

ผลของการอยู่ร่วมกันของราอับสคูลารีไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไม  
คอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของอ้อย

น.ส.ภัทราวรรณ ธิชัยพร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2561  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.



2075474675

CU Thesais 5872017723 thesis / recv: 18072562 18:36:11 / seq: 57

Synergistic effect of arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhizal helper bacteria on  
sugarcane growth

Miss Pattharawan Teacomporn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Biotechnology  
Common Course  
Faculty of Science  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2018  
Copyright of Chulalongkorn University



2075474675

CU Thesisis 5872017723 thesis / recv: 18072562 18:36:11 / seq: 57

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการอยู่ร่วมกันของราอับัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของอ้อย
โดย	น.ส.ภัทราวรรณ ธิम्मพร
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.อลิสา วังโน

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ศาสตราจารย์ ดร.อลิสา วังโน)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ กาญจนทัต)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร)

ภัทรารวรรณ ชีम्मพร : ผลของการอยู่ร่วมกันของราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของอ้อย. ( Synergistic effect of arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhizal helper bacteria on sugarcane growth) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. ดร.อลิสา วังโน

ในปัจจุบันมีทางเลือกที่สามารถทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีและสารกำจัดศัตรูพืชที่หลากหลาย โดยมีความปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม หนึ่งในทางเลือกที่ใช้คือการใช้ปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบด้วยราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อพื้นที่เกษตรกรรมในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและระบุชนิดของราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา รวมไปถึงผลของการอยู่ร่วมกันของราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของต้นอ้อยพบ สปอร์ราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซา 18 ลักษณะที่แตกต่างกันได้จากการแยกดินรอบรากอ้อยของไร่อ้อยในประเทศไทย โดยลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์สามารถจำแนกแบ่งออกได้เป็น 3 วงศ์คือ Glomeraceae, Acaulosporaceae และ Gigasporaceae โดยวงศ์ Glomeraceae เป็นวงศ์ที่พบมากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ ราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซา AY01 และAT04 เป็นราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซาที่สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์และมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากข้าวฟ่างสูงที่สุด เมื่อระบุชนิดด้วยเทคนิคทางอนุวิทยาและสัณฐานวิทยาของราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซา AY01 และAT04 พบว่าอยู่ในสกุล *Diversispora* นอกจากนี้สามารถแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซาได้จำนวน 122 ไอโซเลท โดยพบ 20 ไอโซเลทมีลักษณะความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ลักษณะการสร้าง IAA สารในกลุ่ม siderophore แอมโมเนีย การสร้างไบโอฟิล์ม และมีความสามารถในการละลายฟอสเฟต โดยพบเพียงแบคทีเรีย ATR16 เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการออกของสปอร์ราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซา AY01 และAT04 ได้เมื่อทำการระบุชนิดด้วยเทคนิคอนุวิทยาสามารถระบุได้ว่า ATR16 คือ *Acinetobacter baumannii*

ในการทดลองเพื่อศึกษาการอยู่ร่วมกันของราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซา AY01 และAT04 กับแบคทีเรีย ATR16 โดยเก็บค่าความสูงมวลชีวภาพเหนือดินและใต้ดิน และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากอ้อย จากชุดการทดลองที่มีการใช้ราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซา AY01 ร่วมกับแบคทีเรีย ATR16 พบว่า มีค่าต่าง ๆ สูงกว่าชุดควบคุมและมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อสูงสุด (69.59%) ผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้ราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซาร่วมกับแบคทีเรียที่มีลักษณะของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อชีวภาพเพื่อนำไปใช้ในการเกษตรแบบยั่งยืน

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ  
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5872017723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: sugarcane, Arbuscular mycorrhizal fungi, Arbuscular mycorrhizal helper bacteria, plant growth promoting bacteria

Pattharawan Teacomporn : Synergistic effect of arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhizal helper bacteria on sugarcane growth. Advisor: Asst. Prof. Dr. JITTRA PIAPUKIEW Co-advisor: Prof. Dr. ALISA VANGNAI

Nowadays, the alternative ways for replacement of the use of chemical fertilizer and pesticides are strongly encouraged because of increasing claims of environmentally friendly and healthy agriculture. Biofertilizer using soil microorganisms such as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and beneficial bacteria is a promising tool for sustainable agriculture. The aims of this study were to isolate and identify arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and mycorrhization helper bacteria and to determine the effects of AMF and mycorrhization helper bacteria on sugarcane seedlings. Eighteen different mycorrhizal spores were isolated from the sugarcane rhizosphere soils collected from various sugarcane fields in Thailand. The result in morphological observation found 3 families, namely Glomeraceae, Acaulosporaceae and Gigasporaceae and the population of the family Glomeraceae were found most dominant in the rhizosphere of sugarcane plants. AMF isolate AY01 and isolate AT04 were able to produce and increase their spores in sorghum roots with a large number of spores. AMF isolate AY01 and isolate AT04 were belonging to *Diversispora* using morphology and molecular technique based on 18S rRNA gene. One hundred and twenty-two bacterial isolate were isolated from AMF spores and were screened for their plant growth promoting (PGP) activities. The results showed 20 bacterial isolates had at least four PGP activities such as IAA, siderophore, ammonia and biofilm production or phosphate solubilization. Only one bacterial isolate, ATR16 was able to stimulate both spores of AMF isolate AY01 and isolate AT04. MHB isolate ATR16 was identified as *Acinetobacter baumannii* based on molecular technique.

An experiment was conducted to determine the effect of selected AMF isolates, AY01 and AT04, and MHB isolate ATR16. The results revealed that shoot height, above and belowground biomass and root colonization of AMF in sugarcane seedlings inoculation with the combination of AMF and mycorrhization helper bacteria were significantly higher than the non-inoculated seedlings and sole inoculated seedlings. AMF isolate AY01 + MHB isolate ATR16 treatment was found the greatest increasing growth of the plants and the highest root colonization (69.59%). These results of this study indicate the synergistically interacting between AMF and PGP activities can enhance the growth of sugarcane seedlings and arbuscular mycorrhiza development. These findings could be useful for the development of bioinoculants suitable for the establishment of sustainable agriculture.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2018

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพ็ญภูเขียวอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้ คำปรึกษาต่าง ๆ รวมถึงให้คำแนะนำช่วยเหลือแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดเวลา ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.อลิสรา วังโน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความรู้และคำปรึกษาต่าง ๆ จึงทำให้วิทยานิพนธ์นี้มีความสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ กาญจนทัต และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณนายจรรุภัทร์ และนางวิลาวรรณ อีรัมย์พร บิดาและมารดา ที่คอยให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ให้กำลังใจห่วงใย และคอยเตือนสติเสมอมา

ขอขอบพระคุณบุคลากรภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก ในการปฏิบัติงานด้านต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการราวิทยา (212) ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่คอยให้ความช่วยเหลือในหลาย ๆ ด้าน ถึงแม้จะเป็นเวลาอันสั้นแต่ก็ได้รับความอบอุ่นและจริงใจในการทำงานเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณผู้เกี่ยวข้องในการทำงานทุก ๆ ฝ่าย ถึงแม้ว่าจะอาจเอยนามไม่ได้หมด แต่งานวิจัยชิ้นนี้ไม่สามารถสำเร็จได้ด้วยดีถ้าหากขาดฝ่ายใดฝ่ายหนึ่งที่คอยสนับสนุนในขณะที่ทำงานวิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงยิ่ง

ภัทราวรรณ อีรัมย์พร



2075474675

CU Thesisis 5872017723 thesisis / recv: 18072562 18:36:11 / seq: 57

## สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ง
กิตติกรรมประกาศ .....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 สรีรวิทยาและข้อมูลพื้นฐานของอ้อย .....	4
2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอ้อย.....	4
2.1.2 การเจริญเติบโตของอ้อยเมื่อปลูกด้วยท่อนพันธุ์.....	7
2.1.3 การเจริญเติบโตของอ้อยเมื่อปลูกด้วยต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช .....	8
2.1.4 มูลค่าทางเศรษฐกิจของอ้อย.....	9
2.1.5 ปัญหาการปลูกอ้อย.....	11
2.2 การใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อพื้นที่เกษตรกรรม .....	11
2.2.1 ราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซา .....	12

2.2.2 แบททีเรีย ..... 24

บทที่ 3 อุปกรณ์ และสารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย ..... 30

3.1 อุปกรณ์ ..... 30

3.2 สารเคมี ..... 31

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย ..... 32

3.3.1 การเก็บตัวอย่างดินที่อยู่รอบรากอ้อยและรากอ้อยจากแปลงเกษตรกรรม ..... 32

3.3.2 การแยกและจัดกลุ่มราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ..... 34

3.3.3 การเพิ่มจำนวนสปอร์ของราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ..... 37

3.3.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและระบุชนิดราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกได้  
ด้วยเทคนิคอณูวิทยา ..... 37

3.3.5 การแยกแบททีเรียจากสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ..... 39

3.3.6 ทดสอบลักษณะการเป็น PGPB และการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราออบัสคูลาร์-  
ไมคอร์ไรซาของแบททีเรียที่แยกได้ ..... 39

3.3.7 การการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและระบุชนิดแบททีเรียที่มีลักษณะการเป็น PGPB  
และช่วยกระตุ้นการงอกของสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ..... 42

3.3.8 การศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันของราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบททีเรีย  
ต่อการเจริญเติบโตของอ้อย ..... 43

บทที่ 4 ผลการวิจัย ..... 46

4.1 การแยกชนิดและจัดกลุ่มสปอร์ของราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ..... 46

4.2 การเพิ่มจำนวนสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ..... 48

4.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและระบุชนิดราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกได้ด้วย  
เทคนิคอณูวิทยา ..... 49

4.4 การแยกแบททีเรียจากสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ..... 50

4.5 การทดสอบการเป็น PGPB ของแบททีเรียที่แยกได้และความสามารถในการกระตุ้นการงอก  
ของสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ..... 51



4.6 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและระบุชนิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคอณูวิทยา ... 57

4.7 การศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันของราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียต่อ  
 การเจริญเติบโตของอ้อย ..... 58

บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย..... 61

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง..... 66

บรรณานุกรม..... 68

ประวัติผู้เขียน ..... 81

ภาคผนวก..... 83

ภาคผนวก ก..... 84

ภาคผนวก ข..... 86

ภาคผนวก ค..... 89

ภาคผนวก ง..... 91

ภาคผนวก จ..... 93



2075474675

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1	อันดับ วงศ์และสกุลของเชื้อราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซา.....18
ตารางที่ 2.2	การรายงานผลของราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิด จากการศึกษาที่ผ่านมา.....21
ตารางที่ 2.3	การรายงานผลของราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิดใน สภาวะไม่เหมาะสมจากการศึกษาก่อนหน้า.....23
ตารางที่ 2.4	การรายงานลักษณะความสามารถของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของ พืชจากการศึกษาที่ผ่านมา.....26
ตารางที่ 2.4	การรายงานลักษณะความสามารถของแบคทีเรียในการส่งเสริมความสัมพันธ์ แบบไมคอร์ไรซาจากการศึกษาก่อนหน้า.....29
ตารางที่ 3.1	แหล่งที่มาของตัวอย่างดินที่ใช้ในการวิจัย.....33
ตารางที่ 3.2	ลักษณะสัณฐานสปอร์ราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซาแต่ละสกุล.....36
ตารางที่ 4.1	วงศ์ของสปอร์ราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซาที่จำแนกได้.....46
ตารางที่ 4.2	จำนวนสปอร์และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากข้าวฟ่างของราออบัสคูลารี- ไมคอร์ไรซาที่แยกได้.....48
ตารางที่ 4.3	ผลการแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับสปอร์ของราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซา.....50
ตารางที่ 4.4	คุณลักษณะความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting; PGP).....52
ตารางที่ 4.5	ความสามารถในการกระตุ้นการงอกสปอร์รา AY01 และ AT04 ของแบคทีเรียที่ แยกได้.....56
ตารางที่ 4.6	ค่าเฉลี่ยความสูงของอ้อยอายุ 3 เดือนในแต่ละชุดการทดลอง.....59
ตารางที่ 4.7	ค่าเฉลี่ยมวลชีวภาพเหนือดินและใต้ดินของอ้อยอายุ 3 เดือนในแต่ละ ชุดการทดลอง.....60
ตารางที่ จ.1	ผลการทดสอบการเป็น PGPB ของแบคทีเรียที่แยกได้และความสามารถในการ กระตุ้นการงอกของสปอร์ราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซาของแบคทีเรียทั้ง 122 ไอโซเลต.....93
ตารางที่ จ.2	ผลการทดสอบการศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันของราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซาและ แบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของอ้อย.....98

ตารางที่ จ.3	ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Dunnett's test ของความสูงของอ้อยอายุ 3 เดือน.....	100
ตารางที่ จ.4	ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของมวลชีวภาพเหนือดินของอ้อยอายุ 3 เดือน.....	102
ตารางที่ จ.5	ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของมวลชีวภาพใต้ดินของอ้อยอายุ 3 เดือน.....	104
ตารางที่ จ.6	ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากอ้อยอายุ 3 เดือน.....	106



2075474675

## สารบัญรูปร่างภาพ

รูปที่ 2.1	ลักษณะลำต้นของอ้อย.....	5
รูปที่ 2.2	ลักษณะรากของต้นอ้อย.....	5
รูปที่ 2.3	ลักษณะใบของต้นอ้อย.....	6
รูปที่ 2.4	ลักษณะดอกของต้นอ้อย.....	7
รูปที่ 2.5	การเจริญเติบโตของอ้อยระยะต่าง ๆ.....	8
รูปที่ 2.6	ต้นกล้าอ้อยอายุ 3 เดือนที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช....	9
รูปที่ 2.7	สถิติปริมาณและมูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์ในกลุ่มน้ำตาลที่ได้จากอ้อย.....	10
รูปที่ 2.8	ลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ ของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา.....	13
รูปที่ 2.9	ไดอะแกรมลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ ของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา.....	13
รูปที่ 2.10	ลักษณะสปอร์แบบต่าง ๆ.....	14
รูปที่ 2.11	ลักษณะและการพัฒนาของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิด Acaulosporoid.....	14
รูปที่ 2.12	ลักษณะและการพัฒนาของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิด Entrophosporoid.....	15
รูปที่ 2.13	ลักษณะและการพัฒนาของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิด Gigasporoid.....	16
รูปที่ 2.14	ลักษณะและการพัฒนาของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิด Glomoid.....	16
รูปที่ 2.15	ลักษณะและการพัฒนาของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิด radial- glomoid.....	17
รูปที่ 2.16	การเข้าอยู่อาศัยของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา.....	20
รูปที่ 2.17	กลไกการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี สรีรวิทยา และอณูวิทยาของต้นมะเขือเทศ.....	22
รูปที่ 2.18	กลไกที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของ พืชทั้ง.....	25
รูปที่ 2.19	การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์และราพืชในบริเวณที่เรียกว่า Mycorrhizosphere.....	27
รูปที่ 2.20	ลักษณะของแบคทีเรียที่ส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาบนสปอร์ และเส้นใย.....	28
รูปที่ 3.1	แปลงปลูกไร้อ้อยแต่ละพื้นที่ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง.....	33
รูปที่ 3.2	การวางแผนเพื่อเก็บตัวอย่างดินและวิธีการเก็บตัวอย่างดิน.....	34

รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการแยกสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดิน.....35

รูปที่ 3.4 การปลูกอ้อยในการทดลอง.....44

รูปที่ 3.5 วิธีการใส่แบคทีเรียและ/หรือ สปอร์ราออบัสคูลาร์ ร่วมกับการปลูก  
ต้นกล้าอ้อย.....45

รูปที่ 4.1 ลักษณะสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินของแปลงไร้อ้อยทั้งหมด 5  
พื้นที่.....47

รูปที่ 4.2 ลักษณะสัณฐานของสปอร์รา AY01 และ AT04.....49

รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ ตำแหน่ง 18S rRNA  
ด้วยแบบจำลอง maximum likelihood algorithm แสดงเปอร์เซ็นต์ bootstrap  
จากการทดสอบ 1000 ครั้ง.....50

รูปที่ 4.4 4 ปริมาณการสร้าง IAA ของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะที่  
สร้างในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) + 100 ไมโครกรัมต่อ  
มิลลิลิตร.....51

รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างแอมโมเนียของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP  
อย่างน้อย 4 ลักษณะในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Peptone water.....53

รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างกรดซาลิซิลิกของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP  
อย่างน้อย 4 ลักษณะในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Modi medium.....54

รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบลักษณะการสร้างวงไฮรอปโคโลนีแบคทีเรียของ ATR16 และ AYR07  
บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya’s agar.....54

รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบดัชนีการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP อย่างน้อย 4  
ลักษณะ บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya’s agar.....55

รูปที่ 4.9 ลักษณะการงอกของสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา.....56

รูปที่ 4.10 ลักษณะสัณฐานลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA ของ ATR16.....57

รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ ตำแหน่ง 16S rDNA ด้วยแบบจำลอง  
maximum likelihood algorithm แสดงเปอร์เซ็นต์ bootstrap จากการทดสอบ  
1000 ครั้ง.....57

รูปที่ 4.12 ชุดการทดลองของการศึกษาทดสอบการอยู่ร่วมกันของราออบัสคูลาร์-  
ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน.....58

รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการติดเชื้อราในรากอ้อยอายุ 3 เดือน ในแต่ละ  
ชุดการทดลอง.....60

รูปที่ ก.1	วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืชบนตารางขนาด 1 เซนติเมตรต่อ 1 เซนติเมตร ภายใต้กล้องสเตอริโอ.....	84
รูปที่ ง.1	กราฟ IAA มาตรฐาน.....	91
รูปที่ ง.2	กราฟสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตมาตรฐาน.....	91
รูปที่ ง.3	กราฟสารละลายโซเดียมซาลีไซเลตมาตรฐาน.....	92



2075474675

## บทที่ 1 บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อ้อย (*Saccharum officinarum* Linn.) เป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตต่าง ๆ เช่น น้ำตาล กากน้ำตาล แอลกอฮอล์โมโนโซเดียมกลูตาเมท ผลิตภัณฑ์สัตว์ เป็นต้น จากข้อมูลการส่งออกผลิตภัณฑ์จากอ้อยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 จนถึงปี พ.ศ. 2560 ของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์พบว่า มูลค่าการส่งออกของผลิตภัณฑ์จากอ้อยมีมูลค่าสูงกว่า 10,000 ล้านบาทต่อปีและมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Office of Agricultural Economics, 2017) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าในท้องตลาดมีความต้องการอ้อยค่อนข้างมาก ส่งผลให้ราคาของอ้อยพุ่งสูงขึ้นตามกลไกการตลาด แต่อย่างไรก็ตามปัญหาโรคและศัตรูพืช รวมทั้งสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมยังคงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้การปลูกอ้อยไม่ได้ผลผลิตและคุณภาพเป็นไปตามความต้องการ ด้วยเหตุนี้เกษตรกรผู้ปลูกอ้อยส่วนใหญ่จึงนิยมแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยใช้ปุ๋ยเคมีและสารกำจัดศัตรูพืชที่ราคาสูง เพื่อเพิ่มผลผลิตโดยไม่คำนึงถึงผลข้างเคียงที่เกิดในอนาคต เนื่องจากสารเคมีเหล่านี้สามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อมและส่งผลกระทบต่อคุณภาพดินในระยะยาว ทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกรอีกด้วย ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการเพื่อหาแนวทางแก้ไขปัญหาดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้เกษตรกรสามารถผลิตอ้อยได้ในที่ปริมาณสูง แต่ยังคงมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำและไม่กระทบต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การใช้สายพันธุ์อ้อยชนิดปรับปรุงพันธุ์ให้เหมาะสมกับสิ่งแวดล้อม หรือต้านทานแมลงศัตรูพืช การปรับปรุงดิน รวมไปถึงการใช้ปุ๋ยชีวภาพ หรือจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อพื้นที่เกษตรกรรม

การใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อพื้นที่เกษตรกรรมได้แก่ ราและแบคทีเรีย เป็นวิธีการหนึ่ง ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ในการปรับปรุงบำรุงดิน เพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรให้มากขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์ในดินเหล่านี้มีศักยภาพในการเพิ่มธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืช และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย กลุ่มจุลินทรีย์ประเภทราที่น่าสนใจคือ ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) ซึ่งเป็นราที่อาศัยอยู่กับรากพืชโดยมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน โดยพบว่าพืชมากกว่าร้อยละ 80 มีความสัมพันธ์กับรากกลุ่มนี้ (Smith and Read, 2008; Spatafora et al., 2016) ความสัมพันธ์ดังกล่าวส่งเสริมให้พืชได้รับสารอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้นกว่าพืชที่ไม่มีรากกลุ่มนี้อาศัย (Dalpé, 2005; Smith et al., 2010) ทำให้พืชเศรษฐกิจหลายชนิดทั้งพืชสวนและพืชไร่ เช่น ส้ม หอม กระเทียม ผักสลัด มะเขือเทศ ข้าวโพดข้าวฟ่าง ข้าว รวมถึงอ้อย มีผลผลิตต่อพื้นที่สูงขึ้น (Baum et al., 2015;

Surendran and Vani, 2013) อีกทั้งยังทำให้พืชสามารถอยู่รอดได้ ถึงแม้ว่าอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมก็ตาม เช่น สภาวะเค็ม สภาวะแล้ง สภาวะร้อน รวมถึงสภาวะที่มีการปนเปื้อนของสารโลหะหนัก เป็นต้น (Khan, 1974; Kumar, A. et al., 2010; Lenoir et al., 2016; Parida et al., 2002; Sowiński et al., 2005) ด้วยเหตุนี้ ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจึงถูกนำมาพัฒนาเป็นหัวเชื้อในรูปแบบการค้าเพื่อใช้ในพื้นที่เกษตรกรรมอย่างแพร่หลาย (Douds Jr et al., 2012; Gaur et al., 2000; Wertheim et al., 2014) นอกจากนี้แบคทีเรียในดินบางชนิดที่อาศัยอยู่รอบ ๆ รากพืชหรือในรากพืชนั้นว่ามีประโยชน์ที่จะสนับสนุนการเจริญเติบโตพืชเช่นกัน ตัวอย่างเช่นแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน แบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต แบคทีเรียที่สามารถสร้างสารและธาตุอาหารที่พืชนำไปใช้ได้ แบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมนพืช แบคทีเรียที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ รวมไปถึงแบคทีเรียที่สร้างสารป้องกันและทำลายจุลินทรีย์ ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช เป็นต้น ซึ่งการใช้จุลินทรีย์เหล่านี้จะช่วยพัฒนาทรัพยากรดินอย่างยั่งยืน

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการพัฒนาหัวเชื้อราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในพื้นที่ยุทธศาสตร์อย่างต่อเนื่อง โดยการนำประโยชน์ของความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของพืช (Plant-growth promoting bacteria; PGPB) มาผสมรวมกับหัวเชื้อราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เพื่อส่งเสริมให้พืชมีการเจริญเติบโตและทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น (Lenoir et al., 2016) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม PGPB บางชนิดยังมีคุณสมบัติที่สนับสนุนการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยระหว่างราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับพืชได้ดีขึ้น (Mycorrhization Helper Bacteria; MHB) (Srinath et al., 2003; Sumana et al., 2003) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาแบคทีเรียในกลุ่ม MHB ยังมีรายงานที่ค่อนข้างน้อย และมีความจำเพาะต่อชนิดของราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทำให้การแยกแบคทีเรียในกลุ่ม MHB ที่เหมาะสม จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะทำให้สามารถพัฒนาหัวเชื้อราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีประสิทธิภาพได้ ด้วยเหตุนี้การแยกราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยและเหมาะสมต่อพื้นที่เกษตรกรรมของประเทศไทย จึงเป็นเรื่องที่จำเป็นและสำคัญที่จะนำไปสู่ความยั่งยืนของการผลิตอ้อยทั้งในทางเศรษฐศาสตร์และนิเวศวิทยา



### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. แยกและจำแนกรากาอบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียที่มีสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชและส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา
2. ศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันของรากาอบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของอ้อย

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้รากาอบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียที่ส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาแบคทีเรียเพื่อใช้ในการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อใช้ในพื้นที่เกษตรกรรมต่อไปในอนาคต



2075474675

CU Thesisis 5872017723 thesis / recv: 18072562 18:36:11 / seq: 57

## บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 สรีรวิทยาและข้อมูลพื้นฐานของอ้อย

อ้อย (*Saccharum officinarum* Linn.; Sugarcane) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยเป็นวัชพืชหลักในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น น้ำตาล กากน้ำตาล แอลกอฮอล์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต และอาหารสัตว์ เป็นต้น โดยอนุกรมวิธานของอ้อย คือ

Kingdom Plantae

Phylum Angiosperms

Class Monocotyledons

Order Glumaceae

Family Poaceae

Subfamily Panicoideae

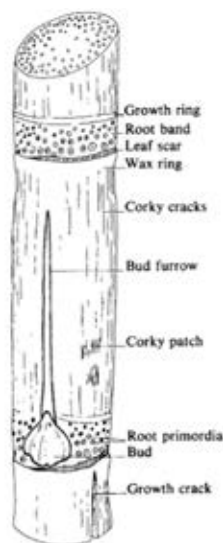
Tribe Andropogoneae

Genus *Saccharum*

#### 2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอ้อย

##### ลำต้น (culm)

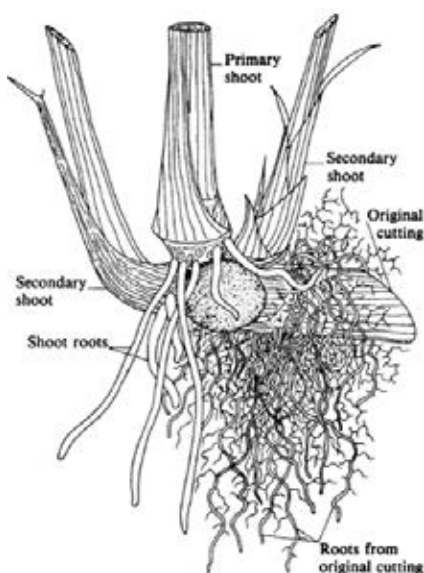
ลำต้นอ้อยประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนลำต้นเหนือดินและลำต้นใต้ดินที่เรียกว่า ตอหรือ เหง้า บริเวณลำต้นเหนือดินจะสังเกตเห็นข้อ (node) และปล้อง (internode) อย่างชัดเจน ข้อเป็นส่วนรับของใบ เมื่อใบหลุดจะปรากฏรอยกาบใบให้เห็น ความยาวระหว่างปล้องจากรอยกาบใบหนึ่งถึงรอยกาบใบถัดไป เรียกรวมกันว่า ข้อปล้อง (joint) อ้อยแต่ละพันธุ์มีรูปร่างปล้องและการจัดเรียงตัวแตกต่างกัน และบริเวณใต้รอยกาบใบมีวงแหวนที่มีขี้ผึ้งหรือไขเกาะอยู่หนา เรียกว่า วงไข (wax ring) เหนือรอยกาบใบมีวงแหวนที่มีปม ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของรากเรียกว่า ปมราก (root primordia) เรียกวงแหวนของปมนี้ว่า บริเวณเกิดราก (root band) ที่ผิวลำต้นอาจปรากฏรอยแตกตื้น และแตกลึก ซึ่งเกิดขึ้นได้ด้วยหลายปัจจัย โดยรอยแตกตื้นมักจะเกิดถัดจากวงไขและเชื่อมต่อเป็นแผ่นเรียกว่า รอยตกระกิด (corky path) ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ลักษณะลำต้นของอ้อย (James, 2004)

### ราก (root)

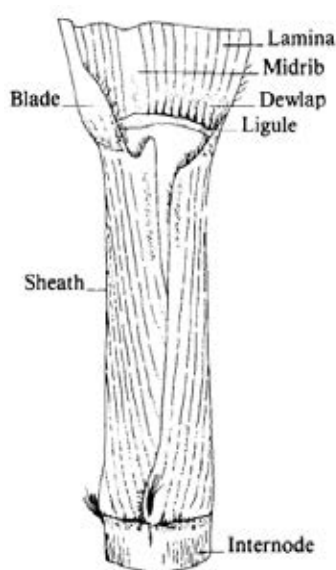
รากเป็นระบบรากฝอย (fibrous root system) เจริญแผ่กระจายรอบลำต้น ความยาวของราก ขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อม รากมี 2 ชนิดคือ รากชุดแรกของท่อนพันธุ์ (selt root) เป็นรากชั่วคราว ซึ่งเกิดจากปุ่มรากของท่อนพันธุ์ (ในกรณีที่ขยายพันธุ์ด้วยท่อนพันธุ์) อีกชนิดหนึ่งคือ รากของต้นอ้อย (shoot root) จะมีขนาดใหญ่กว่ารากท่อนพันธุ์ อวบ สีขาว แต่จะสีเข้มเมื่ออายุมากเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ลักษณะรากของต้นอ้อย (James, 2004)

## ใบ (leaf)

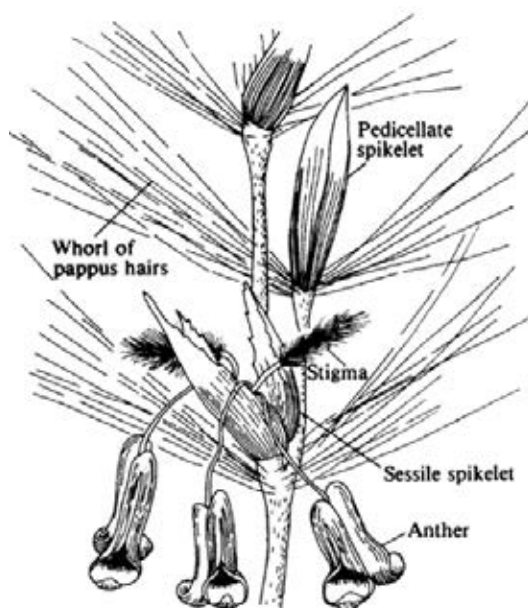
ใบประกอบด้วย 2 ส่วนหลักคือ กาบใบ (leaf sheath) และแผ่นใบ (leaf blade) โดยที่ กาบใบเป็นส่วนที่อยู่ติดและห่อหุ้มลำต้น ไม่มีเส้นกลางใบ มักมีสีเขียวอ่อนหรือม่วงแดง แผ่นใบมักมีสีเขียวแกมเหลืองจนถึงสีเขียวเข้ม ซึ่งขึ้นอยู่กับพันธุ์และความอุดมสมบูรณ์ของดิน ขอบแผ่นใบมีลักษณะฟันเลื่อยเล็กทำให้ใบอ้อยมีความคมมาก รอยต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบด้านในมีลิ้นใบ (ligule) เป็นแผ่นบางยื่นออกจากกาบใบ ด้านหลังของกาบใบและแผ่นใบมีพื้นที่คล้ายสามเหลี่ยม ทั้งสองด้านเรียกว่า Dewlap ดังรูป 2.3



รูปที่ 2.3 ลักษณะใบของต้นอ้อย (James, 2004)

## ช่อดอก (inflorescence)

มีช่อดอกแบบแผ่กระจาย (panicle) เกิดที่ปลายยอดของลำต้น เมื่อช่อดอกบานเต็มที่จะมีลักษณะเหมือนลูกศรเรียกว่า arrow หรือ tassel ลักษณะช่อดอกมีแกนกลาง ก้านแขนงแรกแตกออกจากแกนกลาง ก้านแขนงที่สองแตกออกจากก้านแขนงแรก โดยก้านแขนงที่สองจะเป็นตำแหน่งของกลุ่มดอกย่อย (spikelet) ที่เกิดเป็นคู่ ดังรูปที่ 2.4 อ้อยถูกจัดเป็นพืชวันสั้น (short day plant) จะออกดอกเมื่อเวลากลางวันสั้นกว่ากลางคืน ด้วยเหตุนี้ อ้อยที่ปลูกในประเทศไทยจึงออกดอกในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนมกราคม แต่อย่างไรก็ตามการออกดอกของอ้อยยังคงขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ด้วยเช่นกัน ได้แก่ อายุอ้อย อุณหภูมิและความชื้น



รูปที่ 2.4 ลักษณะดอกของต้นอ้อย (James, 2004)

#### 2.1.2 การเจริญเติบโตของอ้อยเมื่อปลูกด้วยท่อนพันธุ์

การเจริญเติบโตของอ้อยในประเทศไทยตั้งแต่เริ่มปลูกด้วยท่อนพันธุ์จนกระทั่งเก็บเกี่ยวสามารถแบ่งระยะการเจริญเติบโตได้ทั้งหมด 4 ระยะ ดังรูปที่ 2.5 ได้แก่

##### ระยะงอก (germination phase)

ระยะนี้เริ่มตั้งแต่ลงปลูกท่อนพันธุ์จนกระทั่งหน่อโผล่พ้นดิน ระยะเวลาที่ใช้ประมาณ 2-3 สัปดาห์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดพันธุ์ สภาพแวดล้อม เป็นต้น หน่อที่เกิดจากตาของท่อนพันธุ์ เรียกว่า หน่อแรก (primary shoot) ดังรูปที่ 2.2

##### ระยะแตกกอ (tillering phase)

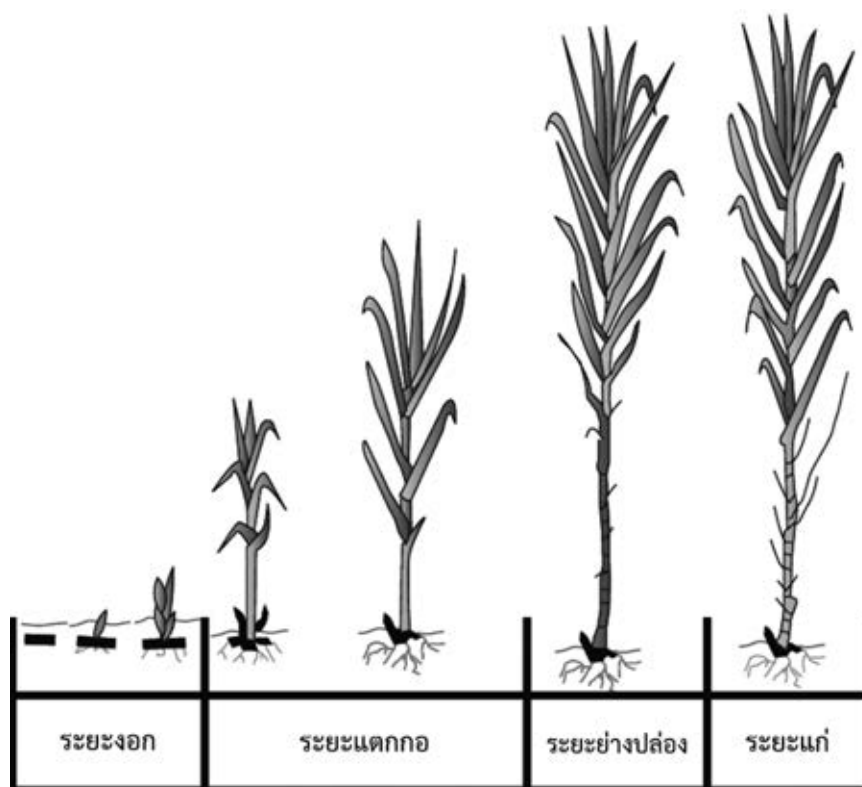
ระยะนี้จะอยู่ในช่วง 2-4 เดือน ซึ่งในช่วงแรกต้นอ้อยจะงอกออกมาจากตำแหน่งตา โดยแต่ละตาจะมีการงอกของอ้อยเพียงต้นเดียวเท่านั้น ต่อมาเมื่อมีการเจริญโตพอสมควรอ้อยจะมีการแตกกอเกิดขึ้นที่บริเวณลำต้นใต้ดิน ทำให้ลำต้นหรือหน่อที่เกิดขึ้นภายหลังอยู่ใกล้ผิวดินหรือลอยขึ้น

##### ระยะย่นปล้อง (stalk elongation phase)

ระยะนี้เป็นระยะที่ต่อเนื่องจากระยะแตกกอ เริ่มตั้งแต่อายุ 3-4 เดือนเป็นต้นไป โดยจะเป็นระยะที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนถึงอายุประมาณ 7-8 เดือน การเจริญเติบโตจะน้อยลงและเริ่มมีการสะสมน้ำตาลเพิ่มขึ้น

### ระยะแก่และสุก (maturity and ripening phase)

ระยะแก่นี้เป็นระยะที่อ้อยมีอัตราการเจริญเติบโตน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับระยะอื่น ๆ เมื่อการเจริญเติบโตเริ่มช้าลง น้ำตาลที่ได้จากการสังเคราะห์แสงจึงถูกเก็บสะสมในลำต้นมากขึ้น ซึ่งเป็นการเริ่มต้นเข้าสู่ระยะสุก โดยที่น้ำตาลจะเริ่มสะสมจากส่วนโคนไปหาส่วนปลายและกระจายการสะสมจนกระทั่งถึงส่วนโคน ทำให้ส่วนกลางและปลายของลำต้นมีความหวานที่ใกล้เคียงกัน จึงเรียกว่า สุก

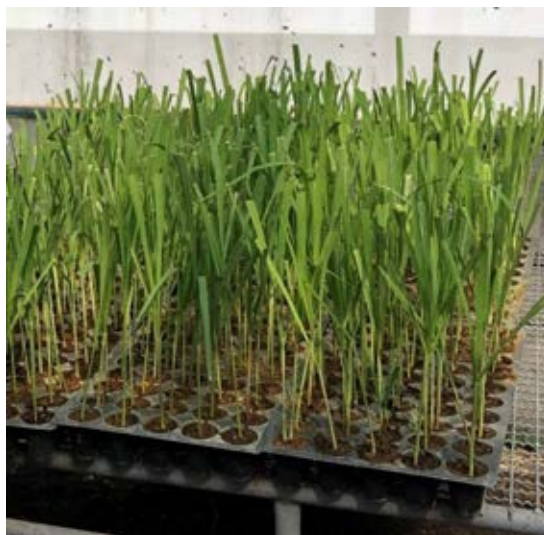


รูปที่ 2.5 การเจริญเติบโตของอ้อยระยะต่าง ๆ (Mandal et al., 2019)

#### 2.1.3 การเจริญเติบโตของอ้อยเมื่อปลูกด้วยต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ในปัจจุบันการขยายพันธุ์อ้อยด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาวะปลอดเชื้อ (plant tissue culture) เป็นที่นิยมมากขึ้นในประเทศไทย เนื่องจากเทคนิคนี้ทำให้ได้พันธุ์อ้อยที่ปลอดโรคต่าง ๆ เช่น โรคใบขาว (sugarcane white leaf) โรคกอตะไคร้ (sugarcane grassy shoot) เป็นต้น โดยการเจริญเติบโตของอ้อยด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นมีระยะการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกับการปลูกอ้อยด้วยท่อนพันธุ์แต่อาจมีระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละระยะแตกต่างกัน เนื่องจากการขยายพันธุ์อ้อยด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะใช้ยอดอ่อนจากท่อนพันธุ์ปลอดเชื้อชักนำให้เกิดรากและ

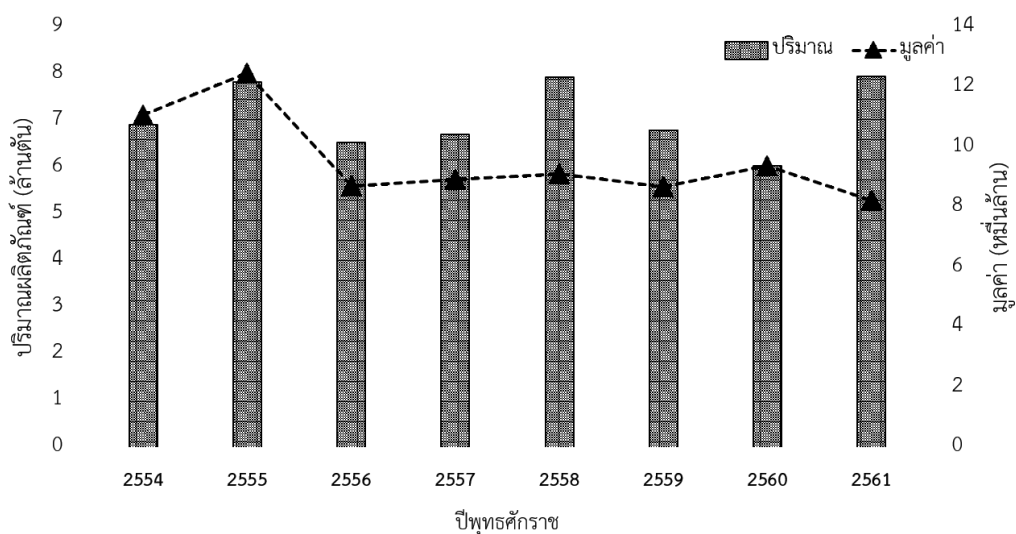
ลำต้นด้วยด้วยอาหารที่เหมาะสม จนกระทั่งต้นกล้าอ้อยมีรากและลำต้นแข็งแรง จึงทำการย้ายปลูกในโรงเรือนเพื่ออนุบาลเป็นเวลา 2-3 เดือน (ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น, 2019) จากนั้นจึงนำไปปลูกในพื้นที่เกษตรกรต่อไป โดยอ้อยที่ได้จากการอนุบาลนี้ อ้อยจะอยู่ในช่วงระยะแตกหน่อเมื่อเทียบกับการปลูกด้วยท่อนพันธุ์ ดังรูป 2.6



**รูปที่ 2.6** ต้นกล้าอ้อยอายุ 3 เดือนที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น

#### 2.1.4 มูลค่าทางเศรษฐกิจของอ้อย

อ้อย เป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยที่สำคัญ เนื่องจากเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตต่าง ๆ เช่น น้ำตาล แอลกอฮอล์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต การผลิตไฟฟ้า และอาหารสัตว์ ฯลฯ จากข้อมูลการส่งออกผลิตภัณฑ์จากอ้อยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2554 จนถึงปี พ.ศ. 2561 ของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พบว่า การส่งออกของผลิตภัณฑ์จากอ้อย ได้แก่ กากน้ำตาล น้ำตาลดิบ น้ำตาลทราย และน้ำเชื่อม มีมูลค่าเฉลี่ยรวมอยู่ที่ 90,000 ล้านบาทต่อปี ดังแสดงในรูปที่ 2.7 (Office of Agricultural Economics, 2017) โดยข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่า ผลิตภัณฑ์จากอ้อยยังคงเป็นที่ต้องการของตลาดโลกอย่างต่อเนื่อง และมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจไทย



รูปที่ 2.7 สถิติปริมาณและมูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์ในกลุ่มน้ำตาลที่ได้จากอ้อยตั้งแต่ปี พุทธศักราช 2554 ถึง 2561 (Office of Agricultural Economics, 2017)

จากการเสวนาของธนาคารแห่งประเทศไทยต่อภาคอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลไทย ในปี พ.ศ. 2560 พบว่า อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล สามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรและผู้ประกอบการในอุตสาหกรรม มีมูลค่ามากกว่า 250,000 ล้านบาท คิดเป็นสัดส่วนสูงถึง 21 เปอร์เซ็นต์ของ GDP ภาคเกษตรกรรม หรือสูงถึง 48 เปอร์เซ็นต์ของ GDP ภาคอุตสาหกรรมอาหารของประเทศ โดยอุตสาหกรรมน้ำตาลเป็นอุตสาหกรรมที่มีต้นทุนคงที่ (fixed cost) อันมาจากที่ดิน เครื่องจักรกลต่าง ๆ ซึ่งเป็นค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นเพื่อลดต้นทุนการผลิตต่อหน่วยให้ลดลงนั้น จำเป็นอย่างมากที่จะต้องจัดหาอ้อยให้มากพอเพื่อนำมาใช้ในการผลิต เพราะนอกจากอ้อยจะเป็นวัตถุดิบหลักแล้ว กากอ้อยและกากน้ำตาลที่เหลือจากกระบวนการหีบอ้อย สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องเช่น เอทานอล และการผลิตไฟฟ้าชีวมวลได้อีกด้วย ดังนั้นแผนการจัดหาอ้อยของโรงงานน้ำตาล จึงเป็นยุทธศาสตร์สำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากปริมาณอ้อยที่จัดหาได้จะเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลต่อผลประกอบการของโรงงาน เพราะถ้าหากทางโรงงานสามารถจัดหาอ้อยได้ในปริมาณที่น้อย ก็จะทำให้ต้นทุนของการผลิตน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้น (โรจน์ลักษณ์ ปรีชา. et al., 2560) นอกจากนี้ในมุมมองของนักเศรษฐศาสตร์ภาคเอกชนก็มีทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ ราคาน้ำตาลในตลาดโลกมีแนวโน้มขยับสูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมน้ำตาลไทย ทั้งระบบแต่ยังคงมีความไม่แน่นอนของผลผลิตอ้อยในไทย ซึ่งจะเป็นปัจจัยฉุดรั้งอัตราการเติบโตของรายได้จากการผลิตน้ำตาล แต่รายได้จากธุรกิจต่อเนื่องจากอุตสาหกรรมน้ำตาลยังคงช่วยให้ผลประกอบการของโรงงานน้ำตาลโดยรวมอยู่ในเกณฑ์ที่ดีอย่างต่อเนื่อง (วาริรัตน์ เพชรสีช่วง., 2559)



ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความต้องการของภาคอุตสาหกรรมต่อผลผลิตของอ้อย ยังมีความต้องการอย่างต่อเนื่องแต่ด้วยปัญหาหลายประการที่ยังคงส่งผลทำให้เกษตรกรไทยมีกำลังการผลิตอ้อยไม่เพียงพอต่อภาคอุตสาหกรรม

### 2.1.5 ปัญหาการปลูกอ้อย

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าปริมาณของอ้อย เป็นกุญแจสำคัญที่จะส่งผลต่อรายได้ของภาคอุตสาหกรรม ในทางกลับกันปัญหาของภาคเกษตรกรรมคือ ต้นทุนในการผลิตต่อไร่สูง แต่มีปริมาณผลผลิตต่อไร่ในปริมาณที่ต่ำ (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่ฯ, 2004) ซึ่งปัญหาดังกล่าวเกิดได้จากหลากหลายปัจจัย เช่น การระบาดของโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา (phytoplasma) ค่าใช้จ่ายในการผลิตจากผลการสำรวจและวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตอ้อยปีการผลิต 2555/56 เฉลี่ยทั่วทั้งประเทศ ของสำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย พบว่า ต้นทุนการผลิตแต่ละรายการของทุกภาคมีความคล้ายคลึงกันมาก โดยต้นทุนการผลิตที่มีสัดส่วนสูง 3 ลำดับแรก ยังคงมีค่าปุ๋ยเคมีและสารเคมี ในอันดับต้น ๆ (ประสิทธิ์ ใจศิล., 2557)

จากการสำรวจการใช้สารเคมีในพื้นที่เกษตรกรรมเป็นระยะเวลาหนึ่งพบว่า การใช้ปุ๋ยเคมีในช่วงแรกสามารถเพิ่มการเติบโตของพืชได้ดี แต่ในทางกลับกันกลับส่งผลต่อการเจริญของพืชในทางตรงข้าม กล่าวคือ ทำให้พืชมีระบบรากที่ไม่ดี มีการสร้างสารอาหารไม่สมบูรณ์ (Heinrich et al., 2012; Sanni and O. O, 2015) อีกทั้งยังส่งผลทำให้ดินขาดสารอาหารและสารอินทรีย์ต่าง ๆ (Zhang et al., 2012) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อสังคมจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืช (Chandini et al., 2019) โดยเฉพาะกลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่รอบรากพืชบางชนิดที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ดังนั้นการใช้ปุ๋ยเคมีเป็นปริมาณมากอาจกลับส่งผลในทางลบได้ ถ้าหากใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม

## 2.2 การใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อพื้นที่เกษตรกรรม

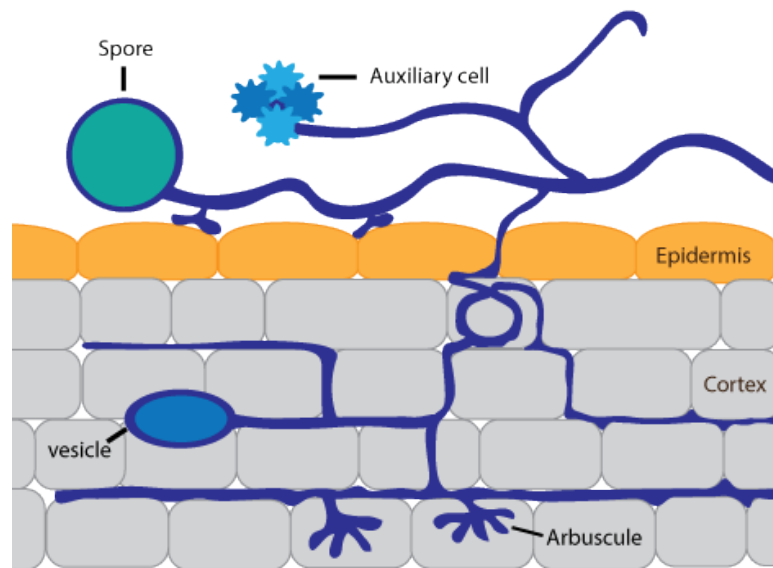
ปุ๋ย (fertilizer) หมายถึง วัสดุหรือสารใด ๆ ที่เติมลงสู่ดินเพื่อเป็นการเพิ่มธาตุอาหารสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชรวมถึงเป็นการเพิ่มผลผลิตอีกทางหนึ่งเช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และธาตุอื่น ๆ ซึ่งปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) หมายถึง ปุ๋ยที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงผสมอยู่จำนวนมากเช่น แบคทีเรีย รา เป็นต้น ทำให้พืชได้รับประโยชน์จากธาตุอาหารในดินมากขึ้น อันเนื่องมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์นั้น ๆ (ธงชัย มาลา., 2546) จากปัญหาของปุ๋ยเคมีที่ราคาสูงและส่งผลต่อสิ่งแวดล้อม หลายฝ่ายจึงมีการสนับสนุนให้ใช้ปุ๋ยชีวภาพในพื้นที่เกษตรเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลทำให้ความต้องการปุ๋ยเคมีมีจำนวนลดลง อันส่งผลให้พื้นที่

เกษตรกรรมมีการฟื้นฟู (Whitelaw, 1999) รวมไปถึงลดต้นทุนของการผลิตทำให้เกษตรกรมีรายได้ที่สูงขึ้น

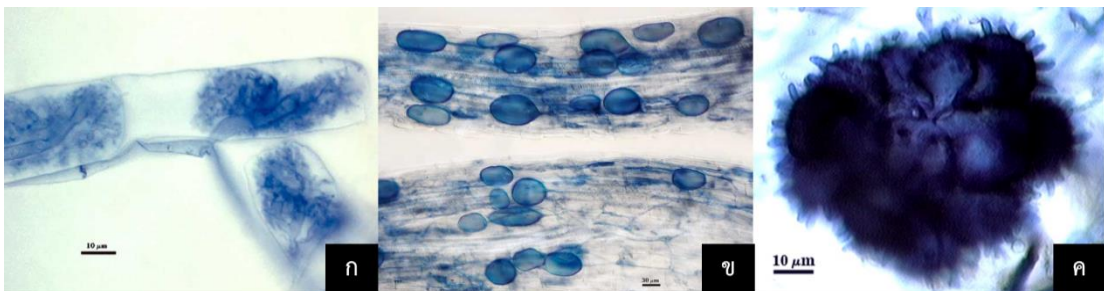
จากข้อมูลการสำรวจของมูลนิธิสายใยแผ่นดิน พ.ศ. 2558 ในประเทศไทย พบว่า พื้นที่เกษตรอินทรีย์ในประเทศไทยที่ได้รองรับมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ขยายตัวเพิ่มขึ้นจาก 2.35 แสนไร่ในปี 2557 เป็น 2.84 แสนไร่ในปี พ.ศ. 2558 และคาดว่าจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นต่อเนื่องตามยุทธศาสตร์การพัฒนาเกษตรอินทรีย์แห่งชาติ พ.ศ. 2560-2564 ซึ่งมีเป้าหมายที่จะเพิ่มพื้นที่เกษตรอินทรีย์ให้ เป็น 6 แสนไร่ภายในปี พ.ศ. 2564 (มูลนิธิสายใยแผ่นดิน, 2019) ดังนั้นความต้องการของปุ๋ยชีวภาพ จึงมีแนวโน้มสูงตามไปด้วย แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเพื่อให้ได้ปุ๋ยชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมกับพืชและพื้นที่ เพื่อให้จุลินทรีย์ มีประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุด

### 2.2.1 ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เป็นราที่เส้นใยไม่มีผนังกันตามขวาง (non-septate) มีลักษณะ แดกแขนงของเส้นใยแบบ 2 แขนง (dichotomous branching) เส้นใยของราจะพันอยู่ภายนอกราก แบบหลวม ๆ และเส้นใยบางส่วนจะแทงผ่านชั้น epidermis ของรากเข้าไปเจริญอยู่ในเซลล์ ชั้นคอร์เท็กซ์ โดยเส้นใยที่แทงเข้าไปเจริญภายในเซลล์นี้ จะแตกแขนงมากมายคล้ายกิ่งไม้กลายเป็น โครงสร้างที่เรียกว่า ออบัสคูล (Arbuscule) ดังรูปที่ 2.8 และรูปที่ 2.9 ก. ซึ่งทำหน้าที่ ในการแลกเปลี่ยนสารอาหารระหว่างพืชและรา โดยโครงสร้างออบัสคูลนี้จะมีอายุประมาณ 1-2 สัปดาห์ และจะสลายตัวให้ธาตุอาหารแก่พืช นอกจากนี้ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบางชนิดจะมีการสร้างโครงสร้างที่ขี้เก็บสะสมอาหารอยู่ในเซลล์ราก เรียกว่า เวสสิเคิล (vesicle) ดังรูปที่ 2.8 และรูปที่ 2.9 ข. หรือบางชนิดสร้างโครงสร้างสะสมอาหารภายนอกเซลล์ที่เรียกว่า auxillary cell ดังรูปที่ 2.8 และรูปที่ 2.9 ค. ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ โดยสปอร์จะมีลักษณะค่อนข้างกลม หลากสี หลายขนาด และมีโครงสร้างพิเศษ ตามแต่ละชนิดของประเภทสปอร์ ดังรูปที่ 2.9 โดยโครงสร้างพิเศษของสปอร์ราทำให้สามารถจำแนก ประเภทสปอร์ออกเป็น 5 ลักษณะคือ acaulosporoid, entrophosporoid, gigasporoid, glomoid และ radial-glomoid (Walker and Vestberg, 1998) ดังรูปที่ 2.10

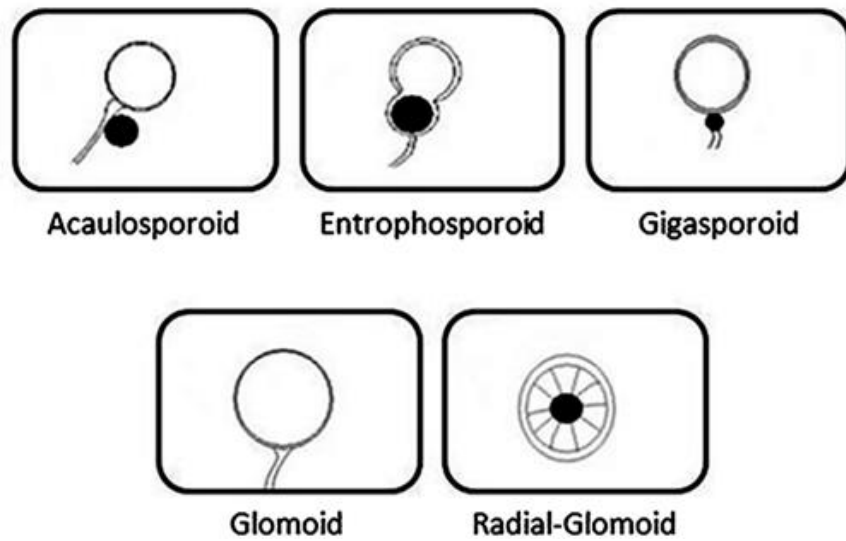


รูปที่ 2.8 ไดอะแกรมลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ ของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา



รูปที่ 2.9 ลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ ของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

- ก. อับสคูลาร์ (INVAM, 2017d)
- ข. เวสสิเคิล (INVAM, 2017d)
- ค. เซลล์ Auxiliary (INVAM, 2017c)

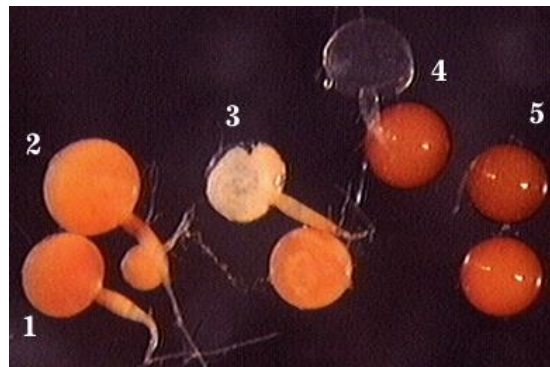


รูปที่ 2.10 ลักษณะสปอร์แบบต่าง ๆ (Souza, 2015)

#### 2.2.1.1 ลักษณะของสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

##### Acaulosporoid

Acaulosporoid เป็นสปอร์ที่เกิดจากด้านข้างของก้อนสปอร์เดิมที่เรียกว่า sporiferous saccule จากนั้นสปอร์ที่เกิดใหม่จะค่อยๆโตขึ้น ขณะที่สปอร์เดิมจะฝ่อลง เนื่องจากของเหลวที่อยู่ในสปอร์เดิมจะถูกถ่ายไปยังสปอร์ที่เกิดขึ้นใหม่ขณะที่มีการสร้างสปอร์ ดังรูปที่ 2.11



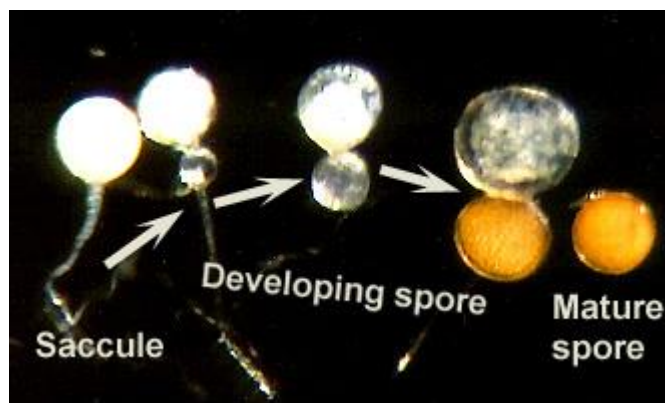
รูปที่ 2.11 ลักษณะและการพัฒนาของสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิด Acaulosporoid (INVAM, 2017a)

จากรูปที่ 2.11 การพัฒนาสปอร์ชนิด Acaulosporoid เริ่มต้นจากหมายเลข 1 ส่วนของสปอร์จะมีโครงสร้างที่เรียกว่า sporiferous saccule จากนั้นสปอร์ใหม่จะเริ่มพัฒนา ออกจากบริเวณด้านข้างของ sporiferous saccule ในหมายเลข 2 สปอร์ที่เกิดใหม่เริ่มมีการขยายขนาด

เพิ่มมากขึ้นจากนั้นสปอร์เก่าจะฝ่อตัวลงและสลายไปในที่สุด ดังหมายเลข 3-5 (Stürmer and B. Morton, 1999) โดยสปอร์ชนิดนี้สามารถพบได้ในสกุล *Acaulospora*, *Ambispora*, *Archaeospora*, และ *Otospora* (Redecker et al., 2013)

#### Entrophosporoid

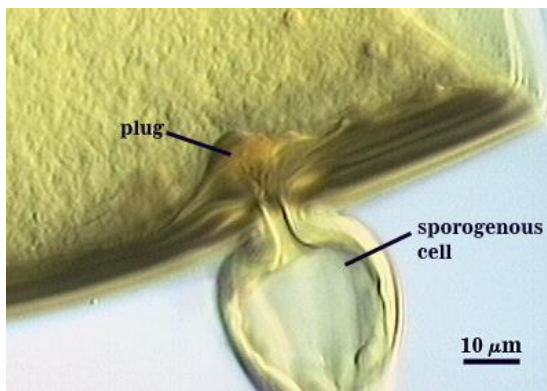
Entrophosporoid เป็นสปอร์ที่เกิดภายในก้านของ saccule หรือสปอร์เดิม โดยสปอร์ใหม่จะมีการขยายตัว ในขณะที่สปอร์เดิมจะค่อย ๆ ฝ่อลงจนแฟบไปในที่สุด ดังรูปที่ 2.12 ที่แสดงการพัฒนาของสปอร์แบบ Entrophosporoid จาก saccule ที่มีลักษณะใส จนกระทั่งเป็นสปอร์ที่เจริญเต็มที่ โดยสปอร์ชนิดนี้พบได้ในสกุล *Entrophospora* (Kaonongbua et al., 2010; Wu et al., 1995)



รูปที่ 2.12 ลักษณะและการพัฒนาของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิด Entrophosporoid (INVAM, 2017b)

#### Gigasporoid

Gigasporoid เป็นสปอร์ที่ค่อนข้างใหญ่ เกิดบริเวณปลายของเส้นใยที่โป่งพอง เรียกว่า bulbous hyphae และมักพบโครงสร้างที่เรียกว่า sporogenous cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่โป่งบริเวณฐานของสปอร์ ดังรูปที่ 2.13 โดยสปอร์ชนิดนี้พบในสกุล *Cetraspora*, *Dentiscutata*, *Gigaspora*, *Racocetra* และ *Scutellospora* (Morton et al., 2011; Redecker et al., 2013)



รูปที่ 2.13 ลักษณะและการพัฒนาของสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิด Gigasporoid (INVAM, 2017c)

#### Glomoid

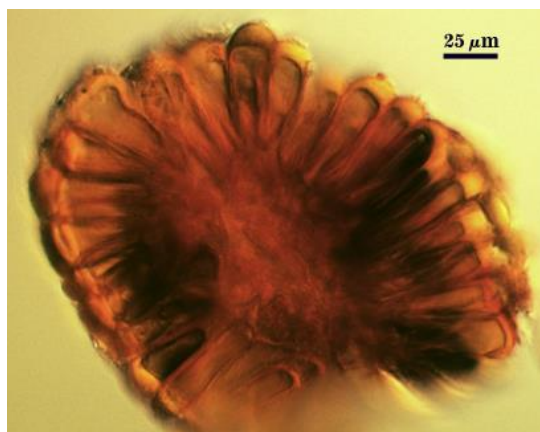
Glomoid เป็นสปอร์เกิดบริเวณปลาย (terminal) หรือบริเวณกลาง (intermediate) ของเส้นใย ดังรูปที่ 2.14 โดยสปอร์ชนิดนี้มักพบในราสกุล *Acaulospora*, *Ambispora*, *Archaeospora*, *Diversispora*, *Geosiphon*, *Glomus*, *Pacispora* และ *Paraglomus* (Schüßler and Walker, 2010)



รูปที่ 2.14 ลักษณะและการพัฒนาของสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิด Glomoid (INVAM, 2017e)

### Radial-glomoid

Radial-glomoid เป็นสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายกับแบบ glomoid แต่แตกต่างกันที่สปอร์แบบ radial-glomoid สร้างสปอร์เรียงเป็นชั้นเดียวรอบ ๆ เส้นใยราที่พันสานตรงแกนกลาง (central plexus of hyphae) ดังนั้นลักษณะสปอร์จึงมีลักษณะเป็นแฉก ๆ ดังรูปที่ 2.15



**รูปที่ 2.15** ลักษณะและการพัฒนาของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิด radial-glomoid (INVAM, 2017e)

#### 2.2.1.2 การจัดจำแนกราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การจัดจำแนกราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซานั้นสามารถทำได้โดยใช้ลักษณะ ทางสัณฐานวิทยา โดยใช้ลักษณะต่าง ๆ ของสปอร์ได้แก่ การจัดเรียงของสปอร์ (spore arrangement) รูปทรงสปอร์ (Spore shape) การพัฒนาของสปอร์ (spore development) ชนิดสปอร์ ขนาดสปอร์ จำนวนชั้นของผนังสปอร์ สีสปอร์ และอาจมีการพิจารณาการมีหรือไม่มีโครงสร้างเวสสิเคิลร่วมด้วย นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการจัดจำแนกโดยวิธีทางอนุวิทยาโดยใช้ตำแหน่ง 18S rRNA และไพรเมอร์ที่มีลักษณะจำเพาะต่อราในกลุ่มนี้ (Redecker et al., 2003) ราอาบัสคูลาร์-ไมคอร์ไรซาอยู่ในไฟลัม Glomeromycota มี 4 อันดับ 11 วงศ์ และ 25 สกุลดังตารางที่ 2.1 (Redecker et al., 2013)

ตารางที่ 2.1 อันดับ วงศ์และสกุลของเชื้อราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซา

อันดับ	วงศ์	สกุล
Archaeosporales	Ambisporaceae	<i>Ambispora</i>
	Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i>
	Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>
Diversisporales	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>
		<i>Corymbiglomus</i>
		<i>Diversispora</i>
	Gigasporaceae	<i>Otospora</i>
		<i>Redeckera</i>
		<i>Tricispora</i>
		<i>Cetraspora</i>
		<i>Dentiscutata</i>
		<i>Gigaspora</i>
		<i>Intraornatospora</i>
<i>Racocetra</i>		
<i>Scutellospora</i>		
Glomerales	Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
	Sacculosporaceae	<i>Sacculospora</i>
	Glomeraceae	<i>Glomus</i>
		<i>Funneliformis</i>
		<i>Sclerocystis</i>
		<i>Rhizophagus</i>
	<i>Septoglomus</i>	
Claroideoglomeraceae	<i>Claroideoglomus</i>	
Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>



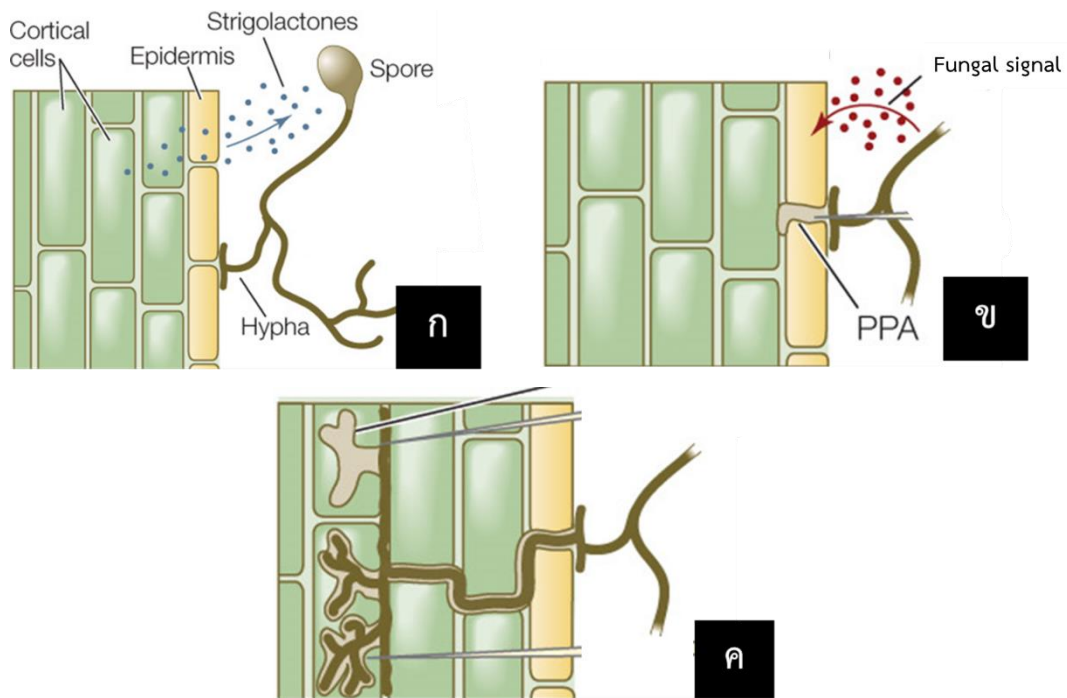
### 2.2.1.3 พืชอาศัยของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

อาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Arbuscular mycorrhiza) เป็นความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันระหว่างรากพืช (Schüßler et al., 2001) พบว่าพืชประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ มีความสัมพันธ์แบบอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Lekberg et al., 2013; Smith and Read, 2008) โดยเฉพาะพืชเศรษฐกิจอย่างเช่น ข้าว อ้อย ยางพารา และปาล์มน้ำมัน เป็นต้น (Smith and Read, 2008) บทบาทที่สำคัญของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อพืชคือการช่วยให้พืชได้รับสารอาหารและน้ำในดินเพิ่มมากขึ้น อันส่งผลทำให้พืชมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงขึ้น (Baum et al., 2015) โดยรวมไปถึงราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบางชนิดสามารถช่วยให้พืชต้านทานต่อความเครียดแบบต่าง ๆ ได้ดีขึ้น

### 2.2.1.4 การเข้าสู่รากพืชของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

เมื่อสิ่งแวดล้อมเหมาะสมต่อการงอกของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา สปอร์ราจะงอกเส้นใยเข้าหารากพืช โดยพืชแต่ละชนิดจะมีการหลั่งสารเคมีออกจากราก เรียกว่า root exudate ที่ส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม strigolactones ซึ่งเป็นสัญญาณในการชักนำ ทำให้ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสามารถเจริญเข้ามาสู่รากพืชได้ (Besserer et al., 2006) เมื่อเส้นใยราเจริญถึงรากพืช ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า appressorium เพื่อยึดเกาะกับรากบริเวณชั้นเซลล์ผิวหนังนอกสุด (epidermis) ดังรูปที่ 2.16 ก. จากนั้นเส้นใยราจะมีการส่งสัญญาณกลับไปยังเซลล์รากพืช ทำให้เซลล์พืชตอบสนองโดยเกิดกระบวนการ Calcium spiking อันเป็นกลไกที่ใช้ในการส่งสัญญาณทำให้เกิดการถอดรหัสของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนในลำดับถัดไป (Navazio et al., 2007; Parniske, 2008) มีการเปลี่ยนแปลงของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์ราก อันทำให้เกิดเซลล์ที่เรียกว่า prepenetration apparatus (PPA) มีลักษณะคล้ายอุโมงค์ (Nagahashi, G. and D. J. Douds, 2008) ดังรูปที่ 2.16 ข. ต่อมาราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะสร้างเส้นใยจากชั้นเซลล์ผิวเข้าสู่ชั้นคอร์เท็กซ์ (cortex) โดยการเจริญในระยะแรกเส้นใยราจะเจริญแทรกอยู่ระหว่างเซลล์พืช (intercellular space) ดังรูปที่ 2.16 ค. ต่อมาเส้นใยราจะมีการกระตุ้นให้พืชสร้าง prepenetration apparatus อีกครั้งโดยจะมีการสร้างโครงสร้างดังกล่าวเข้าไปในเซลล์ (cortical cell) จากนั้นเส้นใยราจะแทรกเข้าไปตามช่อง prepenetration apparatus ที่สร้างไว้และพัฒนาเป็นโครงสร้างเพื่อใช้ในการแลกเปลี่ยนอาหารระหว่างราและรากพืชเรียกว่า อาร์บัสคูล (Arbuscule) ซึ่งมีลักษณะแตกแขนงคล้ายต้นไม้ ดังรูปที่ 2.16 ค. หลังจากเส้นใยรามีการเข้าสู่รากพืช

รบบางชนิดอาจมีการสร้างโครงสร้างพิเศษที่มีลักษณะกลม-รี เรียกว่า เวสิเคิลร่วมด้วย โดยโครงสร้างนี้ทำหน้าที่ในการสะสมอาหารในรูปของไขมันในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ของรากพืช



รูปที่ 2.16 การเข้าอยู่อาศัยของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

#### 2.2.1.5 การใช้ประโยชน์ของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในการเกษตร

##### เพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมน้ำและสารอาหารให้แก่พืช

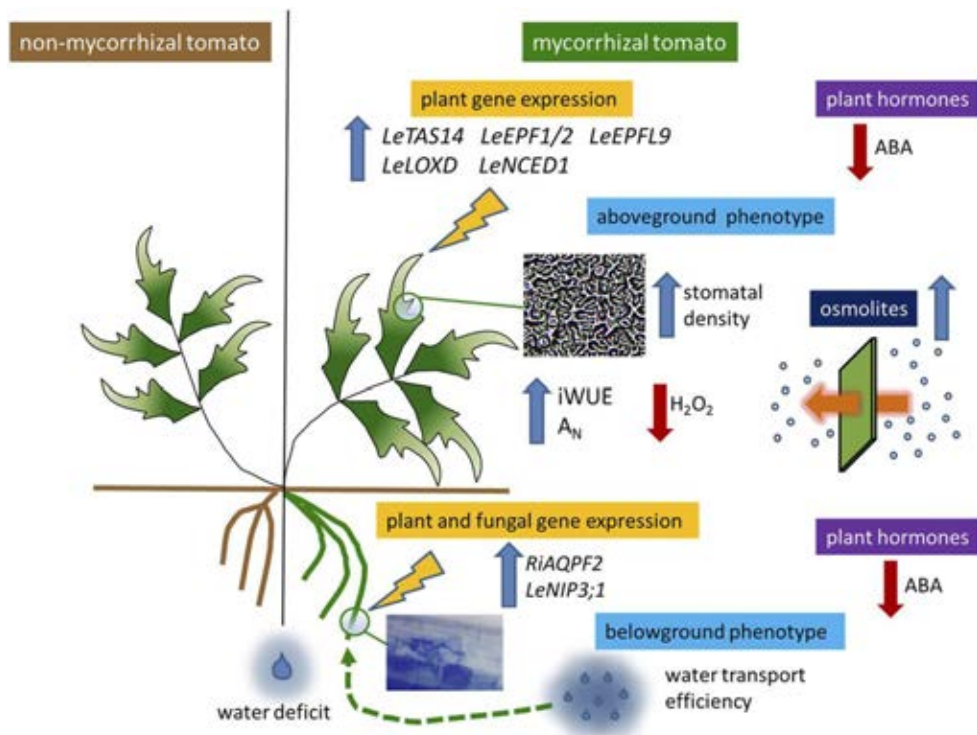
จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา มีบทบาทสำคัญในการช่วยเพิ่มผลผลิตให้กับพื้นที่เกษตรกรรมทั้งพืชไร่ และพืชสวน (Baum et al., 2015) ดังตารางที่ 2.2 โดยราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีบทบาทในการเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมน้ำ แร่ธาตุและสารอาหารต่าง ๆ ให้กับรากพืช เนื่องจากเส้นใยของราสามารถแพร่กระจายไปในดินได้ไกลกว่าการเจริญของรากพืช ทำให้พืชสามารถหาแหล่งอาหารและมีพื้นที่ผิวที่มากขึ้น (Govindarajulu et al., 2005) ดังนั้นจึงทำให้พืชมีได้รับธาตุอาหารเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับพืชที่ไม่มีการใส่เชื้อรานอกจากนี้ยังพบว่า การใช้หัวเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *Glomus mosseae* และ *Acaulosporalaevis* ร่วมกับแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* ในการปลูกพริกไทย ทำให้ลดการใช้ปุ๋ยเคมีลดลงถึงร้อยละ 50 (Tanwar et al., 2013)

ตารางที่ 2.2 การรายงานผลของราอับดับสารไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิดจากการศึกษาที่ผ่านมา

พืชอาศัย	ราอับดับสารไมคอร์ไรซาที่ใช้ในการทดสอบ	การเจริญเติบโต	การสะสมสารอาหาร	แหล่งอ้างอิง
<i>Capsicum annuum</i> (พริก)	<i>G. fasciculatum</i>	เพิ่มน้ำหนักแห้งของต้น และจำนวนผลผลิต	เพิ่มการสะสมของธาตุฟอสฟอรัส (P), สังกะสี (Zn) บริเวณยอด	(Bagyaraj and Sreeramulu, 1982)
	<i>G. fasciculatum,</i>			
	<i>G. albidum,</i>			
	<i>G. macrocarpum</i>			(Sreeramulu and Bagyaraj, 1986)
<i>Glycine Max</i> (ถั่วเหลือง)	<i>G. etunicatum</i>	เพิ่มน้ำหนักสดและแห้งของต้น	เพิ่มการสะสมของธาตุฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) และ สังกะสี (Zn)	(Sharifi et al., 2007)
<i>Zea mays</i> (ข้าวโพด)	<i>G. mosseae</i>	เพิ่มน้ำหนักแห้งของต้น	เพิ่มการสะสมของธาตุฟอสฟอรัส (P)	(Feng et al., 2002)
<i>Saccharum officinarum</i> Linn. (อ้อย)	<i>G. aggregatum,</i> <i>G. manihotis, G. spurcum</i>	เพิ่มน้ำหนักสดและแห้งของต้น	ไม่มีการทดสอบ	(Pentón et al., 2011)

### ช่วยให้พืชเติบโตได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

จากสภาวะแวดล้อมในพืชที่ไม่เหมาะสมเช่น สภาวะเค็ม สภาวะแห้งแล้ง ต่างส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชทำให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ช้าลง และได้ผลผลิตไม่เป็นไปตามที่เกษตรกรต้องการ (Porcel et al., 2012) แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การนำเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาปลูกร่วมกับพืชที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม กลับยังคงทำให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้ดี เมื่อเทียบกับพืชที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกันที่ไม่ได้ใส่เชื้อรา ดังตารางที่ 2.3



รูปที่ 2.17 กลไกการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี สรีรวิทยา และอนุวิทยาของต้นมะเขือเทศ ภายใต้สภาวะขาดน้ำในกรณีที่มีการใส่เชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Chitarra et al., 2016)

จากรูปที่ 2.17 เป็นการศึกษากลไกของเชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อสภาวะขาดน้ำของต้นมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) (Chitarra et al., 2016) โดยกลไกเริ่มจาก เมื่อพืชมีการขาดน้ำ ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่อยู่ในรากพืชจะกระตุ้นให้พืชมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของปากใบ ทำให้ปากใบปิดเพื่อลดการคายน้ำ และลดการทำงานของกรดแอบไซซิก (Abscisic acid; ABA)

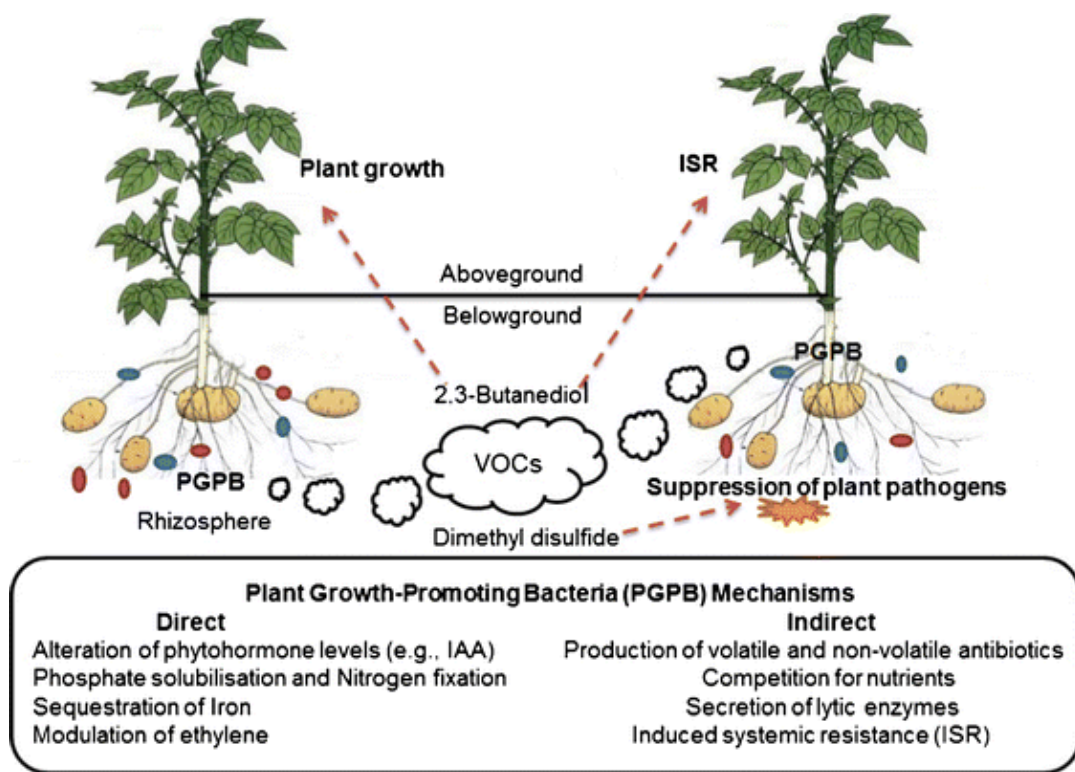
ตารางที่ 2.3 การรายงานผลของรอาบัสตุลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิดจากการศึกษาที่ผ่านมา

พืชอยู่อาศัย	รอาบัสตุลาร์ไมคอร์ไรซาที่ใช้ในการทดสอบ	การเจริญเติบโต	การสะสมสารอาหาร	แหล่งอ้างอิง
<i>Capsicum annuum</i> (พริก)	<i>G. fasciculatum</i>	เพิ่มน้ำหนักแห้งของต้น และจำนวนผลผลิต	เพิ่มการสะสมของธาตุฟอสฟอรัส (P), สังกะสี (Zn) บริเวณยอด	(Bagyaraj and Sreeramulu, 1982)
	<i>G. fasciculatum</i> ,			
	<i>G. albidum</i> ,			(Sreeramulu and Bagyaraj, 1986)
	<i>G. macrocarpum</i>			
<i>Glycine Max</i> (ถั่วเหลือง)	<i>G. etunicatum</i>	เพิ่มน้ำหนักสดและแห้งของต้น	เพิ่มการสะสมของธาตุฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) และ สังกะสี (Zn)	(Sharifi et al., 2007)
<i>Zea mays</i> (ข้าวโพด)	<i>G. mosseae</i>	เพิ่มน้ำหนักแห้งของต้น	เพิ่มการสะสมของธาตุฟอสฟอรัส (P)	(Feng et al., 2002)
<i>Saccharum officinarum</i> Linn. (อ้อย)	<i>G. aggregatum</i> , <i>G. manihotis</i> , <i>G. spurcum</i>	เพิ่มน้ำหนักสดและแห้งของต้น	ไม่มีการทดสอบ	(Pentón et al., 2011)

## 2.2.2 แบคทีเรีย

### 2.2.2.1 แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือ Plant growth promoting bacteria (PGPB)

Plant-growth promoting bacteria หรือ PGPB คือ แบคทีเรียที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ โดย PGPB มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชทั้งในทางตรงและ/หรือทางอ้อม ดังรูปที่ 2.18 (Glick, 1995; Velivelli et al., 2014) ตัวอย่างเช่น การสร้างฮอร์โมนพืช เช่น ออกซิน (IAA) ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อลำเลียง การแบ่งเซลล์ การยืดยาวของลำต้นและราก (Stem and root elongation) (Grobela et al., 2015) เดิมพืชก็สามารถสร้างฮอร์โมนออกซินเพื่อใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ได้เอง แต่การที่แบคทีเรียเหล่านี้ยังสามารถสร้างฮอร์โมนออกซินได้เพิ่มนั้น จะเป็นการช่วยให้รากพืชมีความยาวมากกว่าปกติ จึงทำให้มีพื้นที่ผิวเพิ่มขึ้น อันเป็นการช่วยให้พืชสามารถหลั่งสารเคมีสำคัญที่ใช้ในการสื่อสารระหว่างพืชกับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อื่น ๆ รวมถึงช่วยให้พืชได้รับสารอาหารที่มากขึ้นอีกด้วย (Ali et al., 2010) ความสามารถในการละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilization) ซึ่งธาตุฟอสเฟตถือเป็นธาตุอาหารหลักของพืชชนิดหนึ่ง เช่นเดียวกับธาตุไนโตรเจน แต่ธาตุฟอสเฟตนั้นไม่มีวัฏจักรการหมุนเวียนสารอย่างเช่นคาร์บอน หรือธาตุอื่น ๆ (Bashan et al., 2013a) โดยแบคทีเรียในกลุ่ม PGPB จะมีความสามารถในการละลายธาตุฟอสเฟตที่อยู่ในดินซึ่งเป็นในรูปแบบที่ไม่ละลายน้ำ จากการสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดกลูโคนิก (gluconic acid) กรดซิตริก (citric acid) เพื่อให้ในดินมีจำนวนโปรตอน ( $H^+$ ) มากขึ้นทำให้ธาตุฟอสเฟตที่ติดกับไอออนอื่น ถูกปลดปล่อยออกมา ดังนั้นจึงทำให้ธาตุฟอสเฟตอยู่ในรูปที่ละลายน้ำ และพืชสามารถนำไปใช้ได้ (Bashan et al., 2013b) การสะสมธาตุเหล็ก (Iron Sequestration) ในบริเวณรอบรากพืชโดยแบคทีเรียจะสร้างสารในกลุ่ม siderophores ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการดักจับธาตุเหล็กทำให้ธาตุเหล็กถูกตรึงอยู่บริเวณรอบรากพืช ซึ่งธาตุเหล็กถือเป็นธาตุอาหารหนึ่งที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืชเนื่องจากมีบทบาทในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Olanrewaju et al., 2017) และการที่รอบรากพืชมีสารในกลุ่ม siderophores ยังสามารถป้องกันการบุกรุกของจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้อีกด้วย (Shen et al., 2013) นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างสาร exopolysaccharides (EPS) หรือไบโอฟิล์มเพื่อยึดเกาะกับสิ่งแวดล้อม โดยไบโอฟิล์มสามารถเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับรากพืชและยังช่วยปกป้องอันตรายจากสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Upadhyay et al., 2011) โดยมีการศึกษาเกี่ยวข้องกับการใช้แบคทีเรีย PGPB ค่อนข้างหลากหลาย ดังตารางที่ 2.4



รูปที่ 2.18 กลไกที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้ง

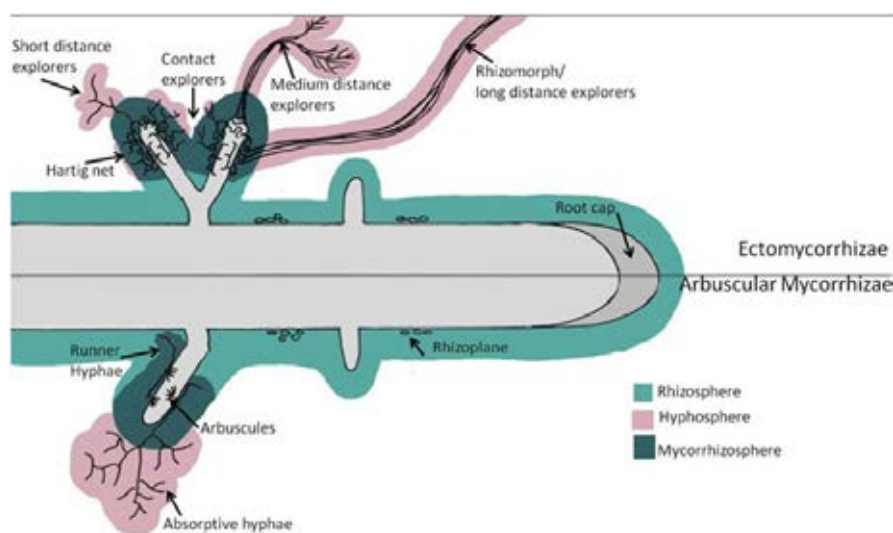
ตารางที่ 2.4 การรายงานลักษณะความสามารถของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากการศึกษาที่ผ่านมา

แบคทีเรีย	ลักษณะความสามารถของ PGP	อ้างอิง
<i>Pseudomonas putida</i>	สร้างสารแอมโมเนีย, IAA, siderophores, HCN, exopolysaccharides และมีความสามารถในการละลายฟอสเฟต	(Ahemad, Munees and Khan, 2010)
<i>Serratia marcescens</i>	สร้างสาร IAA, siderophore และ HCN	(Selvakumar, Govindan et al., 2008)
<i>Bacillus species</i> PSB10	สร้างสาร IAA, siderophores, HCN และแอมโมเนีย	(Wani and Khan, 2010)
<i>Acinetobacter sp.</i>	สร้างสาร ACC deaminase, IAA, มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟต	(Indiragandhi et al., 2008)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	สร้างสาร Gibberellin, kinetin และ IAA	(Verma et al., 2001)
<i>Azospirillum amazonense</i>	สร้าง IAA และมีความสามารถในการละลายฟอสเฟต	(Thakuria et al., 2004)
<i>Variovorax paradoxus</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Flavobacterium</i>	สร้าง IAA และ siderophores	(Belimov et al., 2005)



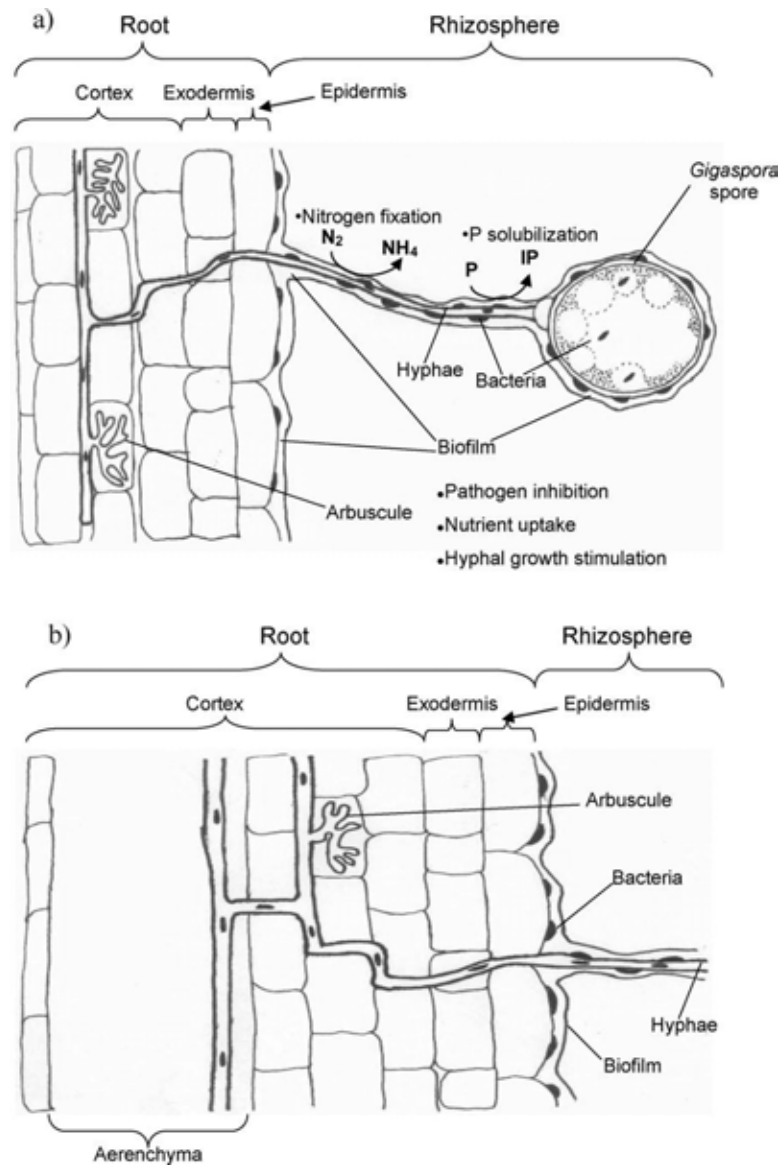
### 2.2.2.2 แบบที่เรียที่ส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา

ความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาไม่ได้มีแต่เพียงความสัมพันธ์ระหว่างรากและรากพืชเท่านั้นแต่ยังมีความสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตอื่นด้วย (Tarkka and Frey-Klett, 2008) โดยบริเวณที่สิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซานั้นจะเรียกรวมว่า “Mycorrhizosphere” (Foster and Marks, 1966) โดยอาจกล่าวได้ว่า Mycorrhizosphere คือ บริเวณที่จุลินทรีย์อยู่บนเส้นใยราสปอร์รา และรากพืชที่มีความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา (Barea et al., 2005) ดังรูปที่ 2.19 ซึ่งแบบที่เรียบางชนิดสามารถช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาได้อีกด้วย จึงเรียกแบบที่เรียเหล่านี้ว่า Mycorrhiza helper bacteria (MHB)



รูปที่ 2.19 การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์และรากพืชในบริเวณที่เรียกว่า Mycorrhizosphere (Churchland and Grayston, 2014)

แบบที่เรียที่ส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา มีกลไกที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์ดังกล่าวที่หลากหลายดังแสดงในรูปที่ 2.20 และตารางที่ 2.5 ตัวอย่างเช่น สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการแบบที่เรียหลายชนิดสามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ (Mosse, 1962; Xavier and Germida, 2003) อยู่ร่วมกันของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากพืชได้ (Frey-Klett et al., 2007) นอกจากนี้ยังแบบที่เรียยังสามารถสังเคราะห์สารอาหารให้กับรากและรากพืชได้อีกด้วย



รูปที่ 2.20 ลักษณะของแบคทีเรียที่ส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาบนสปอร์และเส้นใยราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

ตารางที่ 2.5 การรายงานลักษณะความสามารถของแบคทีเรียในการส่งเสริมความสัมพัทธ์แบบไมคอร์ไรซาจากการศึกษาก่อนหน้านี้

แบคทีเรีย	ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	พืช	ความสามารถในการส่งเสริมความสัมพัทธ์แบบไมคอร์ไรซา	อ้างอิง
<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Gigaspora margarita</i>	<i>Pennisetum americanum</i>	เพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืช	(Abdel-Fattah and Mohamedin, 2000)
<i>Azotobacter diazotrophicus</i> , <i>Klebsiella</i> sp.	<i>Glomus clarum</i>	<i>Ipomoea batatas</i>	เพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืช	(Paula et al., 1992)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	<i>Glomus fasciculatum</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i>	เพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืช	(Bagyaraj and Sreeramulu, 1982)
<i>Pseudomonas putida</i>	Mix of arbuscular mycorrhizal fungi	<i>Trifolium</i>	เพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืช	(Meyer and Linderman, 1986)
<i>Bacillus pabuli</i>	<i>Glomus clarum</i>	pea	เพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืช, กระตุ้นการงอกของสปอร์ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา	(Xavier and Germida, 2003)

### บทที่ 3 อุปกรณ์ และสารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง รุ่น BX 51 (Light microscope)	Olympus Optical Co., Ltd., Japan
กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ รุ่น SZ-60 (Stereo microscope)	Olympus Optical Co., Ltd., Japan
เครื่องอุ่นสารด้วยความร้อนแห้ง (AccuBLOCK™ Digital Dry Bath)	Labnet International, Inc.
เครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ รุ่น ES-315 (Autoclave)	Tomy Seiko Co., Ltd., Japan
เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น TP600 (DNA thermo cycle)	Takara Bio Inc., Japan
อุปกรณ์บันทึกภาพในงานชีววิทยาโมเลกุล Gel Doc™ XR (Gel documentation system)	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
แหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์	Olympus Optical Co., Ltd., Japan
ตู้ปลอดเชื้อ Clean Model.V6 (Laminar flow)	Lab Service, Thailand
เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก CM-610T (Micro centrifuge)	Hsiangtai Machinery Industry Co., Ltd., Taiwan
ไมโครปิเปตขนาด 2, 20, 100, และ 1000 ไมโครลิตร และ ทิว (Micropipatte and replacement tip)	Gilson Inc., USA
อุปกรณ์แยกขนาดโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้ารุ่น Mupid® -ex	Advance Co., Ltd., Japan
เครื่องบดและผสมรุ่น MN400 (Mixer Mill)	Retsch GmbH, Germany
เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter)	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์รุ่น ELGASTAT MAXIMA UF (Ultra- Pure water)	ELGA, England
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมความเย็น รุ่น 3700 (Refrigerated centrifuge)	Kubota Corporation, Japan
เครื่องผสมสาร รุ่น VX100 (Vortex mixer)	Labnet International Inc., USA

### เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น 2002-S

ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

เครื่องแก้วสำหรับการทดลอง

ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น Clean Model. V6 (Laminar flow)

ตู้อบความร้อน รุ่น UE 500 (oven)

ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

หลอดไมโครเซนติฟิวส์ (micro centrifuge tube) ขนาด 2 และ 1.5 มิลลิลิตร

### 3.2 สารเคมี

#### สารเคมี

Agar

Ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Ampicillin

Boric acid (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)

Calcium phosphate (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>)

Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

Chloroform

Ethanol

Ferric Ethylenediaminetetraacetic acid (FeEDTA)

Glucose

Iron (III) tartrate (Fe<sub>2</sub>(C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)<sub>3</sub>)

Isoamyl alcohol

Manganese (II) sulfate (MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O)

Magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O)

Polyethylene glycol

Potato dextrose agar

Potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>)

### บริษัทผู้ผลิต

Mettler Toledo, Switzerland

Sharp, Thailand

-

Lab Service, Thailand

Memmert GmbH + Co.KG,  
Germany

Sharp, Thailand

TPP, Switzerland

### บริษัทผู้ผลิต

-

Ajax Finechem, Australia

T.P. Drug Laboratories Co.,  
Ltd

Merck, Germany

Ajax Finechem, Australia

Serva

-

Merck, Germany

May and Baker, England

Reckitt Benckiser, Thailand

Ajax Finechem, Australia

Carbo Erba

Ajax Finechem, Australia

May and Baker, England

Serva

HiMedia Laboratories, India

Ajax Finechem, Australia



2075474675

CU Thesisis 5872017723 thesis / rev: 18072562 18:36:11 / seq: 57

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Potassium phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	May and Baker, England
Sodium chloride (NaCl)	Fluka, Switzerland
Sodium hypochlorite	-
Streptomycin	General Drugs House Co., Ltd
Sucrose	Ajax Finechem, Australia
Tris boric acid disodium ethylenediamine tetraacetic acid	-

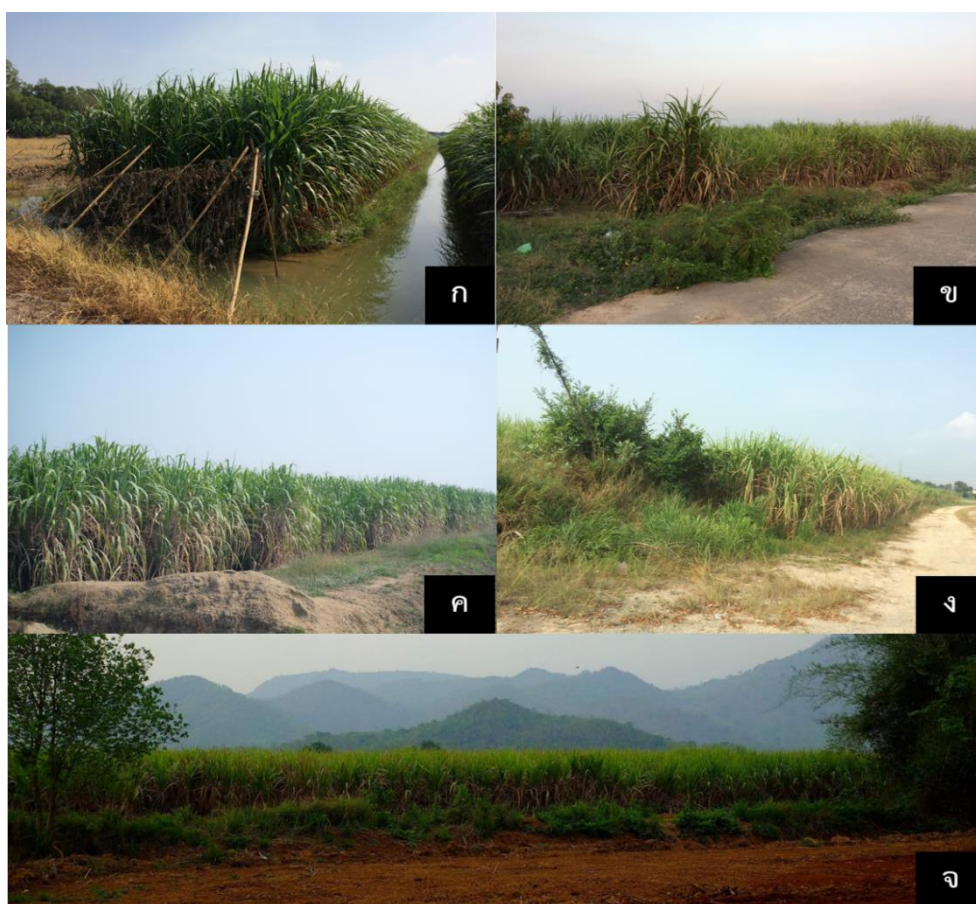
### 3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.3.1 การเก็บตัวอย่างดินที่อยู่รอบรากอ้อยและรากอ้อยจากแปลงเกษตรกรรม

ทำโดยการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกอ้อยจากแหล่งต่าง ๆ ดังแสดงในผังตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.1-3.2 โดยกำหนดพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างมีขนาดกว้าง 10 เมตร ยาว 10 เมตร สุ่มเก็บตัวอย่างดินแปลงละ 8 จุด จุดละประมาณ 0.5 กิโลกรัม โดยขุดดินลึกจากผิวดินประมาณ 30 เซนติเมตร ใส่ถุงพลาสติก ดังรูปที่ 21 ก-ง นำดินและรากอ้อยที่เก็บได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดินที่ใช้ในการวิจัย

รหัส	แหล่งที่มา	พิกัด
AY	จังหวัดพระนครศรีอยุธยา	14.179032, 100.271721
AT	จังหวัดอ่างทอง	14.697512, 100.261116
CH	จังหวัดชลบุรี	13.276061, 101.187420
NP	จังหวัดนครปฐม	14.036852, 99.971288
KA	จังหวัดกาญจนบุรี	14.086879, 99.340500



รูปที่ 3.1 แปลงปลูกไร่อ้อยแต่ละพื้นที่ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

ก. แปลงปลูกไร่อ้อยจังหวัดพระนครศรีอยุธยา (AY)

ข. แปลงปลูกไร่อ้อยจังหวัดอ่างทอง (AT)

ค. แปลงปลูกไร่อ้อยจังหวัดชลบุรี (CH)

ง. แปลงปลูกไร่อ้อยจังหวัดนครปฐม (NP) และ

จ. แปลงปลูกไร่อ้อยจังหวัดกาญจนบุรี (KA)





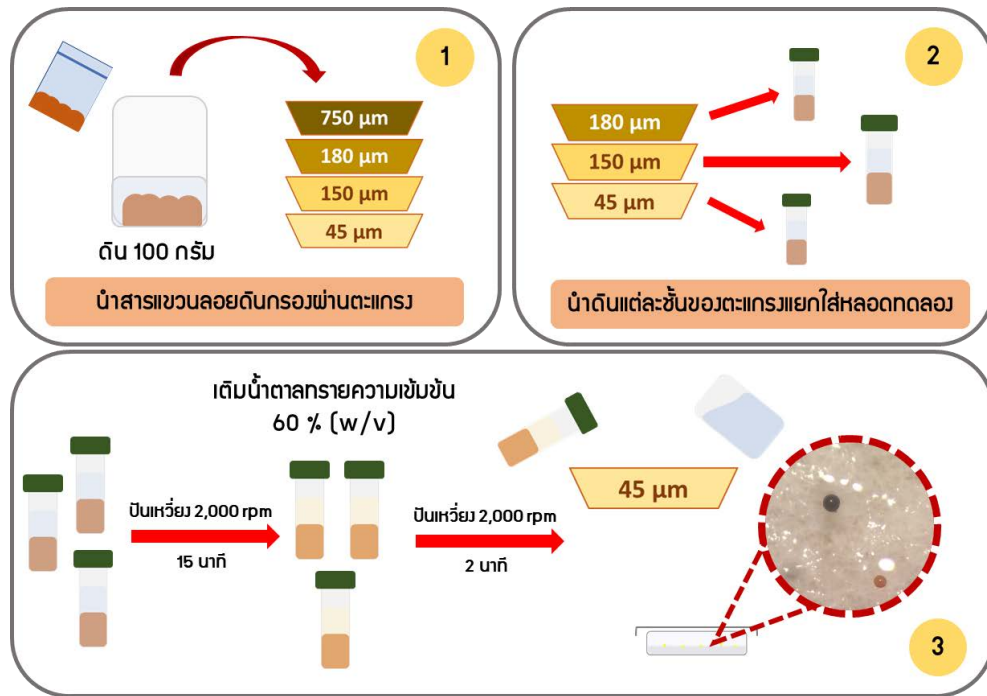
รูปที่ 3.2 การวางแผนเพื่อเก็บตัวอย่างดินและวิธีการเก็บตัวอย่างดิน

### 3.3.2 การแยกและจัดกลุ่มราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซา

#### 3.3.2.1 การแยกสปอร์ราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซาจากดินรอบรากอ้อย

แยกสปอร์ของราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซาด้วยวิธี Wet Sieving (Brundrett et al., 1996) ดังรูปที่ 3.3 โดยนำตัวอย่างดิน 100 กรัมผึ่งให้แห้งในที่ร่ม จากนั้นนำมาแช่น้ำประปา 1 ลิตร อย่างน้อย 30 นาที นำสารแขวนลอยดินผ่านตะแกรงขนาด 750, 180, 150 และ 45 ไมโครเมตร ตามลำดับ เก็บตะกอนดินจากตะแกรงขนาด 180, 150 และ 45 ไมโครเมตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำเพื่อปรับปริมาตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทน้ำทั้งหมดทิ้งจนเหลือแต่ตะกอนดินกันหลอด เติมน้ำละลายน้ำตาลความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ (โดยมวลต่อปริมาตร) ผสมกับตะกอนดินที่เหลือน้ำด้วยเครื่อง Vortex นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายแขวนลอยกรองผ่านผ้าไนลอน ปลอดเชื้อขนาดรู 20 ไมโครเมตร จากนั้นล้างตะกอนที่อยู่บนผ้าด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 3 ครั้ง และย้ายลงบนกระดาษกรองที่ขีดเส้นตารางห่างช่องละ 0.5 เซนติเมตร วางกระดาษกรองที่มีสปอร์ ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ ตรวจนับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามมิติ (stereoscopic microscope) หลังจากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียสจนกว่านำไปใช้ครั้งต่อไป





รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการแยกสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดิน

### 3.3.2.2 การจัดกลุ่มราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยใช้สัณฐานวิทยา

จัดกลุ่มราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยอาศัยหลักทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สเตอริโอโดยแยกตามแหล่งที่มา ลักษณะของสปอร์ ตามคู่มือการจำแนกชนิดราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาของ (Souza, 2015) ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ลักษณะสัณฐานสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละสกุล (Souza, 2015)

สกุล	สปอร์
<i>Acaulospora</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Acaulosporoid
<i>Ambispora</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Acaulosporoid หรือ glomoid
<i>Archaeospora</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Acaulosporoid หรือ glomoid
<i>Diversispora</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Glomoid
<i>Entrophospora</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Entrophosporoid มี Peridium
<i>Funneliformis</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Radial-glomoid
<i>Geosiphon</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Glomoid
<i>Gigaspora</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Gigasporoid
<i>Glomus</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Glomoid หรือจับเป็นกลุ่มเล็ก ๆ หรืออยู่ใน sporocarps และมี Peridium
<i>Claroideoglomus</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Glomoid หรือจับเป็นกลุ่มเล็ก ๆ และมี Peridium
<i>Otospora</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Glomoid
<i>Pacispora</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Glomoid
<i>Paraglomus</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Glomoid หรือจับเป็นกลุ่มเล็กถึงใหญ่
<i>Racocetra</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Gigasporoid หรือจับเป็นกลุ่มเล็กถึงใหญ่
<i>Redeckera</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Glomoid
<i>Rhizophagus</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Glomoid หรือจับเป็นกลุ่มเล็กถึงใหญ่
<i>Scutellospora</i>	สปอร์เดี่ยวแบบ Gigasporoid
<i>Sclerocystis</i>	สปอร์แบบ Radial-glomoid ใน Sporocarps และมี peridium

### 3.3.3 การเพิ่มจำนวนสปอร์ของราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

#### 3.3.3.1 การเพิ่มจำนวนของกลุ่มสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

นำสปอร์ที่ได้จากการจัดกลุ่มตามข้อ 3.3.2.2 มาเพิ่มปริมาณราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ในรากของต้นข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) โดยใช้วัสดุปลูกที่ประกอบด้วยทราย พีทมอสและ เวอร์มิคูไลท์ ในอัตราส่วน 1:1:1 โดยปริมาตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง จากนั้นฟุ้งให้เย็นและบรรจุปลูก ในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 นิ้ว ที่ผ่านการเช็ดด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) วางกระถางทรงที่มีกลุ่มสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (5-10 สปอร์) ลงในกระถาง วางเมล็ดข้าวฟ่างบริเวณรอบกระถางทรงจำนวน 10 เมล็ด ที่ผ่านการฆ่าเชื้อบริเวณผิว (surface sterilization) โดยแช่เมล็ดในสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้ายลงในสารละลายไซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ทำการแช่ต่อเป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วย น้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 5 ครั้ง รดน้ำให้ชุ่มทุกวัน จนครบเวลา 3 เดือน เก็บตัวอย่างดินบริเวณราก มาทำการแยกสปอร์ของราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา โดยวิธี wet-sieving ตรวจสอบจำนวนสปอร์ ซึ่งสปอร์ที่สามารถเพิ่มได้จะถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสปอร์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

#### 3.3.3.2 การเพิ่มจำนวนสปอร์และการทำให้สปอร์บริสุทธิ์ (pure culture)

นำสปอร์ที่เพิ่มปริมาณจากข้อ 3.3.3.1 มาเพิ่มปริมาณในข้าวฟ่างอีกครั้งโดยใช้วิธีเดียวกับข้างต้น แต่ใช้จำนวนสปอร์ 1 สปอร์ต่อต้นข้าวฟ่างเท่านั้น เก็บตัวอย่างดินบริเวณราก มาทำการแยกสปอร์ของราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา โดยวิธี wet-sieving ตรวจสอบจำนวนสปอร์ ต่อดิน 100 กรัมและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากพืช (% root colonization) (ภาคผนวก ก) ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีจำนวนสปอร์และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ ในรากพืชมากที่สุดจะถูกนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

### 3.3.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและระบุชนิดราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกได้ด้วย เทคนิคอนุวิทยา

#### 3.3.4.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

ตรวจสอบลักษณะของสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาด้วยเทคนิค wet mount ด้วยสารละลาย Polyvinyl-Lacto-Glycerol (PVLG) และสารละลาย PVLG + Melzer's reagent อัตราส่วน 1:1 (ภาคผนวก ข) ตรวจสอบการติดสีของสปอร์ จำนวนชั้นของผนัง ขนาดและรูปร่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง



2075474675

CU Thesisis 5872017723 thesisis / revv: 18072562 18:36:11 / seq: 57

### 3.3.4.2 การระบุชนิดราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาด้วยเทคนิคอณูวิทยา

#### การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของสปอร์ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาตามวิธีของ Long และคณะ (2017) โดยนำสปอร์ของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.3.2 จำนวน 30 สปอร์ใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 2 มิลลิลิตร ทำการบดสปอร์ให้แตกด้วยแท่งแก้ว จากนั้นเติมสารละลาย Tri-HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.0) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และสารละลาย Chelex ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (โดยมวลต่อปริมาตร) 10 ไมโครลิตร ทำการบ่มสารละลายที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นย้ายหลอดทดลองแช่ลงในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง เซนติฟิวท์ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการดูดสารละลายส่วนใสใส่ลงในหลอดทดลองอันใหม่ นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมใช้ในขั้นตอนต่อไป

#### การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 18S rRNA

เพิ่มจำนวน DNA ที่ตำแหน่ง 18S rRNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ซึ่งประกอบด้วยสารต่าง ๆ ที่ใช้ทำปฏิกิริยาดังภาคผนวก ข โดยใช้ไพรเมอร์ NS31 (5'TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC3') (Simon et al. 1992) และ AM1 (5'GTTTCCCGT AAGGCGCCG AA3') (Helgason et al. 1998) ตามวิธีของ Bidondo และคณะ (2012)

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ โดยกำหนดสภาวะ ดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Amplification			
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	} 30 รอบ
Annealing	58 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Holding	4 องศาเซลเซียส		

ทำการส่งตัวอย่างจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ ส่งไปที่บริษัท ไบโอเนียร์ (bioneer) ประเทศเกาหลี เพื่อหาลำดับเบสต่อไป

### การทำลำดับเบสนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ตำแหน่ง 18S rRNA

นำลำดับเบสที่ได้จากบริษัทมาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLAST จากนั้นนำลำดับเบสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ และในฐานข้อมูลบางส่วนมาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ด้วยโปรแกรม Mega 10 (Kumar, S. et al., 2018) ตามวิธี Maximum Likelihood อ้างอิงจากโมเดล Kimura 2-parameter ทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า Bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ (Kimura, 1980)

#### 3.3.5 การแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอากัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

ทำการแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอากัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ตามวิธีของ Long และคณะ (2017) โดยการนำตัวอย่างสปอร์ของราอากัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่จัดจำแนกแล้วคลุกกลุ่มภายในแหล่งเดียวกัน มาจำนวน 3-5 สปอร์ ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำเกลือปลอดเชื้อ ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (โดยมวลต่อปริมาตร) บดสปอร์ให้แตก นำของเหลวที่ได้เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ค) เจือจาง 0.25 เท่า แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกโดยการสุ่มโคโลนีที่แตกต่างกันจำนวนอย่างน้อย 20 โคโลนี มาทำให้บริสุทธิ์โดยการขีดลาก (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA ความเข้มข้นเต็มสูตร จนได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ จากนั้นจึงเก็บแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหาร NA เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

#### 3.3.6 ทดสอบลักษณะการเป็น PGPB และการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอากัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาของแบคทีเรียที่แยกได้

##### 3.3.6.1 การตรวจสอบลักษณะการเป็น PGPB ของแบคทีเรีย

ตรวจสอบแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 5 ด้วยลักษณะต่าง ๆ ด้วยวิธีการดังนี้

##### การสร้าง IAA (Indole-3-acetic acid)

ตรวจสอบปริมาณ IAA ตามวิธีของ Ahemad และ Khan (2012) โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก ก) เลี้ยงแบคทีเรียถ่ายใส่ลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ค) ที่มีส่วนผสมของทริปโตเฟน (Tryptophan) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่หลอดทดลอง และเติมสารละลาย Salkowski reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที



2075474675

วัดปริมาณ IAA ที่เกิดขึ้นด้วย วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เทียบกับสารละลาย IAA มาตรฐานความเข้มข้น 0-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ง)

#### การสร้างแอมโมเนีย (NH<sub>3</sub> production)

ตรวจสอบความสามารถในการสร้างแอมโมเนียของแบคทีเรียตามวิธีของ Cappuccio และ Sherman (1996) โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก ก) ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว เลี้ยงเชื้อ peptone water (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนด นำสารแขวนลอยที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลาย ส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลอง และเติมสารละลาย Nessler's reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบสารผลิตภัณฑ์ด้วยความยาวคลื่นที่ 450 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายแอมโมเนียม ซัลเฟตมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-0.8 มิลลิโมลต่อ มิลลิลิตร (ภาคผนวก ง)

#### การสร้างสาร Siderophore

ตรวจสอบการสร้าง Siderophore โดยตรวจสอบการสร้างกรดซาลิซิลิก ตามวิธีของ Ahemad และ Khan (2012) โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก ก) ถ่ายลงในอาหารเหลว Modi medium (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นสกัดสารด้วย ethyl acetate โดยนำสารแขวนลอยแบคทีเรีย 10 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้สารแขวนลอย มีค่าเป็น 2.0 ด้วยสารละลายกรดไฮดรอกลอริก (HCl) จากนั้นดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลาย ส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่และเติมสารละลาย ethyl acetate 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที และดูดสารละลายส่วนบน 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Hathway's reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรวัดปริมาณ สารที่เกิดขึ้นเทียบด้วยสารละลายโซเดียมซาลิซิลเลตมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครโมลต่อ มิลลิลิตร (ภาคผนวก ง)



2075474675

CU Thesisis 5872017723 thesisis / revv: 18072562 18:36:11 / seq: 57

### การละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilization)

ตรวจสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตตามวิธีของ Ahemad และ Khan (2012) โดยการ ใช้ลูปแตะเชื้อแบคทีเรีย จากจานเลี้ยงเชื้อแข็ง NA แต้มลงบนกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar (ภาคผนวก ค) ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นสังเกตการเกิดวงใส บริเวณรอบ ๆ โคลนนี้ ของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับ การเกิดวงใส คำนวณค่า ดัชนีการละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilization index; PSI) จากสมการ

$$\text{ดัชนีการละลายฟอสเฟต} = \frac{\text{ผลรวมของเส้นผ่านศูนย์กลางโคลนของแบคทีเรียและเส้นผ่านศูนย์กลาง}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคลนของแบคทีเรีย}}$$

### การสร้างสาร extracellular polymeric substance (EPS)

ตรวจสอบการสร้างสาร extracellular polymeric substance (EPS) ตามวิธีของ Naseem และ Bano (2014) โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก ก) ถ่ายลงในอาหารเหลว NB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใส 500 ไมโครลิตรและหยดสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายเข้ากันและนำไปแช่ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน สังเกตผลิตภัณฑ์ลักษณะวุ้นสีขาวขุ่นเกิดที่ก้นและทำการบันทึกผลการทดลอง

3.3.6.2 การทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราออบัสคูลาร์-ไมคอร์ไรซาของแบคทีเรียที่แยกได้

นำแบคทีเรียที่ มาทดสอบลักษณะการเป็น MHB ด้วยวิธีการดัดแปลงมาจาก Long และ คณะ (2017) โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก ก) ถ่ายลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อเหลว NB และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (โดยมวลต่อปริมาตร) เจือจาง ให้สารแขวนลอยแบคทีเรียมีความเข้มข้นของเซลล์ 10<sup>8</sup> เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเอาสปอร์ของ ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาของแต่ละกลุ่มแช่ลงในสารแขวนลอยแบคทีเรียเป็นเวลา 10 นาที จากนั้น วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง water agar (WA) (ภาคผนวก ค) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการงอกของสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะของการเป็น PGPB อย่างน้อย 4 ลักษณะและสามารถกระตุ้น การงอกของสปอร์มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.7 การการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและระบุชนิดแบคทีเรียที่มีลักษณะการเป็น PGPB และช่วยกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

#### 3.3.7.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

ตรวจสอบลักษณะโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย สี ลักษณะผิวและขอบของโคโลนีด้วยตาเปล่า จากนั้นทำการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียด้วยวิธีการย้อมแกรม (Gram staining) ตรวจสอบรูปร่าง การติดสีย้อมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

#### 3.4.7.2 การระบุชนิดแบคทีเรียด้วยเทคนิคอณูวิทยา

##### การสกัดดีเอ็นเอ

ตะโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นดูดสารแขวนลอยแบคทีเรีย ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีโอไทด์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 30 วินาทีอีกครั้งและเทส่วนใสออก จนเหลือแต่ตะกอนแบคทีเรีย เติมสารละลาย Lysozyme ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดนิวคลีโอไทด์ 450 ไมโครลิตร สารละลาย Protenase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรปริมาตร 6 ไมโครลิตรและ สารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยมวลต่อปริมาตร) ผสมสารละลายและตะกอน แบคทีเรียให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงอย่างนุ่มนวล จนไม่มีตะกอนตกค้างที่ก้นหลอด นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีหรือจนกว่าสารละลายใส เติมสารละลาย Phenol: Chlorophorm ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่ลงในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่ ดำเนินขั้นตอนดังกล่าวเป็นจำนวน 2 ครั้งจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตด (pH 7.0) เติมสารเอลทิลกอลฮออล์บริสุทซ์ แซ่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใส ออกและเติมสารละลายเอลทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (โดยมวลต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 10 นาทีอีกครั้งดูด สารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นรอตตะกอนดีเอ็นเอใต้ก้นหลอดทดลองแห้ง และทำการเติมสารละลาย tRNase ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 37 องศา เซลเซียส เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมใช้ในขั้นตอนต่อไป



### การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 18S RNA

ทำการส่งตัวอย่างจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.3.7.1 ส่งไปที่บริษัท ไบโอเนียร์ (bioneer) ประเทศเกาหลีเพื่อทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และไพรเมอร์ 1541r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') (Brosius et al., 1981; Cocolin et al., 2001)

### การหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ตำแหน่ง 16S rRNA

หาลำดับเบส จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้จากบริษัทมาเปรียบเทียบกับ ลำดับเบสในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLAST นำลำดับเบสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ และในฐานข้อมูลบางส่วนมาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม Mega 10 (Kumar, S. et al., 2018) ตามวิธี Maximum Likelihood อ้างอิงจากโมเดล Kimura 2-parameter ทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า Bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ (Kimura, 1980)

3.3.8 การศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันของราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของอ้อย

ปลูกต้นกล้าอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 อายุ 3 เดือนที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชขอนแก่น ตำบลท่าพระ อำเภอเมืองฯ จังหวัดขอนแก่น ในถุงเพาะชำสำหรับปลูกต้นไม้ ที่ใส่ดินซีสไคเดือน ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง ร่วมกับสปอร์ราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.3.2 และแบคทีเรียที่มีลักษณะความสามารถ PGP และกระตุ้นการงอกของสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.6.2 ดังรูปที่ 3.4-3.5 โดยสกัดส่วนของแบคทีเรียและสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเป็นไปตามชุดการทดลองดังรายการต่อไปนี้

<b>ชุดการทดลองที่ 1</b>	ชุดเปรียบเทียบ (control) ซึ่งไม่ใส่ราและแบคทีเรีย
<b>ชุดการทดลองที่ 2</b>	ใส่สปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจำนวน 50 สปอร์/ต้น
<b>ชุดการทดลองที่ 3</b>	ใส่แบคทีเรียความเข้มข้น $10^8$ เซลล์ ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร
<b>ชุดการทดลองที่ 4</b>	ใส่สปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจำนวน 50 สปอร์/ต้น และใส่แบคทีเรียความเข้มข้น $10^8$ เซลล์ ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

ทำการปลูกเป็นเวลา 120 วัน บันทึกผลการเจริญของอ้อยได้แก่ ความสูง มวลชีวภาพเหนือดินและมวลชีวภาพใต้ดิน บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากอ้อยตามวิธีดังภาคผนวก ก ในการทดสอบวางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ต้น วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Dunnett' test และ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$



รูปที่ 3.4 การปลูกอ้อยในการทดลอง



รูปที่ 3.5 วิธีการใส่แบคทีเรียและ/หรือ สปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในการปลูกลำอ้อย

- ก. ต้นกล้าอ้อยอายุ 3 เดือน
- ข. สปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบนกระดาษกรอง
- ค. วิธีการใส่สปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา
- ง. วิธีการใส่แบคทีเรีย
- จ. วิธีการปลูกลำอ้อยในถุงเพาะชำ

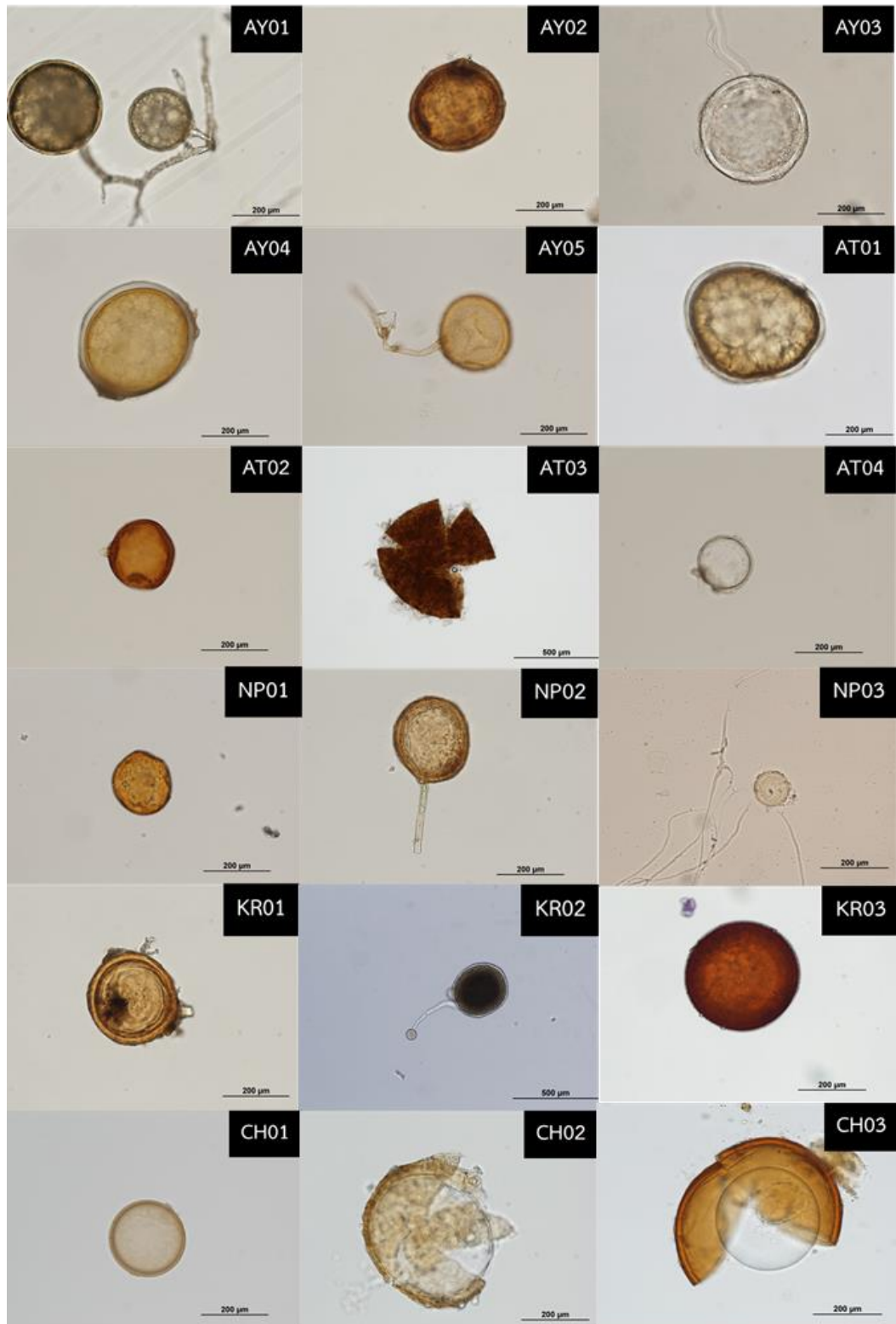
## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 การแยกชนิดและจัดกลุ่มสปอร์ของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

จากการแยกสปอร์ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินของแปลงไร้อ้อยทั้งหมด 5 พื้นที่ ได้แก่ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (AY) จังหวัดอ่างทอง (AT) จังหวัดชลบุรี (CH) จังหวัดนครปฐม (NP) และ จังหวัดกาญจนบุรี (KR) พบสปอร์ของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะต่าง ๆ กัน จำนวน 18 ไอโซเลท ดังรูปที่ 26 โดยพบลักษณะของสปอร์ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจำนวน 3 ลักษณะได้แก่ glomoid, gigasporoid และ acaulosporoid สามารถจัดกลุ่มสปอร์ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แยกได้ออกเป็น 6 กลุ่มซึ่งแยกตามลักษณะสปอร์และแหล่งที่มาของสปอร์ ดังตารางที่ 4.1 โดยสปอร์ส่วนใหญ่ที่พบสปอร์มีลักษณะแบบ Glomeroid

ตารางที่ 4.1 วงศ์ของสปอร์ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่จำแนกได้

สถานที่	ไอโซเลท	ลักษณะสปอร์	การจัดกลุ่ม
จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (AY)	AY01	Glomoid	กลุ่มที่ 1
	AY02	Glomoid	
	AY03	Glomoid	
	AY04	Glomoid	
	AY05	Glomoid	
จังหวัดอ่างทอง (AT)	AT01	Glomoid	กลุ่มที่ 2
	AT02	Glomoid	กลุ่มที่ 3
	AT03	Gigasporoid	
	AT04	Glomoid	กลุ่มที่ 2
จังหวัดนครปฐม (NP)	NP01	Glomoid	กลุ่มที่ 4
	NP02	Glomoid	
	NP03	Glomoid	
จังหวัดกาญจนบุรี (KR)	KR01	Glomoid	กลุ่มที่ 5
	KR02	Glomoid	
	KR03	Glomoid	
จังหวัดชลบุรี (CH)	CH01	Acaulosporoid	กลุ่มที่ 6
	CH02	Acaulosporoid	
	CH03	Acaulosporoid	



รูปที่ 4.1 ลักษณะสปอร์ราาบัสคูลาร์ไมโครไรซาจากตัวอย่างดินของแปลงไร้อ้อยทั้งหมด 5 พื้นที่



#### 4.2 การเพิ่มจำนวนสปอร์ราอากัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

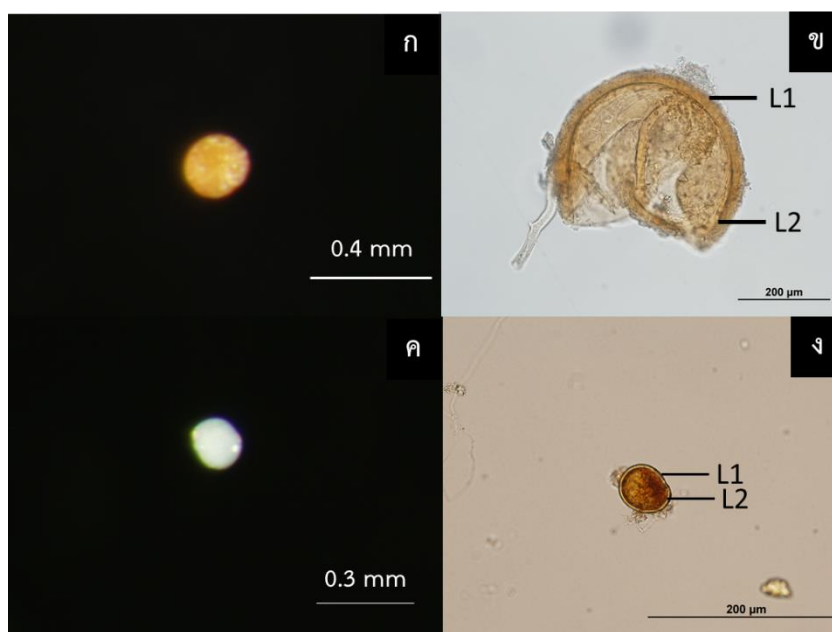
จากการเพิ่มปริมาณของกลุ่มสปอร์ราอากัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจำนวน 6 กลุ่ม ในรากของข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) โดยใช้วัสดุปลูกที่ประกอบด้วยทราย พีทมอสและเวอร์มิคูไลท์ ปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 เดือน โดยพบว่ามีเพียง 6 ไอโซเลท AY01, AY05, AT01, AT04, NP01 และ NP03 เท่านั้นที่สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้ และเมื่อนำสปอร์ทั้ง 6 ไอโซเลทเพิ่มจำนวนสปอร์และทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยใส่สปอร์ 1 สปอร์ต่อต้นข้าวฟ่าง 1 ต้น เป็นเวลา 3 เดือน ตรวจนับจำนวนสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากข้าวฟ่าง พบว่าแต่ละไอโซเลทมีจำนวนสปอร์ที่สร้างต่อดิน 100 กรัมและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากแตกต่างกันโดยจำนวนสปอร์อยู่ระหว่าง 8-27 สปอร์ต่อดิน 100 กรัมและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 65.40-11.49 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2 โดยพบว่า AY01 มีจำนวนสปอร์เฉลี่ย  $27.25 \pm 2.06$  สปอร์ต่อดิน 100 กรัมและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากข้าวฟ่างเฉลี่ย  $65.40 \pm 4.23$  ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยที่สูงสุดเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่น และรา AT04 มีจำนวนสปอร์เฉลี่ย  $54.39 \pm 5.17$  สปอร์ต่อดิน 100 กรัมและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากข้าวฟ่างเฉลี่ย  $16.92 \pm 3.59$  มีค่าเฉลี่ยเป็นอันดับถัดมา ด้วยเหตุนี้ราอากัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 และ AT04 จึงถูกเลือกนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป

**ตารางที่ 4.2** จำนวนสปอร์และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากข้าวฟ่างของราอากัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แยกได้

ไอโซเลท	จำนวนสปอร์ ต่อดิน 100 กรัม (สปอร์)	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากข้าวฟ่าง (%)
AY01	$27.25 \pm 2.06$	$65.40 \pm 4.23$
AY05	$11.50 \pm 2.65$	$16.92 \pm 3.59$
AT01	$11.50 \pm 2.65$	$28.46 \pm 2.42$
AT04	$20.50 \pm 1.29$	$54.39 \pm 5.17$
NP01	$8.25 \pm 1.50$	$11.49 \pm 1.87$
NP03	$12.00 \pm 1.83$	$13.97 \pm 0.55$

### 4.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและระบุชนิดราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคอณูวิทยา

จากผลการเพิ่มจำนวนราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในข้าวฟ่างได้คัดเลือกกรา AY01 และ AT04 มาทำการศึกษาสัณฐานลักษณะสัณฐานวิทยา โดยรา AY01 มีสปอร์แบบ glomoid สีเหลืองอ่อน ดังรูปที่ 4.2 ก. เมื่อย้อมสีด้วย Melzer's reagent พบว่าสีย้อมสามารถย้อมติดผนังสปอร์ทั้ง 2 ชั้น ดังรูปที่ 4.2 ข. ส่วนรา AT04 มีสปอร์แบบ glomoid สีขาว ดังรูปที่ 4.2 ค. และมีจำนวนผนังสปอร์ 2 ชั้น โดยผนังทั้ง 2 ชั้น ดังรูปที่ 4.2 ง สามารถย้อมติดสี Melzer's reagent ได้ ในการระบุชนิดราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยเปรียบเทียบลำดับเบสที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA กับฐานข้อมูล Genbank โดย พบว่า AY01 และ AT04 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%identity) ของลำดับเบสที่ 98.75 และ 99.53 เปอร์เซ็นต์กับรา *Diversispora* sp. เมื่อทำการตรวจสอบโดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการดังรูปที่ 4.3 พบว่าราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทั้ง 2 มีความใกล้เคียงราในสกุล *Diversispora*



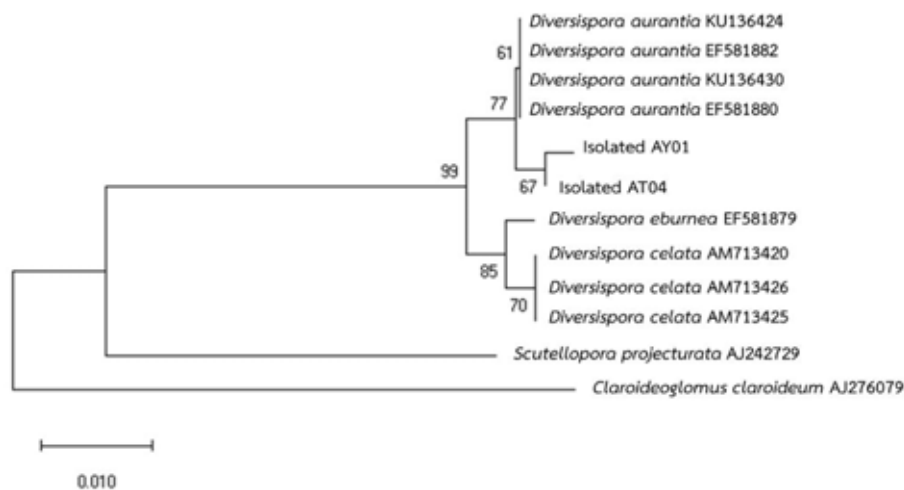
รูปที่ 4.2 ลักษณะสัณฐานของสปอร์รา AY01 และ AT04

ก สปอร์รา AY01

ข สปอร์รา AY01 เมื่อย้อมด้วย Melzer's reagent

ค สปอร์รา AT04

ง สปอร์รา AY01 เมื่อย้อมด้วย Melzer's reagent



รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราอับสคูลารีไมคอร์ไรซาที่ ตำแหน่ง 18S rRNA ด้วยแบบจำลอง maximum likelihood algorithm แสดงเปอร์เซ็นต์ bootstrap จากการทดสอบ 1000 ครั้ง

#### 4.4 การแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอับสคูลารีไมคอร์ไรซา

จากการแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับสปอร์ของราอับสคูลารีไมคอร์ไรซาจากกลุ่มสปอร์ราอับสคูลารีไมคอร์ไรซาทั้ง 6 กลุ่ม แต่ละกลุ่มสามารถแยกได้แบคทีเรียที่มีสัณฐานแตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.3 รวมทั้งสิ้น 122 ไอโซเลท

ตารางที่ 4.3 ผลการแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับสปอร์ของราอับสคูลารีไมคอร์ไรซา

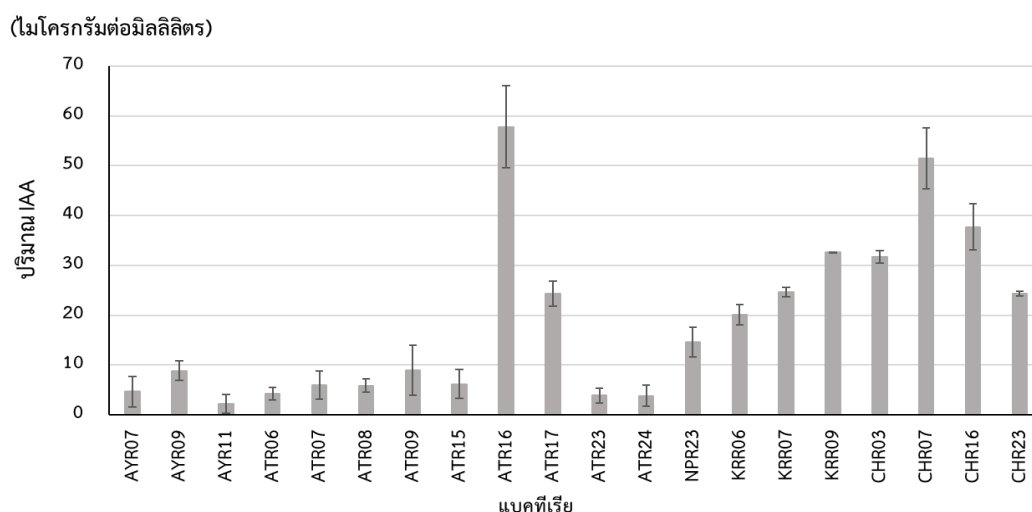
กลุ่มที่	ไอโซเลทสปอร์ที่ใช้ในการแยก	จำนวน (ไอโซเลท)
1	AY01, AY02, AY03, AY04 AY05	30
2	AT01, AT02, AT04, AT05	20
3	AT03	4
4	NP01, NP02, NP03	25
5	KR01, KR02, KR03	20
6	CH01, CH02, CH03	23
	รวม	122



#### 4.5 การทดสอบการเป็น PGPB ของแบคทีเรียที่แยกได้และความสามารถในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอากัสคูลารีไมคอร์ไรซา

จากการนำแบคทีเรียทั้ง 122 ไอโซเลทมาทำการตรวจสอบคุณลักษณะความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting; PGP) จำนวน 5 ลักษณะได้แก่ การสร้างแอมโมเนียม ความสามารถในการสร้าง IAA ความสามารถในการละลายฟอสเฟต การสร้างสารในกลุ่ม siderophore และการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีลักษณะของ PGP ที่แตกต่างกัน (ภาคผนวก จ) โดยมีแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลทที่พบว่าไม่มีลักษณะความสามารถของ PGP ตามที่กำหนดไว้ และแบคทีเรียที่มีลักษณะของ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะมีจำนวน 20 ไอโซเลทคิดเป็น 16.39 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้ ได้แก่ AYR07, AYR09, AYR11, ATR06, ATR07, ATR08, ATR09, ATR15, ATR16, ATR17, ATR23, ATR24, NPR23, KRR06, KRR07, KRR09, CHR03, CHR07, CHR16 และCHR23 แต่ละไอโซเลทมีลักษณะความสามารถดังแสดงในตารางที่ 4.4

จากการตรวจสอบลักษณะความสามารถของแบคทีเรียที่ปรากฏลักษณะของ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะจำนวน 20 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลทมีความสามารถในการสร้าง IAA โดยปริมาณของ IAA ที่แบคทีเรียสร้างได้อยู่ในช่วง 2.21- 57.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยแบคทีเรียที่สามารถสร้าง IAA มีปริมาณสูงสุดคือ ATR16 ที่มีปริมาณ  $57.82 \pm 8.19$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.4



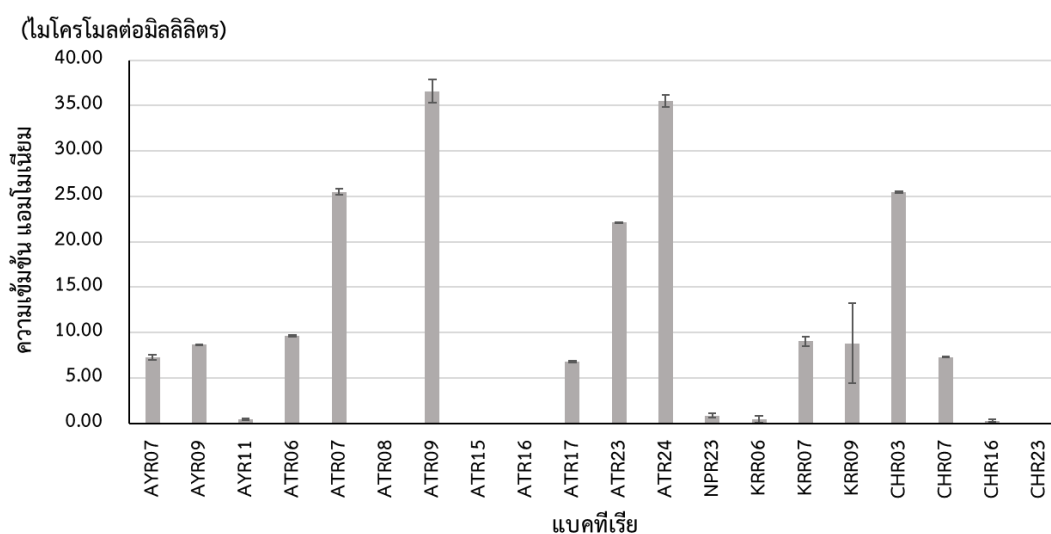
รูปที่ 4.4 ปริมาณการสร้าง IAA ของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะที่สร้างในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) + 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.4 คุณลักษณะความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting; PGP)

ไอโซเลข	การสร้าง IAA	การสร้าง แอมโมเนียม	การสร้างสารในกลุ่ม siderophore	การละลาย ฟอสเฟต	การสร้าง ไบโอฟิล์ม
AYR07	+	+	+	-	+
AYR09	+	+	+	-	+
AYR11	+	+	+	+	-
ATR06	+	+	+	-	+
ATR07	+	+	+	-	+
ATR08	+	-	+	+	+
ATR09	+	+	+	-	+
ATR15	+	-	+	+	+
ATR16	+	-	+	+	+
ATR17	+	+	+	+	-
ATR23	+	+	+	-	+
ATR24	+	+	+	-	+
NPR23	+	+	+	+	-
KRR06	+	+	+	+	-
KRR07	+	+	+	+	-
KRR09	+	+	+	+	+
CHR03	+	+	-	+	+
CHR07	+	+	+	+	+
CHR16	+	+	+	+	-
CHR23	+	-	+	+	+

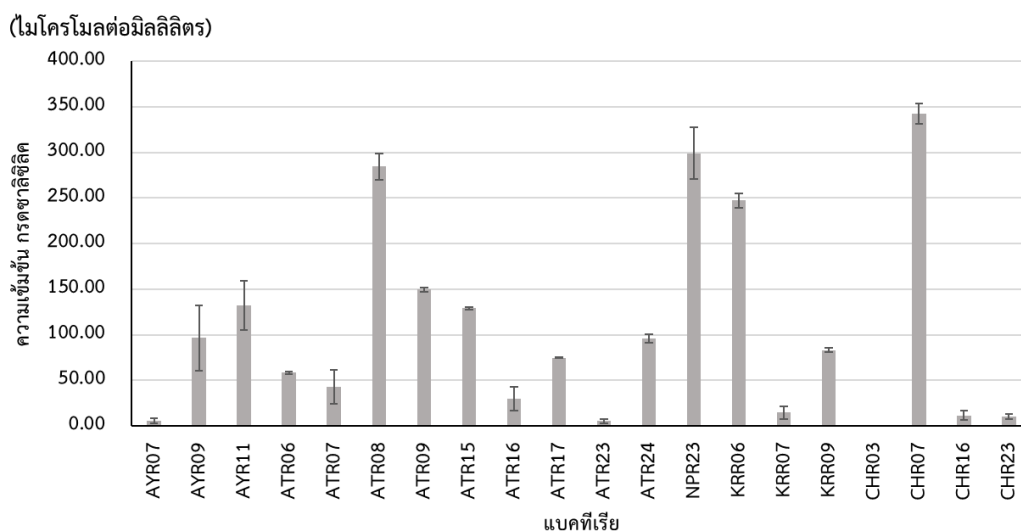
+ หมายถึง มีลักษณะดังกล่าว และ - หมายถึง ไม่มีลักษณะดังกล่าว

สำหรับการตรวจสอบความสามารถในการสร้างแอมโมเนียของแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลทด้วยสารละลาย Nessler's reagent พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 16 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถสร้างแอมโมเนียได้โดยความเข้มข้นของแอมโมเนียที่แบคทีเรียสร้างได้อยู่ระหว่าง 0.31 และ 36.59 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรโดยแบคทีเรียที่สามารถสร้างแอมโมเนียได้ความเข้มข้นสูงที่สุดคือ ATR09 ที่ความเข้มข้น  $36.59 \pm 1.27$  ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังรูปที่ 4.5



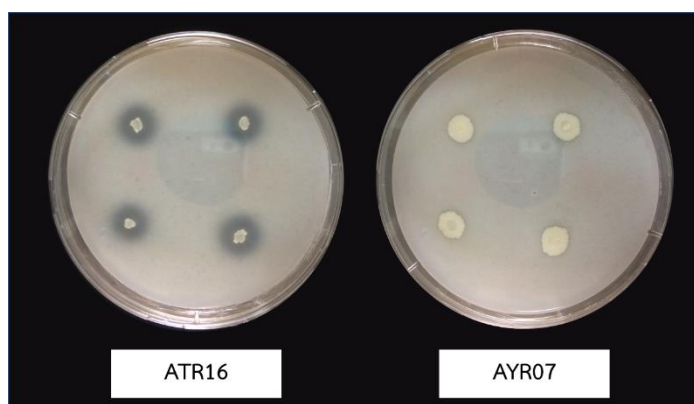
รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างแอมโมเนียของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Peptone water

เมื่อตรวจสอบความสามารถการสร้างสารในกลุ่ม Siderophore ของแบคทีเรียโดยใช้สารละลาย Hathway's reagent เพื่อตรวจหาปริมาณของกรดซาลิซิลิก ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม siderophore พบว่ามีเพียงแบคทีเรีย CHR03 เท่านั้นที่ไม่สามารถสร้างกรดซาลิซิลิก โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้าง Siderophore สามารถสร้างกรดซาลิซิลิกได้มีความเข้มข้น 5.31-342.53 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรโดยแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารได้สูงที่สุดคือ CHR07 ที่ความเข้มข้น  $342.53 \pm 11.05$  ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังรูปที่ 4.6

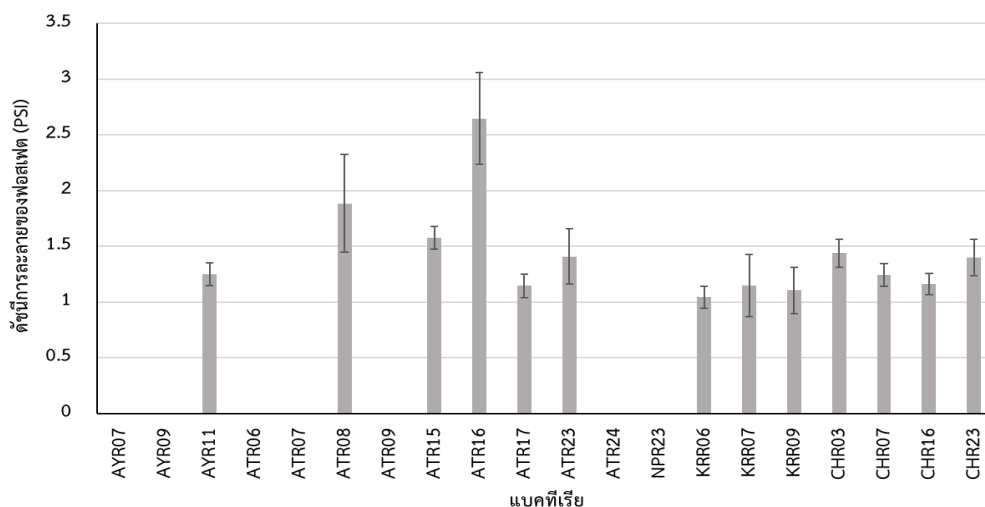


รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างกรดซาลิซิลิกของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Modi medium

ในการทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Pikovskaya's agar พบว่ามีแบคทีเรียจาก 20 ไอโซเลทสามารถสร้างวงใสรอบโคโลนีแบคทีเรียดังรูปที่ 4.7-4.8 ได้เพียง 13 ไอโซเลท ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต ทั้งนี้แบคทีเรียที่มีค่าของดัชนีการละลายฟอสเฟตที่สูงที่สุดคือ ATR16 ที่  $2.65 \pm 0.41$  นอกจากนี้ในการทดสอบการสร้าง EPS โดยการตกตะกอนด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ สังเกตการตกตะกอนของสารผลิตภัณฑ์ในส่วนใสของแบคทีเรีย พบว่ามีส่วนใสแบคทีเรียที่สามารถการตกตะกอนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นเมือกสีขาวขุ่นจำนวน 14 ไอโซเลท แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม ดังตารางที่ 4.4



รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบลักษณะการสร้างวงใสรอบโคโลนีแบคทีเรียของ ATR16 และ AYR07 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar



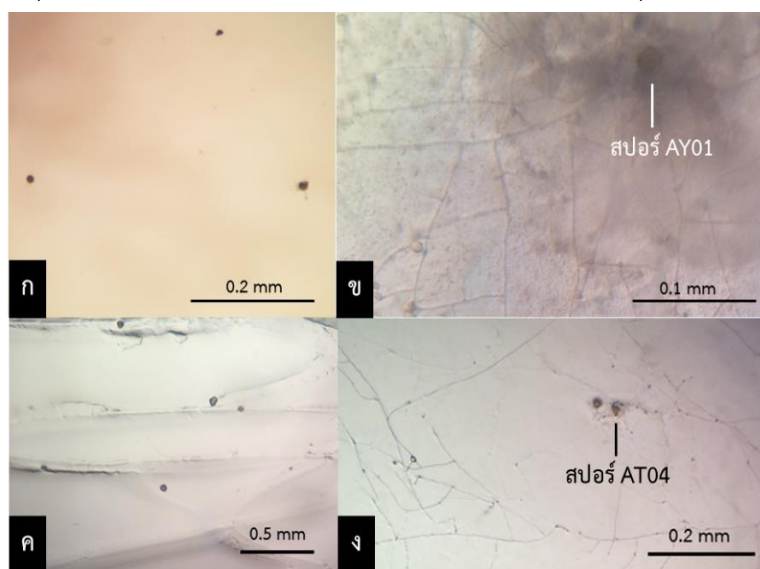
**รูปที่ 4.8** เปรียบเทียบดัชนีการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP  
อย่างน้อย 4 ลักษณะ บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลทมาทดสอบการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราออบัสคูลาร์-ไมคอร์ไรซาที่ได้คัดเลือกจากจำนวนสปอร์และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากข้าวฟ่างสูงสุด 2 อันดับ ได้แก่ AY01 และ AT04 ตรวจสอบการงอกของสปอร์ราไมคอร์ไรซาโดยการทดสอบบนอาหารแข็ง water agar โดยแบคทีเรียที่กระตุ้นการงอกของสปอร์ราไมคอร์ไรซาได้นั้นจะพบการสร้างเส้นใยแบบไม่มีผนังกันตามขวาง และมีการงอกเส้นใยจากตัวสปอร์ในรูปแบบ 2 แขนง (dichotomous branching) ดังรูปที่ 4.9 ข และ ง พบว่าภายในเวลา 7 วันมีเพียง ATR16 ที่สามารถกระตุ้นการงอกสปอร์ของ AY01 และ AT04 ได้ แต่สปอร์ของ AT04 มีเพียงแบคทีเรียไอโซเลท ATR17 เท่านั้น ที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ ซึ่งต่างจากสปอร์ของ AY01 ที่มีแบคทีเรียถึง 11 ไอโซเลท ที่สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ราได้ ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการกระตุ้นการงอกสปอร์รา AY01 และ AT04 ของแบคทีเรียที่แยกได้

ไอโซเลท	ความสามารถในการงอกสปอร์		ไอโซเลท	ความสามารถในการงอกสปอร์	
	AY01	AT04		AY01	AT04
AYR07	+	-	ATR23	-	-
AYR09	+	-	ATR24	-	-
AYR11	-	-	NPR23	-	-
ATR06	+	-	KRR06	-	-
ATR07	+	-	KRR07	-	-
ATR08	+	-	KRR09	+	-
ATR09	+	-	CHR03	+	-
ATR15	+	-	CHR07	+	-
ATR16	+	+	CHR16	-	-
ATR17	-	+	CHR23	-	-

+ หมายถึง กระตุ้นการงอกสปอร์ราไมคอร์ไรซา และ - หมายถึง ไม่กระตุ้นการงอกสปอร์ราไมคอร์ไรซา



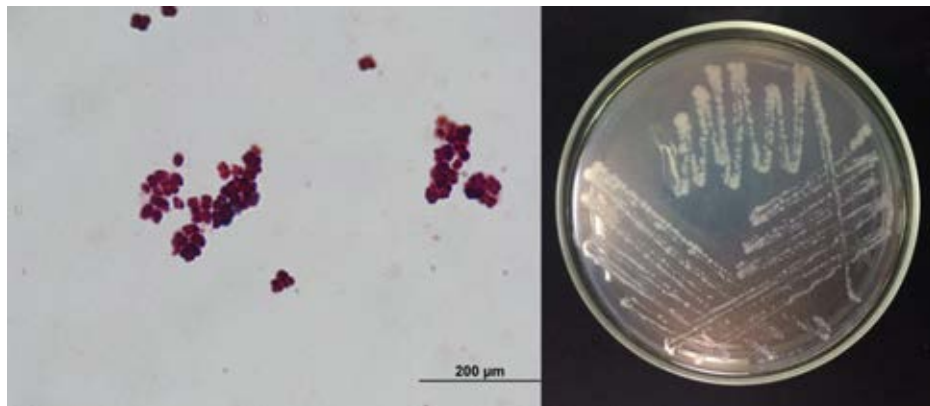
รูปที่ 4.9 ลักษณะการงอกของสปอร์ราอับัสคูลารีไมคอร์ไรซา

ก และค: สปอร์ AY01 และ AT04 ตามลำดับ ในชุดควบคุมไม่มีการงอกของสปอร์รา

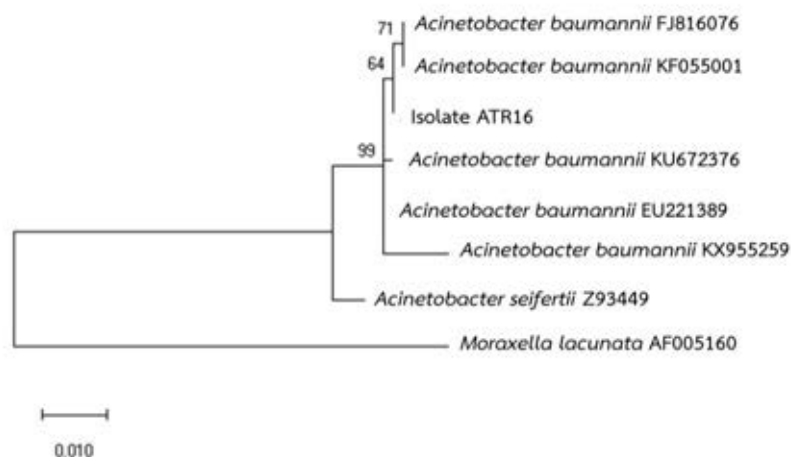
ข และง: สปอร์ AY01 และ AT04 ตามลำดับที่มีการใส่แบคทีเรีย ATR16 ร่วมด้วยพบการงอกของสปอร์รา

#### 4.6 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและระบุชนิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคอณูวิทยา

จากผลทดสอบการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 และ AT04 ของแบคทีเรีย คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ราออบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ทั้ง 2 ชนิดคือ ATR16 โดยลักษณะโคโลนีของ ATR16 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA มีลักษณะโคโลนีขาว และเมื่อทำการย้อมแกรมพบว่า แบคทีเรียมีสัณฐานแบบกลมรี (Coccobacillus) และเป็นแกรมลบ ดังรูปที่ 4.10 เมื่อทำการระบุชนิดแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของแบคทีเรีย ที่ตำแหน่งยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูล Genbank แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย ATR16 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%identity) ของลำดับเบสที่ 100 เปอร์เซ็นต์ตรงกับแบคทีเรีย คือ *Acinetobacter baumannii* ดังรูปที่ 4.11

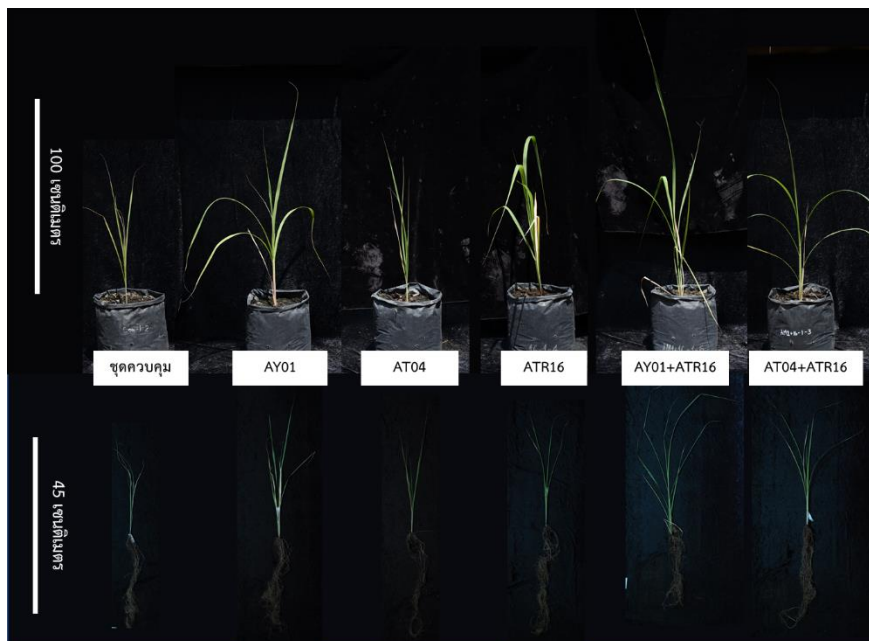


รูปที่ 4.10 ลักษณะสัณฐานลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA ของ ATR16



รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ ตำแหน่ง 16S rDNA ด้วยแบบจำลอง maximum likelihood algorithm แสดงเปอร์เซ็นต์ bootstrap จากการทดสอบ 1000 ครั้ง

#### 4.7 การศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของอ้อย



รูปที่ 4.12 ชุดการทดลองของการศึกษาทดสอบการอยู่ร่วมกันของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน

จากการทดสอบการอยู่ร่วมกันของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 3 เดือนให้ผลดังรูปที่ 4.12, 4.13 และตารางที่ 4.6-4.7 จากการเปรียบเทียบผลต่าง ความสูงอ้อย พบว่าค่าเฉลี่ยความสูงของชุดการทดลองที่ใส่ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรีย ATR16 มีค่าเฉลี่ยความสูงของชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 4.6 แต่ค่าเฉลี่ยความสูงของชุดการทดลองที่มีการใส่เชื้อมีค่าไม่แตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบมวลชีวภาพเหนือดิน (ใบและลำต้น) ของอ้อยในชุดการทดลองที่ใส่ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาหรือแบคทีเรียกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อแสดงดังตารางที่ 4.7 พบว่าค่าเฉลี่ยมวลชีวภาพเหนือดินของชุดการทดลองที่มีการใส่เพียงราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AT04 และแบคทีเรีย ATR16 มีค่าไม่แตกต่างกับชุดการทดลองควบคุม แต่ในชุดการทดลองที่มีการใส่เชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 มีค่าแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ในชุดการทดลองที่ใส่เชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 หรือ AT04 ร่วมกับแบคทีเรีย ATR16 มีค่าเฉลี่ยมวลชีวภาพเหนือดินสูงเกินกว่าชุดการทดลองที่ใส่ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาหรือแบคทีเรียอย่างใดอย่างหนึ่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชุดการทดลองที่ใส่ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 ร่วมกับแบคทีเรีย ATR06 ให้ค่าเฉลี่ยมวลชีวภาพเหนือดินสูงที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยที่  $2.07 \pm 0.49$  กรัม และเป็น 1.23 เท่าของชุดการทดลองที่ใส่แต่ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01



จากตารางที่ 4.7 เมื่อเปรียบเทียบมวลชีวภาพใต้ดิน (ราก) ของอ้อยในชุดการทดลองที่ใส่ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ พบว่ามวลชีวภาพใต้ดินของชุดการทดลองที่มีการใส่ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AT04 และชุดการทดลองที่ใส่ ATR 16 มีค่าไม่เฉลี่ยไม่แตกต่างกับชุดการทดลองควบคุม แต่ค่าเฉลี่ยมวลชีวภาพใต้ดินของชุดการทดลองที่ใส่ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 มีค่าแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และชุดการทดลองที่มีการใส่ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 หรือ AT04 ร่วมกับแบคทีเรีย ATR16 พบว่ามีค่าเฉลี่ยมวลชีวภาพใต้ดินเป็น 2.18, 1.64 เท่าตามลำดับจากเดิม เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ใส่แต่ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 หรือ AT04 เพียงอย่างเดียว โดยชุดการทดลองที่ใส่ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 ร่วมกับแบคทีเรีย ATR06 ให้ค่าเฉลี่ยมวลชีวภาพใต้ดินสูงที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยที่  $4.01 \pm 0.52$  กรัม

จากรูปที่ 4.13 เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากอ้อยของแต่ละชุดการทดลอง พบว่า ชุดการทดลองที่มีการใส่แบคทีเรีย ATR16 มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากอ้อยสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ ในชุดการทดลองที่ใส่ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อที่  $49.20 \pm 2.87$  แต่ในชุดการทดลองที่ใส่ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 ร่วมกับแบคทีเรีย ATR16 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยที่  $69.59 \pm 4.19$  ซึ่งมีค่าเป็น 1.41 เท่าจากเดิม ในชุดการทดลองที่ใส่ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AT01 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากอ้อยเฉลี่ย  $30.52 \pm 2.13$  ซึ่งน้อยกว่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเฉลี่ยของชุดการทดลองที่ใส่ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในชุดการทดลองที่ใส่ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AT04 ร่วมกับแบคทีเรีย ATR16 มีค่าเฉลี่ยสูงขึ้นเป็น  $42.20 \pm 3.80$  %

**ตารางที่ 4.6** ค่าเฉลี่ยความสูงของอ้อยอายุ 3 เดือนในแต่ละชุดการทดลอง

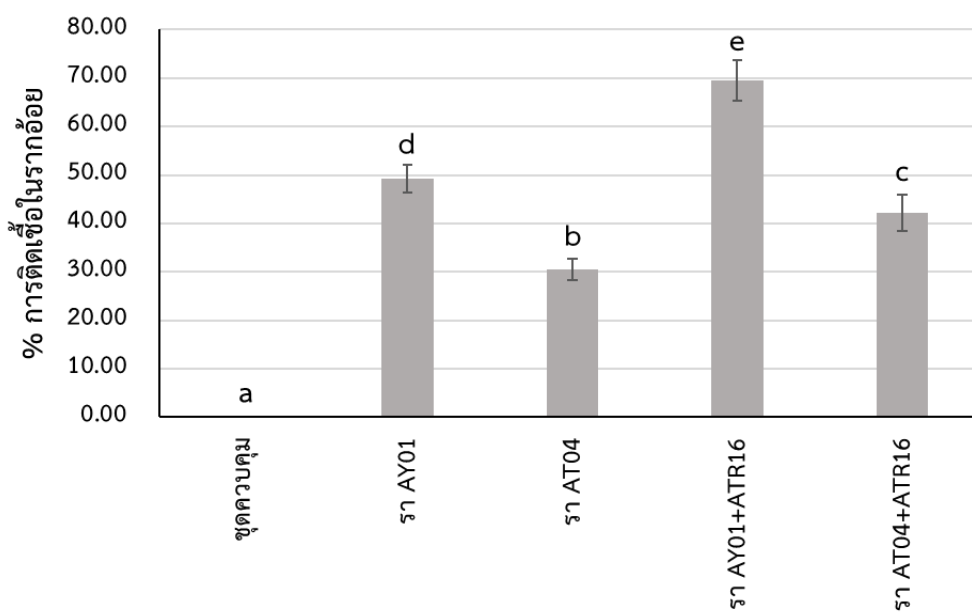
ชุดการทดลอง	ความสูง (เซนติเมตร)
ชุดควบคุม	$10.29 \pm 0.86^a$
รา AY01	$13.60 \pm 0.45^b$
รา AT04	$11.28 \pm 0.70^b$
ATR16	$12.17 \pm 0.86^b$
รา AY01+ATR16	$15.00 \pm 0.87^b$
รา AT04+ATR16	$12.84 \pm 0.97^b$

ค่าเฉลี่ยในแนวสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน ไม่แตกต่างทางสถิติ ทดสอบโดย Dunnett's test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 95%

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยมวลชีวภาพเหนือดินและใต้ดินของอ้อยอายุ 3 เดือนในแต่ละชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง	มวลชีวภาพเหนือดิน (กรัม)	มวลชีวภาพใต้ดิน (กรัม)
ชุดควบคุม	0.87 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.30 <sup>a</sup>
รา AY01	1.68 ± 0.19 <sup>c</sup>	1.84 ± 0.25 <sup>b</sup>
รา AT04	1.11 ± 0.19 <sup>ab</sup>	1.29 ± 0.26 <sup>a</sup>
ATR16	1.08 ± 0.08 <sup>ab</sup>	1.24 ± 0.17 <sup>a</sup>
รา AY01+ATR16	2.07 ± 0.49 <sup>d</sup>	4.01 ± 0.52 <sup>c</sup>
รา AT04+ATR16	1.36 ± 0.45 <sup>b</sup>	2.12 ± 0.57 <sup>b</sup>

ค่าเฉลี่ยในแนวสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน ไม่แตกต่างทางสถิติ ทดสอบโดย Duncan's multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 95%



รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการติดเชื้อราในรากอ้อยอายุ 3 เดือน ในแต่ละชุดการทดลอง

## บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย

ในการแยกและจัดกลุ่มสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินตัวอย่างไร้อ้อยทั้งหมด 5 พื้นที่ ได้แก่ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (AY) จังหวัดอ่างทอง (AT) จังหวัดชลบุรี (CH) จังหวัดนครปฐม (NP) และ จังหวัดกาญจนบุรี (KR) พบสปอร์ของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะสัณฐานที่แตกต่างกัน จำนวน 18 ไอโซเลท โดยพบว่าราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แยกได้มีลักษณะสปอร์แบบ glomoid, gigasporoid และ acaulosporoid โดยลักษณะสปอร์ที่พบมากที่สุดคือลักษณะแบบ glomoid ซึ่งผลการแยกสปอร์มีความสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายของชนิดสปอร์ในพื้นที่ไร้อ้อยในประเทศอินเดีย ที่พบราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะสปอร์แบบ glomoid, acaulosporoid และ gigasporoid ซึ่งจำแนกได้เป็น 4 สกุลได้แก่ *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* และ *Scutellospora* (Suresh. N. and Nelson., 2015) แต่ในการศึกษาพื้นที่ไร้อ้อยของประเทศมอริออคโค กลับพบความหลากหลายของลักษณะสปอร์ที่มากกว่า กล่าวคือสามารถพบลักษณะสปอร์ได้ถึง 5 ลักษณะและสามารถจำแนกราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ถึง 8 สกุล คือ *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Pacispora*, *Scutellospora*, *Ambispora* และ *Rhizophagus* (Selmaoui et al., 2017) ซึ่งความหลากหลายของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ภูมิประเทศ ลักษณะของดิน ความเป็นกรดต่างของดิน และการใช้ปุ๋ยเคมีและสารกำจัดศัตรูพืชในพื้นที่เกษตรกรรม (Gao et al., 2010; Xu et al., 2017) โดยเฉพาะการใช้ปุ๋ยเคมีเป็นระยะเวลาอันส่งผลต่อการอยู่ร่วมกันของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับรากพืช การสร้างสปอร์ รวมถึงชุมชนของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอีกด้วย (Corkidi et al., 2002; Guo et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีพบว่าปุ๋ยฟอสฟอรัสในปริมาณที่สูง สามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและการเข้าอยู่ในรากพืชได้ เนื่องจากราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีบทบาทสำคัญต่อการเป็นแหล่งฟอสฟอรัสให้กับพืช เมื่อมีการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในพื้นที่ จึงทำให้บทบาทของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาลดลงการเข้าอยู่ร่วมกันของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากพืชจึงลดลงด้วยเช่นกัน (Tang et al., 2001) ด้วยเหตุนี้การใช้ปุ๋ยเคมีจึงทำให้ความหลากหลายของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาลดลง

เนื่องจากการเพิ่มจำนวนราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามปกติ จำเป็นต้องทำการเพิ่มจำนวนภายในรากพืช จากผลการเพิ่มจำนวนสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากข้าวฟ่าง (trap culture) มีเพียง 6 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถเพิ่มจำนวนได้คิดเป็น 30 เปอร์เซ็นต์จากสปอร์ที่แยกได้ทั้งหมด ซึ่งเป็นจำนวนที่น้อยเมื่อเทียบกับจำนวนไอโซเลทที่แยกได้เริ่มต้น โดยสาเหตุอาจเนื่องมาจากการใช้สปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีอายุมากเกินไป หรือไม่สมบูรณ์มาใช้ในการเพิ่มจำนวน จึงทำให้มีบางไอโซเลทไม่สามารถเจริญต่อได้ นอกจากนี้ความจำเพาะต่อพืชอาศัยของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซายังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อ

การเพิ่มจำนวนและการเข้าอยู่ของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Bawadekji, 2016) โดยพบว่าสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *Claroideoglomus etunicatum* ที่แยกได้จากดินรอบรากพืชชนิดต่าง ๆ เมื่อนำมาเพิ่มจำนวนในรากข้าวโพดและรากข้าวฟ่าง พบว่า *C. etunicatum* SS1 สามารถเพิ่มจำนวนและมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากข้าวโพดสูงกว่ารากข้าวฟ่าง ในทางกลับกัน *C. etunicatum* SS4 ที่แยกได้จากพืชต่างชนิดกลับเพิ่มจำนวนสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากข้าวฟ่างสูงกว่าการเพิ่มจำนวนราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากข้าวโพด ดังนั้นจะเห็นได้ว่าถึงแม้จะเป็นสปอร์ชนิดเดียวกันแต่ความจำเพาะของราอาบัสคูลาร์มีผลต่อการเพิ่มจำนวนสปอร์ (Gopal et al., 2016) ซึ่งความจำเพาะดังกล่าวอาจเนื่องมาจากสารที่พืชหลั่งจากรากพืช (root exudate) ที่มีความหลากหลายขึ้นและมีหลายปัจจัยส่งผลต่อรูปแบบการหลั่งสารดังกล่าว โดยสารที่หลั่งจากรากพืชทำหน้าที่ในการเป็นติดต่อสื่อสารระหว่างราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา กับรากพืช ทำให้ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสามารถเข้าอยู่ในรากพืชได้ (Nagahashi and Gerald, 2000; Tahat and Sijam, 2012) แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนราอาบัสคูลาร์ในรากพืชเป็นเพียงทางเลือกหนึ่ง ที่นิยมนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา แต่ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการเพิ่มจำนวนสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีวิธีการเพิ่มจำนวนราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่หลากหลายและมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น (Douds et al., 2006) ดังนั้นราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้ในรากข้าวฟ่าง ก็อาจสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้โดยการใช้วิธีการอื่น ๆ ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนต่อไปในอนาคต

สำหรับการศึกษาสัณฐานและการระบุชนิดราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาด้วยเทคนิคอณูวิทยา โดยเปรียบเทียบลำดับเบสของราที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA พบว่ารา AY01 และ AT04 เป็นราในสกุล *Diversispora* ซึ่งราสกุลดังกล่าวมีรายงานก่อนหน้านี้ว่า สามารถแยกได้จากดินรอบรากอ้อยในหลายพื้นที่ (Selmaoui et al., 2017; Ventura et al., 2018) นอกจากนี้ยังสามารถแยกได้ในสกุลดังกล่าวได้จากดินรอบรากพืชหลายชนิดเช่น ถั่วเหลือง ปาล์ม *Asteriscus maritimus* พืชพื้นถิ่นในทะเลทรายอย่าง *Tetraena qatarense* Beier & Thulin, *Prosopis cineraria* (L.) Druce รวมถึงต้นไม้ใหญ่อย่างเช่น *Uniperus communis* L อีกด้วย (Balázs et al., 2014; Estrada et al., 2012; Symanczik et al., 2014)

สำหรับการแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากกลุ่มสปอร์ราที่แยกได้จากดินรอบรากอ้อย สามารถแยกแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ 122 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่มีลักษณะความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting; PGP) ได้ โดยพบความสามารถในการสร้างแอมโมเนียมและการละลายฟอสเฟต ซึ่งเป็นแหล่งธาตุอาหารที่สำคัญต่อพืช โดยมีรายงานการแยกแบคทีเรียจากสปอร์อาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *Glomus intraradices*, *G. mosseae*, *G. caledonium*, *Racocetra alborosea* และ

*Funneliformis mosseae* พบว่าแบคทีเรียหลายไอโซเลทมีความสามารถในการสร้างแอมโมเนีย และการละลายฟอสเฟตได้เช่นเดียวกัน (Bharadwaj et al., 2008; Gopal et al., 2012; Roesti et al., 2005) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าแบคทีเรียที่แยกจากสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในการศึกษาคั้งนี้ยังมีความสามารถในการสร้างกรดกรดซาลิซิลิก ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม siderophore ที่เกี่ยวข้องกับ การป้องกันตัวเองของพืชเมื่อได้รับผลกระทบจากศัตรูพืช รวมไปถึงทำให้พืชสามารถทนในสภาวะไม่ เหมาะสมทำให้พืชสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ในบริเวณที่มีการตกค้างของ โลหะหนักได้อีกด้วย (Islam et al., 2016; Ji et al., 2019; Liu et al., 2008)

เมื่อทำการทดสอบลักษณะความสามารถของ PGP ของแบคทีเรียที่แยกได้ในด้านของ การสร้าง IAA ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องต่อการพัฒนาของรากพืช (Patten and Glick, 2002) และ การสร้าง Exopolysaccharides (EPS) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย พบว่า แบคทีเรียที่แยกได้หลายไอโซเลทมีความสามารถในการสร้างสาร IAA และ EPS ได้ โดยมีรายงานว่า สาร IAA มีผลต่อความสัมพันธ์ของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับพืช กล่าวคือ IAA เป็นปัจจัยสำคัญต่อ การสร้างและพัฒนาของรากแขนง (lateral root) ซึ่งจะเป็นบริเวณที่ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเข้า อาศัย ดังนั้นการที่พืชมีพื้นที่ผิวรากที่มากย่อมทำให้ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสามารถเข้าอยู่ได้มากขึ้น (Battini et al., 2016; Ludwig-Müller and Güther, 2007) โดยพบแบคทีเรียหลายชนิดที่แยกได้ จากสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีความสามารถในสร้าง IAA ได้ เช่น *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* และ *Arthrobacter ilicis* เป็น ต้น (Battini et al., 2016; Bharadwaj et al., 2008) ยิ่งไปกว่านั้นความสามารถในการสร้าง EPS ก็ สามารถส่งเสริมความสัมพันธ์ของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้เช่นเดียวกันกล่าวคือ ไบโอฟิล์มได้จะทำ ให้แบคทีเรียสามารถยึดเกาะกับพื้นที่ผิวของสปอร์ราและเส้นใยราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ (Cruz and Ishii, 2012; Scheublin et al., 2010) ดังนั้นทำให้สารต่าง ๆ ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น สามารถ เข้าถึงรากพืชและโครงสร้างราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ง่าย นอกจากนี้ไบโอฟิล์มยังทำให้พืชทนต่อ สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้นอีกด้วย (Kasim et al., 2016)

จากผลการทดสอบแบคทีเรียที่มีลักษณะของ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะต่อการกระตุ้น การงอกของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 และ AT04 ซึ่งทั้ง 2 เป็นราในสกุล *Diversispora* พบว่ามีเพียงแบคทีเรียไอโซเลท ATR16 เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ได้ ทั้ง 2 ไอโซเลท โดยมีรายงานพบแบคทีเรียที่แยกได้จากสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามี ความสามารถในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา โดยพบแบคทีเรียบางชนิด สามารถย่อยสลายสารโคตินได้ ซึ่งสารโคตินเป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของสปอร์ราอาบัสคู ลาร์ไมคอร์ไรซา ส่งผลทำให้สปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสามารถงอกได้ดีขึ้น (Ames et al., 1989; Selvakumar, Gopal et al., 2016) รวมไปถึงเพิ่มสามารถกระตุ้นการเจริญของเส้นใยและส่งเสริม

การเข้าอยู่ของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากพืชอีกด้วย (Long et al., 2017) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบการรายงานของแบคทีเรียที่สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์รา *Diversispora* sp. ได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นการศึกษาแรกที่พบแบคทีเรียที่สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดนี้

เมื่อทำการระบุชนิดแบคทีเรียด้วยเทคนิคอณูวิทยา โดยเปรียบเทียบลำดับเบสของราที่ตำแหน่งยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรีย ATR16 คือ *Acinetobacter baumannii* โดยแบคทีเรีย ATR16 มีความสามารถในการสร้าง IAA การละลายฟอสเฟต การสร้างสารในกลุ่ม siderophore และสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ ถึงแม้ในการศึกษาครั้งนี้จะพบว่า ATR16 ไม่มีความสามารถในการสร้างแอมโมเนีย แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า *A. baumannii* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ ซึ่งทำให้พืชได้รับแหล่งไนโตรเจนได้เช่นเดียวกันกับการสร้างแอมโมเนีย (Sachdev et al., 2010) แต่เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้สารละลาย Nessler's reagent ที่มีข้อจำกัดในการปฏิกิริยากับแอมโมเนียเท่านั้น จึงทำให้ไม่สามารถตรวจสอบพบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ของ ATR16 ได้ อย่างไรก็ตามก็ไม่สามารถระบุได้ชัดว่า ATR16 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ จำเป็นต้องมีการพิสูจน์ในความสามารถดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตาม ATR16 ก็มีแนวโน้มที่อาจสามารถตรึงไนโตรเจนได้เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้าเนื่องจากเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย *A. baumannii* มีลักษณะความสามารถของ PGP อีกหลายประการซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเช่น การสร้างสาร IAA การละลายฟอสเฟต การสร้างสารในกลุ่ม Siderophore ยิ่งไปกว่านั้น *A. baumannii* ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของศัตรูพืชได้อีกด้วย (Patel et al., 2017; Rokhbakhsh Zamin et al., 2011; Sachdev et al., 2010) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานของแบคทีเรีย *A. baumannii* ต่อการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดอื่น จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าในการศึกษาครั้งนี้ได้พบแบคทีเรียที่สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *Diversispora* sp. ที่ไม่เคยมีการรายงานของแบคทีเรียที่สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์มาก่อน นอกจากนี้แบคทีเรียที่สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *Diversispora* sp. ในการศึกษาครั้งนี้คือ *A. baumannii* ซึ่งยังไม่พบการรายงานความสามารถในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราไมคอร์ไรซาชนิดอื่นด้วยเช่นกัน ถึงแม้ว่ามีรายงานหลายฉบับกล่าวถึง *A. baumannii* เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสที่ก่อโรคกับผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอ (KrzyŚciak et al., 2017; Tunyapanit et al., 2014) แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย ATR16 อาจไม่มีความสามารถในด้านของการก่อโรคได้ เนื่องจากการระบุชนิดครั้งนี้ใช้ตำแหน่งยีน 16S rRNA เพียงบางส่วนเท่านั้น จึงทำให้ระบุชนิดได้แบบกว้าง ๆ ไม่สามารถระบุถึงความสามารถของการก่อโรคได้ นอกจากนี้มีการรายงานว่า *A. baumannii* เป็นแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและนำไปใช้ในพื้นที่จริงเช่นกัน ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าลำดับ

นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย ATR16 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *A. baumannii* ในกลุ่มที่เป็น PGPB ได้แก่ *A. baumannii* FJ816076, *A. baumannii* KF055001 มากกว่าการเป็นแบคทีเรีย *A. baumannii* KX955259 ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาล แต่อย่างไรก็ตามควรมีการตรวจสอบแบคทีเรียที่แยกได้นี้อีกครั้งก่อนนำไปใช้ในพื้นที่ยุติ

จากการศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรีย พบว่าการใส่เชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *Diversispora* sp. AY01 หรือ *Diversispora* sp. AT04 ร่วมกับแบคทีเรีย *A. baumannii* ATR16 ส่งผลทำให้พืชผลต่างความสูง มวลชีวภาพเหนือดินและใต้ดินมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าจนมีค่าเฉลี่ยแตกต่างจากชุดการทดลองที่ใส่ราอับสคูลาร์หรือแบคทีเรียอย่างใดอย่างหนึ่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากอ้อยของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทั้ง *Diversispora* sp. AY01 และ *Diversispora* sp. AT04 ที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเฉลี่ยสูงขึ้นเมื่อใส่ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ร่วมกับแบคทีเรีย ATR16 จนแตกต่างกับชุดการทดลองที่ใส่เพียงราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาหรือแบคทีเรีย อย่างใดอย่างหนึ่ง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *A. baumannii* ATR16 มีความสามารถในการส่งเสริมความสัมพันธ์แบบอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา จากการศึกษาก่อนหน้าที่รายงานเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียที่ส่งเสริมความสัมพันธ์แบบอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาพบว่า แบคทีเรียหลายชนิดสามารถส่งเสริมความสัมพันธ์แบบอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะมีบทบาทต่อการเพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืชทำให้การแลกเปลี่ยนสารอาหารระหว่างพืชและราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีมากขึ้น ส่งผลทำให้พืชมีการเจริญเติบโตสูงขึ้นตามไปด้วย (Bharadwaj et al., 2008; Gopal et al., 2012; Selvakumar, Gopal et al., 2017)

ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ร่วมกับแบคทีเรียสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ้อยได้ โดยแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและเพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากอ้อย อันแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีคุณสมบัติที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา ซึ่งจะเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อพัฒนาหัวเชื้อเพื่อใช้ในพื้นที่เกษตรกรรมต่อไปในอนาคต



2075474675

CU-Thesis 5872017723 thesis / rev: 18072562 18:36:11 / seq: 57

## บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง

จากการแยกสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินของแปลงไร้อ้อยทั้งหมด 5 พื้นที่ ได้แก่ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (AY) จังหวัดอ่างทอง (AT) จังหวัดชลบุรี (CH) จังหวัดนครปฐม (NP) และ จังหวัดกาญจนบุรี (KR) พบสปอร์ของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะต่าง ๆ กัน จำนวน 18 ไอโซเลท โดยสามารถจัดกลุ่มแยกตามลักษณะสปอร์และแหล่งที่มาได้จำนวน 6 กลุ่ม ซึ่ง ลักษณะสปอร์ที่พบได้แก่ glomoid, gigasporoid และ acaulosporoid

จากการเพิ่มปริมาณของกลุ่มสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจำนวน 6 กลุ่ม ในรากของต้น ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) เป็นเวลา 3 เดือนพบว่ามีเพียง 6 ไอโซเลทได้แก่ AY01, AY05, AT01, AT04, NP01 และ NP03 เท่านั้นที่สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้ จากนั้นนำสปอร์ดังกล่าวมา เพิ่มจำนวนในรากข้าวฟ่างอีกครั้งโดยใส่สปอร์ 1 สปอร์ต่อต้นข้าวฟ่าง 1 ต้น ปลูกข้าวฟ่างเป็นเวลา 3 เดือน เมื่อตรวจสอบพบว่าราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 และ AT04 ที่มีจำนวนสปอร์และ เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อสูงที่สุด 2 อันดับแรก เมื่อนำราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทั้ง 2 ไอโซเลท ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระบุชนิดด้วยเทคนิคอณูวิทยาที่ตำแหน่งยีน 18S rRNA พบว่า ราอาบัสคูลาร์ทั้ง 2 คือ *Diversispora* sp.

ในการแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับสปอร์ของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากกลุ่มสปอร์ ราทั้ง 6 กลุ่ม แต่ละกลุ่มสามารถแยกแบคทีเรียที่มีสัณฐานวิทยาแตกต่างกันได้ทั้งหมด 122 ไอโซเลท ทำการตรวจสอบคุณลักษณะความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting; PGP) จำนวน 5 ลักษณะได้แก่ การสร้างแอมโมเนียม ความสามารถในการสร้าง IAA ความสามารถในการละลายฟอสเฟต การสร้างสารในกลุ่ม siderophore และการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่ามีแบคทีเรียที่มีลักษณะของ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะมีจำนวน 20 ไอโซเลท

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการงอกของ ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AY01 และ AT04 พบว่ามีเพียง ATR16 เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการงอก ของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทั้ง 2 ไอโซเลทได้และเมื่อทำการระบุชนิดด้วยเทคนิคอณูวิทยา สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้เป็น *A. Baumannii* ATR16

จากการศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรีย พบว่า การใส่เชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *Diversispora* sp. AY01 หรือ *Diversispora* sp. AT04 ร่วมกับ แบคทีเรีย *A. baumannii* ATR16 ส่งผลทำให้พืชผลต่างความสูง มวลชีวภาพเหนือดินและใต้ดินมี ค่าเฉลี่ยสูงกว่าจนมีค่าเฉลี่ยแตกต่างจากชุดการทดลองควบคุมและชุดการทดลองที่ใส่ราอาบัสคูลาร์- ไมคอร์ไรซาหรือแบคทีเรียอย่างใดอย่างหนึ่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์



การติดเชื้อของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากอ้อยสูงขึ้นเมื่อมีการใส่แบคทีเรีย *A. baumannii* ATR16 ร่วมด้วย

ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาร่วมกับแบคทีเรียสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ้อยได้ โดยแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและเพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากอ้อย อันแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีคุณสมบัติที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา ซึ่งจะเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อพัฒนาหัวเชื้อเพื่อใช้ในพื้นที่เกษตรกรรมต่อไปในอนาคต



2075474675

CU Thesisis 5872017723 thesis / recv: 18072562 18:36:11 / seq: 57

## บรรณานุกรม

### ภาษาไทย

- โรจน์ลักษณะ ปรีชา., มนัสชัย จิงตระกูล., คมสันต์ ศรีคงเพชร., and วัชรพงศ์ รัชตเวชกุล. 2560. ก้าวสู่  
บริบทใหม่ของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลไทย. [online]. 2562. Available from:  
[https://www.bot.or.th/Thai/MonetaryPolicy/NorthEastern/DocLib\\_Research/03\\_P  
aper\\_SugarcaneIndust.pdf](https://www.bot.or.th/Thai/MonetaryPolicy/NorthEastern/DocLib_Research/03_Paper_SugarcaneIndust.pdf)
- คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา. 2004. พืชเศรษฐกิจ กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.  
ธงชัย มาลา. 2546. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ : เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. กรุงเทพฯ:  
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประสิทธิ์ ใจคิด. 2557. โครงการจัดทำต้นทุนผลผลิตและถ่ายทอดความรู้ เพื่อลดต้นทุนการผลิตอ้อย  
ของเกษตรกร ในปีเพาะปลูก 2557/58. มหาวิทยาลัยขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- มูลนิธิสายใยแผ่นดิน. 2019. ภาพรวมสถานการณ์เกษตรอินทรีย์ไทย 2559. [online]. 2019.  
Available from: <http://www.greenet.or.th/article/411>
- วาริรัตน์ เพชรสีช่วง. 2559. แนวโน้มธุรกิจ/อุตสาหกรรม ปี 2559-61: อุตสาหกรรมน้ำตาล. [online].  
2562. Available from: [https://www.krungsri.com/bank/getmedia/e246cd57-  
4e3d-42a0-9443-47eef86b192a/IO\\_Sugar\\_2016\\_TH.aspx](https://www.krungsri.com/bank/getmedia/e246cd57-4e3d-42a0-9443-47eef86b192a/IO_Sugar_2016_TH.aspx)
- ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น. 2019. พัฒนาอ้อยพันธุ์สะอาดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.  
[online]. 2019. Available from: [http://www.doa.go.th/pibai/pibai/n18/v\\_1-  
feb/korkui.html](http://www.doa.go.th/pibai/pibai/n18/v_1-feb/korkui.html)

### ภาษาอังกฤษ

- Abdel-Fattah, G. M. and Mohamedin, A. H. 2000. Interactions between a vesicular-  
arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) and *Streptomyces*  
*coelicolor* and their effects on sorghum plants grown in soil amended with  
chitin of brawn scales. *Biology and Fertility of Soils*, 32(5), 401-409.
- Ahemad, M. and Khan, M. S. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* strain PS1 enhances  
growth parameters of greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] in insecticide-  
stressed soils. *Journal of Pest Science*, 84(1), 123-131.
- Ahemad, M. and Khan, M. S. 2012. Evaluation of plant-growth-promoting activities of

- rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide stress. *Annals of Microbiology*, 62(4), 1531-1540.
- Ali, B., Sabri, A. N., and Hasnain, S. 2010. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(8), 1379-1384.
- Ames, R., Mihara, K., and Bayne, H. 1989. Chitin-decomposing actinomycetes associated with a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus from a calcareous soil. *New Phytologist*, 111(1), 67-71.
- Bagyaraj, D. J. and Sreeramulu, K. R. 1982. Preinoculation with VA mycorrhiza improves growth and yield of chilli transplanted in the field and saves phosphatic fertilizer. *Plant and Soil*, 69(3), 375-381.
- Balázs, T. K. Błaszowski, J. Chwat, G. Góralaska, A. Gáspár, B. K. Lukács, A. F., et al. 2014. Spore-based study of arbuscular mycorrhizal fungi of semiarid sandy areas in Hungary, with *Diversispora jakucsiae* sp. nov. *Mycological Progress*, 14(1), 1-11.
- Barea, J.-M., Pozo, M. J., Azcón, R., and Azcón-Aguilar, C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761-1778.
- Bashan, Y., Kamnev, A. A., and de-Bashan, L. E. 2013a. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*, 49(1), 1-2.
- Bashan, Y., Kamnev, A. A., and de-Bashan, L. E. 2013b. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils*, 49(4), 465-479.
- Battini, F., Cristani, C., Giovannetti, M., and Agnolucci, M. 2016. Multifunctionality and diversity of culturable bacterial communities strictly associated with spores of the plant beneficial symbiont *Rhizophagus intraradices*. *Microbiological Research*, 183, 68-79.
- Baum, C., El-Tohamy, W., and Gruda, N. 2015. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Scientia Horticulturae*, 187, 131-141.

- Bawadekji, A. 2016. New Hosts for Large Scale Inoculum Production of Arbuscular Mycorrhizal Fungi from Saudi Soils. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 6, 111-115.
- Belimov, A. A.Hontzeas, N.Safronova, V. I.Demchinskaya, S. V.Piluzza, G.Bullitta, S., et al. 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology & Biochemistry*, 37(2), 241-250.
- Besserer, A.Puech-Pages, V.Kiefer, P.Gomez-Roldan, V.Jauneau, A.Roy, S., et al. 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol*, 4(7), 1239-1247.
- Bharadwaj, D. P., Lundquist, P.-O., and Alström, S. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungal spore-associated bacteria affect mycorrhizal colonization, plant growth and potato pathogens. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(10), 2494-2501.
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., and Noller, H. F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 148(2), 107-127.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., and Malajczuk, N. 1996. *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*.
- Cappuccino, J. G. and Sherman, N. 1996. *Microbiology: a laboratory manual*.
- Chandini, Kumar, R., Kumar, R., and Prakash, O. 2019. The Impact of Chemical Fertilizers on our Environment and Ecosystem. Inpp. 69-86.
- Chitarra, W.Pagliarani, C.Maserti, B.Lumini, E.Siciliano, I.Cascone, P., et al. 2016. Insights on the Impact of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis on Tomato Tolerance to Water Stress. *Plant Physiology*, 171(2), 1009-1023.
- Churchland, C. and Grayston, S. J. 2014. Specificity of plant-microbe interactions in the tree mycorrhizosphere biome and consequences for soil C cycling. *Frontiers in Microbiology*, 5(261), 1-20.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., and Comi, G. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5113-5121.

- Corkidi, L., Rowland, D. L., Johnson, N. C., and Allen, E. B. 2002. Nitrogen fertilization alters the functioning of arbuscular mycorrhizas at two semiarid grasslands. *Plant and Soil*, 240(2), 299-310.
- Cruz, A. F. and Ishii, T. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungal spores host bacteria that affect nutrient biodynamics and biocontrol of soil-borne plant pathogens. *Biology Open*, 1(1), 52-57.
- Dalpé, Y. 2005. *Mycorrhizae: A potential tool for plant protection but not a panacea*.
- Douds, D. D., Nagahashi, G., Pfeffer, P. E., Reider, C., and Kayser, W. M. 2006. On-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite. *Bioresource Technology*, 97(6), 809-818.
- Douds Jr, D. D., Lee, J., Rogers, L., E. Lohman, M., Pinzon, N., and Ganser, S. 2012. Utilization of inoculum of AM fungi produced on-farm for the production of *Capsicum annuum*: A summary of seven years of field trials on a conventional vegetable farm. 28, 129-145.
- Estrada, B., Palenzuela, J., Barea, J.-M., Manuel Ruiz-Lozano, J., Alves da Silva, G., and Oehl, F. 2012. *Diversispora clara* (Glomeromycetes); a new species from saline dunes in the Natural Park Cabo de Gata (Spain). *Mycotaxon*, 118(1), 73-81.
- Feng, G., Zhang, F., Li, X., Tian, C., Tang, C., and Rengel, Z. 2002. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza*, 12(4), 185-190.
- Foster, R. C. and Marks, G. C. 1966. *The Fine Structure of the Mycorrhizas of Pinus Radiata D. Don*.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J., and Tarkka, M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176(1), 22-36.
- Gao, J., Ellis, L. B., and Wackett, L. P. 2010. The University of Minnesota biocatalysis/biodegradation database: improving public access. *Nucleic Acids Res*, 38, 1-4.
- Gaur, A., Adholeya, A., and Mukerji, K. G. 2000. On-farm production of VAM inoculum and vegetable crops in marginal soil amended with organic matter. 77, 21-26.
- Glick, B. 1995. *The Enhancement of Plant Growth by Free-Living Bacteria*.

- Gopal, S., Kim, K., Walitang, D., Chanratana, M., Kang, Y., Chung, B., et al. 2016. Trap Culture Technique for Propagation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi using Different Host Plants. *49*, 608-613.
- Gopal, S., Murugesan, C., Shagol, C., Kim, K., and Sa, T. 2012. Spore Associated Bacteria (SAB) of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Increase Nutrient Uptake and Plant Growth Under Stress Conditions. *korean journal of soil science and fertilizer*, *45*, 582-592.
- Govindarajulu, M.E., Pfeffer, P., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D., Allen, J., et al. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, *435*, 819-823.
- Gobelak, A., Napora, A., and Kacprzak, M. 2015. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, *84*, 22-28.
- Guo, J., Luo, P., Han, X., Yang, J., and Li, D. 2018. *Influence of Long-term Fertilization on AM Fungi Community Structures in a Brown Soil*.
- Heinrich, W. S., Konrad, M., Günter, K., and Karl, S. 2012. Fertilizers, 1. General. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,.
- Indiragandhi, P., Anandham, R., Madhaiyan, M., and Sa, T. M. 2008. Characterization of Plant Growth-Promoting Traits of Bacteria Isolated from Larval Guts of Diamondback Moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Current Microbiology*, *56*(4), 327-333.
- INVAM. 2017a. *Acaulospora capsicula* (reference accession NC177). [online]. 2019. Available from: <http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/acaulosporaceae/acaulospora/colossica.html>
- INVAM. 2017b. *Entrophospora infrequens* (reference accession AZ237). [online]. 2019. Available from: <http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/acaulosporaceae/entrophospora/infrequens.html>
- INVAM. 2017c. *Gigaspora decipiens* (reference accession AU102). [online]. 2019. Available from: <http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/gigasporaceae/gigaspora/decipiens.html>
- INVAM. 2017d. *GLOMERACEAE Piroz. & Dalpé emend C. Walker & Schüßler*. [online]. 2019. Available from: <http://fungi.invam.wvu.edu/the->

fungi/classification/glomaceae.html

- INVAM. 2017e. *Glomus clavisporum* (Voucher specimens). [online]. 2019. Available from: <http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/glomus/clavisporum.html>
- Islam, F.Yasmeen, T.Arif, M.Riaz, M.Shahzad, S.Imran, Q., et al. 2016. Combined ability of chromium (Cr) tolerant plant growth promoting bacteria (PGPB) and salicylic acid (SA) in attenuation of chromium stress in maize plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 456-467.
- James, G. 2004. *Sugarcane*. Second Edition. Blackwell Science Ltd: Blackwell Publishing Company, USA.
- Ji, S.-H.Kim, J.-S.Lee, C.-H.Seo, H.-S.Chun, S.-C.Oh, J., et al. 2019. Enhancement of vitality and activity of a plant growth-promoting bacteria (PGPB) by atmospheric pressure non-thermal plasma. *Scientific reports*, 9(1), 1044.
- Kaonongbua, W., Morton, J. B., and Bever, J. D. 2010. Taxonomic revision transferring species in *Kuklospora* to *Acaulospora* (Glomeromycota) and a description of *Acaulospora colliculosa* sp. nov. from field collected spores. *Mycologia*, 102(6), 1497-1509.
- Kasim, W. A., Gaafar, R. M., Abou-Ali, R. M., Omar, M. N., and Hewait, H. M. 2016. Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(2), 217-227.
- Khan, A. G. 1974. The Occurrence of Mycorrhizas in Halophytes, Hydrophytes and Xerophytes, and of Endogone Spores in Adjacent Soils. *Microbiology-sgm*, 81, 7-14.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
- KrzyŚciak, P., Chmielarczyk, A., Pobiega, M., Romaniszyn, D., and Wójkowska-Mach, J. 2017. *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired infection: biofilm production and drug susceptibility. *APMIS*, 125(11), 1017-1026.
- Kumar, A., Sharma, S., and Mishra, S. 2010. Influence of Arbuscular Mycorrhizal (AM)

- Fungi and Salinity on Seedling Growth, Solute Accumulation, and Mycorrhizal Dependency of *Jatropha curcas* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29(3), 297-306.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Lekberg, Y., Gibbons, S. M., Rosendahl, S., and Ramsey, P. W. 2013. Severe plant invasions can increase mycorrhizal fungal abundance and diversity. *The ISME journal*, 7(7), 1424-1433.
- Lenoir, I., Fontaine, J., and Lounès-Hadj Sahraoui, A. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry*, 123, 4-15.
- Liu, D., Zou, J., Wang, M., and Jiang, W. 2008. Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in *Amaranthus viridis* L. *Bioresource Technology*, 99(7), 2628-2636.
- Long, L., Lin, Q., Yao, Q., and Zhu, H. 2017. Population and function analysis of cultivable bacteria associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *3 Biotech*, 7(1), 8-8.
- Ludwig-Müller, J. and Güther, M. 2007. Auxins as Signals in Arbuscular Mycorrhiza Formation. *Plant Signaling & Behavior*, 2(3), 194-196.
- Mandal, D., Kumar, V., Rao, Y., Bhattacharya, A., and Ramana, K. V. 2019. *Experimental Field Campaigns at Vijayawada Test Site*.
- Meyer, J. R. and Linderman, R. 1986. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 18(2), 185-190.
- Morton, J., P. Bentivenga, S., and D. Bever, J. 2011. Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Canadian Journal of Botany*, 73, 25-32.
- Mosse, B. 1962. The Establishment of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza under Aseptic Conditions. *Journal of general microbiology*, 27, 509-520.
- Nagahashi and Gerald. 2000. In Vitro and in Situ Techniques to Examine the Role of



- Roots and Root Exudates During AM Fungus-Host Interactions. Inpp. 287-305.
- Nagahashi, G. and D. J. Douds, D. 2008. Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytologist*, 136, 299-304.
- Naseem, H. and Bano, A. 2014. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 689-701.
- Navazio, L., Moscatiello, R., Genre, A., Novero, M., Baldan, B., Bonfante, P., et al. 2007. A Diffusible Signal from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicits a Transient Cytosolic Calcium Elevation in Host Plant Cells. *Plant Physiology*, 144(2), 673-681.
- Office of Agricultural Economics. 2017. *Export*. [online]. 2017. Available from: [http://www.oae.go.th/oae\\_report/export\\_import/export.php](http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php) [2017, December]
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., and Babalola, O. O. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 1-16.
- Parida, A., Das, A., and Das, P. 2002. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove. *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *Journal of Plant Biology*, 170, 28-36.
- Parniske, M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 763-775.
- Patel, P., Shah, R., and Modi, K. 2017. Isolation and characterization of plant growth promoting potential of *Acinetobacter* sp. RSC7 isolated from *Saccharum officinarum* cultivar Co 671. 5, 483-491.
- Patten, C. L. and Glick, B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795-3801.
- Paula, M., Urquiaga, S., Siqueira, J., and Döbereiner, J. 1992. Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Biology and Fertility of Soils*, 14(1), 61-66.
- Pentón, G., Reynaldo, I. M., Martín, G. J., Rivera, R. H., and Oropesa, K. 2011. Using

- EcoMic® Pectimorf® bioactive product and the establishment of two forage species. *Pastures Forages*, 34(281), 281-294.
- Porcel, R., Aroca, R., and Ruiz-Lozano, J. M. 2012. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 181-200.
- Redecker, D., Hijri, I., and Wiemken, A. 2003. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: Perspectives and problems. 38, 113-124.
- Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S. L., Morton, J. B., and Walker, C. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*, 23(7), 515-531.
- Roesti, D., Ineichen, K., Braissant, O., Redecker, D., Wiemken, A., and Aragno, M. 2005. Bacteria associated with spores of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6673.
- Rokhbakhsh Zamin, F.Sachdev, D.Kazemi-Pour, N.Engineer, A.Zinjarde, S.Dhakephalkar, P., et al. 2011. Characterization of plant growth promoting traits of Acinetobacter species isolated from rhizosphere of Pennisetum glaucum. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 556-566.
- Sachdev, D., Nema, P., Dhakephalkar, P., Zinjarde, S., and Chopade, B. 2010. Assessment of 16S rRNA gene-based phylogenetic diversity and promising plant growth-promoting traits of Acinetobacter community from the rhizosphere of wheat. *Microbiological Research*, 165(8), 627-638.
- Sanni, K. and O. O, A. 2015. Influence of Goat and Pig Manure on Growth and Yield Potential of Okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) in Ikorodu Agro-Ecological Zone of Nigeria. 7, 1-6.
- Scheublin, T. R., Sanders, I. R., Keel, C., and van der Meer, J. R. 2010. Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi. *The ISME journal*, 4, 752.
- Schüßler, A. and Walker, C. 2010. *The Glomeromycota: a species list with new families*. [online]. 2019. Available from: <http://www.amf-phylogeny.com/>

- Schüßler, A., Schwarzott, D., and Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution *105*, 1413-1421.
- Selmaoui, K., Artib, M., Semane, F., El Gabardi, S., Naoual, H., El Aymani, I., et al. 2017. DIVERSITY OF ENDOMYCORRHIZAL FUNGI (A.M.F.) IN THE RHIZOSPHERE OF SUGAR CANE (*SACCHARUM OFFICINARUM*) GROWN IN MOROCCO. *8*, 15753-15761.
- Selvakumar, G., Kim, K., Shagol, C. C., Joe, M. M., and Sa, T. 2017. Spore associated bacteria of arbuscular mycorrhizal fungi improve maize tolerance to salinity by reducing ethylene stress level. *Plant Growth Regulation*, *81*(1), 159-165.
- Selvakumar, G., Krishnamoorthy, R., Kim, K., and Sa, T.-M. 2016. Genetic diversity and association characters of bacteria isolated from arbuscular mycorrhizal fungal spore walls. *PLoS One*, *11*(8), e0160356.
- Selvakumar, G., Mohan, M., Kundu, S., Gupta, A., D. Joshi, P., Nazim, S., et al. 2008. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). *Letters in applied microbiology*, *46*, 171-175.
- Sharifi, M., Ghorbanli, M., and Ebrahimzadeh, H. 2007. Improved growth of salinity-stressed soybean after inoculation with salt pre-treated mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology*, *164*, 1144-1151.
- Shen, X., Hu, H., Peng, H., Wang, W., and Zhang, X. 2013. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics*, *14*(1), 271.
- Smith, S. E., Facelli, E., Pope, S., and Andrew Smith, F. 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*, *326*(1), 3-20.
- Smith, S. E. and Read, D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd edition London: Academic Press.
- Souza, T. 2015. Glomeromycota Classification. In *Handbook of Arbuscular Mycorrhizal Fungi* pp. 87-128. Cham: Springer International Publishing.
- Sowiński, P., Rudzińska-Langwald, A., Adamczyk, J., Kubica, I., and Fronk, J. 2005.

- Recovery of maize seedling growth, development and photosynthetic efficiency after initial growth at low temperature. *Journal of Plant Physiology*, 162(1), 67-80.
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., et al. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028-1046.
- Sreeramulu, K. R. and Bagyaraj, D. J. 1986. Field response of chilli to VA mycorrhiza on black clayey soil. *Plant and Soil*, 93(2), 299-302.
- Srinath, J., Bagyaraj, D. J., and Satyanarayana, B. N. 2003. Enhanced growth and nutrition of micropropagated *Ficus benjamina* to *Glomus mosseae* co-inoculated with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus coagulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(1), 69-72.
- Stürmer, S. and B. Morton, J. 1999. Taxonomic Reinterpretation of Morphological Characters in Acaulosporaceae Based on Developmental Patterns. *Mycologia*, 91, 849-857.
- Surendran, U. and Vani, D. 2013. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi in sugarcane productivity under semiarid tropical agro ecosystem in India. 7, 269-278.
- Suresh. N. and Nelson., R. 2015. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in the rhizosphere of sugarcane *European Journal of Experimental Biology*, 5, 13-19.
- Symanczik, S., Błaszowski, J., Chwat, G., Boller, T., Wiemken, A., and Al-Yahya'ei, M. N. 2014. Three new species of arbuscular mycorrhizal fungi discovered at one location in a desert of Oman: *Diversispora omaniana*, *Septoglomus nakheelum* and *Rhizophagus arabicus*. *Mycologia*, 106(2), 243-259.
- Tahat, M. and Sijam, K. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant root exudates bio-communications in the rhizosphere. *African journal of microbiology research*, 6, 7295-7299.
- Tang, F., White, J., and Charvat, I. 2001. *The Effect of Phosphorus Availability on Arbuscular Mycorrhizal Colonization of Typha angustifolia*.
- Tanwar, D. A., Aggarwal, A., Kadian, N., and Gupta, A. 2013. Arbuscular mycorrhizal inoculation and super phosphate application influence plant growth and yield

- of *Capsicum annuum*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13, 55-66.
- Tarkka, M. T. and Frey-Klett, P. 2008. Mycorrhiza Helper Bacteria. In A. Varma (Ed.), *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics* pp. 113-132. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Thakuria, D., Talukdar, N. C. t., Goswami, C., Hazarika, S., Boro, R., and Khan, M. 2004. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. 86, 978-985.
- Tunyapanit, W., Pruekprasert, P., Laoprasopwattana, K., and Chelae, S. 2014. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital patients. *ScienceAsia*, 40, 28-34.
- Upadhyay, S., Singh, J., and Singh, D. 2011. Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere*, 21(2), 214-222.
- Velivelli, S., Sessitsch, A., and Doyle, B. 2014. The Role of Microbial Inoculants in Integrated Crop Management Systems. *Potato Research*, 57, 291-309.
- Ventura, M., Moura, J., Souza, R., Vieira Junior, W., Cesar Vieira Rocha, E., and Cesar Silva, J. 2018. *INFLUENCE OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN THE ESTABLISHMENT OF PRE-BROKEN SUGAR CANE*.
- Verma, A., Kukreja, K., Pathak, D., Suneja, S., and Narula, N. 2001. In vitro production of plant growth regulators (PGRs) by *Azotobacter chroococcum*. *Indian Journal of Microbiology*, 41, 305-307.
- Walker, C. and Vestberg, M. 1998. Synonymy Amongst the Arbuscular Mycorrhizal Fungi: *Glomus claroideum*, *G. maculosum*, *G. multisubstenum* and *G. fistulosum*. *Annals of Botany*, 82(5), 601-624.
- Wani, P. A. and Khan, M. S. 2010. *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3262-3267.
- Wertheim, F., Douds, D., Handley, D., and Hutton, M. 2014. Evaluating the potential of arbuscular mycorrhizal fungi to boost yields in field-grown leeks. *Journal of the NACAA*, 7.
- Whitelaw, M. A. 1999. Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-

- Solubilizing Fungi. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* pp. 99-151. Academic Press.
- Wu, C. G., Liu, Y. S., Huang, Y. L., Wang, Y. P., and C. C., C. 1995. Glomales of Taiwan V. *Glomus chimonobambusae* and *Entrophospora kentinensis*, spp. nov. *Mycotaxon*, 53, 283-294.
- Xavier, L. J. C. and Germida, J. J. 2003. Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(3), 471-478.
- Xu, X.Chen, C.Zhang, Z.Sun, Z.Chen, Y.Jiang, J., et al. 2017. The influence of environmental factors on communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Chenopodium ambrosioides* revealed by MiSeq sequencing investigation. *Scientific reports*, 7, 45134-45134.
- Zhang, Q.-C.Shamsi, I. H.Xu, D.-T.Wang, G.-H.Lin, X.-Y.Jilani, G., et al. 2012. Chemical fertilizer and organic manure inputs in soil exhibit a vice versa pattern of microbial community structure. *Applied Soil Ecology*, 57, 1-8.

#### Uncategorized References

- Sumana, D. A., Bagyaraj, D. J., and Arpana, J. 2003. Interaction between *Glomus mosseae*, *Azotobacter chroococcum* and *Bacillus coagulans* and their influence on growth and nutrition of neem. *Journal of Soil Biologu and Ecology*, 23, 80-86.

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ภัทรารวรรณ ธีรัมย์พร
วัน เดือน ปี เกิด	27 เมษายน 2536
สถานที่เกิด	พระนครศรีอยุธยา
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
ที่อยู่ปัจจุบัน	72 ถนนเทศบาล10 ตำบลตลาดหลวง อำเภอเมือง จังหวัดอ่างทอง 14000
ผลงานตีพิมพ์	ภัทรารวรรณ ธีรัมย์พร, อลิสา วังใน และจิตรตรา เพ็ญภูเขียว. 2562. การคัดเลือกแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับสปอร์ของราออบัสคูลาไมคอร์ไรซาซึ่งมีความสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช. ใน การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 15; วันที่ 6-7 ธันวาคม 2561; มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน. 2031-2040.



2075474675

CD IThesis 5872017723 thesis / recv: 18072562 18:36:11 / seq: 57

## ภาคผนวก



2075474675

CU Theses 5872017723 thesis / recv: 18072562 18:36:11 / seq: 57



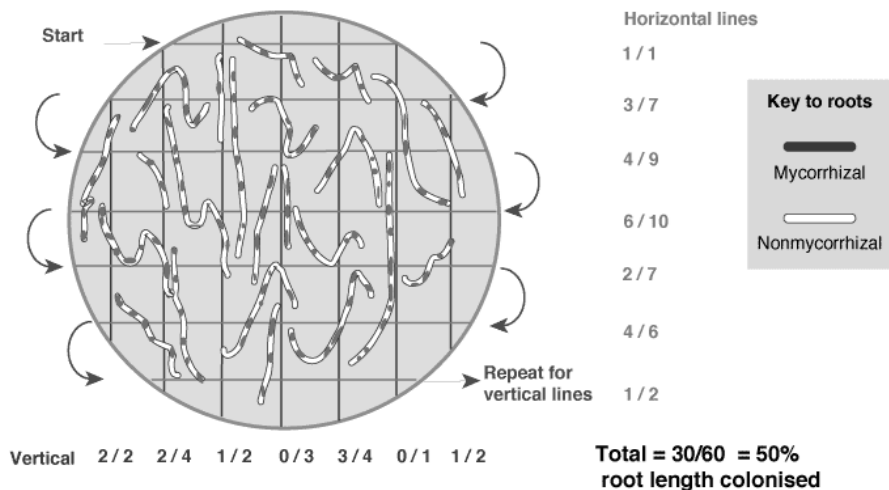
## ภาคผนวก ก

### ขั้นตอนการทดลอง

#### 1. การย้อมสีรากและวิธีการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซาในรากพืช (%root colonization)

นำรากพืชตัวอย่างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นตัดรากให้มีขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (มวลโดยปริมาตร) และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการล้างรากด้วยน้ำสะอาด แช่วรากลงในสารละลายไฮดรเจนคลอไรด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) เป็นเวลา 5 นาที เติมสีย้อม trypan blue (ภาคผนวก ข) ล้างสีส่วนเกินด้วยสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) นำรากที่ได้ทดลองบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการขีดตารางขนาด 1 เซนติเมตรต่อ 1 เซนติเมตร ตรวจสอบตามดั่งรูปที่ 42 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืช} = \frac{\text{จำนวนจุดที่รากที่มีการเข้าอยู่ของราออบัสคูลารีไมคอร์ไรซา ทั่วเส้นตาราง}}{\text{จำนวนจุดที่รากทั้งหมดทั่วเส้นตาราง}}$$



รูปที่ ก.1 วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืชบนตารางขนาด 1 เซนติเมตรต่อ 1 เซนติเมตร ภายใต้กล้องสเตอริโอ

## 2. การเตรียมและล้างเซลล์แบคทีเรียเพื่อเป็นหัวเชื้อเพื่อใช้ในการทดลองต่าง ๆ

ตะกอกโคลนเดี่ยวของแบคทีียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB นำไปปั่นบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ชำระคืน จากนั้นดูดสารแขวนลอยแบคทีเรีย ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ดูดสารละลายแขวนลอยแบคทีเรียใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (โดยมวลต่อปริมาตร) เป็นจำนวน 2 รอบ จากนั้นปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรียด้วยน้ำเกลือ ให้สารแขวนลอยแบคทีเรียมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรที่ 0.8 ( $OD_{600}=0.8$ ) เพื่อทำเป็นหัวเชื้อเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

## 3. การบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 3 เดือน

การบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 3 เดือน ซึ่งเก็บข้อมูลได้แก่ ความสูง มวลชีวภาพเหนือดินและใต้ดิน โดยทำการแยกดินและรากภายในถุงเพาะชำอ้อยอายุ 3 เดือน โดยระมัดระวังไม่ให้รากขาด ล้างรากด้วยน้ำประปา จนมั่นใจว่าไม่มีเศษดินหลงเหลืออยู่ จากนั้นทำการวัดความสูงของต้นอ้อยจากโคนต้นจนถึงข้อปล้องที่สูงที่สุดของลำต้น บันทึกผลการทดลอง จากนั้นตัดส่วนโคนของลำต้นเพื่อแยกส่วนลำต้นและรากออกเป็น 2 ส่วนด้วยกรรไกร และนำทั้ง 2 ส่วนแยกใส่ถุงกระดาษ นำถุงกระดาษดังกล่าวอบแห้งในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำถุงกระดาษที่ผ่านการอบใส่ลงในกล่องสุญญากาศที่มีการบรรจุซิลิกาเจลเพื่อดูดความชื้นภายในกล่องทันทีหลังจากนำออกจากตู้อบเป็นเวลา 5-6 ชั่วโมงหรือจนกว่าอุณหภูมิของถุงกระดาษลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการชั่งน้ำหนัก บันทึกผลและนำถุงกระดาษกลับไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสอีกครั้ง ทำซ้ำแบบเดิมจนกว่าน้ำหนักที่บันทึกได้มีค่าคงที่

## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสารเคมีที่เกี่ยวข้อง

#### 1. สีย้อม Tryphan blue

Tryphan blue	0.05	กรัม
สารละลาย lactoglycerol	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร		

#### 2. สารละลาย Lactoglycerol

กรดแลคติก	100	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร		

#### 3. สารละลาย Polyvinyl alcohol-lactic acid-glycerol (PVLG)

Polyvinyl alcohol	8.33	กรัม
กรดแลคติก	50	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	5	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร		

#### 4. สารละลาย Melzer's reagent

Chloral hydrate	100	กรัม
Iodine	1.5	กรัม
Potassium iodine	5	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร		

### 5. สาร ความเข้มข้น และปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาลูซิเฟอเรส

สาร	ปริมาตรแนะนำ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (2XPremix)	25 $\mu$ L	15.0
20 $\mu$ M. NS31	0.2 $\mu$ M	0.3
20 $\mu$ M. AM1	0.2 $\mu$ M	0.3
DNA template	<500 ng	3.0
Sterilized distilled water	Up to 50 $\mu$ L	11.4
ปริมาตรรวม	50	30

### 6. สารละลาย Salkowski reagent

Ferric chloride	6.76	กรัม
70% perchloric acid	50	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร		

### 7. สารละลาย Nessler's reagent

#### สารละลาย ก

KI	3.5	กรัม
น้ำกลั่น	15	มิลลิลิตร

#### สารละลาย ข

HgCl <sub>2</sub>	1.7	กรัม
น้ำกลั่น	30	มิลลิลิตร

#### สารละลาย ค

โซเดียมไฮดรอกไซด์	12	กรัม
น้ำกลั่น	15	มิลลิลิตร

ค่อย ๆ เติมสารละลาย ข ลงในสารละลาย ก พร้อมเขย่าให้สารละลายเข้ากันตลอดการเท จนกระทั่งเกิดตะกอนสีแดงอย่างถาวร (โดยสารละลาย ข ยังคงเหลืออยู่) จากนั้นเติมสารละลาย ค ลงไปเพื่อเจือจางให้สารทั้งหมดมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมสารละลาย ข ที่เหลือจนกระทั่งเกิดตะกอนขุ่นเล็กน้อย นำสารละลาย Nessler's reagent ที่ได้เก็บใส่ขวดสีชาเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

**8. สารละลาย Hathway's reagent**

0.1 M Ferric chloride ในสารละลาย 0.1 N HCl	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
0.1 M Potassium iodine	1	มิลลิลิตร



2075474675

CU ThesIs 5872017723 thesis / recv: 18072562 18:36:11 / seq: 57

## ภาคผนวก ค

### สูตรอาหารอาหาร

#### 1.อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient agar

Peptone	0.5	กรัม
Beef extract	0.5	กรัม
ผงวุ้น	1.5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 2.อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient broth

Peptone	0.5	กรัม
Beef extract	0.5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Peptone water

Peptone	1.0	กรัม
Sodium Chloride	0.5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



2075474675

#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Modi medium

Potassium hydrogen phosphate	0.05	กรัม
Sodium Chloride	0.01	กรัม
Magnesium chloride	0.04	กรัม
Mannitol	1.00	กรัม
Glutamine	0.10	กรัม
Ammonium nitrate	0.10	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Pikovskayas Agar

Yeast extract	0.05	กรัม
Dextrose	1.00	กรัม
Calcium phosphate	0.5	กรัม
Ammonium sulphate	0.05	กรัม
Potassium chloride	0.02	กรัม
Magnesium sulphate	0.01	กรัม
Manganese sulphate	0.01	มิลลิกรัม
Ferrous sulphate	0.01	มิลลิกรัม
ผงวุ้น	1.5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 6. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง water agar (WA)

ผงวุ้น	1.5	กรัม
--------	-----	------

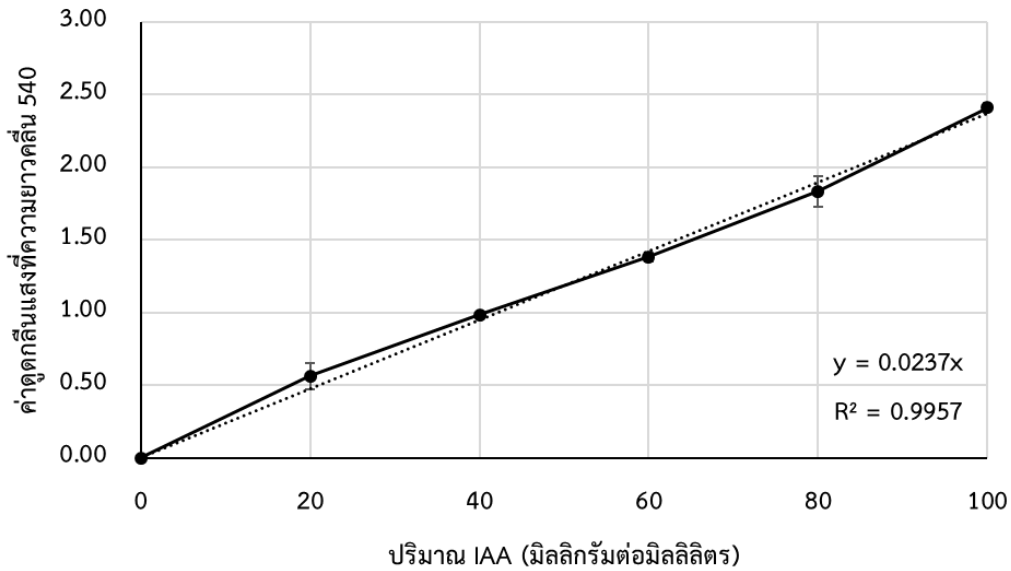
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ง

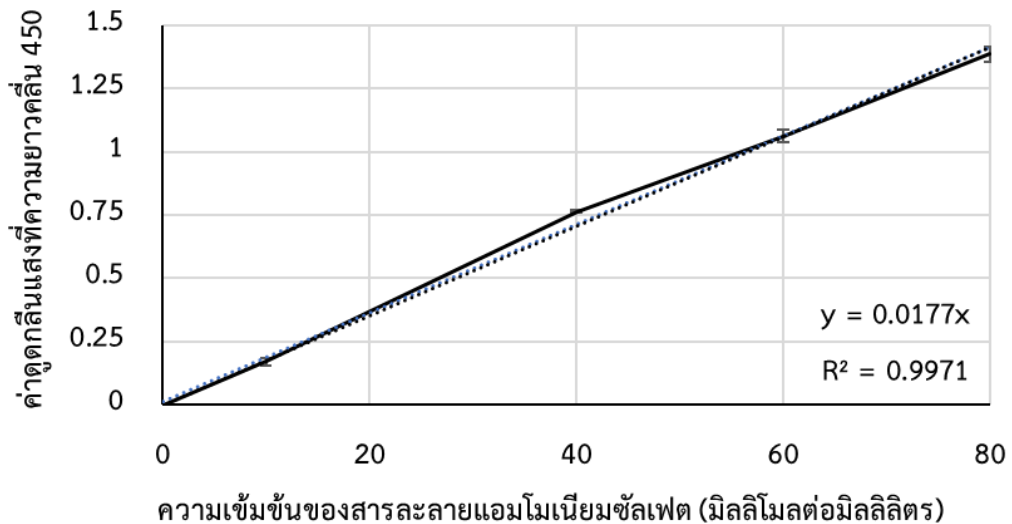
### กราฟมาตรฐาน

#### 1. กราฟ IAA มาตรฐาน



รูปที่ ง.1 กราฟ IAA มาตรฐาน

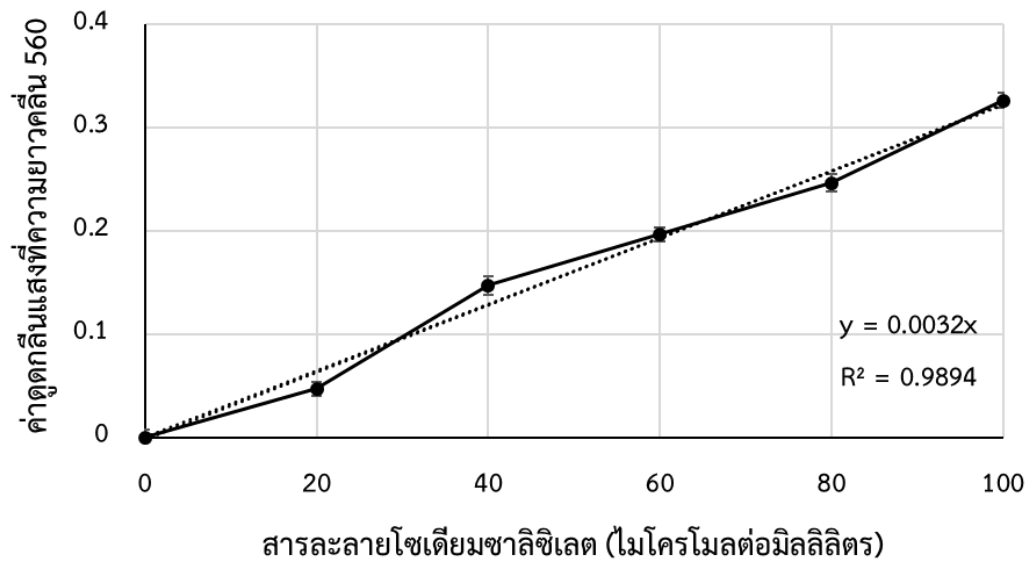
#### 2. กราฟสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตมาตรฐาน



รูปที่ ง.2 กราฟสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตมาตรฐาน



### 3. กราฟสารละลายโซเดียมซาลีไซเลตมาตรฐาน



รูปที่ ๓.3 กราฟสารละลายโซเดียมซาลีไซเลตมาตรฐาน

ภาคผนวก จ

ตารางที่ จ.1 ผลการทดสอบการเป็น PGPB ของแบคทีเรียที่แยกได้และความสามารถในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอับัสคูลารีไมคอร์ไรซาของแบคทีเรียทั้ง 122 ไอโซเลต

กลุ่ม	ไอโซเลต	การสร้าง				การละลายฟอสเฟต	จำนวนลักษณะ PGP
		IAA	NH <sub>3</sub>	Siderophore	EPS		
1	AYR01	+	+	+	-	-	3
	AYR02	+	-	-	-	-	1
	AYR03	-	+	-	-	-	1
	AYR04	+	+	+	-	-	3
	AYR05	+	+	+	-	-	3
	AYR06	+	+	+	-	-	3
	AYR07	+	+	+	+	-	4
	AYR08	-	-	-	-	-	0
	AYR09	+	+	+	+	-	4
	AYR10	+	+	+	-	-	3
	AYR11	+	+	+	-	+	4
	AYR12	+	-	+	-	-	2
	AYR13	+	-	+	-	-	2
	AYR14	+	+	+	-	-	3
	AYR15	+	+	+	-	-	3
	AYR16	+	+	+	-	-	3
	AYR17	-	-	-	-	-	0
	AYR18	-	-	-	-	-	0
	AYR19	+	+	+	-	-	3
	AYR20	+	+	-	-	-	2
	AYR21	+	+	+	-	-	3
	AYR22	-	+	+	-	+	3
	AYR23	+	+	+	-	-	3
	AYR24	-	-	-	-	-	0
	AYR25	+	+	+	-	-	3

กลุ่ม	ไอโซเลท	การสร้าง				การละลายฟอสเฟต	จำนวนลักษณะ PGP
		IAA	NH <sub>3</sub>	Siderophore	EPS		
	AYR26	+	+	+	-	-	3
	AYR27	-	-	-	-	-	0
	AYR28	+	+	+	-	-	3
	AYR29	-	-	-	-	-	0
	AYR30	+	-	+	-	-	2
2	ATR01	+	-	+	+	-	3
	ATR02	+	+	+	-	-	3
	ATR03	-	-	+	-	-	1
	ATR04	+	+	+	-	-	3
	ATR05	-	+	+	-	-	2
	ATR06	+	+	+	+	-	4
	ATR07	+	+	+	+	-	4
	ATR08	+	-	+	+	+	4
	ATR09	+	+	+	+	-	4
	ATR10	+	-	+	-	-	2
	ATR11	+	+	+	-	-	3
	ATR12	-	-	-	-	-	0
	ATR13	+	-	-	-	+	2
	ATR14	+	-	-	-	+	2
	ATR15	+	-	+	+	+	4
	ATR16	+	-	+	+	+	4
	ATR17	+	+	+	-	+	4
	ATR18	-	+	+	+	-	3
	ATR19	-	+	+	+	-	3
	ATR20	-	+	+	-	-	2
3	ATR21	+	-	+	-	-	2
	ATR22	+	-	+	+	-	3
	ATR23	+	+	+	+	-	4

กลุ่ม	ไอโซเลข	การสร้าง				การละลายฟอสเฟต	จำนวนลักษณะ PGP
		IAA	NH <sub>3</sub>	Siderophore	EPS		
	ATR24	+	+	+	+	-	4
4	NPR01	+	-	+	-	+	3
	NPR02	+	-	-	-	-	1
	NPR03	-	-	-	+	-	1
	NPR04	+	-	-	-	-	1
	NPR05	+	-	-	-	+	2
	NPR06	+	+	-	-	-	2
	NPR07	+	-	-	-	-	1
	NPR08	-	-	-	-	+	1
	NPR09	+	-	-	-	+	2
	NPR10	+	+	-	-	+	3
	NPR11	+	-	-	-	+	2
	NPR12	+	-	-	-	-	1
	NPR13	+	+	-	-	+	3
	NPR14	+	-	-	-	+	2
	NPR15	+	-	-	+	+	3
	NPR16	+	-	-	-	+	2
	NPR17	-	-	-	+	-	1
	NPR18	-	-	-	+	+	2
	NPR19	+	-	-	-	-	1
	NPR20	+	-	-	+	+	3
	NPR21	+	-	-	-	-	1
	NPR22	-	-	+	+	+	3
	NPR23	+	+	+	-	+	4
	NPR24	-	-	-	+	-	1
	NPR25	+	+	-	-	-	2
5	KRR01	+	-	-	-	+	2
	KRR02	+	-	-	-	+	2

กลุ่ม	ไอโซเลข	การสร้าง				การละลายฟอสเฟต	จำนวนลักษณะ PGP	
		IAA	NH <sub>3</sub>	Siderophore	EPS			
	KRR03	-	-	-	+	-	1	
	KRR04	+	-	-	+	-	2	
	KRR05	+	-	-	-	+	2	
	KRR06	+	+	+	-	+	4	
	KRR07	+	+	+	-	+	4	
	KRR08	-	-	-	+	-	1	
	KRR09	+	+	+	+	+	5	
	KRR10	+	+	-	-	+	3	
	KRR11	+	-	-	-	+	2	
	KRR12	+	-	-	-	-	1	
	KRR13	+	-	+	-	+	3	
	KRR14	+	-	-	+	+	3	
	KRR15	+	-	-	+	+	3	
	KRR16	+	-	-	-	+	2	
	KRR17	-	-	-	+	+	2	
	KRR18	-	-	+	+	+	3	
	KRR19	+	-	-	+	+	3	
	KRR20	+	-	-	-	-	1	
	6	CHR01	+	-	-	-	+	2
		CHR02	+	-	-	-	-	1
CHR03		+	+	-	+	+	4	
CHR04		+	-	-	-	-	1	
CHR05		+	-	-	-	-	1	
CHR06		+	+	-	-	+	3	
CHR07		+	+	+	+	+	5	
CHR08		-	-	-	+	-	1	
CHR09		+	-	-	-	-	1	
CHR10		+	-	-	-	-	1	

กลุ่ม	ไอโซเลท	การสร้าง				การละลายฟอสเฟต	จำนวนลักษณะ PGP
		IAA	NH <sub>3</sub>	Siderophore	EPS		
	CHR11	+	-	-	-	-	1
	CHR12	+	-	-	+	+	3
	CHR13	+	-	-	+	+	3
	CHR14	+	-	-	-	-	1
	CHR15	+	-	-	-	-	1
	CHR16	+	+	+	-	+	4
	CHR17	-	+	+	-	+	3
	CHR18	-	-	-	+	-	1
	CHR19	+	-	-	-	-	1
	CHR20	+	-	-	-	-	1
	CHR21	+	-	-	-	-	1
	CHR22	-	-	+	+	+	3
	CHR23	+	-	+	+	+	4
รวมทั้งหมดมีแบคทีเรีย (ไอโซเลท)							122

+ หมายถึง มีลักษณะดังกล่าว และ - หมายถึง ไม่มีลักษณะดังกล่าว

ตารางที่ จ.2 ผลการทดสอบการศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันของราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและ  
แบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของอ้อย

ชุดการทดลอง	BLOCK	ความสูง (เซนติเมตร)	มวลชีวภาพเหนือดิน (กรัม)	มวลชีวภาพ ใต้ดิน (กรัม)
ชุดควบคุม	1	11	0.63	0.99
	1	8.7	0.69	1.31
	1	10.2	1.02	0.81
	2	11	0.47	1.28
	2	9.2	0.9	1.02
	2	10	1.01	1.09
	3	11	1.12	0.3
	3	10.5	0.93	1.01
	3	11	1.08	1.1
รา AY01	1	14	1.68	1.89
	1	14	1.38	1.48
	1	13.4	2	2.2
	2	13.5	1.5	1.98
	2	14	1.7	2.18
	2	14	1.88	1.7
	3	13	1.57	1.71
	3	13	1.7	1.57
	3	13.5	1.73	1.81
ATR16	1	11.6	1.2	1.3
	1	12.2	1.12	1.12
	1	11	1.12	1.33
	2	11.4	1.15	1.42
	2	13.2	1.12	1.53
	2	12.6	1	1.15
	3	12.5	1.02	1.1
	3	11.5	0.99	1.06
	3	13.5	0.98	1.11



2075474675

CU Thesais 5872017723 thesis / recv: 18072562 18:36:11 / seq: 57

ชุดการทดลอง	BLOCK	ความสูง (เซนติเมตร)	มวลชีวภาพเหนือดิน (กรัม)	มวลชีวภาพ ใต้ดิน (กรัม)
รา AY01+ATR16	1	15.6	1.75	4.98
	1	15.5	2.6	4.15
	1	14.2	2.13	4.55
	2	15.2	1.47	3.94
	2	14.5	2.49	3.75
	2	16.8	2.6	3.26
	3	14.7	2.5	4.08
	3	14.1	1.52	3.56
	3	14.4	1.59	3.84
รา AT04	1	12.2	1.33	1.75
	1	12	1.18	1.03
	1	11.2	0.96	1.56
	2	10.4	1.35	1.09
	2	11	1.26	1.52
	2	12	0.89	1.12
	3	11.3	0.9	1.03
	3	10.2	0.93	1.29
	3	11.2	1.15	1.22
รา AT04+ATR16	1	13.9	2.1	1.93
	1	12	1.4	2.37
	1	13.4	2.08	1.45
	2	11.6	1	2.69
	2	13.4	1.09	2.11
	2	12	1.48	2.14
	3	12.8	1.01	2.91
	3	14.3	1.05	2.4
	3	12	1.05	1.11



2075474675

CU Thesisis 5872017723 thesis / recv: 18072562 18:36:11 / seq: 57



ตารางที่ จ.3 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Dunnett's test ของความสูงของอ้อยอายุ 3 เดือน

#### Between-Subjects Factors

	Value Label	N
ชุดการทดลอง	control	9
	AY01	9
	AT04	9
	ATR16	9
	AY01+ATR16	9
	AT04+ATR16	9
BLOCK	1	18
	2	18
	3	18

#### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: ความสูงของต้นอ้อยอายุ 3 เดือน

F	df1	df2	Sig.
0.485	17	36	0.944

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + ชุดการทดลอง + BLOCK

**ตารางที่ จ.3** ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Dunnett's test ของความสูงของอ้อยอายุ 3 เดือน (ต่อ)

**Post Hoc test**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: ความสูงของต้นอ้อยอายุ 3 เดือน

(I) ชุดการทดลอง	(J) ชุดการทดลอง	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	
Dunnett t (>control) <sup>a</sup>	AY01	control	3.3111*	0.38423	0.000	2.4277
	AT04	control	0.9889*	0.38423	0.027	0.1055
	ATR16	control	1.8778*	0.38423	0.000	0.9944
	AY01+ATR16	control	4.7111*	0.38423	0.000	3.8277
	AT04+ATR16	control	2.5333*	0.38423	0.000	1.6500

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 0.664.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Dunnett t-tests treat one group as a control and compare all other groups against it.

ตารางที่ จ.4 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan  
ของมวลชีวภาพเหนืดินของอ้อยอายุ 3 เดือน

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
ชุดการทดลอง	control	9
	AY01	9
	AT04	9
	ATR16	9
	AY01+ATR16	9
	AT04+ATR16	9
BLOCK	1	18
	2	18
	3	18

Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: มวลชีวภาพเหนืดินของต้นอ้อยอายุ 3 เดือน

F	df1	df2	Sig.
3.628	17	36	0.001

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + ชุดการทดลอง + BLOCK

ตารางที่ จ.4 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของมวลชีวภาพเหนืดินของอ้อยอายุ 3 เดือน (ต่อ)

Post Hoc test

มวลชีวภาพเหนืดิน (ใบและลำต้น)

ชุดการทดลอง	N	Subset			
		1	2	3	4
Duncan <sup>a</sup> -control	9	0.8722			
ATR16	9	1.0778	1.0778		
AT04	9	1.1056	1.1056		
AT04+ATR16	9		1.3622		
AY01	9			1.6822	
AY01+ATR16	9				2.0722
Sig.		0.128	0.064	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 0.091.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = 0.05.

ตารางที่ จ.5 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan  
ของมวลชีวภาพใต้ดินของอ้อยอายุ 3 เดือน

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
ชุดการทดลอง	control	9
	AY01	9
	AT04	9
	ATR16	9
	AY01+ATR16	9
	AT04+ATR16	9
BLOCK	1	18
	2	18
	3	18

Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: มวลชีวภาพใต้ดินของต้นอ้อยอายุ 3 เดือน

F	df1	df2	Sig.
2.061	17	36	0.034

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + ชุดการทดลอง + BLOCK

ตารางที่ จ.5 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan  
ของมวลชีวภาพไ้ดินของอ้อยอายุ 3 เดือน (ต่อ)

Post Hoc test

มวลชีวภาพเหนือดิน (ใบและลำต้น)

ชุดการทดลอง	N	Subset		
		1	2	3
Duncan <sup>a,b</sup> control	9	0.9900		
ATR16	9	1.2356		
AT04	9	1.2900		
AY01	9		1.8356	
AT04+ATR16	9		2.1233	
AY01+ATR16	9			4.0122
Sig.		0.109	0.104	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 0.136

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = 0.05.

ตารางที่ จ.6 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรกของอ้อยอายุ 3 เดือน

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
ชุดการทดลอง	control	9
	AY01	9
	AT04	9
	ATR16	9
	AY01+ATR16	9
	AT04+ATR16	9
BLOCK	1	15
	2	15
	3	15

Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรกของอ้อยอายุ 3 เดือน

F	df1	df2	Sig.
2.040	14	30	0.050

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + ชุดการทดลอง + BLOCK

ตารางที่ จ.6 ผลการวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากอ้อยอายุ 3 เดือน (ต่อ)

### Post Hoc test

เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากอ้อยอายุ

ชุดการทดลอง	N	Subset				
		1	2	3	4	5
Duncan <sup>c</sup> control	9	0.0000				
AT04	9		30.5244			
AT04+ATR16	9			42.2044		
AY01	9				49.1967	
AY01+ATR16	9					69.5878
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 7.786

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = 0.05.