รหัสโครงการ SUT3-304-49-12-17

รายงานการวิจัย

การรวบรวมและคัดเลือกสายพันธุ์ Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

(Collection and selection of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR))

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-49-12-17

รายงานการวิจัย

การรวบรวมและคัดเลือกสายพันธุ์ Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

(Collection and selection of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR))

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย
ดร. สมปอง หมื่นแจ้ง
รศ.ดร. สมพร ชุณหลือชานนท์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว
พฤษภาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ช่วยเหลืออย่างดียิ่งทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

23 พฤษภาคม 2555

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดหา Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์แปซิฟิค 283 โดยการดำเนินแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณรากข้าวโพดในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง นครสวรรค์ สระบุรี และนครราชสีมา แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติพื้นฐาน ในการส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่าแบคทีเรียจำนวน 153 ไอโซเลต มีความสามารถในการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืช (Indole-3-acetic acid: IAA) จำนวน 16 ไอโซเลต ได้คัดเชื้อ 6 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการเจริญของรากข้าวโพดมา คือ ทดสอบในระดับกระถาง พบว่า ได้ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดสูงสุดคือ ไอโซเลต SUT2 และ SUT3 เมื่อนำไปทดลองในระดับแปลงที่มีการจัดกรรมวิธีใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมี โดยลดอัตราส่วนปุ๋ยเคมีลง 25% และ 50% จากอัตราส่วนที่แนะนำ พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ลดอัตราส่วนลง มีแนวโน้มทำให้ต้นข้าวโพดมีการเจริญเติบโต และให้ผลผลิตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราส่วนแนะนำเพียงอย่างเดียว การจำแนกชนิดของไอโซเลต SUT3 โดยใช้การอ่านลำดับเบสบนสายดีเอนเอของยีน 16S rDNA พบว่ามีความคล้ายกับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus subtilis*

คำสำคัญ: PGPR, ข้าวโพดฝักอ่อน, ปุ๋ยเคมี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

The objective of this study was to select highly effective Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for maize (Pacific 283) cultivation. The PGPR were isolated from maize rhizosphere from Chiang Mai, Lampang, Nakhon Sawan, Saraburi and Nakhon Ratchasima provinces. From 153 isolates, the isolates SUT2 and SUT3 showed the highest plant growth promotion from pot experiments. The true isolates selected for further study in the field experiment were mixed with the 25% and 50% reduction from the recommended chemical fertilizer rate. The results showed that the plant yield and biomass reduced amount of chemical fertilizer mixing with isolate SUT3 of was not significantly different from these of recommended chemical fertilizer rate. In addition, the isolate SUT3 was identified as one closely related to Bacillus subtilis sp., and there was reasonable evidence to show this isolate SUT3 could reduce the amount of chemical fertilizer used in maize field. Keywords: PGPR, Baby Corn, Chemical fertilizer.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)		ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
บทที่ 1	บทนำ	
	1.1 ความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
	1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	
บทที่ 2	ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
	ความสำคัญและปัญหา	3
บทที่ 3	วิธีการดำเนินการวิจัย	
	3.1 ดำเนินการรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ PGPR ที่ได้มีการศึกษารวบรวมไว้	5
	3.2 ทำการคัดเลือก PGPR จากที่รวบรวมไว้ตามคุณสมบัติ	5
บทที่ 4	ผลการทดลอง	7
	4.1 การใช้ Bacillus subtilis เพื่อการผลิตเม็ดพันธุ์ข้าวโพดฝักอ่อน. วารสารแก่นเกษตร. 38(2):155-162.	8
	4.2 Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizophere of forage corn cultivated in Thailand	16
บทที่ 5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	27
บรรณานุกรม		28
ประวัตินักวิจัย		29

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันปุ๋ยอินทรีย์มีแนวโน้มเป็นที่นิยมของเกษตรกรทั่วไป เนื่องจากกระแสของการศึกษาความห่วงใยในสิ่งแวดล้อมที่ร่วมรณรงค์ให้ลดการใช้สารเคมีในระบบเกษตรธรรมชาติ ซึ่งแนวคิดนี้เหมาะต่อระบบเกษตรยั่งยืน ซึ่งนับว่าประจวบเหมาะกับสภาพเศรษฐกิจตกต่ำที่นานาประเทศกำลังประสบอยู่ อนึ่ง เนื่องจากดินของประเทศไทยส่วนใหญ่โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความอุดมสมบูรณ์และปริมาณอินทรีย์วัตถุต่ำ เพราะอยู่ในเขตร้อนชื้น ซึ่งมีการชะล้างพังทะลายของหน้าดินสูง การปลูกพืชในระยะยาวอย่างต่อเนื่อง ขาดการบำรุงรักษาที่เหมาะสม ทำให้ดินเสื่อมลงตามลำดับ ดังนั้น การใช้ปุ๋ยอินทรีย์เพื่อให้เกิดความยั่งยืนในระบบเกษตรจึงเป็นสิ่งที่น่าจะสนับสนุน

อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของการผลิตหรือใช้ปุ๋ยอินทรีย์ในปัจจุบัน ได้แก่ ขาดความรู้พื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ทำให้ปุ๋ยมีประสิทธิภาพต่ำ ใช้ได้ผลในระยะสั้นหรืออาจก่อให้เกิดผลกระทบเชิงลบในระยะยาว เช่น มีโลหะหนักปนเปื้อน การสูญเสียไนโตรเจนที่ระเหิดเป็นแก๊สแอมโมเนีย กลิ่นไม่พึงประสงค์ ค่า pH ต่ำ เป็นต้น และยิ่งไปกว่านั้นจากผลการวิเคราะห์กลุ่มปุ๋ยอินทรีย์ที่ผลิตจากสหกรณ์การเกษตรบ้านลาด จำกัด พบว่าในปุ๋ยอินทรีย์เหล่านี้ไม่เคยพบจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร โดยเฉพาะในกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนและไมคอไรซาเลย (เทคโนโลยีภูมิปัญญาท้องถิ่น, 2544)

ดังนั้น แนวคิดที่จะพัฒนาให้มีการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพ และสามารถใช้ได้ดีในระยะยาว คือ การใช้แบคทีเรียกลุ่ม PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) PGPR เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติที่ดีต่อพืชใน 3 ประการ (Glick และคณะ, 1999) ได้แก่

1. เป็นปุ๋ยชีวภาพ (Biofertilizer)
2. เป็นผู้สร้างฮอร์โมนให้พืช
3. เป็นผู้ควบคุมศัตรูพืช

ดังนั้น การใช้แบคทีเรียกลุ่ม PGPR เป็นอีกทางเลือกหนึ่งโดยเฉพาะกับสภาวการณ์ปัจจุบันที่เน้นความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถใช้ทดแทนปุ๋ยเคมีและยาปราบศัตรูพืช (โดยเฉพาะเชื้อราที่มีภาวะดื้อยาสูงขึ้นในปัจจุบัน) จึงเห็นได้ว่าในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น กลุ่มประเทศ EU หรือ สหรัฐอเมริกา ได้มีการพัฒนาขึ้นเป็นการค้าในรูปของ Bioinoculant แล้ว เช่น กลุ่ม Rhizobium, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces เป็นต้น (Bloemberg และ Lugtenberg, 2001) แต่อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้ในสภาพจริงยังมีความจำเป็นต้องศึกษาศักยภาพและประสิทธิภาพในพื้นที่แต่ละพื้นที่กับพืชแต่ละชนิดด้วย ซึ่งจากการวิจัยหลาย ๆ แห่งพบว่า

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียชนิดเดียวกันจะต่างกันไปตามสภาพสิ่งแวดล้อมของดิน (Kurek และ Jaroszuk-Scisel, 2003 และ Ramoz และคณะ 2003)

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อให้ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น PGPR ที่มีประสิทธิภาพสูง รวมไปถึงที่มีคุณสมบัติคงทนในสภาวะกดดัน (stress toletant)

1.2.2 เพื่อให้ได้กลุ่มสายพันธุ์ PGPR ที่เหมาะสมในการนำมาใช้กับพืชแต่ละกลุ่ม

1.2.3 เพื่อให้ได้ข้อมูลสำคัญของสายพันธุ์ PGPR เพื่อใช้เป็นการควบคุมคุณภาพ และปริมาณเพื่อทำการผลิตเป็นหัวเชื้อ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการนี้เป็นโครงการย่อยของการศึกษาวิจัยชุดโครงการการพัฒนาหัวเชื้อผสม PGPR สำหรับปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพคุณภาพสูง โดยจะดำเนินการคัดเลือกสายพันธุ์ PGPR ที่มีคุณสมบัติในเชิงเป็นปุ๋ยชีวภาพ สร้างฮอร์โมนพืชได้ดีจากสถาบันที่ทำการรวบรวมไว้อยู่เดิม ได้แก่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, กรมวิชาการเกษตร และภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นนำมาทดสอบผลกระทบต่อพืชสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผัก และข้าวโพด ในระดับเรือนทดลอง จากนั้นจะนำเชื้อกลุ่มดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาหัวเชื้อ PGPR เพื่อการเก็บรักษาระยะยาว ซึ่งเป็นโครงการย่อยอีกโครงหนึ่งของชุดโครงการดังกล่าว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น PGPR ที่มีประสิทธิภาพสูง รวมไปถึงที่มีคุณสมบัติคงทนในสภาวะกดดัน (stress toletant)

1.4.2 ได้กลุ่มสายพันธุ์ PGPR ที่เหมาะสมในการนำมาใช้กับพืชแต่ละกลุ่ม

1.4.3 ได้ข้อมูลสำคัญของสายพันธุ์ PGPR เพื่อใช้เป็นการควบคุมคุณภาพ และปริมาณเพื่อทำการผลิตเป็นหัวเชื้อ

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความสำคัญของ แบคทีเรียกลุ่ม PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับปุ๋ยชีวภาพ และการควบคุมกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีพบว่า กิจกรรมหลักหรือหัวใจของเทคโนโลยีทั้งสองนี้ ถูกควบคุมโดยกลุ่มจุลินทรีย์เพียงบางกลุ่มเท่านั้น โดยเฉพาะในปัจจุบันมีการค้นคว้า วิจัย กลุ่มจุลินทรีย์ที่เรียกว่า PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) กันอย่างกว้างขวาง และผู้นำของกลุ่มวิจัยนี้มักพบว่าเป็นประเทศที่พัฒนาแล้วทั้งสิ้น ดังนั้น แนวคิดที่จะพัฒนาให้มีการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพและสามารถใช้ได้ดีในระยะยาว คือ การใช้แบคทีเรียกลุ่ม PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) PGPR เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติที่ดีต่อพืชใน 3 ประการ (Glick และคณะ, 1999) ได้แก่

1. เป็นปุ๋ยชีวภาพ (Biofertilizer) ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศมาเป็นปุ๋ยไนโตรเจนให้กับพืชได้ เช่น แบคทีเรียในจีนัส Beijerinkia, Azotobacter และ Azospirillum ไซยาโนแบคทีเรีย เช่น Anabaena และ Nostoc เป็นต้น แบคทีเรียที่ทำให้ Phosphorus ละลาย หรือกลุ่มแบคทีเรียที่สร้าง Siderophore เพื่อสกัดธาตุเหล็กในดินให้กับพืช เป็นต้น ตัวอย่างบทบาทของ PGPR ที่มีคุณสมบัติเป็นปุ๋ยชีวภาพ เช่น แบคทีเรีย Paenibacillus polymyxa มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ และสามารถให้ธาตุอาหารไนโตรเจนกับพืช และยังสามารถส่งเสริมการเจริญในพืชกลุ่มข้าวโพดได้เป็นอย่างดี (von der Weid และคณะ 2000) หรือการใช้ PGPR ในจี*นัส Serratia protecemaculans* 1-10 และ *S. liquefaciens* 2-68 ร่วมกับ *Bradyrhizobium japonicum* ในการปลูกถั่วเหลือง สามารถเพิ่มจำนวนปม มวลชีวภาพและประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้ดีขึ้นกว่าเมื่อใช้เชื้อ กับ *B. japonicum* ตามลำพัง ซึ่งพบว่า Serratia ทั้งสองสายพันธุ์ช่วยย่นระยะเวลาการสร้างปมของถั่วและสามารถเพิ่มอัตราการสร้างปมจาก กับ *B. japonicum* อีกด้วย (Ramos และคณะ 2002) และในกรณีที่มีการพัฒนาเชื้อกลุ่มนี้ขึ้นมาเป็นหัวเชื้อเชิงการค้าใช้กับภาคเกษตรกรรมได้แก่ ประเทศบราซิล เมกซิโก และสหรัฐอเมริกา ได้พัฒนาหัวเชื้อปุ๋ยไนโตรเจนจากแบคทีเรีย *Gluconacetobacter diazotrophicus* และ Azospirillum ใช้กับพืชไร่สำคัญ เช่น อ้อย ข้าวสาลี โดยพบว่าเมื่อมีการใส่หัวเชื้อในพื้นที่ 600,000 เฮกเตอร์ ในประเทศเมกซิโก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1999 และเพิ่มเป็น 1.5 ล้านเฮกเตอร์ ในปี ค.ศ. 2000 ทำให้ผลผลิตของพืชเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 26% (Cabellero-Mellado และคณะ 2002)

2. เป็นผู้สร้างฮอร์โมนให้พืช (Phytostimulator) ฮอร์โมนที่แบคทีเรียสร้างได้แก่ Auxin, Gibbere llin และ Cytokinin ตัวอย่างจีนัสของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ Azospirillum และ Azotobacter ดังตัวอย่างงานวิจัยล่าสุดของ Ramos และคณะ (2002) พบว่าการใช้แบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* กับการปลูกต้นกล้า Alder (Alnus glutinosa) พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของต้น Alder ได้อย่างดีเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ได้ใส่เชื้อ โดยเฉพาะมีระบบรากที่สมบูรณ์ พื้นที่ผิวของใบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งพบว่าเป็นบทบาทมาจากสารประกอบกลุ่ม auxin และ gibberllin ที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ หรือการใช้ *B. licheniformis* ร่วมกับ *B. pumis* กับต้นกล้าของพืช Pinus pinae ซึ่งมีความสามารถในการสร้าง gibberllin พบว่าเพิ่มพื้นที่ผิวของใบและความยาวของรากได้สูงกว่าใช้ Bacillus เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญ (Probanaza และคณะ, 2000)

3. เป็นผู้ควบคุมศัตรูพืช (Biopesticilde) ซึ่งส่วนใหญ่พบว่ามีการสร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งเชื้อรากก่อโรคได้ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียจีนัส Bacillus, Pseudomonas ดังเช่น จากรายงานการวิจัยโดยใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* กับข้าว rye (Secale cereale) พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา Fusaricum culmorum ที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวได้ดียิ่งขึ้น ถ้ามีการปรับสภาพของดินให้มีปริมาณอนุภาคดินเหนียวมากขึ้น (Kurek และ Jaroszuk-Scisel, 2003) หรือการใช้เชื้อผสมในกลุ่มจีนัส Bacillus เช่น *B. amyloliquefaciens, B. sphaericus B. pumilis* สามารถยับยั้งกลุ่มของเชื้อก่อโรค เช่น Ralstonia, Collectotrichum หรือ Rhizoctonia โดยกระบวนการสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่พืชได้เป็นอย่างดี (Jetiyanon และ Kloepper, 2002)

จะเห็นได้ว่าการใช้แบคทีเรียกลุ่ม PGPR เป็นอีกทางเลือกหนึ่งโดยเฉพาะกับสภาวการณ์ปัจจุบันที่เน้นความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถใช้ทดแทนปุ๋ยเคมี และยาปราบศัตรูพืช (โดยเฉพาะเชื้อราที่มีภาวะดื้อยาสูงขึ้นในปัจจุบัน) จึงเห็นได้ว่าในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น กลุ่มประเทศ EU หรือ สหรัฐอเมริกา ได้มีการพัฒนาขึ้นเป็นการค้าในรูปของ Bioinoculant แล้ว เช่น กลุ่ม Rhizobium, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces เป็นต้น (Bloemberg และ Lugtenberg, 2001) แต่อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้ในสภาพจริงยังมีความจำเป็นต้องศึกษาศักยภาพและประสิทธิภาพในพื้นที่แต่ละพื้นที่กับพืชแต่ละชนิดด้วย ซึ่งจากการวิจัยหลาย ๆ แห่ง พบว่าประสิทธิภาพของแบคทีเรียชนิดเดียวกันจะต่างกันไปตามสภาพสิ่งแวดล้อมของดิน (Kurek และ Jaroszuk-Scisel, 2003 และ Ramos และคณะ 2002)

แม้ว่าจะมีบางหน่วยงานของรัฐ หรือ สถาบันอุดมศึกษาบางแห่งได้ทำการศึกษาวิจัยจุลินทรีย์ในลักษณะนี้ แต่พบว่าที่ผ่านมาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาแบบแยกประเภทของจุลินทรีย์กับกลุ่มพืช ยังขาดการนำไปประยุกต์ใช้ในวงกว้าง จึงทำให้สถานภาพของการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ขาดทิศทาง และความชัดเจน รวมไปถึงขาดการวิจัยในเชิงลึกเพื่อสร้างฐานองค์ความรู้ใหม่

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ดำเนินการรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ PGPR ที่ได้มีการศึกษารวบรวมไว้

3.1.1 PGPR, Bacillus และ Streptomuces จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

3.1.2 PGPR ที่ตรึงไนโตรเจน และสร้างฮอร์โมนพืชได้จากกลุ่มวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร

3.1.3 PGPR และเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสฟอรัส และโปแตสเซียมจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2 ทำการคัดเลือก PGPR จากที่รวบรวมไว้ตามคุณสมบัติ

3.2.1 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ทำการทดสอบทั้งในสภาพมีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน โดยใช้เทคนิค Acetylene Reduction Assay (ARA) ตรวจสอบด้วยเครื่อง Gas Chromatography โดยใช้ Capillary Column

3.2.2 ความสามารถในการสร้าง Indole Acetic Acid (IAA) โดยการเกิดสี เมื่อใช้ tryptophan เป็นสารตั้งต้น

3.2.3 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคกลุ่ม Phytopthora, Fusarium และ Collectotricham โดยดูจากลักษณะ clear zone ที่เกิดจากการยับยั้ง

3.2.4 ทำการคัดเลือก PGPR เพิ่มเติมโดยใช้ลักษณะจากข้อ 3.2.1 -3.2.3 แต่ทดสอบในสภาวะกดดัน ได้แก่ อุณหภูมิสูง (40, 45, 50 และ 60°ซ), ความเป็นกรด (pH 3.5, 4, 4.5, 5 และ 5.5) และความเป็นด่าง (pH 8, 8.5 และ 9)

3.2.5 นำ PGPR ที่คัดเลือกได้ ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น 3 ประการ มาทดสอบกับพืชในระดับกระถางสภาพปลอดเชื้อ ได้แก่ กลุ่มผัก และข้าวโพด โดยคุณสมบัติในส่วนที่เป็นปุ๋ยชีวภาพ จะทำการทดสอบกับพืชที่ปลูกด้วยอาหารสังเคราะห์ในระบบปลอดเชื้อ จากนั้นปลูกเชื้อ PGPR ลงไป โดยมีตำรับ ดังนี้ อาหารสังเคราะห์ที่ขาดธาตุอาหาร N (ในกรณี N_2-fixer) และ อาหารที่มี P และ K ต่ำ (ในกรณี phosphate และ potassium solubilizer) สำหรับคุณสมบัติที่มีการสร้าง phytohormone จะทำการทดสอบกับพืชในระบบปลอดเชื้อ โดยทำการปลูกเชื้อร่วมกับพืช จากนั้นทำการตรวจสอบความสูง จำนวนใบ ความยาวของราก และมวลของราก ส่วนกรณีต้านทานโรคจะทำในทำนองเดียวกัน แต่จะกระตุ้นให้พืชเกิดสภาพอ่อนแอ และไม่เป็นโรค จากนั้นจึงทำการปลูกเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกไว้ในผัก จะทำการบันทึกผลทุก

7 วัน เป็นเวลา 35-40 วัน ส่วนข้าวโพด จะบันทึกผลทุก 14 วัน เป็นเวลา 45-60 วัน โดยแต่ละลักษณะบทบาทของ PGPR ของพืชแต่ละชนิดจะทำการทดลอง 10 ซ้ำ ในเรือนเพาะ

3.2.6 ทำการคัดเลือกกลุ่ม PGPR ที่มีศักยภาพสูงที่ได้จาก ข้อ 3.2.5 มาทำการจำแนกชนิด โดยใช้การอ่านลำดับเบสบน DNA จากกลุ่มยีน ribosomal DNA

ทั้งนี้ วิธีการศึกษาวิจัย และการวิเคราะห์ผลโดยละเอียดได้แสดงไว้ในผลงานวิจัย ดังนี้

1. พงษ์เดช ภิรมย์อยู่ และคณะ (2553). การใช้ Bacillus subtilis เพื่อการผลิตเม็ดพันธุ์ข้าวโพดฝักอ่อน. วารสารแก่นเกษตร. 38(2):155-162.
2. Piromyou, P *et. al.,* 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizophere of forage corn cultivated in Thailand. Eu. J. of Soil. Biol. 47:44-54.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการศึกษาวิจัย โดยละเอียดได้แสดงไว้ในผลงานวิจัย (รายเอียดตามแนบ) ดังนี้

1. พงษ์เดช ภิรมย์อยู่ และคณะ (2553). การใช้ Bacillus subtilis เพื่อการผลิตเม็ดพันธุ์ข้าวโพดฝักอ่อน. วารสารแก่นเกษตร. 38(2):155-162.
2. Piromyou, P et. al., 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizophere of forage corn cultivated in Thailand. Eu. J. of Soil. Biol. 47:44-54.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. ได้ทำการคัดเลือก PGPR ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์แปซิฟิค 283 พบว่าจากทั้งหมด 153 ไอโซเลต มีเพียง 6 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูง จากนั้นนำมาคัดเลือกประสิทธิภาพต่อในระดับกระถางพบว่า ไอโซเลต SUT2 และ SUT3 ให้ประสิทธิภาพส่งเสริมการเจริญข้าวโพดฝักอ่อนเป็นที่น่าพอใจ เมื่อนำไปทดสอบต่อในระดับแปลง พบว่า เชื้อผสม SUT2 และ 3 ให้ผลค่อนข้างดี เมื่อใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ลดลงไป 25% และ 50% ในขณะเดียวกันไอโซเลต SUT3 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชได้บางจีนัส เช่น *Rhizoctonia solani*, *Verticillum* sp. และ *Fusarium oxysporum* จึงได้ทำการอ่านลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอจาก ยีน 16SrDNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่ร้อยละ 99 ดังนั้น *B. subtilis* SUT3 จึงมีศักยภาพในการผลิตเป็นหัวเชื้อ เพื่อใช้ทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี และสารเคมีป้องกันโรคสาเหตุจากเชื้อรา และแบคทีเรียบางชนิดในข้าวโพดได้ในอนาคต

2. ได้ทำการคัดเลือก PGPR ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริฐเติบโตของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พบว่า Pseudomonas sp. SUT19 และ *Brevibacillus* sp. SUT47 ให้ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตดีที่สุดทั้งในระดับกระถาง และระดับแปลงทดลอง เมื่อทำการตรวจสอบสมบัติสำคัญพบว่า การสร้างเอนไซม์ ACC-deaminase น่าจะเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดต่อการส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ สำหรับการศึกษาในพืชกลุ่มผัก ได้ทำการคัดเลือกผักคะน้าเป็นตัวแทน ผลการทดลองพบว่า *Bacillus* sp. SUT1 และ *Pseudomonas* SUT19 ให้ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของคะน้าได้ดีที่สุด

บรรณานุกรม

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ “เทคโนโลยีภูมิปัญญาท้องถิ่น” ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย ตุลาคม 2544. ISBN :974-436-099-2

พงษ์เดช ภิรมย์อยู่ และคณะ (2553). การใช้ *Bacillus subtilis* เพื่อการผลิตเม็ดพันธุ์ข้าวโพดฝักอ่อน. วารสารแก่นเกษตร. 38(2):155-162.

Bai, Y., Pan, B., Charles, T. C. and Smoth, D. L. (2002). Co-inoculation dose and root zone temperature for plant growth promoting rhizobacteria on soybean [Glycine max (L.) Merr] grown in soil-less media. Soil Biology&Biochemistry. 34:1953-1957.

Bloemberg, G. V. and Lugtenberg, B. J.J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biotecontrol by rhizobacteria. Curr. Opi. In Plant Bio. 4 : 343-350.

Glick, B. R., Patten , C. L., Holguin, G. and Penrose, D. M. (1999). Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press. Waterloo, Ontario, Canada.

Jetiyanon , K. and Kloepper, J. W. (2002). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. Biological Control. 24:285-291.

Kurek, E. and Jaroszuk-Scisel, J. (2003) Rye (Secale cereale) growth promotion by Pseudomonas fluorescens strains and their interactions with Fusarium culmorum under various soil conditions. Biological Control. 26:48-56.

Piromyou, P et. al., 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizophere of forage corn cultivated in Thailand. Eu. J. of Soil. Biol. 47:44-54.

Probanaza , A., Lucas Garcia , J. A., Ruiz Palomino, M., Ramos, B., Gutierrez Manero, F. J. (2002). Pinus pinea L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR Bacillus (B. *licheniformis* CECT 5106 and B. pumilus CECT 5105). Applied Soil Ecology. 20:75-84.

Ramos, B., Lucas Garcia , J. A., Probanza , A., Barrientos, M. L., and Guterrrez Manero, F. J. (2002). Alterations in the rhizobacterial community associated with

European alder growth when inoculated with PGPR strain Bacillus licheniformis. Environmental and Experimental Botany. 49:61-68.

von der Weid, I., Paiva, E., Nobrega, A., van Elsas, J. D. and Seldin, L. (2000). Res. Microbiol. 151:369-381.