validly published names using the CLUSTAL W programme, version 1.81 (Thompson *et al.*, 1994). Gaps and ambiguous nucleotides were manually adjusted and corrected. Subsequently, pairwise sequence similarities between sequences of roo10^T and other species were determined using the same programme. The phylogenetic tree was reconstructed using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987) in the programme MEGA version 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). The Kimura two-parameter model (Kimura, 1980) was used for the calculation of evolutionary distances. Additional phylogenetic trees were reconstructed using the maximum-parsimony (Fitch, 1971) and the maximum-likelihood (Felsenstein, 1981) methods. The levels of confidence of the clusters were determined using the bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) with 1000 re-samplings.

Strain roo10^T displayed sequence similarity levels that were higher than 97 % with *P. kalamensis* JA40^T (97.8 %), *Pseudoxanthomonas sangjuensis* 5 GH38-5^T (97.7 %) and *Pseudoxanthomonas daejeonensis* TR6-08^T (97.1 %). Similarity levels lower than 97 % were observed between roo10^T and all other species of the genus *Pseudoxanthomonas*. Reconstruction of the phylogenetic tree using the neighbour-joining method showed that roo10^T formed a distinct clade with *P. kalamensis* JA40^T although this was not significantly supported by the bootstrap value (Fig. 1). However, this cluster was consistently observed in the trees that were generated by the maximum-parsimony and maximum-likelihood methods (Figs S1 and S2, available in the online Supplementary Material).

Strain roo10^T was grown on TSA at 30 °C for 48 h in order to determine its morphological characteristics. Cell morphology was examined under a transmission electron microscope (JEM-1230; JEOL). Phenotypic features of roo10^T and those of the closely related species including *P. kalamensis* DSM 18571^T, *P. sangjuensis* 5 GH38-5^T and *P. daejeonensis* DSM 17801^T were determined and compared. Hanging-drop wet mounts were used for determination of cell motility. Catalase was tested using 3 % H_2O_2. Cytochrome oxidase was determined on filter paper soaked with tetramethyl-*p*-phenylenediamine (Sigma). DNase and L-arginine dihydrolase were tested using DNase test agar base (Sisco Research Laboratories) and arginine dihydrolase broth (HiMedia), respectively. Production of gas and H_2S was tested on triple-sugar iron agar (HiMedia). The methyl red and Voges–Proskauer reactions were tested in MR-VP medium (Biomark) according to the manufacturer's protocol. Indole production was tested using motility–indole–lysine medium (Biomark). Hydrolysis of starch and Tween 80 was determined according to previously described methods (Atlas & Snyder, 2011; Kilburn *et al.*, 1973). Hydrolysis of casein was performed on skim milk agar (HiMedia). The pH range for growth was examined at pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 in tryptone soya broth (TSB; HiMedia). Citrate–phosphate, Tris–HCl and carbonate–bicarbonate buffer systems (Gomori, 1955) were used for pH 4–7, pH 8–9 and pH 10, respectively. pH was checked after sterilization and incubation with bacteria. NaCl tolerance was determined at 0.005, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 % (w/v) NaCl in TSB. Growth at 10, 15, 20, 25, 30, 37 and 42 °C was tested on TSA medium. Additional phenotypic features were determined using API 20NE and API 50CH galleries (bioMérieux).

Cells of roo10^T were rod-shaped, Gram-stain-negative and non-flagellated (Fig. S3). Colonies grown on TSA medium at 30 °C for 48 h were circular and yellow. Full details of phenotypic features of roo10^T are given in species description. Additionally, roo10^T displayed several phenotypic features that were distinct from those of the closely related species (Table 1). These included cell motility, hydrolysis of casein, gelatin and starch, growth conditions, assimilation of carbon sources and acid production from substrates. These differential phenotypic features indicated that roo10^T was readily distinguishable from its close relatives.

For the analysis of cellular fatty acid profiles, cells of roo10^T and its close relatives were grown on TSA plates to exponential phase after incubation at 30 °C for 48 h. The analysis was performed using GLC according to the instructions of the Microbial Identification System (MIDI), Sherlock version 6.0 (Kämpfer & Kroppenstedt, 1996; Sasser, 1990). Identification of cellular fatty acids was based on the TSBA6 database of the MIDI system (Sasser, 1990).

Cellular fatty acid profiles of roo10^T and its close relatives are provided in Table S1. The predominant fatty acids (>10 %) found in roo10^T included iso-$C_{15:0}$ (23.5 %), iso-$C_{16:0}$ (18.9 %) and anteiso-$C_{15:0}$ (11.5 %). Other fatty acids

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

that were present at moderate levels (5–10 %) were summed feature 9 (iso-$C_{17:1}\omega9c$ and/or 10-methyl $C_{16:0}$; 7.9 %), iso-$C_{11:0}$ 3-OH (6.2 %) and summed feature 3 ($C_{16:1}\omega7c/C_{16:1}\omega6c$; 5.4 %). The presence of iso-$C_{15:0}$ as one of the major fatty acids in roo10^T was consistent with previous reports on other species of the genus *Pseudoxanthomonas* (Kim *et al.*, 2015). Comparison between the fatty acid profiles of roo10^T and its close relatives indicated both quantitative and qualitative differences. For example, iso-$C_{16:0}$ occurred in roo10^T, *P. sangjuensis* 5 GH38-5^T and *P. kalamensis* DSM 18571^T as the major type but was found in moderate amount in *P. daejeonensis* DSM 17801^T. Additionally, $C_{16:0}$ was absent in roo10^T but present in all of the reference strains. The results obtained from the analysis of fatty acid profiles confirmed the distinction between roo10^T and the most closely related species.

For the analysis of polar lipids, roo10^T was grown in TSB medium to exponential phase after incubation at 30 °C for 48 h on a rotary shaker. Cells were harvested by centrifugation and lyophilized. Extraction and analysis of polar lipids were performed according to the method described by Minnikin *et al.* (1984). Ubiquinones were extracted from lyophilized biomass and prepared following the method described by Komagata & Suzuki (1987). The analysis of ubiquinones was performed using a HPLC system equipped with a Cosmosil 5 C_{18} column (4.6×150 mm; Nacalai Tesque). Methanol and 2-propanol (2 : 1, v/v) were used as the elution solvent. Genomic DNA was extracted from cells of roo10^T that were grown on TSA at 30 °C for 48 h by the method of Marmur (1961). The DNA G+C content was determined using the HPLC method of Mesbah *et al.* (1989). Lambda DNA (Invitrogen) was used as the standard.

Major polar lipids of roo10^T consisted of diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidyl-*N*-methylethanolamine (PME) (Fig. S4). Unknown ninhydrin-positive lipids and unknown polar lipids were also found. This result was somewhat similar to what had been described in previous reports. DPG, PG and PE were commonly found in the type strains of several species of the genus *Pseudoxanthomonas* (Lee *et al.*, 2008; Kumari *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015). In contrast, roo10^T was the first strain of the genus that contained PME as one of the major polar lipids. The ubiquinone present in roo10^T was Q-8. This was consistent with the description of the genus *Pseudoxanthomonas* (Finkmann *et al.*, 2000). The DNA base composition analysis revealed that the G+C content of roo10^T was 65.7 mol% (T_m). Consistently, previous studies have shown that the DNA G+C contents of species of the genus *Pseudoxanthomonas* ranged from 60.1 % to 71.1 % (Kim *et al.*, 2015). Taken together, these results supported the affiliation of roo10^T to the genus *Pseudoxanthomonas*.

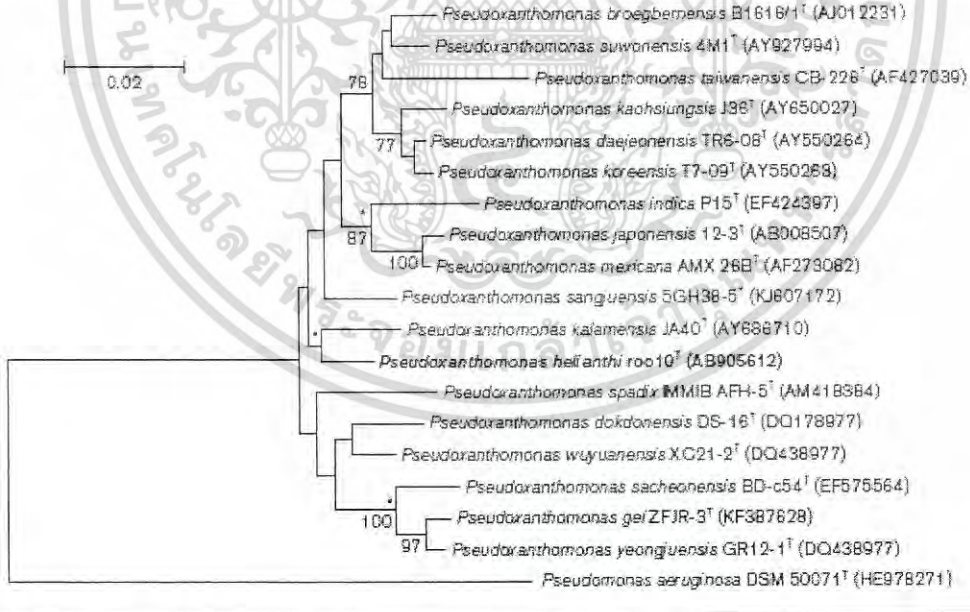


Fig. 1. Phylogenetic tree reconstructed with the neighbour-joining method based on the nearly complete 16S rRNA gene sequences of roo10^T and other species of the genus *Pseudoxanthomonas*. *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T was used as the outgroup. Tree branches that were also recovered using maximum-likelihood and maximum-parsimony methods are indicated with asterisks. Bootstrap values are shown at the node of each cluster as the percentage of 1000 replicates. Only values higher than 70% are displayed. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1. Differential phenotypic characteristics of roo10^T and the reference strains

All data were obtained in the present study. Strains: 1, roo10^T; 2, *P. kalamensis* DSM 18571^T; 3, *P. sangjuensis* 5 GH38-5^T; 4, *P. daejeonensis* DSM 17801^T. +, Positive; −, negative; w, weakly positive.

Characteristics	1	2	3	4
Motility	−	−	−	+
Nitrate reduction	−	−	+	−
Hydrolysis of:				
Casein	−	−	+	−
Gelatin	−	−	+	−
Starch	+	−	+	−
Growth at:				
pH 9	+	−	+	+
42 °C	−	−	+	−
3 % (w/v) NaCl	+	+	−	+
6 % (w/v) NaCl	−	−	−	−
Assimilation of:				
L-Arabinose	−	+	−	+
D-Mannose	−	−	+	−
Malic acid	+	−	−	−
N-acetyl-glucosamine	+	w	+	−
Acid produced from:				
Arbutin	+	−	+	−
L-Arabinose	−	−	+	−
D-Cellobiose	+	+	+	−
Erythritol	−	−	−	−
D-Fructose	+	−	−	+
D-Fucose	+		+	+
D-Galactose	+	−	+	−
Glycogen	−	−	+	−
D-Lactose	+	−	+	−
D-Lyxose	−	+	+	+
Potassium 5-ketogluconate	−	+	−	−
D-Xylose	−	−	+	−

Based on their phylogenetic relationship, the DNA–DNA relatedness between roo10^T and *P. kalamensis* DSM 18571^T, *P. sangjuensis* 5 GH38-5^T and *P. daejeonensis* DSM 17801^T was determined. Genomic DNA was prepared according to the previously described method (Marmur, 1961). The DNA–DNA hybridization in microdilution-well plates and photobiotinylation of DNA probes were carried out according to the method described by Ezaki *et al.* (1989). The DNA–DNA relatedness was determined using the colorimetric method (Verlander, 1992). The result indicated that roo10^T displayed relatively low levels of DNA–DNA relatedness with *P. kalamensis* DSM 18571^T (22±0.5 %), *P. sangjuensis* 5 GH38-5^T (21±0.2 %) and *P. daejeonensis* DSM 17801^T (3±1 %). These levels were much lower than the 70 % cut-off level that has been accepted for assigning two strains to the same species (Wayne *et al.*, 1987). This result supported the proposal that roo10^T represents a novel species of the genus *Pseudoxanthomonas*, for which we propose the name *Pseudoxanthomonas helianthi*.

Description of *Pseudoxanthomonas helianthi* sp. nov.

Pseudoxanthomonas helianthi (he.li.an'thi. N.L. gen. n. *helianthi* of *Helianthus tuberosus*).

Cells are Gram-stain-negative and non-motile rods (0.4–0.5× 1.5–1.6 μm). Flagella are not observed. Colonies are circular and yellow when grown on TSA medium at 30 °C for 48 h. Growth occurs at pH ranging from 7 to 9 in TSB medium (optimum pH 8.0). Grows at 20, 25, 30 and 37 °C (optimum temperature 30 °C) on TSA medium. Tolerates NaCl up to 5 % (w/v) concentration with the optimum NaCl concentration at 0.005 % (w/v). Positive for catalase, cytochrome oxidase and DNase but negative for L-arginine dihydrolase. Negative for methyl red and Voges–Proskauer reactions. Does not produce gas and H_2S when grown in triple-sugar iron agar. Does not produce indole. Hydrolyzes starch but not casein, gelatin and Tween 80. Nitrate is not reduced to nitrite. Glucose fermentation and urease are negative. Beta-glucosidase and beta-galactosidase are positive. *N*-acetylglucosamine, D-glucose, malic acid, D-maltose and D-mannose are assimilated while adipic acid, L-arabinose, capric acid, D-mannitol, potassium gluconate, phenylacetic acid and trisodium citrate are not. Acid is produced from the following carbon sources: *N*-acetylglucosamine, starch, amygdalin, D-arabinose, arbutin, D-cellobiose, erythritol, aesculin, D-fructose, D-fucose, L-fucose, D-galactose, gentiobiose, D-glucose, D-lactose, D-mannose, D-maltose, methyl α-D-glucopyranoside, salicin and L-sorbose. Acid is not produced from the following carbon sources: D-adonitol, L-arabinose, D-arabitol, L-arabitol, dulcitol, glycerol, glycogen, inositol, inulin, D-lyxose, D-mannitol, D-melezitose, D-melibiose, methyl α-D-xylopyranoside, methyl β-D-xylopyranoside, potassium gluconate, potassium 2-ketogluconate, potassium 5-ketogluconate, D-raffinose, L-rhamnose, D-ribose, D-saccharose, D-sorbitol, D-tagatose, D-trehalose, D-turanose, xylitol, D-xylose and L-xylose. The major fatty acids (>10 %) are iso-$C_{15:0}$, iso-$C_{16:0}$ and anteiso-$C_{15:0}$. Major polar lipids include diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidyl-*N*-methylethanolamine (PME). The major ubiquinone is Q-8.

The type strain is roo10^T (=BCC 70 700^T=NBRC 110414^T), which was isolated from roots of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). The DNA G+C content of the type strain is 65.7 mol% (T_m).

References

Araújo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W. Jr., Van Elsas, J. D., Van Vuurde, J. W. & Azevedo, J. L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl Environ Microbiol* 68, 4906–4914.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Atlas, R. & Snyder, J. (2011). *Reagents, Stains and Media: Bacteriology*, pp. 272–303. Edited by J. Versalovic, K. Carroll, G. Funke, J. Jorgensen, M. Landry & D. Warnock. Washington, DC: ASM press.

Chang, J. S., Chou, C. L., Lin, G. H., Sheu, S. Y. & Chen, W. M. (2005). *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis*, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity. *Syst Appl Microbiol* **28**, 137–144.

Chen, M. Y., Tsay, S. S., Chen, K. Y., Shi, Y. C., Lin, Y. T. & Lin, G. H. (2002). *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, N_2O-producing species isolated from hot springs. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2155–2211.

Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid–deoxyribonucleic acid hybridization in micro-dilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 224–229.

Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**, 368–376.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.

Finkmann, W., Altendorf, K., Stackebrandt, E. & Lipski, A. (2000). Characterization of N_2O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 273–282.

Fitch, W. M. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* **20**, 406–416.

Gomori, G. (1955). Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods Enzymol* **1**, 138–146.

Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996). Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* **42**, 989–1005.

Kilburn, J. O., O'Donnell, K. F., Silcox, V. A. & David, H. L. (1973). Preparation of a stable mycobacterial Tween hydrolysis test substrate. *Appl Microbiol* **26**, 826.

Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H. & other authors (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 716–721.

Kim, S. J., Ahn, J. H., Weon, H. Y., Lim, J. M., Kim, S. G. & Kwon, S. W. (2015). *Pseudoxanthomonas sangjuensis* sp. nov., isolated from greenhouse soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**, 3170–3174.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111–120.

Komagata, K. & Suzuki, K. (1987). *Lipid and Cell Wall Analysis in Bacterial Systematics*, pp. 161–208. Edited by R. R. Colwell & R. Grigorova. Orlando: Academic Press.

Kumar, K., Sharma, P., Tyagi, K. & Lal, R. (2011). *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dumpsite. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 2107–2111.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley & Sons.

Lee, D. S., Ryu, S. H., Hwang, H. W., Kim, Y. J., Park, M., Lee, J. R., Lee, S. S. & Jeon, C. O. (2006). *Pseudoxanthomonas suwonensis* sp. nov., isolated from BTEX-contaminated soil in Korea, transfer of *Stenotrophomonas dokdonensis* Yoon *et al.* 2006 to the genus *Pseudoxanthomonas* as *Pseudoxanthomonas dokdonensis* comb. nov. and emended description of the genus *Pseudoxanthomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2235–2240.

Li, D., Pang, H., Sun, L., Fan, J., Li, Y. & Zhang, J. (2014). *Pseudoxanthomonas wuyuanensis* sp. nov., isolated from saline–alkali soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 799–804.

Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol* **3**, 208–218.

Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159–167.

Minnikin, D. E., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. & Parlett, J. H. (1984). An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* **2**, 233–241.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.

Sasser, M. (1990). *Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids*. MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725–2729.

Thierry, S., Macarie, H., Iizuka, T., Geissdörfer, W., Assih, E. A., Spanevello, M., Verhe, F., Thomas, P., Fudou, R. & other authors (2004). *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann *et al.* 2000 and of its type species. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2245–2255.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.

Verlander, C. P. (1992). Detection of horseradish peroxidase by colorimetry. In *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, pp. 185–201. Edited by L. J. Kricka. New York: Academic Press.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E. & other authors (1987). International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463–464.

Zhang, L., Wei, L., Zhu, L., Li, C., Wang, Y. & Shen, X. (2014). *Pseudoxanthomonas ginsengisoli* sp. nov., a novel endophytic bacterium isolated from the stem of *Geum aleppicum*. *Antonie van Leeuwenhoek* **105**, 653–661.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย

รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
1. งบประมาณที่ได้รับการอนุมัติ	
1.1 จำนวนเงินที่ได้รับงวดที่ 1	272,000
1.2 จำนวนเงินที่ได้รับงวดที่ 2	48,000
1.3 ดอกเบี้ยรายรับ	467.84
รวม	**320,467.84**
2. ค่าใช้จ่าย	
2.1 ค่าใช้สอย	13,602.00
2.2 ค่าวัสดุ	306,867.81
รวม	**320,469.81**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chokchai Kittiwongwattana

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผศ.ดร.

3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

   สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

   สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง

   ถ.ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

   โทรศัพท์ 0-2329-8400 ต่อ 3600

   โทรสาร 0-329-8427

   E-mail: kkchokch@kmitl.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

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

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

พันธุศาสตร์ของพืชและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางชีววิทยาของพืชทั้งในเชิงพื้นฐานและเชิงประยุกต์ เช่น การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การทำพันธุวิศวกรรม เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในการถ่ายฝากยีน

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

   3.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

   3.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

3.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

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

สถานภาพ: ผู้ร่วมวิจัยระหว่างการศึกษาระดับปริญญาเอก

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

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

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

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

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

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

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

3.4 งานวิจัย:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T149113

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้