โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดเลือกแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาจากดินไร่อ้อย

Screening of mycorrhizal helper bacteria from sugarcane soil of sugarcane field

ชื่อนิสิต นางสาวทัดดาว จันทร์บาง **เลขประจำตัว** 5932024623

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาจากดินไร่อ้อย

Screening of mycorrhizal helper bacteria from sugarcane soil of sugarcane field

นางสาวทัดดาว จันทร์บาง

อาจารย์ที่ปรึกษา
อาจารย์ ดร.ณัฏฐ์ ทรงวรวิทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: การคัดเลือกแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาจากดินไร่อ้อย
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวทัดดาว จันทร์บาง
อาจารย์ที่ปรึกษา	: อาจารย์ ดร.ณัฏฐ์ ทรงวรวิทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

การเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรโดยอาศัยจุลินทรีย์วิธีการหนึ่งคือ การนำแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPB) และมีคุณสมบัติสนับสนุนการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยระหว่างราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับพืช (MHB) มาผสมรวมกับหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เพื่อส่งเสริมความสัมพันธ์ระหว่างรากับพืช ส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตและทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าว โดยแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแบบ glomoid ที่พบในดินไร่อ้อยจำนวน 3 แปลง ในจังหวัดนครปฐม โดยสามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวน 38 ไอโซเลท และได้ทำการทดสอบลักษณะการเป็น PGPB ได้แก่ การสร้างฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน (indole-3-acetic acid: IAA) การสร้างแอมโมเนียม การสร้างสารในกลุ่ม siderophore การละลายฟอสเฟต และการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีลักษณะของการเป็น PGPB ที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียที่มีลักษณะการเป็น PGPB อย่างน้อย 4 ลักษณะ มีจำนวน 14 ไอโซเลท (36.84 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้) แบคทีเรียที่สามารถสร้าง IAA มีปริมาณสูงที่สุดคือไอโซเลท NP204 ที่ปริมาณ 51.44±1.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียที่สามารถสร้างแอมโมเนียได้ความเข้มข้นสูงที่สุดคือไอโซเลท NP312 ที่ความเข้มข้น 105.76±5.98 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียที่สามารถสร้างสารกรดซาลิซิลิคซึ่งเป็นสารในกลุ่ม siderophore ได้สูงที่สุดคือไอโซเลท NP115 ที่ความเข้มข้น 228.82±3.12 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียที่มีค่าของดัชนีการละลายฟอสเฟตสูงที่สุดคือไอโซเลท NP312 ที่ค่า 3.20±0.12 และแบคทีเรียที่สามารถสร้างไบโอฟิลม์มีจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ NP107, NP109, NP112, NP303, NP305, NP309 และ NP312 และเมื่อนำแบคทีเรียที่เป็น PGPB มาทดสอบลักษณะการเป็น MHB โดยสังเกตจากความสามารถในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา พบว่าภายในเวลา 7 วัน มีเพียงแบคทีเรียไอโซเลท NP204 และ NP312 ที่สามารถกระตุ้นการงอกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มาจากแปลงไร่อ้อยได้ทั้ง 3 แปลง และให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด โดยที่ไอโซเลท NP204 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและ NP312 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จากผลการศึกษานี้จึงสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาในดินไร่อ้อยได้ 2 ไอโซเลท นั่นคือ NP204 และ NP312 ซึ่งเหมาะต่อการนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อชีวภาพทางการเกษตรต่อไป

คำสำคัญ: แบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา, แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช, ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

Research Title	: Screening of mycorrhizal helper bacteria from sugarcane soil of sugarcane field
Student name	: Miss. Thaddaw Janbang
Advisor	: Nut Songvorawit, Ph.D.
Co-Advisor	: Assistant Professor Jittra Piapukiew, Ph.D.
Department of	: Biology

Abstract

One way to increase agricultural productivity by using microbes is the use of plant growth promoting bacteria (PGPB) with properties of mycorrhizal helper bacteria (MHB) combining with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in order to enhance symbiotic association between fungi and plants. This can improve plant growth and tolerance under inappropriate conditions. Therefore, this study aimed to screen bacteria with these properties by isolating them from glomoid spores of AMF found in soil of three sugarcane fields in Nakhon Pathom Province, Thailand. A total of 38 bacterial isolates was obtained and then they were evaluated for their plant growth promoting (PGP) abilities, including the production of auxin hormones (indole-3-acetic acid: IAA), ammonia, siderophore, phosphate solubilization and biofilm production. The results showed that 14 bacterial isolates (36.84% of the total isolates) had at least four PGP activities. The isolate that produced the highest amount of IAA was NP204 with the production of IAA of 51.44±1.75 µg/ml. For ammonia production, NP312 had the highest amount of ammonia production at the concentration of 105.76±5.98 µmol/ml. NP115 was the isolate that produced the highest amount of salicylic at the concentration of 228.82±3.12 µmol/ml. For phosphate solubilization, NP312 had the highest of phosphate solubilization index at 3.20±0.12. Moreover, biofilm production was detected in only 7 bacterial isolates, i.e. NP107, NP109, NP112, NP303, NP305, NP309 and NP312. Bacteria with PGP properties were then tested for MHB from the ability to stimulate AMF spore germination. Only NP204 and NP312 were able to stimulate spore germination of AMF from all 3 sugarcane fields within 7 days and also yielded the highest spore germination percentage. NP204 was gram-positive bacteria and NP312 was gram-negative bacteria. These results suggest that these two bacterial isolates have a potential to further develop for inoculum production using in agriculture.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi, mycorrhizal helper bacteria, plant growth promoting bacteria

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ณัฏฐ์ ทรงวรวิทย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ ทั้งในส่วนการวางแผนงาน แก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล และให้คำแนะนำในการเขียนเล่มโครงการ รวมถึงการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลในการเขียนเล่มโครงการ ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการ ที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ ทั้งในส่วนของการอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ สารเคมีที่ใช้การปฏิบัติการ รวมถึงโรงเรือนในการปลูกต้นข้าวฟ่าง ที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ตลอดจนการให้ความรู้ สอนเทคนิคเฉพาะทางต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการปฏิบัติงาน รวมถึงการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลในการเขียนเล่มโครงการ ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณนางสาวภัทราวรรณ ธีฆัมพร และพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการราวิทยา ห้อง 212 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือมาโดยตลอด ทั้งการสอนเทคนิคปฏิบัติการ การจัดซื้อและจัดหาสารเคมีหรืออุปกรณ์ให้การปฏิบัติงาน ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณนางสาวณักษ์ลภัส ธนันท์ธนพงศ์, นางสาวชมจันทร์ พันธ์พัฒนะ, นางสาวสายกลาง ศรีสำราญ, นางสาวกชกร วรนิตย์, นางสาวนดา ยีมัสซา และนายพงศ์ปณต สาเรือง ที่ช่วยรดน้ำต้นข้าวฟ่างให้เจริญเติบโตจนสามารถนำมาใช้ในการปฏิบัติการได้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา ที่ให้ความกรุณาในการสอนใช้ template และสอนใช้โปรแกรมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในการเขียนอ้างอิง ทำให้สามารถเขียนเล่มโครงการได้สะดวกมากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า และอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวตี อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2562 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก
ABSTRACT ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญภาพ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ 1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ 3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 4
2.1. ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) 4
2.2. เอนโดไมคอร์ไรซา (endomycorrhiza) 5
2.2.1. ลักษณะของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 6
2.3. บทบาทของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อพืช 9
2.3.1. เพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับธาตุอาหารของพืช 9
2.3.2. ช่วยให้พืชเติบโตได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม 9
2.3.3. ทำงานร่วมกับจุลชีพในดินเพื่อส่งเสริมการเติบโตของพืช 9
2.3.4. ทำให้พืชต้านทานโรคได้ดีขึ้น 10
2.4. แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช
(plant growth promoting bacteria: PGPB) 10
2.5. แบคทีเรียที่ส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา
(mycorrhiza helper bacteria: MHB) 11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน 13
3.1. ขั้นตอนการดำเนินงาน 13
3.1.1. การเก็บตัวอย่างดินที่อยู่รอบรากอ้อยจากแปลงเกษตรกรรม 14
3.1.2. การแยกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแปลงไร่อ้อย 14
3.1.3. การแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 15
3.1.4. การทดสอบลักษณะการเป็น PGPB ของแบคทีเรีย 16
3.1.4.1. การสร้าง indole-3-acetic acid (IAA) 16

3.1.4.2. การสร้างแอมโมเนีย (NH_3 production) ... 16
3.1.4.3. การสร้างสารในกลุ่ม siderophore ... 17
3.1.4.4. การละลายฟอสเฟต (phosphate solubilization) ... 17
3.1.4.5. การสร้างสาร extracellular polymeric substance (EPS) ... 17
3.1.5. การเพิ่มจำนวนสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในต้นข้าวฟ่าง ... 18
3.1.6. การแยกและจัดกลุ่มราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินรอบรากข้าวฟ่าง ... 19
3.1.7. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้ในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ... 19
3.1.8. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่มีลักษณะการเป็น PGPB และช่วยกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ... 19
บทที่ 4 ผลการศึกษา ... 20
4.1. การแยกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแปลงไร่อ้อย ... 20
4.2. การแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ... 21
4.3. การทดสอบลักษณะการเป็น PGPB ของแบคทีเรีย ... 21
4.3.1. การสร้าง indole-3-acetic acid (IAA) ... 22
4.3.2. สร้างแอมโมเนีย (NH_3 production) ... 23
4.3.3. การสร้างสารในกลุ่ม siderophore ... 24
4.3.4. การละลายฟอสเฟต (phosphate solubilization) ... 25
4.3.5. การสร้างสาร extracellular polymeric substance (EPS) ... 26
4.4. การเพิ่มจำนวนสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในต้นข้าวฟ่าง ... 26
4.5. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้ในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ... 26
4.6. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่มีลักษณะการเป็น PGPB และช่วยกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ... 28
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา ... 30
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ ... 34
6.1. สรุปผลการศึกษา ... 34
6.2. ข้อเสนอแนะ ... 35
6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ ... 35
6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต ... 35
เอกสารอ้างอิง ... 36

ภาษาไทย 36
ภาษาอังกฤษ 36
ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารเคมีในการทดลอง 42
ภาคผนวกที่ 2 สูตรอาหาร 43
ภาคผนวกที่ 3 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย 45
ภาคผนวกที่ 4 spore cleaning 45
ภาคผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐาน 45
ภาคผนวกที่ 6 ผลการทดสอบการเป็น PGPB ของแบคทีเรียทั้ง 38 ไอโซเลตที่แยกได้จากสปอร์รา
อาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา 47

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3-1 พิกัดบอกตำแหน่งจุดเก็บตัวอย่างดินจากแปลงไร่อ้อยทั้ง 3 แปลง 13
ตารางที่ 4-1 ลักษณะของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอไรซาที่จำแนกได้..... 20
ตารางที่ 4-2 แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา..... 21

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 การจำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซาตามลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีวิทยา 4
ภาพที่ 2-2 โครงสร้างของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในรากพืช 6
ภาพที่ 2-3 ลักษณะสปอร์แบบต่าง ๆ 6
ภาพที่ 2-4 ลักษณะสปอร์แบบ ACAULOSPOROID 7
ภาพที่ 2-5 ลักษณะสปอร์แบบ ENTROPHOSPOROID 7
ภาพที่ 2-6 ลักษณะสปอร์แบบ GIGASPOROID 8
ภาพที่ 2-7 ลักษณะสปอร์แบบ GLOMOID 8
ภาพที่ 2-8 ลักษณะสปอร์แบบ RADIAL-GLOMOID 9
ภาพที่ 2-9 กลไกที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ทั้งทางตรงและทางอ้อม 11
ภาพที่ 2-10 กลไกที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา 12
ภาพที่ 3-1 แผนที่บอกตำแหน่งจุดเก็บตัวอย่างดินจากแปลงไร่อ้อยทั้ง 3 แปลง..... 13
ภาพที่ 3-2 การเก็บตัวอย่างดินในแปลงไร่อ้อย 14
ภาพที่ 3-3 การแยกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแปลงไร่อ้อย 15
ภาพที่ 3-4 การแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา..... 16
ภาพที่ 3-5 เพิ่มจำนวนสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในต้นข้าวฟ่าง โดยต้นข้าวฟ่างมีอายุแตกต่างกัน (A) ข้าวฟ่างมีอายุ 2 วัน (B) ข้าวฟ่างมีอายุ 5 วัน (C) ข้าวฟ่างมีอายุ 14 วัน (D) ข้าวฟ่างมีอายุ 3 เดือน 18
ภาพที่ 4-1 ลักษณะสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินของแปลงไร่อ้อยทั้งหมด 3 พื้นที่..... 20
ภาพที่ 4-2 ปริมาณการสร้าง IAA ของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะที่สร้างในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NUTRIENT BROTH (NB) + ทริปโตเฟน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 23
ภาพที่ 4-3 ปริมาณการสร้างแอมโมเนียของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PEPTONE WATER (ERROR BAR คือ STANDARD DEVIATION)..... 24

ภาพที่ 4-4 ปริมาณการสร้างกรดซาลิซาลิคของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะ ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ MODI MEDIUM (ERROR BAR คือ STANDARD DEVIATION)..... 25
ภาพที่ 4-5 ลักษณะการสร้างวงใสรอบโคโลนีแบคทีเรียบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PIKOVSKAYA'S AGAR 25
ภาพที่ 4-6 ดัชนีการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะ บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PIKOVSKAYA'S AGA (ERROR BAR คือ STANDARD DEVIATION)..... 26
ภาพที่ 4-7 ลักษณะการงอกของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา..... 27
ภาพที่ 0-1 กราฟ IAA มาตรฐาน..... 45
ภาพที่ 0-2 กราฟสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตมาตราฐาน..... 46
ภาพที่ 0-3 กราฟสารละลายโซเดียมซาลิซิเลตมาตราฐาน 46
ภาพที่ 0-4 การทดสอบการสร้าง INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)..... 48
ภาพที่ 0-5 การทดสอบการสร้างแอมโมเนีย (NH_3 PRODUCTION)..... 49
ภาพที่ 0-6 การทดสอบการสร้างสารในกลุ่ม SIDEROPHORE..... 49
ภาพที่ 0-7 การทดสอบการสร้างสาร EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCE (EPS) . 49
ภาพที่ 0-8 การทดสอบการละลายฟอสเฟต (PHOSPHATE SOLUBILIZATION) 50

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตต่าง ๆ เช่น น้ำตาล กากน้ำตาล โมโนโซเดียมกลูตาเมท แอลกอฮอล์ อาหารสัตว์ และปุ๋ย เป็นต้น ในการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยจะทำให้เกิดผลพลอยได้ตามมา ได้แก่ ชานอ้อย กากตะกอน และกากน้ำตาล ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างมาก นอกจากน้ำตาลจะเป็นสินค้าที่จำเป็นสำหรับการบริโภคภายในประเทศแล้ว ยังเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญมีมูลค่าเฉลี่ยสูงกว่า 90,000 ล้านบาทต่อปี (เศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2562: ออนไลน์) ดังนั้น ตลาดโลกมีความต้องการอ้อยสูง แต่การปลูกอ้อยเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงและคุณภาพดีด้วยทำได้ค่อนข้างยากเพราะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สภาพแวดล้อม ปัญหาโรคและศัตรูพืช ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่แก้ไขปัญหาโดยการใช้ปุ๋ยเคมีและสารกำจัดศัตรูพืชที่ราคาสูง เพื่อเพิ่มผลผลิตโดยไม่คำนึงถึงผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นตามมา เช่น สารเคมีตกค้าง และโครงสร้างดินเสื่อม (วิฑูรย์ ปัญญากุล, 2547) ทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกรอีกด้วย ในปัจจุบันมีการพัฒนาแนวทางการแก้ไขปัญหาดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้เกษตรกรสามารถผลิตอ้อยในปริมาณที่สูงแต่ยังคงใช้ต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เช่น สายพันธุ์อ้อยที่ใช้ปลูกเป็นชนิดที่ปรับปรุงพันธุ์ให้เหมาะสมกับสิ่งแวดล้อมหรือต้านทานแมลงศัตรูพืช การปรับปรุงดิน รวมไปถึงการใช้ปุ๋ยชีวภาพ หรือจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อพื้นที่เกษตรกรรม

การใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อพื้นที่เกษตรกรรม ได้แก่ ราและแบคทีเรีย เป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ในการปรับปรุงและบำรุงดินเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งกลุ่มจุลินทรีย์ประเภทราที่น่าสนใจคือ ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) ซึ่งเป็นราที่อาศัยอยู่กับรากพืช มีการดำรงชีวิตร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัย (symbiotic association) โดยพบว่าพืชมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ มีความสัมพันธ์กับรากลุ่มนี้ (Smith and Read, 2008) ซึ่งทำให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหารในดินไปสู่พืช โดยเส้นใยราที่อยู่ภายนอกรากจะทำหน้าที่ในการดูดซับธาตุอาหารจากดิน แล้วลำเลียงไปยังโครงสร้างแลกเปลี่ยนธาตุอาหารของราที่อยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ของพืชเพื่อส่งต่อให้กับพืช ในขณะเดียวกันราก็ได้รับสารประกอบคาร์บอนจำพวกน้ำตาลจากพืชผ่านทางโครงสร้างแลกเปลี่ยนนี้เช่นเดียวกัน (Smith and Read, 2008) ความสัมพันธ์ดังกล่าวส่งเสริมให้พืชได้รับสารอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้นกว่าพืชที่ไม่มีรากลุ่มนี้อาศัย (Dalpe, 2005; Smith et al., 2010) ทำให้พืชเศรษฐกิจหลายชนิดทั้งพืชสวนและพืชไร่ เช่น ผัดกาดหอม แครอท แตงกวา หอม กระเทียม ข้าว ยางพารา ข้าวโพด ข้าวฟ่าง รวมถึงอ้อย

มีผลผลิตต่อไร่สูงขึ้น (Surendran and Vani, 2013; Baum et al., 2015) อีกทั้งยังทำให้พืชมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ได้แก่ ความแห้งแล้ง ความเค็ม และช่วยลดการทำลายของศัตรูพืชในระบบรากพืช (Poomipan, 2013) ด้วยเหตุนี้ จึงได้มีการนำราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามาพัฒนาเป็นหัวเชื้อเพื่อใช้ในการปลูกพืช เพื่อช่วยเพิ่มการดูดซับธาตุอาหารจากดินและลดการใช้ปุ๋ยเคมี (Poomipan et al., 2011)

แบคทีเรียในดินบางชนิดที่อาศัยอยู่รอบ ๆ รากพืชหรือในระบบรากพืชก็นับว่ามีประโยชน์แก่การเจริญเติบโตของพืชเช่นกัน ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียกลุ่มส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting bacteria, PGPB) เป็นแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์สามารถสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้ พบได้ในบริเวณอาณาเขตรากพืช (rhizosphere) และในเนื้อเยื่อพืช (endophytic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีการใช้งานเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรมาเป็นเวลานานแล้ว เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเพิ่มธาตุอาหารให้แก่พืช กระตุ้นการเจริญของพืชโดยการผลิตฮอร์โมนพืช ช่วยควบคุมและยับยั้งกิจกรรมของเชื้อก่อโรคพืช และปรับปรุงโครงสร้างดิน ผ่านกลไกทั้งทางตรง และทางอ้อม กลไกทางตรง เช่น การตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต การสร้างฮอร์โมนพืช ส่วนกลไกทางอ้อม เช่น การชักนำระบบความต้านทานโรค เป็นต้น (ธนากร แสงสง่า, 2557) ซึ่งการใช้จุลินทรีย์เหล่านี้จะช่วยพัฒนาทรัพยากรดินอย่างยั่งยืน นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม PGPB บางชนิดยังมีคุณสมบัติที่สนับสนุนการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยระหว่างราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับพืช (mycorrhizal helper bacteria, MHB) และยังช่วยกระตุ้นการงอกของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอีกด้วย (Frey-Klett et al., 2007)

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการพัฒนาหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในพื้นที่การเกษตรอย่างต่อเนื่อง โดยการนำความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่มีต่อพืชมาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำแบคทีเรียในกลุ่ม PGPB มาผสมรวมกับหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อส่งเสริมให้พืชมีการเจริญเติบโตและทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น (Lenoir et al., 2016) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาแบคทีเรียในกลุ่ม MHB ยังมีรายงานที่ค่อนข้างน้อยและแบคทีเรียมีความจำเพาะต่อชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ด้วยเหตุนี้การแยกแบคทีเรียในกลุ่ม MHB ที่เหมาะสมจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถพัฒนาหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้มีประสิทธิภาพ ดังนั้น โครงการนี้จึงจะทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาจากดินไร่อ้อยที่เหมาะสมต่อพื้นที่เกษตรกรรมของประเทศไทย ซึ่งเป็นเรื่องที่จำเป็นและสำคัญอย่างยิ่งที่จะนำไปสู่ความยั่งยืนของการผลิตอ้อยทั้งในทางเศรษฐศาสตร์และนิเวศวิทยา

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

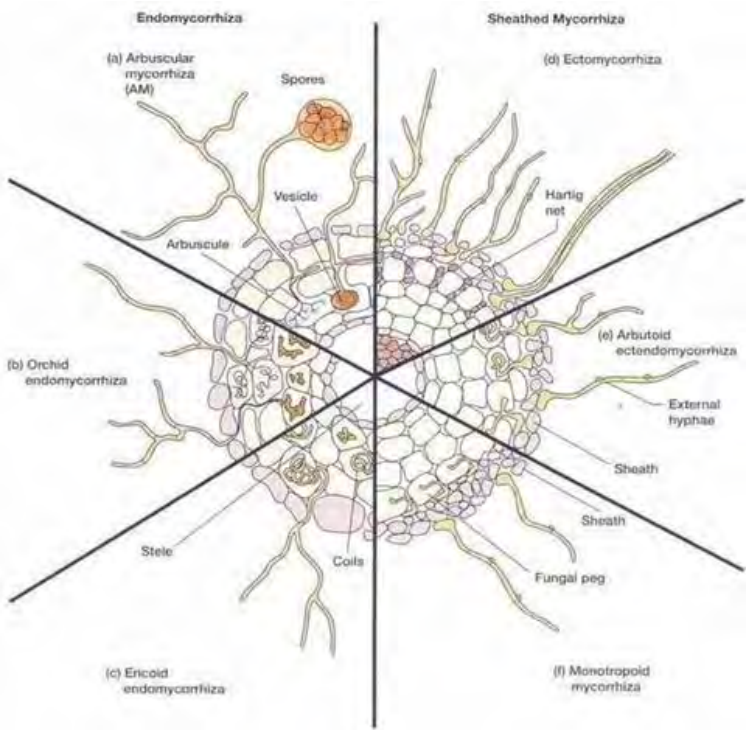
- เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาจากดินไร่อ้อย

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1. ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza)

ไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) มาจากภาษากรีกว่า mike แปลว่ารา รวมกับคำว่า rhiza แปลว่า ราก (กิตติมา ด้วงแค, 2548: ออนไลน์) หมายถึงการดำรงชีวิตร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยระหว่างรากับพืชชั้นสูง ซึ่งเป็นลักษณะความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นได้กับพืชที่เจริญเติบโตบนดินทั่วไป โดยพบ ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของพืชทั้งหมด (Poomipan, 2013) ซึ่งการดำรงชีวิตร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยนี้ ทำให้รากับพืชได้รับประโยชน์ร่วมกัน โดยพืชจะได้รับน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็น เช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ส่วนราจะได้รับสารอาหารจากพืช เช่น โปรตีน น้ำตาล และวิตามิน ผ่านทางระบบรากของพืช ทำให้พืชที่มีราไมคอร์ไรซาอยู่ที่รากมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดียิ่งขึ้น (Smith and Read, 2008)

ไมคอร์ไรซาสามารถจำแนกชนิดได้เป็น 7 กลุ่ม (ภาพที่ 2-1) ได้แก่ ectomycorrhiza, endomycorrhiza (arbuscular mycorrhiza), ectendomycorrhiza, ericoid mycorrhiza, arbutoid mycorrhiza, monotropoid mycorrhiza และ orchid mycorrhiza (Harley and Smith, 1983) โดยในโครงงานนี้จะกล่าวถึงเอนโดไมคอร์ไรซา (endomycorrhiza)

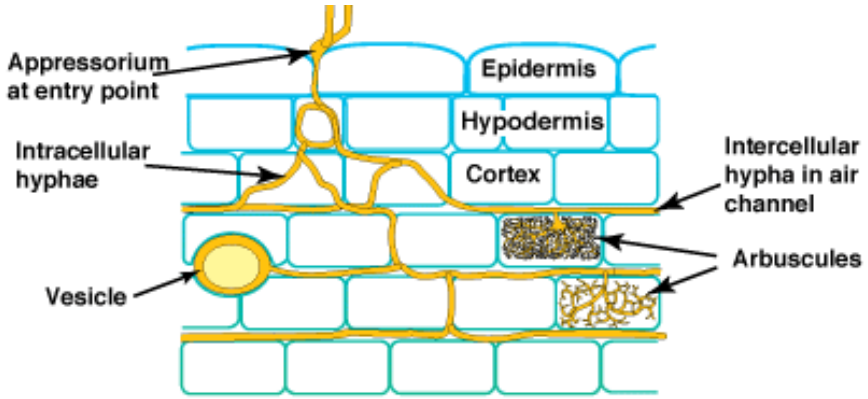


ภาพที่ 2-1 การจำแนกชนิดของราไมคอร์ไรซาตามลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีวิทยา (Amballa and Bhumi, 2016)

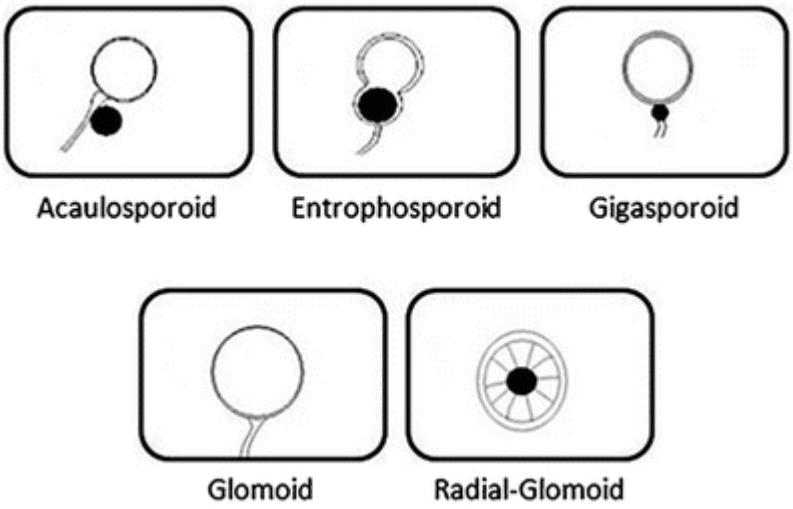
2.2. เอนโดไมคอร์ไรซา (endomycorrhiza)

เอนโดไมคอร์ไรซา (endomycorrhiza) เป็นไมคอร์ไรซาที่มีเส้นใยเจริญอยู่รอบ ๆ รากพืช และบางส่วนของเส้นใยเจริญเข้าไปในเซลล์ของรากพืช (intracellular) และอาจเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ (intercellular) ของรากพืชในชั้น cortex เส้นใยที่เจริญอยู่รอบ ๆ รากพืชอยู่กันอย่างหลวม ๆ หรือยื่นออกจากรากพืชสู่ดินประมาณ 1 ซ.ม. ส่วนของเส้นใยราที่เจริญเข้าไปในรากพืชจะเจริญอยู่ในชั้น primary cortex เท่านั้น และนิยมเรียกชื่อกันในปัจจุบันว่า ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhiza fungi: AMF) โดยราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะมีการสร้างโครงสร้างพิเศษในเซลล์รากพืช 2 โครงสร้าง คือ โครงสร้างเวสสิเคิล (vesicle) และอาร์บัสคูล (arbuscule) (ภาพที่ 2-2) โดยเส้นใยจะเจริญเข้าไปอยู่ในเซลล์ชั้น cortex หรืออยู่ระหว่างเซลล์ชั้น cortex ไม่เข้าไปในชั้น meristematic cells หรือชั้น endodermis เส้นใยอาจขดเป็นวงในเซลล์รากหรืออาจจะมีการแตกแขนงแบบ dichotomous จนเกือบเต็มเซลล์ ทำให้มีลักษณะคล้ายกะหล่ำดอกหรือคล้ายต้นไม้ (tree-like) อยู่ในเซลล์พืช เรียกโครงสร้างนี้ว่า อาร์บัสคูล (arbuscule) ซึ่งจะเจริญอยู่ระยะหนึ่งและสลายไป โครงสร้าง arbuscule นั้นเป็นโครงสร้างที่ราใช้สะสมแร่ธาตุและอาหาร โดยเฉพาะฟอสฟอรัส ซึ่งเมื่อพืชย่อยสลายโครงสร้างนี้ สารอาหารสามารถถ่ายเทไปให้กับพืชได้ การถ่ายเทสารอาหารนั้นอาจเกิดจากการแลกเปลี่ยนสารอาหารที่บริเวณผิวหน้าของ arbuscule ที่สัมผัสกับเซลล์ได้ ราจะได้รับสารประกอบคาร์บอนจำพวกน้ำตาลจากพืช โครงสร้าง arbuscule นี้จะมีอายุประมาณ 2-14 วันก็จะสลายไป เมื่อโครงสร้าง arbuscule สลายไป ราก็จะมีการสร้างโครงสร้างซึ่งมีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ลักษณะคล้ายถุง ผนังหนา เกิดที่ปลายของเส้นใย (terminal) หรือตรงกลางเส้นใย (intercalary) ซึ่งโป่งบวมออกมา ภายในมีหยดไขมันสีเหลืองบรรจุอยู่ เป็นโครงสร้างที่ใช้ในการเก็บสะสมอาหารของรา และเป็นโครงสร้างที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี เรียกโครงสร้างนี้ว่า เวสสิเคิล (vesicle) เนื่องจากโครงสร้างทั้งสองนี้เป็นโครงสร้างที่ไม่พบในรากลุ่มอื่น จึงทำให้นักวิจัยใช้โครงสร้างนี้ในการบ่งชี้ว่ามีราชนิดนี้เข้าอยู่อาศัยในพืชอาศัยหรือไม่ รากของพืชที่มีราอาศัยร่วมอยู่ด้วยสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติและไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ แต่รากพืชบางชนิดอาจพบการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอ่อนและไม่มีรากขน ซึ่งสีเหลืองนี้จะจางหายไปเมื่อถูกแสงสว่างและความเข้มของสีขึ้นอยู่กับปริมาณการเข้าสู่รากของรา (Harley and Smith, 1983)

ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจะสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ โดยสปอร์จะมีลักษณะค่อนข้างกลม หลากสี หลายขนาด และมีโครงสร้างพิเศษตามแต่ละชนิดของประเภทสปอร์ โดยโครงสร้างพิเศษของสปอร์ราทำให้สามารถจำแนกประเภทสปอร์ออกเป็น 5 ลักษณะคือ acaulosporoid, entrophosporoid, gigasporoid, glomoid และ radial-glomoid (Walker and Vestberg, 1998) ดังภาพที่ 2-3



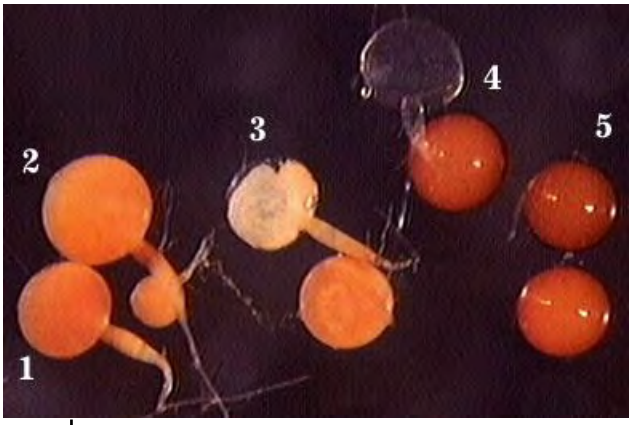
ภาพที่ 2-2 โครงสร้างของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในรากพืช
ที่มา: https://mycorrhizas.info/method.html



ภาพที่ 2-3 ลักษณะสปอร์แบบต่าง ๆ
(Walker and Vestberg, 1998)

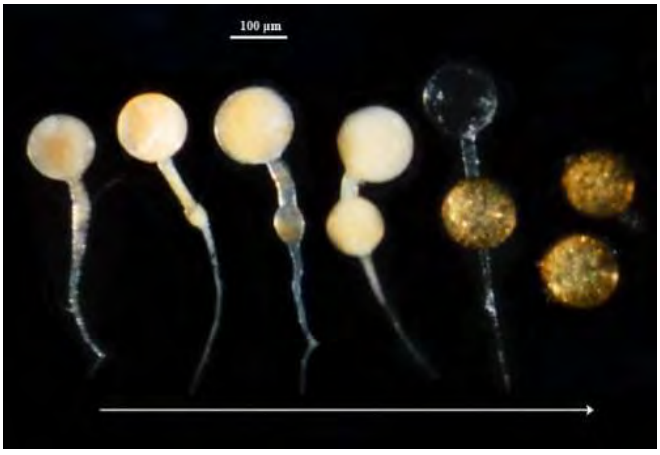
2.2.1. ลักษณะของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

Acaulosporoid เป็นสปอร์ที่เกิดจากด้านข้างของก้านสปอร์เดิมที่เรียกว่า sporiferous saccule จากนั้นสปอร์ที่เกิดใหม่จะค่อย ๆ โตขึ้น ขณะที่สปอร์เดิมจะฝ่อลง เนื่องจากของเหลวที่อยู่ภายในสปอร์เดิมจะถูกถ่ายไปยังสปอร์ที่เกิดขึ้นใหม่ขณะที่มีการสร้างสปอร์ ดังภาพที่ 2-4 การพัฒนาสปอร์ชนิด acaulosporoid เริ่มต้นจากหมายเลข 1 ส่วนของสปอร์จะมีโครงสร้างที่เรียกว่า sporiferous saccule จากนั้นสปอร์ใหม่จะเริ่มพัฒนาออกจากบริเวณด้านข้างของ sporiferous saccule ในหมายเลข 2 สปอร์ที่เกิดใหม่เริ่มมีการขยายขนาดเพิ่มมากขึ้นจากนั้นสปอร์เก่าจะฝ่อตัวลงและสลายไปในที่สุด ดังภาพที่ 2-4 หมายเลข 3-5 (Stürmer and Morton, 1999)



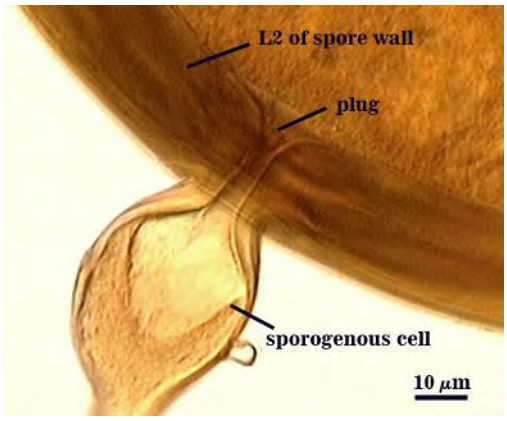
ภาพที่ 2-4 ลักษณะสปอร์แบบ acaulosporoid
ที่มา: http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/acaulosporaceae/acaulospora/colossica.html

Entrophosporoid เป็นสปอร์ที่เกิดภายในก้านของ saccule หรือสปอร์เดิม โดยสปอร์ใหม่จะมีการขยายตัว ในขณะที่สปอร์เดิมจะค่อย ๆ ฝ่อลงจนแฟบไปในที่สุด ดังภาพที่ 2-5 ที่แสดงการพัฒนาของสปอร์แบบ entrophosporoid จาก saccule ที่มีลักษณะใส จนกระทั่งเป็นสปอร์ที่เจริญเต็มที่



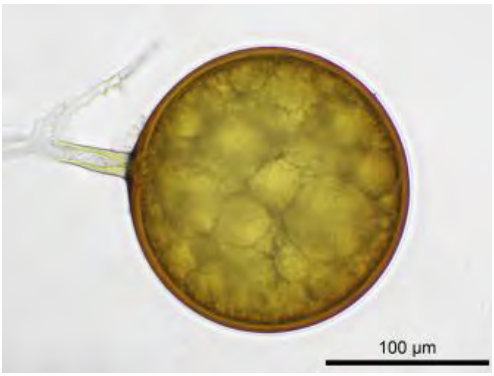
ภาพที่ 2-5 ลักษณะสปอร์แบบ entrophosporoid
ที่มา: http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/acaulosporaceae.html

Gigasporoid เป็นสปอร์ที่ค่อนข้างใหญ่ เกิดบริเวณปลายของเส้นใยที่โป่งพอง เรียกว่า bulbous hyphae และมักพบโครงสร้างที่เรียกว่า sporogenous cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่โป่งบริเวณฐานของสปอร์ (ภาพที่ 2-6)



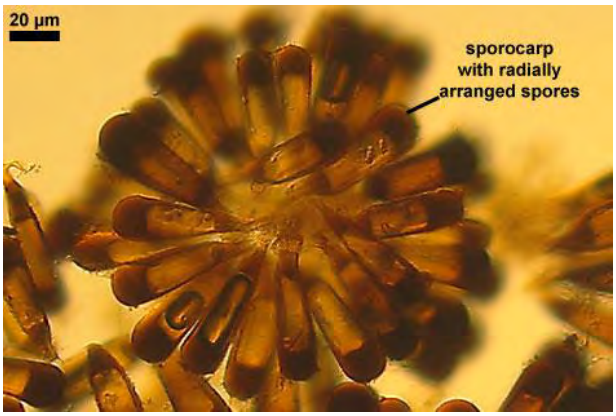
ภาพที่ 2-6 ลักษณะสปอร์แบบ gigasporoid
ที่มา: http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/gigasporaceae/gigaspora/decipiens.html

Glomoid เป็นสปอร์เกิดบริเวณปลาย (terminal) หรือบริเวณกลาง (intermediate) ของเส้นใย (ภาพที่ 2-7) โดยสปอร์ชนิดนี้มักพบในราสกุล *Acaulospora, Ambispora, Archaeospora, Diversispora, Geosiphon, Glomus, Pacispora* และ *Paraglomus*



ภาพที่ 2-7 ลักษณะสปอร์แบบ glomoid
ที่มา: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128130124000206

Radial-glomoid เป็นสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายกับแบบ glomoid แต่แตกต่างที่สปอร์แบบ radial-glomoid สร้างสปอร์เรียงเป็นชั้นเดียวรอบ ๆ เส้นใยราที่พันสานตรงแกนกลาง (central plexus of hyphae) ดังนั้นสปอร์จึงมีลักษณะเป็นแฉก ๆ (ภาพที่ 2-8)



ภาพที่ 2-8 ลักษณะสปอร์แบบ radial-glomoid
ที่มา: http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/pages/G_-clavisporum-18-5-PV-r_jpg.htm

2.3. บทบาทของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อพืช

2.3.1. เพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับธาตุอาหารของพืช

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารพืชที่ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสามารถดูดซับให้กับพืชได้มากกว่าธาตุอื่น ๆ ซึ่งพืชที่มีราอารบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเข้าอยู่อาศัยในรากจะได้รับฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้น และมักส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตเพิ่มขึ้นด้วย (Poomipan et al., 2011) เนื่องจากฟอสฟอรัสมักเกิดปฏิกิริยากับเหล็ก อะลูมิเนียม และแคลเซียม เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ละลายน้ำยาก ทำให้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช อีกทั้งฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่เคลื่อนที่ในดินได้ช้า ทำให้พืชมีโอกาสขาดธาตุฟอสฟอรัสได้ง่าย (Marschner and Dell, 1994) อย่างไรก็ตามการเข้าอยู่อาศัยของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากพืชจะช่วยแก้ปัญหาการดูดซับฟอสฟอรัสให้กับพืชได้ เนื่องจากเส้นใยราที่แพร่กระจายอยู่หนาแน่นในดินจะทำหน้าที่เสมือนราก ซึ่งจะเป็นการเพิ่มพื้นที่ในการดูดซับฟอสฟอรัสให้กับพืชได้อีกทางหนึ่ง

2.3.2. ช่วยให้พืชเติบโตได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

ราอาร์บัสไมคอร์ไรซาช่วยให้พืชสามารถเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ดินเค็ม สภาวะแล้ง และดินเป็นพิษ โดยในสภาวะแล้งนั้น ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาช่วยดูดซับน้ำให้กับพืชผ่านทางเส้นใยราที่แพร่กระจายในดิน ซึ่งเส้นใยเหล่านี้มีขนาดเล็กมากจึงสามารถดูดซับน้ำจากช่องบรรจุน้ำขนาดเล็กได้ดีกว่ารากพืช (Faber et al., 1991)

2.3.3. ทำงานร่วมกับจุลชีพในดินเพื่อส่งเสริมการเติบโตของพืช

ในการใช้ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาร่วมกับจุลชีพในดิน มีรายงานว่าการใช้ราไมคอร์ไรซาร่วมกับไรโซเบียมสำหรับการปลูกพืชตระกูลถั่วที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ในสภาวะที่ดินมีฟอสฟอรัสที่เป็น

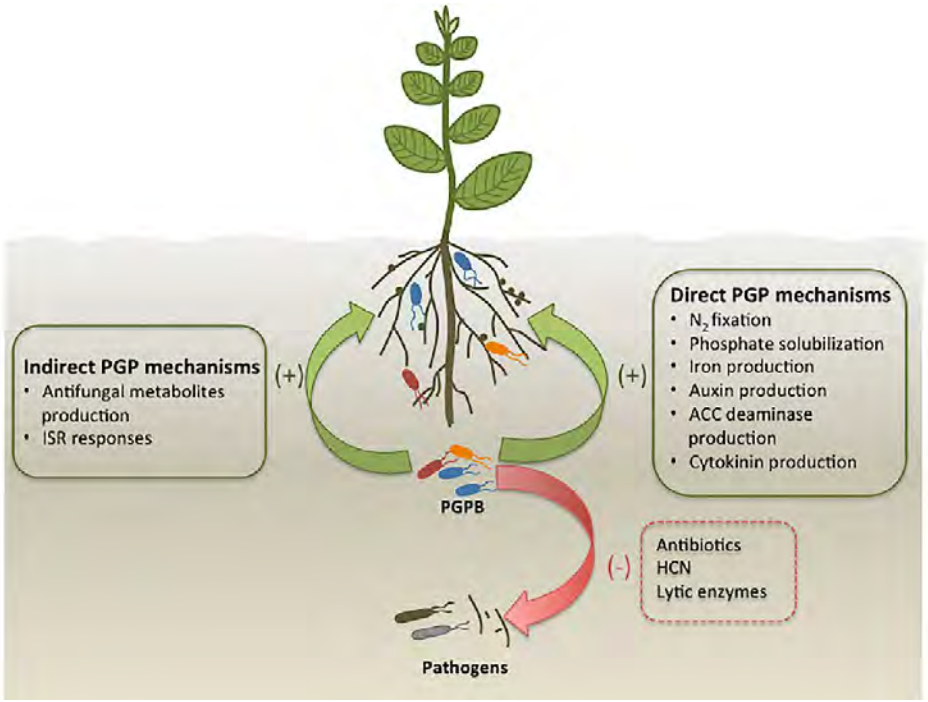
ประโยชน์ต่ำ ทำให้ถั่วมีการเติบโตสมบูรณ์ได้ผลผลิตใกล้เคียงกับการใช้ไรโซเบียมร่วมกับปุ๋ยฟอสฟอรัส (นันทกร บุญเกิด และ หนึ่ง เตียอำรุง, 2541)

2.3.4. <u>ทำให้พืชต้านทานโรคได้ดีขึ้น</u>

ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทำให้พืชมีความทนทานต่อการเกิดโรคพืชทางระบบรากได้ดี เช่น ทำให้พืชมีความทนทานต่อโรคเน่าจากเชื้อสาเหตุโรคพืช *Sclerotium cepivorum* นอกจากนี้การดูดซับธาตุอาหารโดยราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อส่งให้กับพืชนั้น ยังมีส่วนในการส่งเสริมให้พืชมีความแข็งแรงมากขึ้น จึงทำให้พืชสามารถทนทานต่อการเข้าทำลายของศัตรูพืชได้ดี (West, 1995)

2.4. แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting bacteria: PGPB)

แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting bacteria) หรือเรียกสั้น ๆ ว่า PGPB คือ แบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชตามกลไกทั้งทางตรงและทางอ้อม (ภาพที่ 2-9) โดยกลไกทางตรงต่อพืช ได้แก่ ความสามารถในการตรึงไนโตเจน ความสามารถในการเพิ่มธาตุอาหาร เช่น การละลายฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ความสามารถในการผลิตกรดมาละลายแร่ธาตุ เช่น ฟอสเฟต ความสามารถในการสร้างสาร siderophore ในการจับธาตุเหล็ก ซึ่งเป็นแร่ธาตุหลักที่จุลินทรีย์ต้องการ ทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชไม่สามารถนำแร่ธาตุไปใช้ได้ ซึ่งเป็นการควบคุมเชื้อโรคพืชทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช (phytohormone) เช่น auxin (IAA), cytokinin, gibberellin ลดปริมาณ ethylene ในพืช ซึ่งออกซินหรือ indole-3-acetic acid (IAA) เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชที่สามารถทำให้เกิดการแบ่งตัวและยืดตัวของเซลล์ในส่วนที่เป็นลำต้นพืช นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างสาร exopolysaccharides (EPS) หรือไบโอฟิล์มเพื่อยึดเกาะกับสิ่งแวดล้อม โดยไบโอฟิล์มสามารถเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับรากพืชและยังช่วยป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อมอีกด้วย และกลไกทางอ้อมต่อพืช ได้แก่ ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ความสามารถในการกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิคุ้มกัน (systemic resistance) ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อราก่อโรค ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรค ความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช และความสามารถในการเป็นเชื้อปรสิต (parasite) ของเชื้อสาเหตุโรคพืช จะเห็นได้ว่าการใช้แบคทีเรียกลุ่ม PGPB เป็นอีกหนึ่งทางเลือกโดยเฉพาะกับสภาวการณ์ปัจจุบันที่เน้นความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถใช้ทดแทนปุ๋ยเคมี และยาปราบศัตรูพืช แต่อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้ในสภาพจริงยังมีความจำเป็นต้องศึกษาศักยภาพและประสิทธิภาพในพื้นที่แต่ละพื้นที่กับพืชแต่ละชนิดด้วย (หนึ่ง เตียอำรุง และคณะ, 2548)



ภาพที่ 2-9 กลไกที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม

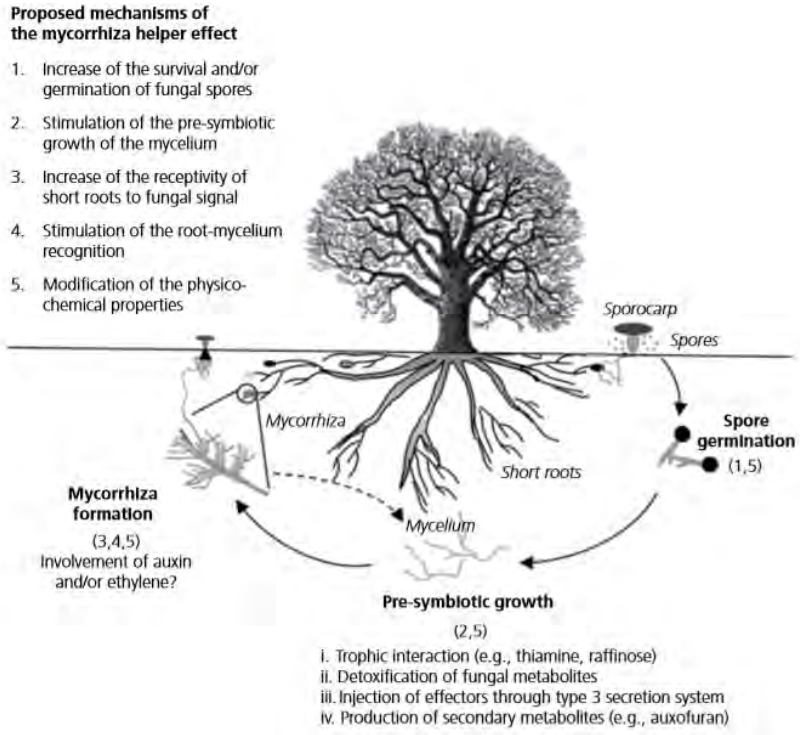
(Premachandra et al., 2016)

2.5. แบคทีเรียที่ส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา (mycorrhiza helper bacteria: MHB)

แบคทีเรียบางชนิดสามารถช่วยส่งเสริมการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยระหว่างราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับพืช เรียกแบคทีเรียเหล่านี้ว่า mycorrhiza helper bacteria (MHB) (Frey-Klett et al., 2007) โดยสามารถพบได้บนเส้นใยรา รากพืชที่มีความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา และในไซโตพลาสซึมของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา แบคทีเรียในกลุ่ม MHB มีกลไกที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาที่หลากหลาย ดังภาพที่ 2-10 เช่น ช่วยเพิ่มการอยู่รอดและการงอกของสปอร์ของรา กระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตของเส้นใยรา ช่วยให้รากพืชที่สั้นสามารถรับรู้สัญญาณจากราได้เพิ่มขึ้น กระตุ้นการรับรู้หรือจดจำกันระหว่างรากกับเส้นใยรา และช่วยปรับเปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่จะเป็นประโยชน์ต่อความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา (Cruz and Ishii, 2012) นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถสังเคราะห์สารอาหารให้กับราและรากพืชได้อีกด้วย กลไกเหล่านี้ถือเป็นประโยชน์ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชอย่างมาก โดยแบคทีเรียที่ส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาสามารถพบได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ในแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus, Brevibacillus, Paenibacillus*, *Rhodococcus, Streptomyces,* และ *Arthrobacter*

ส่วนในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Agrobacterium, Azospirillum, Azotobacter, Burkholderia, Bradyrhizobium, Enterobacter, Pseudomonas, Klebsiella* และ *Rhizobium* (Rigamonte et al., 2010)

จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า *Bacillus pabuli* ที่พบใน *Glomus clarum* ซึ่งเป็นสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในต้นถั่ว มีความสามารถในการส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา โดยสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืชและกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Xavier and Germida, 2003) และพบว่า *Azotobacter chroococcum* ที่พบใน *G. fasciculatum* ซึ่งเป็นสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในต้นมะเขือเทศ (*Lycopersicum esculentum*) มีความสามารถในการส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา โดยสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืช (Bagyaraj and Sreeramulu, 1982) ในปัจจุบันมีแบคทีเรียในกลุ่ม MHB จำนวนมากที่เป็นแบคทีเรียที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPB) เช่น *Pseudomonas* sp. ที่ช่วยเพิ่มผลผลิตชีวมวลในต้น *Catharanthus roseus* ภายใต้ภาวะเครียดจากการขาดน้ำ และยังสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืชอีกด้วย (Rigamonte et al., 2010)



ภาพที่ 2-10 กลไกที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา (Cruz and Ishii, 2012)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1. ขั้นตอนการดำเนินงาน

แปลงไร่อ้อยที่ทำการเก็บตัวอย่างดินจำนวน 3 แปลง อยู่ที่ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ดังแผนที่ในภาพที่ 3-1 และพิกัดบอกตำแหน่งดังตารางที่ 3-1 โดยแต่ละแปลงมีระยะห่างกันประมาณ 2.7 กิโลเมตร แปลงที่ 1 มีขนาดพื้นที่ 4 ไร่ แปลงที่ 2 มีขนาดพื้นที่ 8 ไร่ 3 งาน และแปลงที่ 3 มีขนาดพื้นที่ 4 ไร่ ช่วงเวลาที่ดำเนินการไปเก็บตัวอย่างดิน คือวันที่ 31 สิงหาคม 2562 โดยช่วงที่ไปเก็บตัวอย่างดินนั้นอ้อยมีอายุ 10 เดือน ซึ่งเมื่อ 4 เดือนก่อนหน้า แปลงอ้อยทั้ง 3 แปลงนี้ได้ผ่านการใส่ปุ๋ยยูเรียและฉีดยาฆ่าวัชพืชจำนวน 1 ครั้ง หลังจากเก็บเกี่ยวผลผลิตจะทำการไถตัดใบเพื่อให้เป็นปุ๋ยบำรุงดินและให้ดินหลวมมากขึ้น

ภาพที่ 3-1 แผนที่บอกตำแหน่งจุดเก็บตัวอย่างดินจากแปลงไร่อ้อยทั้ง 3 แปลง

ตารางที่ 3-1 พิกัดบอกตำแหน่งจุดเก็บตัวอย่างดินจากแปลงไร่อ้อยทั้ง 3 แปลง

แหล่งที่มา	พิกัด
แปลงที่ 1	13.986077, 100.011230
แปลงที่ 2	13.986628, 100.024017
แปลงที่ 3	13.988153, 100.001503

3.1.1. การเก็บตัวอย่างดินที่อยู่รอบรากอ้อยจากแปลงเกษตรกรรม

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงไร่อ้อย 3 แปลง โดยจะใช้รหัส NP1, NP2 และ NP3 แทนตัวอย่างจากแปลงที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ โดยกำหนดพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างมีขนาดกว้าง 2 เมตร ยาว 2 เมตร สุ่มเก็บตัวอย่างดินที่ใกล้บริเวณรากอ้อยแปลงละ 4 จุด จุดละประมาณ 0.5 กิโลกรัม โดยขุดดินลึกจากผิวดินประมาณ 30 เซนติเมตร ใส่ถุงพลาสติก ดังแสดงในภาพที่ 3-2 และนำดินไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ภาพที่ 3-2 การเก็บตัวอย่างดินในแปลงไร่อ้อย

3.1.2. การแยกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแปลงไร่อ้อย

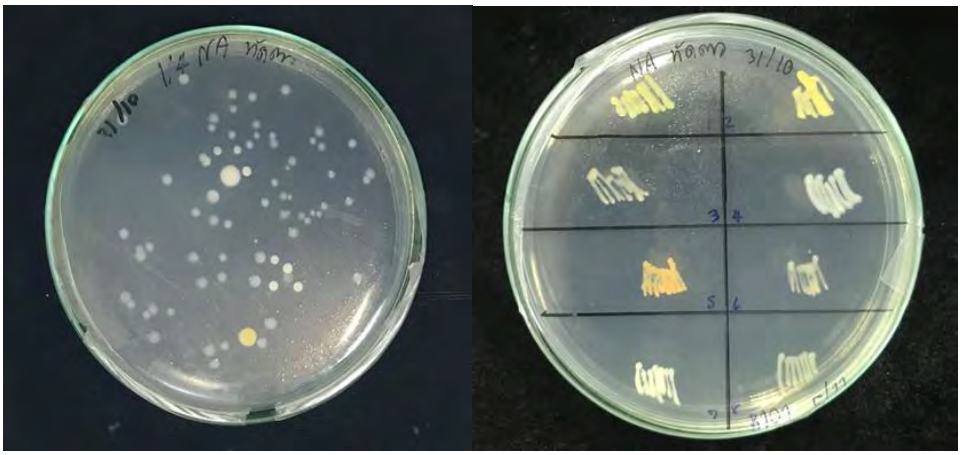
นำตัวอย่างดินจากแปลงไร่อ้อยมาแยกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาตามแหล่งที่มา ด้วยวิธี wet sieving (Brundrett et al., 1996) โดยนำตัวอย่างดิน 100 กรัม ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม จากนั้นนำมาแช่น้ำประปา 1 ลิตร นำสารแขวนลอยดินเทผ่านตะแกรงขนาด 750, 180, 150, 75 และ 45 ไมโครเมตร ตามลำดับ เก็บตะกอนดินจากตะแกรงขนาด 150, 75 และ 45 ไมโครเมตร (ภาพที่ 3-3) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำเพื่อปรับปริมาตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทน้ำทั้งหมดทิ้งจนเหลือแต่ตะกอนดินก้นหลอด เติมสารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ (โดยมวลต่อปริมาตร) ผสมกับตะกอนดินที่เหลือด้วยเครื่อง vortex นำไปปั่นเหวี่ยงต่อด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายแขวนลอยกรองผ่านผ้าไนลอนปลอดเชื้อขนาดรู 20 ไมโครเมตร จากนั้นล้างตะกอนที่อยู่บนผ้าด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 3 ครั้ง และย้ายลงบนบนจานเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำการจัดกลุ่มราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereoscopic microscope) หลังจากนั้นเก็บที่

อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ครั้งต่อไป เพื่อนำสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามาแยกแบคทีเรีย

ภาพที่ 3-3 การแยกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแปลงไร่อ้อย

3.1.3. <u>การแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา</u>

ทำการแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากข้อ 3.1.2 ตามวิธีของ Long และคณะ (2017) โดยการนำตัวอย่างสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แยกได้ภายในแหล่งเดียวกัน มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (โดยมวลต่อปริมาตร) บดสปอร์ให้แตก นำของเหลวที่ได้ เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง nutrient agar (NA) เจือจาง 0.25 เท่า แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกโดยการสุ่มโคโลนีที่แตกต่างกันจำนวนอย่างน้อย 8 โคโลนี มาทำให้บริสุทธิ์โดยการขีดลาก (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA ความเข้มข้นเต็มสูตร จนได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ (ภาพที่ 3-4) จากนั้นจึงเก็บแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหาร NA เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบลักษณะการเป็น PGPB



ภาพที่ 3-4 การแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

3.1.4. การทดสอบลักษณะการเป็น PGPB ของแบคทีเรีย

การตรวจสอบลักษณะการเป็น PGPB ของแบคทีเรีย ตรวจสอบแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 3.1.3 ด้วยลักษณะต่าง ๆ ด้วยวิธีการดังนี้

3.1.4.1. การสร้าง indole-3-acetic acid (IAA)

ตรวจสอบปริมาณ IAA ตามวิธีของ Ahemad และ Khan (2012) โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของทริปโตเฟน (tryptophan) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำสารแขวนลอยแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองและเติมสารละลาย Salkowski reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากัน บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดปริมาณ IAA ที่เกิดขึ้น ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เทียบกับสารละลาย IAA มาตรฐานความเข้มข้น 0-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.1.4.2. การสร้างแอมโมเนีย (NH_3 production)

ตรวจสอบความสามารถในการสร้างแอมโมเนียของแบคทีเรียตามวิธีของ Cappuccino และ Sherman (1996) นำหัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ peptone water ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนด นำสารแขวนลอยแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ใส่หลอดทดลองและเติมสารละลาย Nessler's reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 450 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

3.1.4.3. <u>การสร้างสารในกลุ่ม siderophore</u>

ตรวจสอบการสร้าง siderophore โดยตรวจสอบการสร้างกรดซาลิซิลิคตามวิธีของ Ahemad และ Khan (2012) นำหัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Modi medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนด นำสารแขวนลอยแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสทั้งหมดมาปรับ pH ให้มีค่าเป็น 2.0 ด้วยสารละลายกรดไฮดรอคลอริก (HCl) จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง และเติม ethyl acetate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที และดูดสารละลายส่วนบนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองและเติมสารละลาย Hathway's reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตรวจสอบสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายโซเดียมซาลิซิเลตมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

3.1.4.4. <u>การละลายฟอสเฟต (phosphate solubilization)</u>

ตรวจสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตตามวิธีของ Ahemad และ Khan (2012) ใช้ลูปแตะเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA แต้มลงบนกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด สังเกตการเกิดวงใสบริเวณรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับการเกิดวงใสเพื่อคำนวณหาค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต (phosphate solubilization index; PSI) จากสมการ

$$\text{ดัชนีการละลายฟอสเฟต} = \frac{\text{ผลรวมของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรียกับบริเวณใส}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรีย}}$$

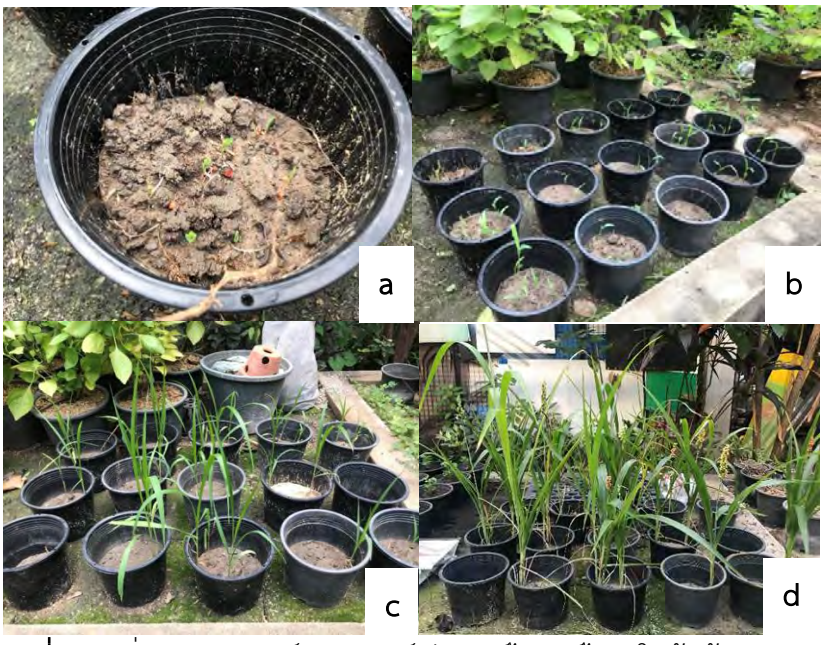
3.1.4.5. <u>การสร้างสาร extracellular polymeric substance (EPS)</u>

ตรวจสอบการสร้างสาร extracellular polymeric substance (EPS) ตามวิธีของ Naseem และ Bano (2014) นำหัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว

NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด นำสารแขวนลอยแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสปริมาตร 500 ไมโครลิตรและหยดสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายเข้ากันและนำไปแช่ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน สังเกตผลิตภัณฑ์ลักษณะวุ้นสีขาวขุ่นเกิดที่เกิดขึ้น

3.1.5. <u>การเพิ่มจำนวนสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในต้นข้าวฟ่าง</u>

เพิ่มจำนวนสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินตัวอย่างที่เก็บได้ในข้อ 3.1.1 โดยทำการเพาะเมล็ดข้าวฟ่างลงในกระถางที่มีดินตัวอย่างผสมกับทราย โดยทรายต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างดินและทรายมาบรรจุในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว ที่ผ่านการทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) จากนั้นใส่เมล็ดข้าวฟ่างลงบนกระถาง กระถางละ 5 เมล็ด ซึ่งเมล็ดข้าวฟ่างต้องผ่านการฆ่าเชื้อบริเวณผิว (surface sterilization) โดยแช่เมล็ดในสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้ายลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ทำการแช่ต่อเป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วย น้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 5 ครั้ง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ เป็นเวลา 3 เดือน (ภาพที่ 3-5)



ภาพที่ 3-5 เพิ่มจำนวนสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในต้นข้าวฟ่าง โดยต้นข้าวฟ่างมีอายุแตกต่างกัน (a) ข้าวฟ่างมีอายุ 2 วัน (b) ข้าวฟ่างมีอายุ 5 วัน (c) ข้าวฟ่างมีอายุ 14 วัน (d) ข้าวฟ่างมีอายุ 3 เดือน

3.1.6. <u>การแยกและจัดกลุ่มราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินรอบรากข้าวฟ่าง</u>

แยกสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในข้อ 3.1.5 ด้วยวิธี wet sieving (Brundrett et al., 1996) เพื่อทำการจัดกลุ่มราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แยกได้โดยอาศัยหลักทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereoscopic microscope) โดยแยกตามแหล่งที่มา ลักษณะของสปอร์ตามคู่มือการจำแนกชนิดราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาของ Souza (2015) และคัดเลือกสปอร์ที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้ไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.1.7. <u>การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้ในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา</u>

นำแบคทีเรียที่มีลักษณะของการเป็น PGPB อย่างน้อย 4 ลักษณะมาทดสอบลักษณะการเป็น MHB ด้วยวิธีการดัดแปลงมาจาก Long และคณะ (2017) นำเอาสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาของแต่ละกลุ่มที่แยกจากดินรอบรากข้าวฟ่างตามแหล่งที่มา โดยแหล่งที่มาละ 45 สปอร์ นำมาผ่านกระบวนการ spore cleaning จากนั้นแช่สปอร์ลงในหัวเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำสปอร์มาวางบนเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง water agar (WA) โดยในแต่ละแหล่งที่มาจะใช้ทั้งหมด 15 เพลทซึ่งจะวางสปอร์ 3 สปอร์ต่อเพลท โดยมีชุดควบคุม (ไม่มีการนำสปอร์ไปแช่ในหัวเชื้อแบคทีเรีย) จำนวน 1 เพลท และชุดทดลอง (นำสปอร์ไปแช่ในหัวเชื้อแบคทีเรีย 1 เพลทต่อหัวเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งในการทดลองนี้มีทั้งหมด 14 หัวเชื้อแบคทีเรีย) จำนวน 14 เพลท บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในตรวจสอบการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา จากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลอง เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์

3.1.8. <u>การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่มีลักษณะการเป็น PGPB และช่วยกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา</u>

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย ตรวจสอบลักษณะโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย สี ลักษณะผิวและขอบของโคโลนีด้วยตาเปล่า จากนั้นทำการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียด้วยวิธีการย้อมแกรม (gram staining) ตรวจสอบรูปร่าง การติดสีย้อมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

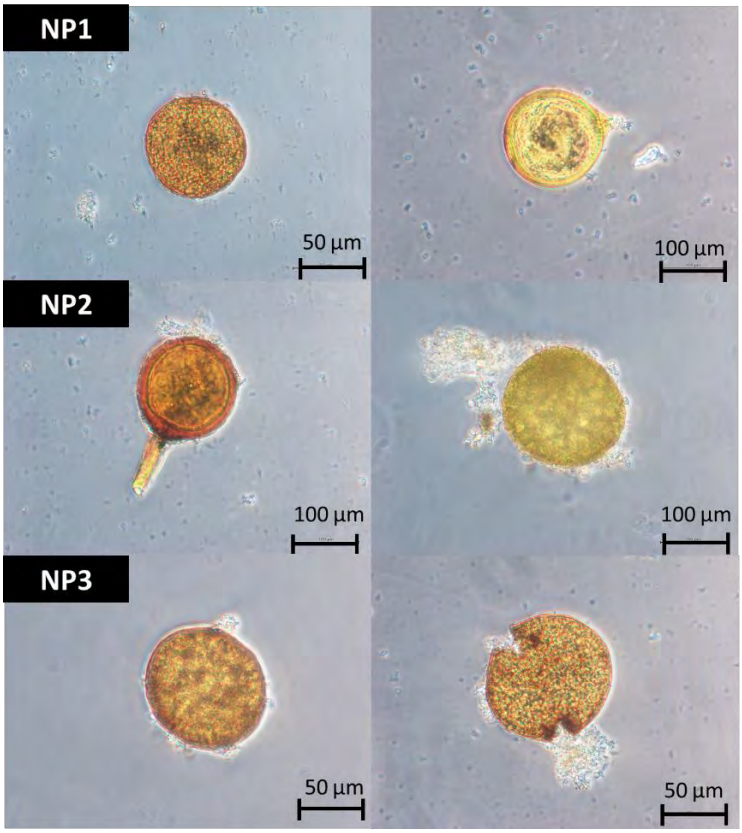
บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1. การแยกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแปลงไร่อ้อย

จากการแยกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินของแปลงไร่อ้อยทั้งหมด 3 แปลง ที่จังหวัดนครปฐม (NP) พบสปอร์ของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะเป็น glomoid โดยในแต่ละแปลงพบสปอร์ที่มีรูปร่างกลม สีน้ำตาล สีส้ม สีเหลืองอ่อน และสีขาว ขนาดของสปอร์ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 100-200 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 4-1 โดยทำการแบ่งสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาตามแหล่งที่มา ดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ลักษณะของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอไรซาที่จำแนกได้

แหล่งที่มา	ไอโซเลท	ลักษณะสปอร์
แปลงที่ 1	NP1	glomoid
แปลงที่ 2	NP2	glomoid
แปลงที่ 3	NP3	glomoid



ภาพที่ 4-1 ลักษณะสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินของแปลงไร่อ้อยทั้งหมด 3 พื้นที่

4.2. การแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากกลุ่มสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทั้ง 3 ไอโซเลท แต่ละไอโซเลทสามารถแยกได้แบคทีเรียที่มีสัณฐานแตกต่าง ดังตารางที่ 4-2 รวมทั้งสิ้น 38 ไอโซเลท

ตารางที่ 4-2 แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

ไอโซเลทสปอร์ที่ใช้ในการแยก	จำนวนแบคทีเรีย (ไอโซเลท)	ไอโซเลทแบคทีเรียที่แยกได้
NP1	16	NP101-NP116
NP2	7	NP201-NP207
NP3	15	NP301-NP315
รวม	38	

4.3. การทดสอบลักษณะการเป็น PGPB ของแบคทีเรีย

จากการนำแบคทีเรียทั้ง 38 ไอโซเลท มาทำการตรวจสอบลักษณะความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting; PGP) จำนวน 5 ลักษณะ ได้แก่ ความสามารถในการสร้าง IAA การสร้างแอมโมเนียม การสร้างสารในกลุ่ม siderophore ความสามารถในการละลายฟอสเฟต และการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีลักษณะของ PGP ที่แตกต่างกัน (ภาคผนวกที่ 1) โดยมีแบคทีเรียจำนวน 24 ไอโซเลท ที่พบว่าไม่มีลักษณะความสามารถของ PGP ตามที่กำหนดไว้ และแบคทีเรียที่มีลักษณะของ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะมีจำนวน 14 ไอโซเลท คิดเป็น 36.84 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้ ได้แก่ NP101, NP107, NP109, NP112, NP115, NP116, NP204, NP303, NP305, NP306, NP307, NP309, NP312 และ NP315 โดยแต่ละไอโซเลทมีลักษณะความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ดังแสดงในตารางที่ 4-3

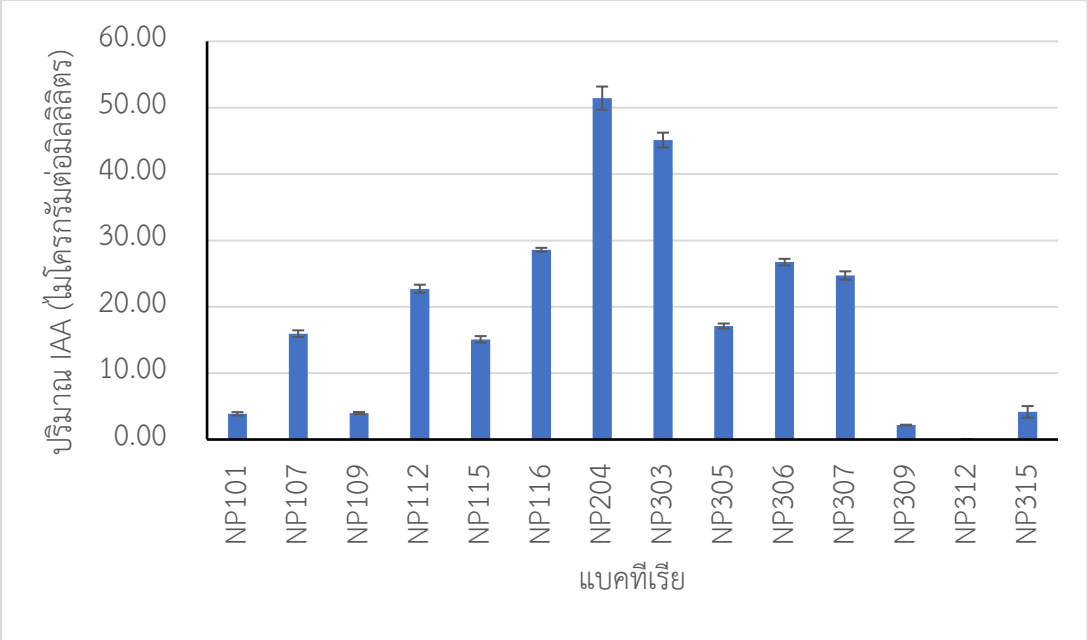
ตารางที่ 4-3 คุณลักษณะความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting; PGP)

ไอโซเลท	การสร้าง IAA	การสร้างแอมโมเนียม	การสร้างสารในกลุ่ม siderophore	การละลายฟอสเฟต	การสร้างไบโอฟิลม์
NP101	+	+	+	+	-
NP107	+	+	-	+	+
NP109	+	+	+	+	+
NP112	+	+	+	+	+
NP115	+	+	+	+	-
NP116	+	+	+	+	-
NP204	+	+	+	+	-
NP303	+	+	+	+	+
NP305	+	+	-	+	+
NP306	+	+	+	+	-
NP307	+	+	+	+	-
NP309	+	-	+	+	+
NP312	-	+	+	+	+
NP315	+	+	+	+	-

+ หมายถึง มีลักษณะดังกล่าว และ - หมายถึง ไม่มีลักษณะดังกล่าว

4.3.1. <u>การสร้าง indole-3-acetic acid (IAA)</u>

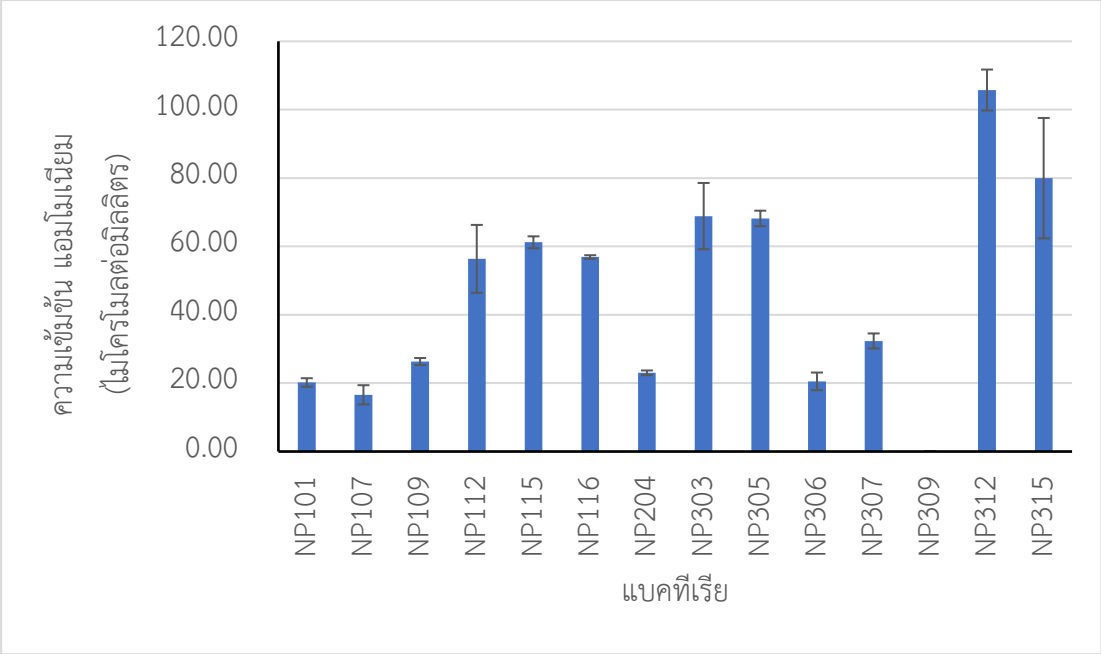
การตรวจสอบลักษณะความสามารถของแบคทีเรียที่ปรากฏลักษณะของ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะจำนวน 14 ไอโซเลท พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลท มีความสามารถในการสร้าง IAA โดยปริมาณของ IAA ที่แบคทีเรียสร้างได้อยู่ในช่วง 2.17-51.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรียที่สามารถสร้าง IAA มีปริมาณสูงที่สุดคือ NP204 ที่ปริมาณ 51.44±1.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 4-2 และมีเพียงแบคทีเรีย NP312 เท่านั้นที่ไม่สามารถสร้าง IAA ได้



ภาพที่ 4-2 ปริมาณการสร้าง IAA ของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะที่สร้างในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) + ทริปโตเฟน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (error bar คือ standard deviation)

4.3.2. สร้างแอมโมเนีย (NH_3 production)

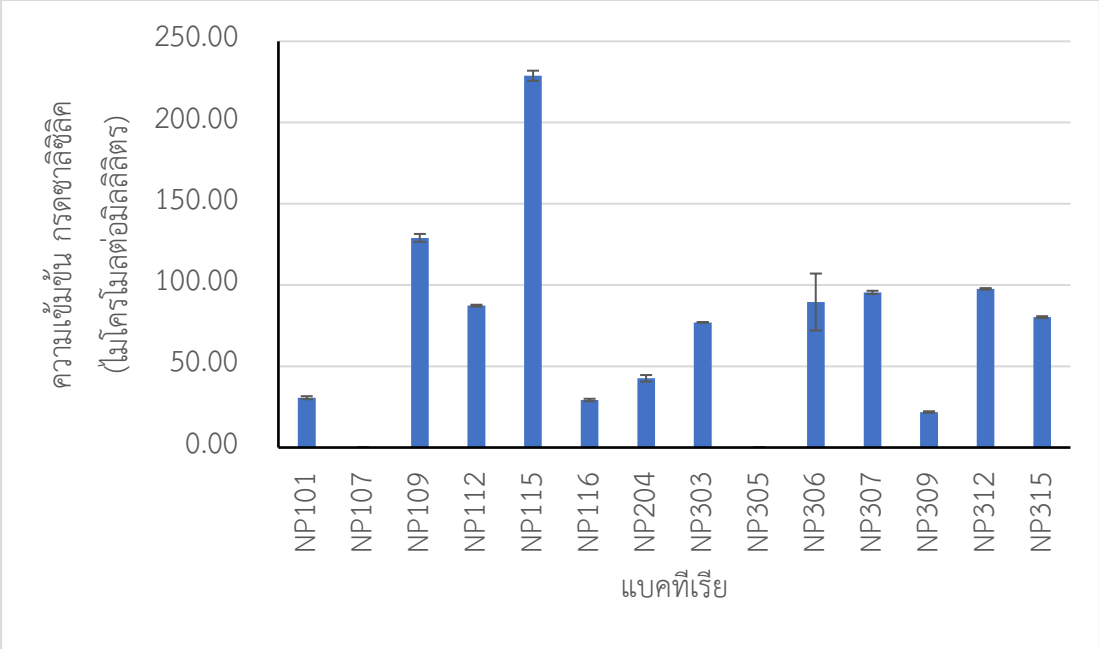
การตรวจสอบความสามารถในการสร้างแอมโมเนียของแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลท ด้วยสารละลาย Nessler's reagent พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างแอมโมเนียได้ โดยความเข้มข้นของแอมโมเนียที่แบคทีเรียสร้างได้อยู่ในช่วง 16.59-105.76 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรียที่สามารถสร้างแอมโมเนียได้ความเข้มข้นสูงที่สุดคือ NP312 ที่ความเข้มข้น 105.76±5.98 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 4-3 และมีเพียงแบคทีเรีย NP309 เท่านั้นที่ไม่สามารถสร้างแอมโมเนียได้



ภาพที่ 4-3 ปริมาณการสร้างแอมโมเนียของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ peptone water (error bar คือ standard deviation)

4.3.3. <u>การสร้างสารในกลุ่ม siderophore</u>

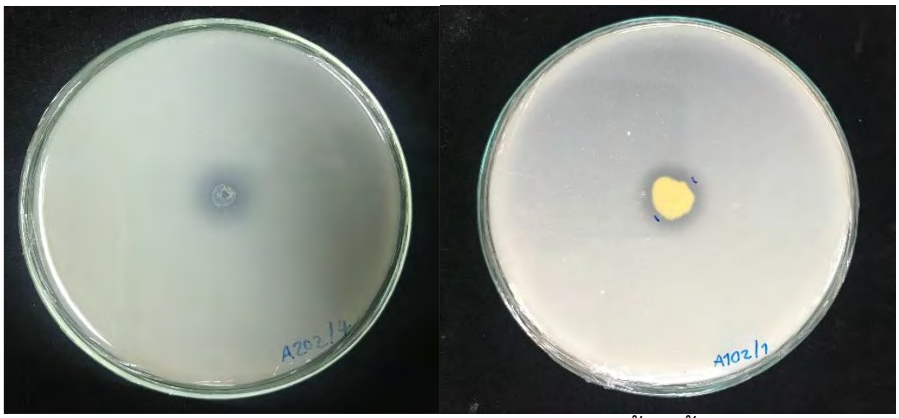
การตรวจสอบความสามารถการสร้างสารในกลุ่ม siderophore ของแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลท ด้วยสารละลาย Hathway's reagent เพื่อตรวจหาปริมาณของกรดซาลิซาลิค ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม siderophore พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างสามารถสร้างกรดซาลิซาลิคได้ โดยความเข้มข้นของกรดซาลิซิลิคที่แบคทีเรียสร้างได้อยู่ในช่วง 21.83-228.82 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารกรดซาลิซิลิคได้สูงที่สุดคือ NP115 ที่ความเข้มข้น 228.82±3.12 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 4-4 และมีเพียงแบคทีเรีย NP107 และ NP305 เท่านั้นที่ไม่สามารถสร้างกรดซาลิซิลิคได้



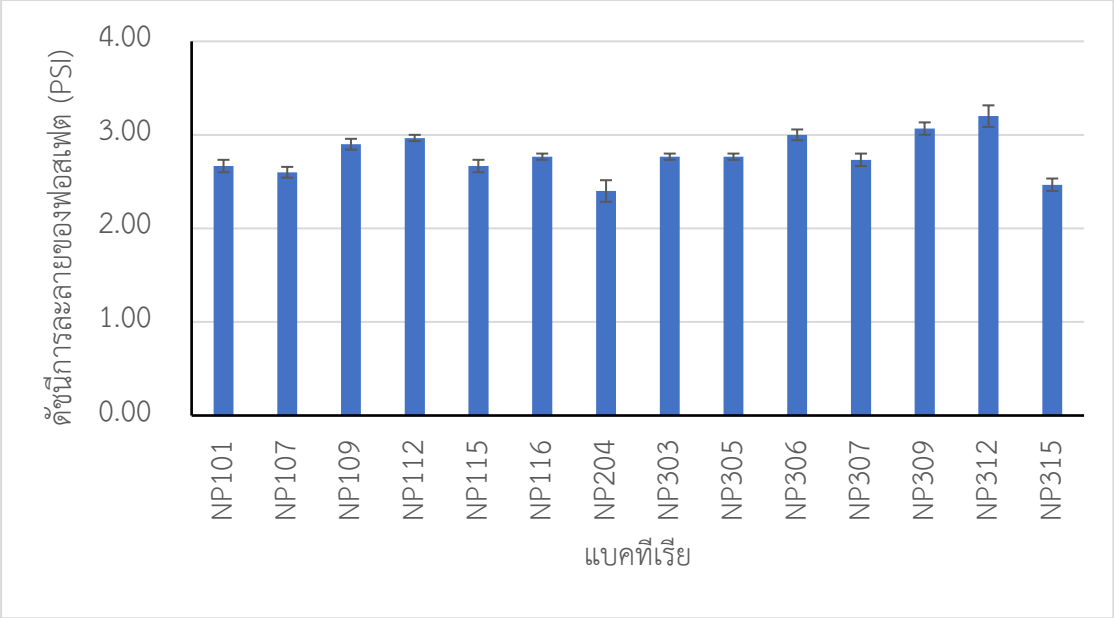
ภาพที่ 4-4 ปริมาณการสร้างกรดซาลิซาลิคของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Modi medium (error bar คือ standard deviation)

4.3.4. <u>การละลายฟอสเฟต (phosphate solubilization)</u>

การทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Pikovskaya's agar พบว่ามีแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างวงใสรอบโคโลนีแบคทีเรียได้ ดังภาพที่ 4-5 ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต โดยแบคทีเรียมีค่าของดัชนีการละลายฟอสเฟตอยู่ในช่วง 2.40-3.20 ซึ่งแบคทีเรียที่มีค่าของดัชนีการละลายฟอสเฟตสูงที่สุดคือ NP312 ที่ค่า 3.20±0.12 ดังภาพที่ 4-6



ภาพที่ 4-5 ลักษณะการสร้างวงใสรอบโคโลนีแบคทีเรียบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar



ภาพที่ 4-6 ดัชนีการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่มีลักษณะ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะ บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's aga (error bar คือ standard deviation)

4.3.5. การสร้างสาร extracellular polymeric substance (EPS)

การทดสอบการสร้าง EPS โดยการตกตะกอนด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ สังเกตการตกตะกอนของสารผลิตภัณฑ์ในส่วนใสของแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลท พบว่ามีส่วนใสแบคทีเรียที่สามารถการตกตะกอนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นวุ้นสีขาวขุ่นจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ NP107, NP109, NP112, NP303, NP305, NP309 และ NP312 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิลม์ ดังตารางที่ 4-3

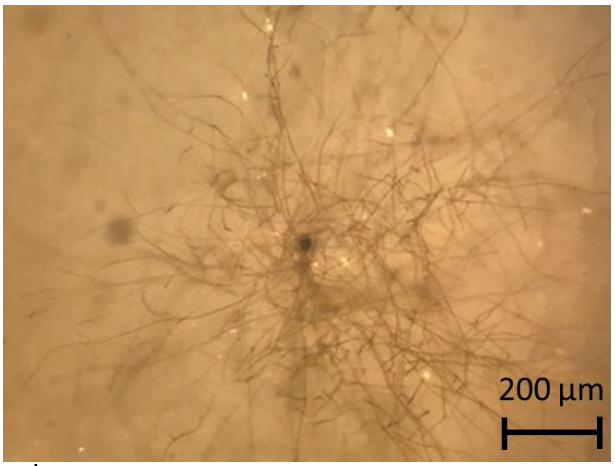
4.4. การเพิ่มจำนวนสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในต้นข้าวฟ่าง

จากการเพิ่มจำนวนสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินตัวอย่างที่เก็บได้ พบว่าสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาไอโซเลท NP1 มีจำนวนสปอร์มากที่สุด พบจำนวนสปอร์เฉลี่ย 68.34±2.15 สปอร์ต่อดิน 100 กรัม และรา NP2 มีจำนวนสปอร์เฉลี่ย 52.16±4.37 สปอร์ต่อดิน 100 กรัม และรา NP3 มีจำนวนสปอร์น้อยที่สุด โดยพบจำนวนสปอร์เฉลี่ย 45.32±5.67 สปอร์ต่อดิน 100 กรัม

4.5. การทดสอบความสามารถของแบคที่เรียที่แยกได้ในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลท มาทดสอบการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์-ไมคอร์ไรซาที่ได้ทำการเพิ่มจำนวน โดยแยกตามแหล่งที่มา ซึ่งจะตรวจสอบการงอกของสปอร์รา อาร์-

บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยการทดสอบบนอาหารแข็ง water agar โดยแบคทีเรียที่กระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้นั้นจะพบการสร้างเส้นใยแบบไม่มีผนังกั้นตามขวาง และมีการงอกเส้นใยจากตัวสปอร์ในรูปแบบ 2 แขนง (dichotomous branching) ดังภาพที่ 4-7 พบว่าภายในเวลา 7 วัน ชุดควบคุมไม่พบการงอกของสปอร์ราเกิดขึ้น มีเพียงแบคทีเรีย NP204 และ NP312 ที่สามารถกระตุ้นการงอกสปอร์ได้ทั้ง 3 แหล่งที่มา ได้แก่ NP1, NP2 และ NP3 โดยแบคทีเรีย NP204 สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP1 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 66.67 เปอร์เซ็นต์ สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP2 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP3 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 66.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบคทีเรีย NP312 สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP1 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP2 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 66.67 เปอร์เซ็นต์ และสามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP3 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้แบคทีเรีย NP112 สามารถกระตุ้นการงอกสปอร์ได้ 2 แหล่งที่มา โดยสามารถกระตุ้นการงอกสปอร์ NP1 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 66.67 เปอร์เซ็นต์ และสามารถกระตุ้นการงอกสปอร์ NP3 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 66.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบคทีเรียที่สามารถกระตุ้นการงอกสปอร์ได้เพียงแค่แหล่งที่มาเดียว คือ NP101, NP107, NP303, NP306 และ NP309 และแบคทีเรียที่ไม่สามารถกระตุ้นการงอกสปอร์ได้เลย คือ NP109, NP115, NP116, NP305, NP307 และ NP315 โดยตารางที่ 4-4 จะแสดงเปอร์เซ็นต์การงอกสปอร์รา



ภาพที่ 4-7 ลักษณะการงอกของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

ตารางที่ 4-4 เปอร์เซ็นต์การงอกสปอร์รา NP1, NP2 และ NP3 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ

ไอโซเลทของแบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การงอก (%)		
	NP1	NP2	NP3
control	-	-	-
NP101	66.67	-	-
NP107	-	-	33.33
NP109	-	-	-
NP112	66.67	-	66.67
NP115	-	-	-
NP116	-	-	-
NP204	33.33	100	66.67
NP303	-	-	100
NP305	-	-	-
NP306	-	-	66.67
NP307	-	-	-
NP309	-	-	66.67
NP312	33.33	66.67	100
NP315	-	-	-

4.6. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่มีลักษณะการเป็น PGPB และช่วยกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

จากผลทดสอบการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา NP1, NP2 และ NP3 ของแบคทีเรีย คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ทั้ง 3 ไอโซเลทคือ NP204 และ NP312 โดยลักษณะโคโลนีของ NP204 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน โคโลนีรูปร่างกลม (circular) และนูนโค้งจากผิวหน้าอาหารแต่ไม่สูงกว่าผิวหน้าอาหารมากนัก (convex) ลักษณะผิวหน้าของโคโลนีเกลี้ยงเกลา (smooth) ริมขอบโคโลนีเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (undulate) และมีลักษณะทึบไม่ให้แสงผ่าน (opaque) และเมื่อทำการย้อมแกรมพบว่าแบคทีเรียมีสัณฐานเป็นรูปแท่ง (rod-shaped) และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนลักษณะโคโลนีของ NP312 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA มีลักษณะโคโลนีสีขาว โคโลนีรูปร่างกลม

(circular) และนูนโค้งจากผิวหน้าอาหารแต่ไม่สูงกว่าผิวหน้าอาหารมากนัก (convex) ลักษณะผิวหน้าของโคโลนีเกลี้ยงเกลา (smooth) ริมขอบโคโลนีเกลี้ยงไม่มีรอยหักเว้า (entire) และมีลักษณะโปร่งแสงพอประมาณ คล้ายกระจกฝ้า (translucent) และเมื่อทำการย้อมแกรมพบว่าแบคทีเรียมีสัณฐานเป็นรูปแท่ง (rod-shaped) และเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

ในการแยกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินของแปลงไร่อ้อยทั้งหมด 3 แปลง ที่จังหวัดนครปฐม โดยตรวจสอบจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา พบสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีลักษณะเป็น glomoid ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายของชนิดสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในไร่อ้อยที่รัฐทมิฬนาฑูทางภาคใต้ของประเทศอินเดีย ที่พบราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะสปอร์แบบ glomoid, acaulosporoid และ gigasporoid ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 4 สกุล ได้แก่ *Acaulospora, Gigaspora, Glomus,* และ *Scutellospora* ใน 4 สกุลนี้ *Glomus* ถูกพบมากที่สุด โดยชนิดที่โดดเด่นคือ *G. mosseae* และ *G. fasciculatum* (Sivakumar, 2012) ซึ่งสปอร์มีลักษณะเป็น glomoid เช่นเดียวกับการสำรวจราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินไร่อ้อยที่จังหวัดซูลาเวซีใต้ ประเทศอินโดนีเซีย ที่พบสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในวงศ์ Glomaceae, Acaulosporaceae และ Gigasporaceae ซึ่งสามารถจำแนกได้หลายสกุล เช่น *Glomus, Gigaspora, Acaulospora, Scutellospora* และ*Sclerocystis* เป็นต้น (Kumalawati et al., 2014) จะเห็นได้ว่าในแต่ละพื้นที่จะพบความหลากหลายของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สภาพภูมิอากาศ ลักษณะทางเคมีกายภาพของดินบริเวณนั้น ไม่ว่าจะเป็นลักษณะเนื้อดิน และค่า pH ของดิน โดยเนื้อดินอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชเช่นเดียวกับประสิทธิภาพของไมคอร์ไรซาในรูปแบบต่าง ๆ เช่น การระบายน้ำ การระบายอากาศ และการได้รับสารอาหารในดิน ส่วนค่า pH ของดิน มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอาหารและไอออนในดิน ซึ่งทั้งหมดนี้มีผลต่อความหนาแน่นของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเป็นอย่างมาก (Sivakumar, 2012) นอกจากนี้การใช้ปุ๋ยเคมีในพื้นที่เพาะปลูกก็ถือเป็นปัจจัยสำคัญต่อความหลากหลายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอีกด้วย เนื่องจากการใช้ปุ๋ยเคมีที่มีธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณที่สูง สามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและการเข้าอยู่ในรากพืชได้ เนื่องจากราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีบทบาทสำคัญต่อการเป็นแหล่งฟอสฟอรัสให้กับพืช เมื่อมีการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในพื้นที่ จึงส่งผลให้บทบาทของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาลดลง การเข้าอยู่ร่วมกันของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากพืชจึงลดลงด้วยเช่นกัน (Tang et al., 2001) ซึ่งสอดคล้องกับแปลงไร่อ้อยที่ทำการศึกษาทั้ง 3 แปลง ที่มีประวัติการใช้ปุ๋ยเคมีมาก่อน จึงทำให้มีความหลากหลายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่น้อยมาก และการที่แปลงไร่อ้อยที่ทำการศึกษาทั้ง 3 แปลง พบสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีลักษณะเป็น glomoid เหมือนกัน อาจเป็นเพราะทั้ง 3 แปลงตั้งอยู่ในพื้นที่ใกล้กัน (ตำบลเดียวกัน) ทำให้มีลักษณะทางกายภาพของเนื้อดินที่เหมือนกันคือเป็นดินร่วนปนเหนียว รวมถึงความแปรปรวนและการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศที่ไม่แตกต่างกันมาก

นัก นอกจากนี้แต่ละแปลงยังมีรูปแบบการทำการเกษตรที่เหมือนกัน ได้แก่ การใช้ปุ๋ยเคมี การเตรียมดิน ช่วงเวลาในการเริ่มเพาะปลูก ทั้งหมดนี้จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ทั้ง 3 แปลงพบสปอร์ในลักษณะเดียวกัน และลักษณะสปอร์แบบ glomoid เป็นลักษณะสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในวงศ์ Glomaceae ซึ่งพบมากที่สุดในไร่อ้อย เนื่องจากคุณสมบัติของดินในไร่อ้อยที่มีความเป็นกลางถึงด่างเล็กน้อย ซึ่งเหมาะสำหรับสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในวงศ์ Glomaceae (Datta and Kulkarni, 2012)

การแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสามารถแยกแบคทีเรียที่มีสัณฐานแตกต่างกันได้ทั้งหมด 38 ไอโซเลท พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จำนวน 14 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จะปรากฏลักษณะของ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะ ได้แก่ ความสามารถในการสร้าง IAA สร้างแอมโมเนียม สร้างสารในกลุ่ม siderophore และมีความสามารถในการละลายฟอสเฟต ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ahmad และคณะ (2008) ที่ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะการเป็น PGPB โดยพบว่ามีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Azotobacter* spp., *P. fluorescent, Mesorhizobium ciceri* และ *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ โดยสามารถสร้าง IAA สร้างแอมโมเนียม สร้างสารในกลุ่ม siderophore และมีความสามารถในการละลายฟอสเฟต นอกจากนี้ยังมีการศึกษาแบคทีเรีย *P. putida* โดยพบว่าเป็นแบคทีเรียที่ลักษณะของ PGP ครบทั้ง 5 ลักษณะ ได้แก่ มีความสามารถในการสร้าง IAA ในปริมาณ 34±1.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการสร้างแอมโมเนียม มีการสร้างสารในกลุ่ม siderophore ที่ความเข้มข้น 41±1.5 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต ซึ่งค่าของดัชนีการละลายฟอสเฟตเท่ากับ 1.8 และมีการสร้างไบโอฟิล์ม (Ahemad and Khan, 2012) ซึ่งปริมาณสารต่าง ๆ ที่สร้างได้มีความสอดคล้องและอยู่ในช่วงของปริมาณสารที่สร้างได้ของการศึกษาในครั้งนี้ และยังพบการยืนยันว่าแบคทีเรีย *P. putida* มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศภายใต้สภาวะเรือนกระจกอีกด้วย (Almaghrabi et al., 2013) นอกจากนี้ปริมาณการสร้าง IAA ในช่วงดังกล่าวนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยพบว่า *B. subtilis, Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. และ *Cronobacter malonaticus* มีการสร้าง IAA อยู่ในช่วง 14-23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นถั่วได้ โดยวัดจากความสูงของลำต้น น้ำหนักสดของลำต้น น้ำหนักแห้งของลำต้น และความยาวรากที่มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Bhatt and Vyas, 2014)

จากผลการทดสอบแบคทีเรียที่มีลักษณะของ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะต่อการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทั้ง 3 แหล่งที่มาที่มีลักษณะสปอร์แบบ glomoid ได้แก่ NP1, NP2 และ NP3 พบว่ามีเพียงแบคทีเรีย NP204 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกและ NP312 เป็น

แบคทีเรียแกรมลบ ที่สามารถกระตุ้นการงอกสปอร์ได้ทั้ง 3 แหล่งที่มา จากการศึกษาก่อนหน้านี้ มีรายงานพบแบคทีเรีย *B. pabuli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่แยกได้จากสปอร์ *G. clarum* ซึ่งเป็นสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในต้นถั่ว มีความสามารถในการส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา โดยสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในรากพืชและกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Xavier and Germida, 2003) โดยพบว่าแบคทีเรียสามารถสร้าง chitinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสารไคตินที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ส่งผลทำให้สปอร์ราสามารถงอกได้ดีขึ้น (Bharadwaj et al., 2008) โดยจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียสามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ที่มาจากแหล่งที่มาเดียวกันได้มากที่สุด นั่นคือแบคทีเรีย NP204 สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP2 มากที่สุด เช่นเดียวกับแบคทีเรีย NP312 ที่สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP3 มากที่สุด นอกจากนี้แบคทีเรียไอโซเลทอื่น ๆ ที่มีความสามารถในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ ก็ให้ผลในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ที่มาจากแหล่งที่มาเดียวกันได้มากที่สุดเช่นกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Bharadwaj และคณะ (2008) ที่ได้แยกแบคทีเรียจากสปอร์ *G. mosseae* ซึ่งเป็นสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในต้นมันฝรั่ง โดยพบว่าแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas, Stenotrophomonas* และ *Arthrobacter* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซา โดยสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของสปอร์ *G. mosseae* ในรากมันฝรั่งได้ ซึ่งแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของสปอร์ *G. mosseae* ได้สูงที่สุด จากนั้นได้นำแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. ไปทดสอบเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดอื่น พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของสปอร์ *G. mosseae* ได้สูงกว่าสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดอื่นถึง 2 เท่า จะเห็นได้ว่าผลที่ได้เป็นเช่นเดียวกันกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่แบคทีเรียจะสามารถส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาได้ดีในสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แยกแบคทีเรียนั้น ๆ ออกมา ซึ่งเป็นผลมาจากความจำเพาะระหว่างราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับแบคทีเรีย โดยความจำเพาะนี้ขึ้นปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ชนิดของแบคทีเรีย ปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ (Requena et al., 1997) ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ (Krishna et al., 1982) ชนิดของพืช และพื้นที่ในการเพาะปลูก อย่างไรก็ตามแม้ว่าผลทดสอบในชุดควบคุมของงานวิจัยนี้จะไม่พบการงอกของสปอร์ แต่ในการทดลองนี้ผู้วิจัยสังเกตผลในระยะเวลาเพียง 7 วัน ซึ่งอาจไม่เพียงพอ เนื่องจากโดยทั่วไปสปอร์ราจะใช้เวลาในการงอกประมาณ 1-3 สัปดาห์ (Mukherjee and Ané, 2011) ดังนั้นหากตรวจสอบผลในระยะเวลาที่มากกว่า 7 วัน อาจทำให้เห็นผลได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น แต่ในบางชุดทดลองที่พบการงอกของสปอร์ภายใน 7 วัน อาจเป็นเพราะว่าแบคทีเรียมีบทบาทในการเร่งการงอกของสปอร์ราจากความสามารถในการผลิต chitinase ซึ่งสามารถย่อยสลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของสปอร์รา

อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Bharadwaj et al., 2008) ทำให้บางชุดการทดลองที่มีแบคทีเรียสามารถช่วยกระตุ้นให้มีการงอกของสปอร์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าราไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากการทดลองนี้มีศักยภาพในการที่จะสามารถพัฒนาเป็นหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของอ้อย และการนำความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่มีต่อพืชมาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ที่มีคุณสมบัติที่สนับสนุนการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยระหว่างราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับพืช โดยมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา มาผสมร่วมกับหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา จะส่งเสริมให้พัฒนาเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์หรือปุ๋ยชีวภาพที่ประสิทธิภาพสูงและเหมาะสมต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียและราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้จากการทดลองนี้ที่มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและผลผลิตของอ้อยทั้งในระดับโรงเรือนและแปลงทดลองยังมีความจำเป็นและสำคัญที่ต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

จากผลการแยกสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างดินของแปลงไร่อ้อยทั้งหมด 3 แปลง ที่จังหวัดนครปฐม (NP) ได้แก่ NP1, NP2 และ NP3 พบสปอร์ของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีลักษณะเป็น glomoid จากนั้นทำการแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับสปอร์ของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากกลุ่มสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาทั้ง 3 แหล่งที่มา แต่ละแหล่งที่มาสามารถแยกได้แบคทีเรียที่มีสัณฐานแตกต่าง รวมทั้งสิ้น 38 ไอโซเลท จึงทำการตรวจสอบคุณลักษณะความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting; PGP) จำนวน 5 ลักษณะ ได้แก่ ความสามารถในการสร้าง IAA การสร้างแอมโมเนียม การสร้างสารในกลุ่ม siderophore ความสามารถในการละลายฟอสเฟต และการสร้างไบโอฟิล์ม พบแบคทีเรียที่มีลักษณะของ PGP อย่างน้อย 4 ลักษณะมีจำนวน 14 ไอโซเลท คิดเป็น 36.84 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้ ได้แก่ NP101, NP107, NP109, NP112, NP115, NP116, NP204, NP303, NP305, NP306, NP307, NP309, NP312 และ NP315 โดยแบคทีเรียที่สามารถสร้าง IAA มีปริมาณสูงที่สุดคือ NP204 ที่ปริมาณ 51.44±1.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียที่สามารถสร้างแอมโมเนียได้ความเข้มข้นสูงที่สุดคือ NP312 ที่ความเข้มข้น 105.76±5.98 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียที่สามารถสร้างสารกรดซาลิซิลิคซึ่งเป็นสารในกลุ่ม siderophore ได้สูงที่สุดคือ NP115 ที่ความเข้มข้น 228.82±3.12 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียที่มีค่าของดัชนีการละลายฟอสเฟตสูงที่สุดคือ NP312 ที่ค่า 3.20±0.12 และแบคทีเรียที่สามารถสร้างไบโอฟิลม์มีจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ NP107, NP109, NP112, NP303, NP305, NP309 และ NP312 เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลทมาทดสอบการกระตุ้นการงอกของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาโดยแยกตามแหล่งที่มา พบว่าภายในเวลา 7 วัน มีเพียงแบคทีเรีย NP204 และ NP312 ที่สามารถกระตุ้นการงอกสปอร์ได้ทั้ง 3 แหล่งที่มา ได้แก่ NP1, NP2 และ NP3 โดยแบคทีเรีย NP204 สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP1 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 66.67 เปอร์เซ็นต์ สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP2 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP3 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 66.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบคทีเรีย NP312 สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP1 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP2 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 66.67 เปอร์เซ็นต์ และสามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ NP3 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบคทีเรียจะกระตุ้นการงอกของสปอร์ที่มาจากแหล่งที่มาเดียวกันได้มากที่สุด และเมื่อนำแบคทีเรีย NP204 และ NP312 มาศึกษาลักษณะสัณฐาน

วิทยาของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรีย NP204 มีสัณฐานเป็นรูปแท่ง (rod-shaped) และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรีย NP312 มีสัณฐานเป็นรูปแท่ง (rod-shaped) และเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จากผลการศึกษานี้จึงสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาในดินไร่อ้อยได้ 2 ไอโซเลท นั่นคือ NP204 และ NP312 ซึ่งเหมาะต่อการนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อชีวภาพทางการเกษตรต่อไป

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ทำการแยกแบคทีเรียจากสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มาจากตัวอย่างดินของแปลงไร่อ้อย จังหวัดนครปฐม ดังนั้นไอโซเลทของแบคทีเรียที่ได้จึงมีความจำเพาะต่อพื้นที่ ชนิดของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และชนิดของพืช สำหรับการนำไปใช้ประโยชน์จึงควรคำนึงถึงความจำเพาะดังกล่าว

6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

สำหรับการศึกษาในอนาคตควรระบุชนิดของสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียช่วยส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาด้วยเทคนิคอณูวิทยา และควรทำการศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของอ้อย เพื่อเป็นการยืนยันว่าแบคทีเรียไอโซเลทนั้น ๆ สามารถส่งเสริมความสัมพันธ์แบบไมคอร์ไรซาและมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ้อยได้จริง

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กิตติมา ด้วงแค. 2548. เห็ดราไมคอร์ไรซา. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.dnp.go.th/foremic/fmo/mycorrhiza.htm [25 มกราคม 2563]

ธนากร แสงสง่า. 2557. พีจีพีอาร์ บทบาทในการส่งเสริมและป้องกันภายใต้สภาวะเครียด. วารสารสำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22: 553–570.

นันทกร บุญเกิด และ หนึ่ง เตียอำรุง. 2541. รายงานการวิจัยการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมและไมโครไรซ่าเพื่อเพิ่มผลผลิตพืชตระกูลถั่วให้เป็นอาหารสัตว์. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

วิฑูรย์ ปัญญากุล. 2547. เกษตรยั่งยืน วิถีการเกษตรเพื่ออนาคต. กรุงเทพมหานคร: มูลนิธิสายใยแผ่นดิน.

เศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2562. สถิติการส่งออกน้ำตาล. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://impexp.oae.go.th/service/export.php [16 ธันวาคม 2562]

หนึ่ง เตียอำรุง, กมลลักษณ์ เทียมไธสง และนันทกร บุญเกิด. 2548. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). วารสารเทคโนโลยีสุรนารี. 12(3): 249–25.

ภาษาอังกฤษ

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.

Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M. S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research. 163(2): 173–181.

Almaghrabi, O. A., Massoud, S. I. and Abdelmoneim, T. S. 2013. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. Saudi Journal of Biological Sciences. 20(1): 57–61.

Amballa, H. and Bhumi, N. R. 2016. Significance of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere microflora in plant growth and nutrition. In Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture (pp. 417–452): Springer.

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.

Baum, C., Gruda, N. and EI-Tohamy, W. A. 2015. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: a review. Scientia Horticulturae. 187: 131–141.

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.

Bhatt, P. V. and Vyas, B. R. M. 2014. Screening and characterization of plant growth and health promoting rhizobacteria. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(6): 139–155.

Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. and Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Murdoch University: ACIAR Monograph.

Cappuccino, J. G. and Sherman, N. 1996. Microbiology: A laboratory manual. 3rd ed. New York: Benjamin/Cummings Pub. Co.

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.

Dalpe, Y. 2005. Mycorrhizae: a potential tool for plant protection but not panacea. Phytoprotection. 86: 53–59.

Datta, P. and Kulkarni, M. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity in sugarcane rhizosphere in relation with soil properties. Notulae Scientia Biologicae. 4(1): 66–74.

Faber, B. A., Zasoski, R. J., Munns, D. N. and Shackel, K. 1991. A method for measuring hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants. Canadian Journal of Botany. 69(1): 87–94.

Frey-Klett, P., Garbaye, J. and Tarkka, M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. New Phytologist. 176: 22–36.

Harley, J. L. and Smith, S. E. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press.

Krishna, K. R., Balakrishna, A. N. and Bagyarajf, D. J. 1982. Interaction between a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus and *Streptomyces cinnamomeous* and their effects on finger millet. New Phytologist. 92(3): 401–405.

Kumalawati, Z., Musa, Y., Amin, N., Asrul, L. and Ridwan, I. 2014. Exploration of arbuscular mycorrhizal fungi from sugarcane rhizosphere in South Sulawesi. International Journal of Scientific and Technology Research. 3(1): 201–203.

Lenoir, I. Fontaine, J. and Sahraoui, L. H. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: a review. Phytochemistry. 123: 4–15.

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: 8.

Marschner, H. and Dell, B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. Plant and Soil. 159(1): 89–102.

Mukherjee, A. and Ané, J. M. 2011. Germinating spore exudates from arbuscular mycorrhizal fungi: molecular and developmental responses in plants and their regulation by ethylene. Molecular Plant-Microbe Interactions. 24(2): 260–270.

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.

Poomipan, P. 2013. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant, soil and environment. Thai Journal of Science and Technology. 2: 91–101.

Poomipan, P., Suwanarit, A., Suwanarit, P., Nopamornbodi, O. and Dell, B. 2011. Reintroduction of a native Glomus to a tropical Ultisol promoted grain yield in maize after fallow restored the density of arbuscular mycorrhizal fungal spores. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 174: 257–268.

Premachandra, D., Hudek, L. and Brau, L. 2016. Bacterial modes of action for enhancing of plant growth. Journal of Biotechnology and Biomaterials. 6(3): 1–8.

Requena, N., Jimenez, I., Toro, M. and Barea, J. M. 1997. Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystems. The New Phytologist. 136(4): 667–677.

Rigamonte, T. A., Pylro, V. S. and Duarte, G. F. 2010. The role of mycorrhization helper bacteria in the establishment and action of ectomycorrhizae associations. Brazilian Journal of Microbiology. 41(4): 832–840.

Sivakumar, N. 2012. Effect of edaphic factors and seasonal variation on spore density and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in sugarcane fields. Annals of Microbiology. 63(1): 151–160.

Smith, S. E. and Read, D. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. 3rd ed. London: Academic Press.

Smith, S. E., Facelli, E., Pope, S. and Smith, F. A. 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. Plant Soil. 326: 3–20.

Souza, T. 2015. Glomeromycota classification. In Handbook of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (pp. 87–128): Springer.

Stürmer, S. L. and Morton, J. B. 1999. Taxonomic reinterpretation of morphological characters in Acaulosporaceae based on developmental patterns. Mycologia. 91(5): 849–857.

Surendran, U. and Vani, D. 2013. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi in sugarcane productivity under semiarid tropical agro ecosystem in India. International Journal of Plant Production. 7(2): 269–278.

Tang, F., White, J. A. and Charvat, I. 2001. The effect of phosphorus availability on arbuscular mycorrhizal colonization of *Typha angustifolia*. Mycologia. 93(6): 1042–1047.

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.

West, H. 1995. Soil phosphate status modifies response of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Senecio vulgaris* L. to infection by the rust, *Puccinia lagenophorae* Cooke. New Phytologist. 129(1): 107–116.

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.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารเคมีในการทดลอง

1. สารละลาย Salkowski reagent

Ferric chloride	6.76	กรัม
70% perchloric acid	50	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. สารละลาย Nessler’s reagent

สารละลาย ก

Potassium iodine	3.5	กรัม
น้ำกลั่น	15	มิลลิลิตร

สารละลาย ข

Mercury (II) chloride	1.7	กรัม
น้ำกลั่น	30	มิลลิลิตร

สารละลาย ค

Sodium hydroxide	12	กรัม
น้ำกลั่น	15	มิลลิลิตร

ค่อย ๆ เติมสารละลาย ข ลงในสารละลาย ก พร้อมเขย่าให้สารละลายเข้ากันตลอดการเท จนกระทั่งเกิดตะกอนสีแดงอย่างถาวร (โดยสารละลาย ข ยังคงเหลืออยู่) จากนั้นเติมสารละลาย ค ลงไปเพื่อเจือจาง จากนั้นค่อย ๆ เติมสารละลาย ข ที่เหลือจนกระทั่งเกิด ตะกอนขุ่นเล็กน้อย นำสารละลาย Nessler’s reagent ที่ได้เก็บใส่ขวดสีชาเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. สารละลาย Hathway's reagent

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

ภาคผนวกที่ 2 สูตรอาหาร

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

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว peptone water

Peptone	1	กรัม
Sodium Chloride	0.5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Modi medium

Potassium hydrogen phosphate	0.05	กรัม
Sodium chloride	0.01	กรัม
Magnesium chloride	0.04	กรัม
Mannitol	1	กรัม
Glutamine	0.1	กรัม
Ammonium nitrate	0.1	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Pikovskaya’s Agar

Yeast extract	0.05	กรัม
Dextrose	1	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

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง water agar (WA)

ผงวุ้น	1.5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวกที่ 3 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

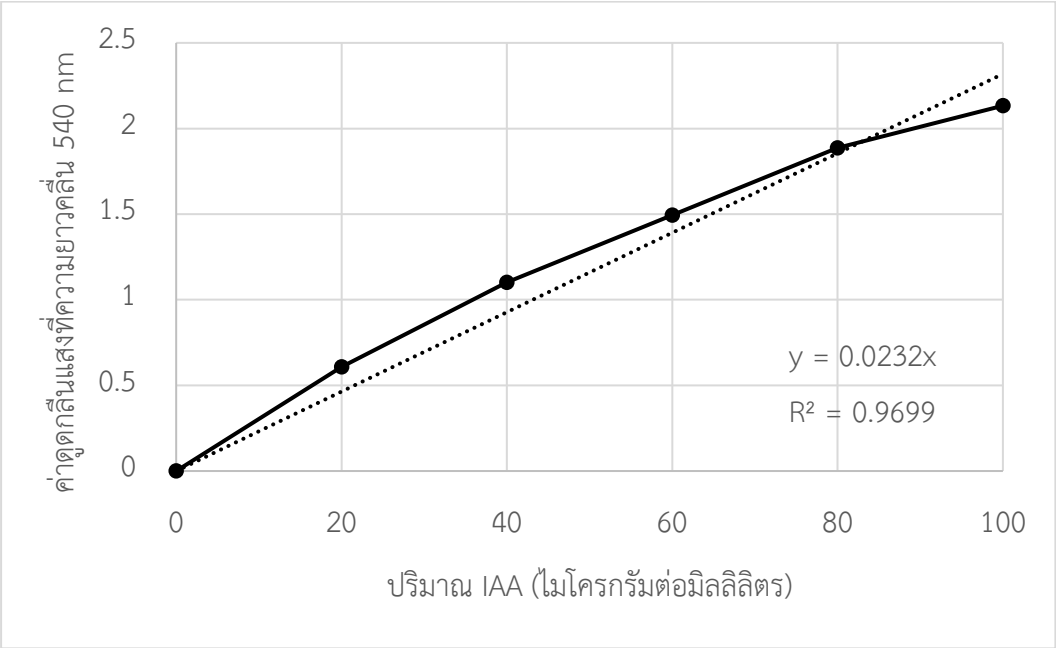
แตะโคโลนีเดี่ยวของแบคทีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ข้ามคืน จากนั้นดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 50 ไมโครลิตร ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ดูดสารละลายแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียที่ตกตะกอนด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (โดยมวลต่อปริมาตร) เป็นจำนวน 2 รอบ จากนั้นปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรียด้วยน้ำเกลือ ให้สารแขวนลอยแบคทีเรียมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรที่ 0.8 (OD_{600}=0.8) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง

ภาคผนวกที่ 4 spore cleaning

แช่สปอร์ใน 2% chloramine-T ใน 0.1% tween 20 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ รอบ และนำสปอร์ไปจุ่มใน antibiotic (200 mg/L streptomycin + 200 mg/L amplicilin) จากนั้นล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั้นหลาย ๆ รอบ

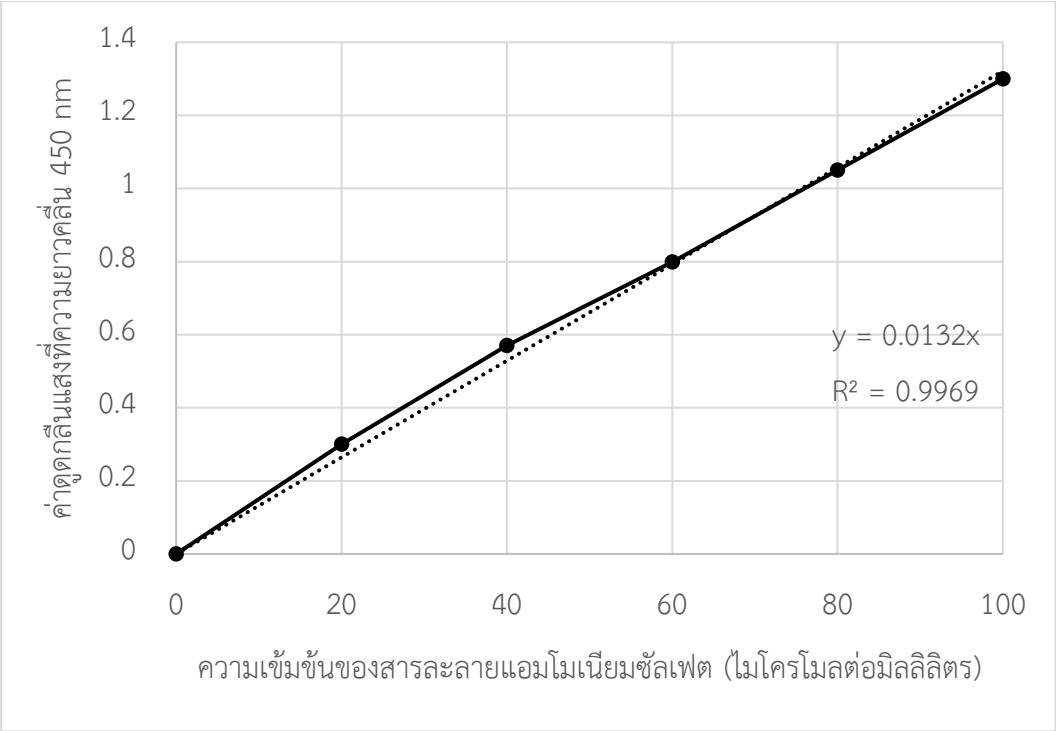
ภาคผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐาน

1. กราฟ IAA มาตราฐาน



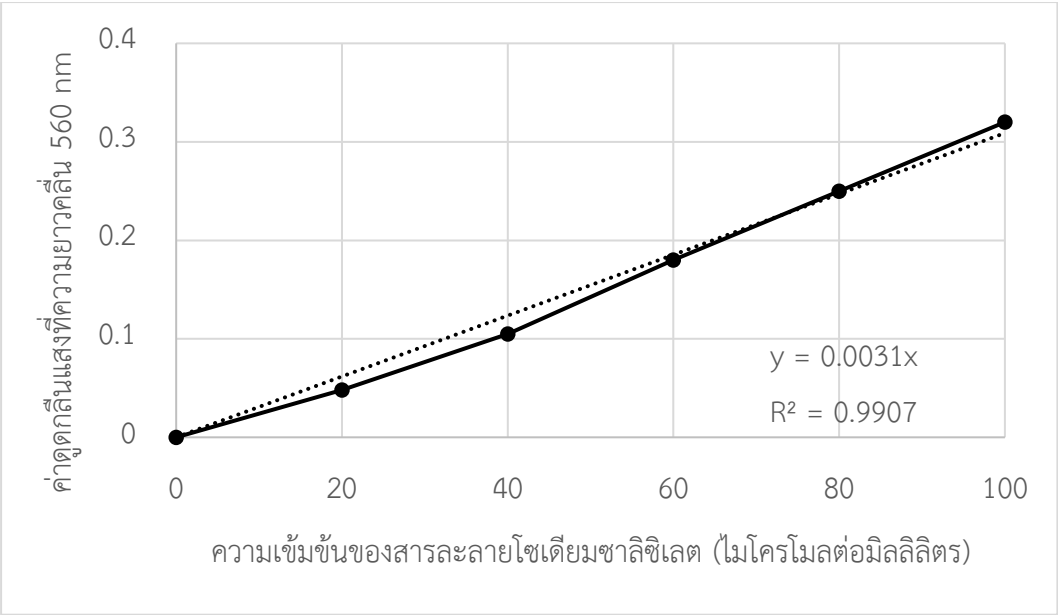
ภาพที่ 0-1 กราฟ IAA มาตรฐาน

2. กราฟสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตมาตราฐาน



ภาพที่ 0-2 กราฟสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตมาตราฐาน

3. กราฟสารละลายโซเดียมซาลิซิเลตมาตราฐาน



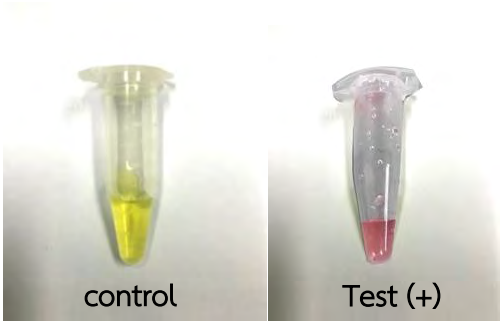
ภาพที่ 0-3 กราฟสารละลายโซเดียมซาลิซิเลตมาตราฐาน

ภาคผนวกที่ 6 ผลการทดสอบการเป็น PGPB ของแบคทีเรียทั้ง 38 ไอโซเลตที่แยกได้จากสปอร์ราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

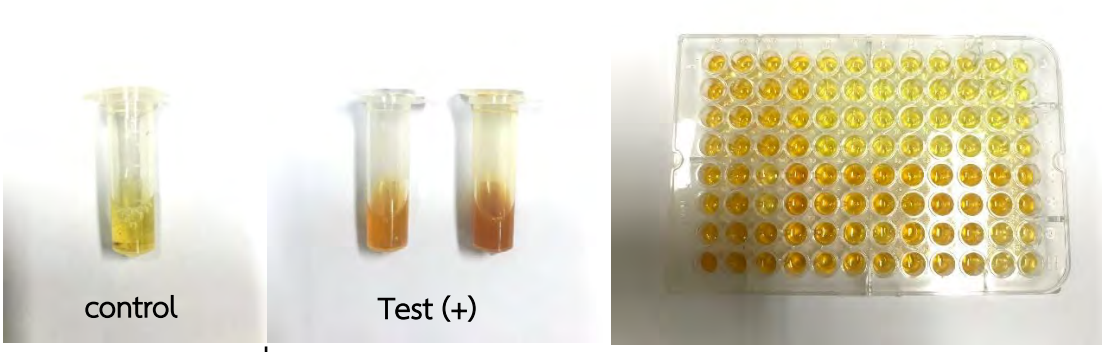
ไอโซเลท	การสร้าง				การละลายฟอสเฟต	จำนวนลักษณะ PGP
	IAA	NH_3	siderophore	EPS		
NP101	+	+	+	-	+	4
NP102	-	-	-	-	-	0
NP103	-	+	-	-	+	2
NP104	-	+	-	-	+	2
NP105	+	-	-	-	-	1
NP106	-	+	+	-	+	3
NP107	+	+	-	+	+	4
NP108	-	-	-	-	-	0
NP109	+	+	+	+	+	5
NP110	-	+	+	-	+	3
NP111	+	+	-	-	-	2
NP112	+	+	+	+	+	5
NP113	+	+	-	-	+	3
NP114	+	+	-	-	+	3
NP115	+	+	+	-	+	4
NP116	+	+	+	-	+	4
NP201	-	-	-	-	-	0
NP202	-	-	-	-	-	0
NP203	-	-	-	-	-	0
NP204	+	+	+	-	+	4
NP205	-	-	-	-	-	0
NP206	-	-	-	-	-	0
NP207	-	-	-	-	-	0
NP301	+	-	+	-	+	3

NP302	+	-	+	-	+	3
NP303	+	+	+	+	+	5
NP304	+	+	-	-	-	2
NP305	+	+	-	+	+	4
NP306	+	+	+	-	+	4
NP307	+	+	+	-	+	4
NP308	-	+	-	-	-	1
NP309	+	-	+	+	+	4
NP310	-	+	-	-	+	2
NP311	+	+	+	-	-	3
NP312	-	+	+	+	+	4
NP313	+	+	-	+	-	3
NP314	-	+	+	-	-	2
NP315	+	+	+	-	+	4
รวมทั้งหมดมีแบคทีเรีย (ไอโซเลท)						38

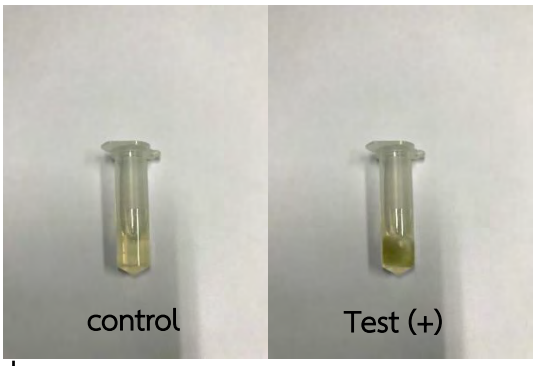
+ หมายถึง มีลักษณะดังกล่าว และ - หมายถึง ไม่มีลักษณะดังกล่าว



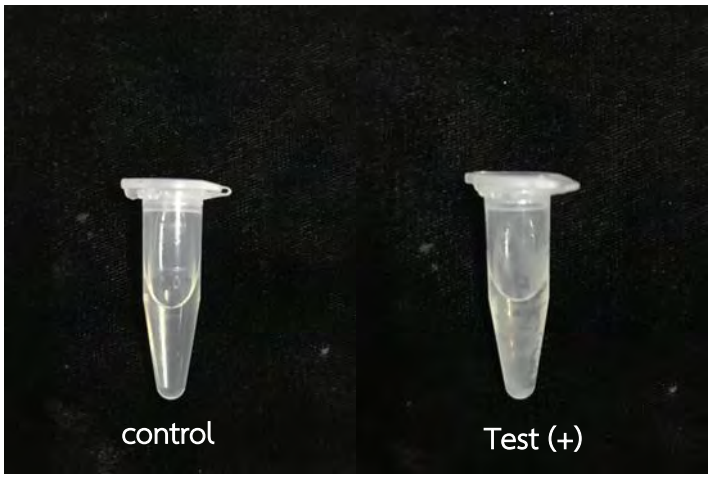
ภาพที่ 0-4 การทดสอบการสร้าง indole-3-acetic acid (IAA)
โดยผลการทดสอบเป็นบวก จะได้สารละลายสีชมพู



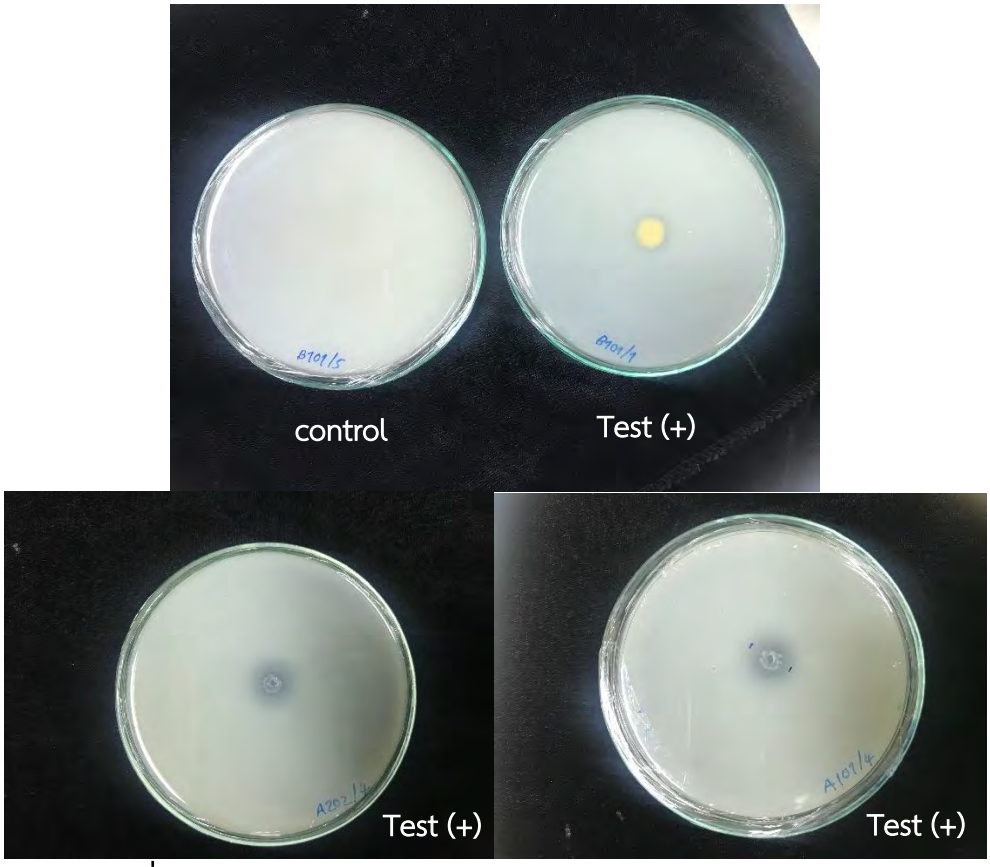
ภาพที่ 0-5 การทดสอบการสร้างแอมโมเนีย (NH_3 production)
โดยผลการทดสอบเป็นบวก จะได้สารละลายสีส้ม-น้ำตาล



ภาพที่ 0-6 การทดสอบการสร้างสารในกลุ่ม siderophore
โดยผลการทดสอบเป็นบวก จะได้สารละลายสีน้ำเงิน-เขียว



ภาพที่ 0-7 การทดสอบการสร้างสาร extracellular polymeric substance (EPS)
โดยผลการทดสอบเป็นบวก จะได้วุ้นสีขาวขุ่น



ภาพที่ 0-8 การทดสอบการละลายฟอสเฟต (phosphate solubilization) โดยผลการทดสอบเป็นบวก จะได้วงใสรอบโคโลนีแบคทีเรีย