SUT3-304-56-36-19

รายงานการวิจัย

การใช้เชื้อแบคทีเรียอาศัยในเนื้อเยื่อพืชเพื่อเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการปลูกข้าวเพื่อลดความเครียดที่เกิดจากสภาวะน้ำท่วม และสภาวะขาดน้ำ

(Application of endophytic bacteria as biofertilizer with rice cultivation for reducing stress occur from flooding and drying conditions)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-304-56-36-19

รายงานการวิจัย

การใช้เชื้อแบคทีเรียอาศัยในเนื้อเยื่อพืชเพื่อเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการปลูกข้าวเพื่อลดความเครียดที่เกิดจากสภาวะน้ำท่วม และสภาวะขาดน้ำ

(Application of endophytic bacteria as biofertilizer with rice cultivation for reducing stress occur from flooding and drying conditions)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

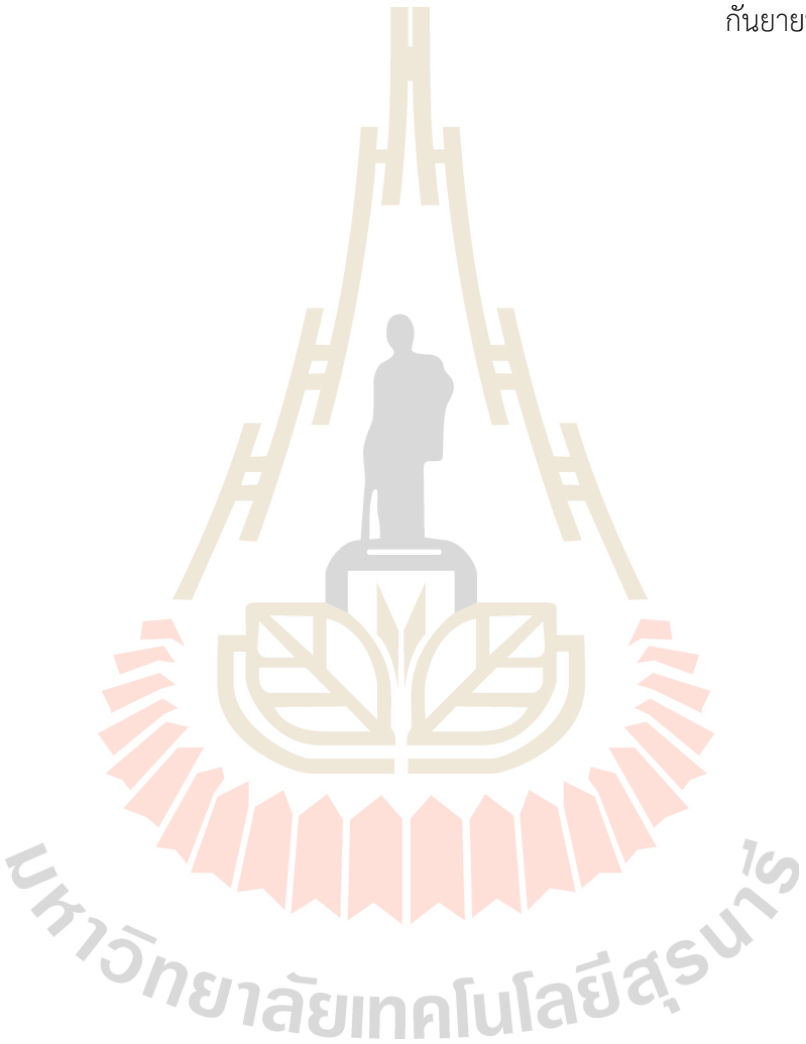
กันยายน 2560

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556 และดำเนินการภายใต้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ทดลอง และเครื่องมือวิเคราะห์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2560



บทคัดย่อ

การปลูกข้าวในสภาพไร่มีโอกาสเผชิญกับสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมหลายประการ ทั้งสภาวะเครียดที่เกิดจากปัจจัยทางกายภาย และชีวภาพ โดยการตอบสนองของต้นข้าวต่อสภาวะเครียดนี้ส่งผลให้ต้นข้าวมีอัตราการเจริญเติบโตที่ลดลง และส่งผลถึงปริมาณผลผลิตในที่สุด ดังนั้นหากต้องการลดการตอบสนองต่อสภาวะเครียดในต้นข้าว จึงมีแนวคิดที่จะใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อข้าว (endophyte) ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase เป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการปลูกข้าว โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่มแบรดี้ไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช และช่วยให้ต้นข้าวเจริญได้ในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ โดยในงานวิจัยนี้เน้นที่สภาวะขาดน้ำและสภาวะน้ำท่วมขัง ซึ่งผลการทดลองพบเชื้อแบรดี้ไรโซเบียมจำนวน 2 ไอโซเลท คือ R48 และ R64 ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการ แต่พบว่าสามารถช่วยให้ต้นข้าวเจริญได้ดีกว่าพืชในตำรับควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อภายใต้สภาวะขาดน้ำเท่านั้น แต่ไม่ประสบผลสำเร็จในสภาวะน้ำท่วมขัง ดังนั้นจึงได้นำแบรดี้ไรโซเบียมทั้ง 2 ไอโซเลทมาทดสอบกับข้าวต่อไปเพื่อตรวจสอบตำแหน่งการอยู่อาศัยของเชื้อในต้นข้าว และผลการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางชีวเคมีของต้นข้าวที่เกิดจากการใช้เชื้อ endophyte นี้เมื่อปลูกภายใต้สภาวะขาดน้ำ โดยทำการทดลองเทียบกับเชื้อแบรดี้ไรโซเบียมอ้างอิง สายพันธุ์ SUTN9-2 ซึ่งเคยพบว่าเป็นเชื้อที่เจริญในเนื้อเยื่อข้าวและส่งเสริมการเจริญของข้าวภายใต้สภาวะปกติได้ ทั้งนี้ผลการตรวจสอบตำแหน่งที่อยู่ของเชื้อ endophyte ที่ใช้ในการทดลองภายใต้การปลูกสภาวะปกติ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน และวิธีการย้อมเซลล์แบคทีเรียที่มียีน *gus* ติดตาม (GUS-staining) พบว่าเชื้อที่ใช้ทดสอบเหล่านี้มีความสามารถในการเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้จริง โดยเข้าอยู่อาศัยในบริเวณรากข้าว ทั้งนี้พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R64 ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้ดีที่สุดซึ่งสอดคล้องกับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียนี้ในเนื้อเยื่อข้าวที่มีมากกว่าเชื้อที่ใช้ทดสอบอื่น แต่ถึงแม้เชื้อเหล่านี้ไม่สามารถส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวในสภาวะขาดน้ำได้ดีเทียบเท่ากับการปลูกในสภาวะปกติ เชื้อสายพันธุ์ SUTN9-2 สามารถลดปริมาณเอทธิลีนที่เกิดจากสภาวะเครียด และช่วยให้ต้นข้าวมีเปอร์เซ็นต์การฟื้นตัวจากการขาดน้ำได้ดีกว่าต้นข้าวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ ทั้งนี้ยืนยันได้จากการลดลงของระดับกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในต้นข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อ SUTN9-2, R48 และ R64 เมื่อเทียบกับต้นข้าวที่ไม่ได้ปลูกเชื้อเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะการขาดน้ำ ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณของ reactive oxygen species (ROS) ที่ผลิตจากสภาวะเครียดมีลดปริมาณลง แสดงให้เห็นว่าพืชมีสภาวะเครียดลดลง ซึ่งเป็นอิทธิพลมาจากการใช้เชื้อ endophyte เหล่านี้ ตัวอย่างเช่น เชื้อไอโซเลท R48 สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ ascorbate peroxidase (APX) เพื่อบรรเทาความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เกิดจากสารกลุ่ม ROS ได้มากกว่าต้นข้าวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ นอกจากนี้เชื้อไอโซเลท R48 และ R64 ยังช่วยกระตุ้นให้พืชสร้างรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงให้เพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งอาจเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้ต้นข้าวยังคงทนต่อสภาวะเครียดที่เกิดจากการขาดน้ำได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ถึงแม้จะไม่สามารถใช้เชื้อ endophyte เหล่านี้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวในสภาวะขาดน้ำได้โดยตรง แต่อาจสามารถใช้เชื้อกลุ่มนี้ร่วมกับการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ หรือปุ๋ยเคมีในปริมาณต่ำ ๆ เพื่อให้มีธาตุอาหารเพียงพอต่อต้นข้าว ในขณะที่เชื้อ endophyte ทำหน้าที่ในการลดความเครียดในพืช หรือส่งเสริมการฟื้นตัวของต้นข้าวหากต้องเผชิญกับสภาวะขาดน้ำเมื่อต้องปลูกในสภาพไร่ ซึ่งการทดสอบเชื้อเหล่านี้ในสภาพไร่จะได้ดำเนินการต่อไป

Abstract

Rice growing under field condition could be able to encounter the several stress conditions, including biotic and abiotic stresses. The stress responses occurring in plant can reduce plant growth and yield of rice. To alleviate the stress responses, endophytic bacteria containing the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase activity would be another choice of biofertilizer to be used with rice cultivation. This research project focused on the flooding and drying conditions. The two selected bradyrhizobial isolates, R48 and R64 were obtained due to their properties of plant hormone (IAA) production, contain ACC deaminase activity, and support plant growth under drying stress condition. However, these isolates did not promote the growth under flooding condition. Therefore, *Bradyrhizobium* sp. isolates R48 and R64 were inoculated to rice and subjected to verify the localization of cell in rice tissue, as well as the plant physiological and biological changes under normal and drying conditions compared with the plant inoculated with the reference strain of *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2. The SEM and GUS-staining experiments revealed that these three bacteria are rice endophyte. Under normal condition, isolate 64 promoted the highest rice growth which is correlated with the high number of cell in the rice tissue. Although these endophytic bacteria could not support rice growth in stress condition, strain SUTN9-2 reduce the amount of stress ethylene production and also provided higher plant growth recovery rate than that of non-inoculated plant. The significant decrease of superoxide dismutase (SOD) activity in plant inoculated with these three endophytic bacteria under stress condition indicated the lowering of reactive oxygen species (ROS) level which occur in plant from stress condition. The activity of ascorbate peroxidase (APX), which was activated in plant inoculated with endophytic bacteria isolate R48 may be one of mechanisms to scavenge the ROS and reduce the toxicity in cell. Moreover, bacteria isolates R48 and R64 also increased the amount of plant pigments required for photosynthesis. Therefore, rice endophytic bradyrhizobium cannot be able to use alone as biofertilizer to support plant growth under drying condition. However, these rice endophyte can be used to reduce stress and increase the plant recovery from stress condition. Therefore, the application of organic fertilizer or small amount of chemical fertilizer together with these endophytic bacteria would be appropriate for rice growing in the field condition that risk for drying condition in Thailand. Further studies in the field application will be conducted.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	6
3.1 การคัดแยกเชื้อ endophytic bacteria จากเนื้อเยื่อข้าว	6
3.2 การทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการส่งเสริมการเจริญของพืช	6
3.3 การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวเมื่อปลูกภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม	7
3.4 การติดตามเชื้อ endophytic bacteria ในเนื้อเยื่อข้าว	7
3.5 การตรวจสอบผลของการใช้เชื้อ endophytic bacteria ต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางชีวเคมีของพืชที่เกี่ยวข้องกับการเจริญภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะขาดน้ำ	8
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล	12
4.1 การคัดเลือกเชื้อ endophytic bacteria จากเนื้อเยื่อข้าว	12
4.2 การตรวจสอบและติดตามเชื้อ endophytic bacteria ที่ทำการทดสอบในเนื้อเยื่อข้าว	16
4.3 การตรวจสอบผลของการใช้เชื้อ endophytic bacteria ต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางชีวเคมีของพืชที่เกี่ยวข้องกับการเจริญภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะขาดน้ำ	21
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	32
บรรณานุกรม	33

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) เบื้องต้นในการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวภายใต้การปลูกสภาวะขาดน้ำ..... 15
รูปที่ 2 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) เบื้องต้นในการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวภายใต้การปลูกสภาวะน้ำท่วม..... 17
รูปที่ 3 การย้อมแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) ในรากข้าวที่ปลูกเชื้อด้วยไอโซเลท 48-gus (A) และไอโซเลท 64-gus (B) ด้วยเทคนิค gus-stainning หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 3 วัน ภายใต้สภาวะปกติ..... 19
รูปที่ 4 การย้อมแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) ในรากข้าวที่ปลูกเชื้อด้วย B. diazoefficiens USDA110-gus (A) และไอโซเลท 64-gus (B-D) ด้วยเทคนิค gus-stainning หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน ภายใต้สภาวะปกติ..... 20
รูปที่ 5 รูปถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope (SEM) ในตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณรากข้าวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (non-inoculation) (A) และที่ปลูกเชื้อด้วย SUTN9-2 (B) ที่ระยะเวลา 7 วันหลังการปลูกเชื้อ ภายใต้สภาวะปกติ..... 20
รูปที่ 6 จำนวนแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) ไอโซเลทต่าง ๆ ที่พบในเนื้อเยื่อข้าวหลังจากทำการปลูกเชื้อไปแล้ว 30 วัน ภายใต้สภาวะปกติ..... 21
รูปที่ 7 การทดสอบการเจริญของข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อแบคทีเรียเจริญในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาวะการปลูกแบบ (A) สภาวะปกติ และ (B) สภาวะขาดน้ำ..... 23
รูปที่ 8 มวลชีวภาพของข้าวที่ปลูกเชื้อด้วยแบคทีเรียที่เจริญในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) ชนิดต่าง ๆ ภายใต้ (A) สภาวะการให้น้ำปกติ และ (B) สภาวะขาดน้ำ..... 24
รูปที่ 9 แสดงภาพข้าวที่ฟื้นตัวและไม่ฟื้นตัวจากสภาวะขาดน้ำเปรียบเทียบระหว่าง (A) ข้าวที่ไม่ทำการปลูกเชื้อ, (B) ข้าวที่ปลูกเชื้อด้วย SUTN9-2, (C) ไอโซเลท 48 และ (D) ไอโซเลท 64... 25
รูปที่ 10 แสดงรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของข้าว คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ ในข้าวที่ปลูกในสภาวะปกติ (A) และสภาวะขาดน้ำ (B)..... 28
รูปที่ 11 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) ในข้าวส่วนลำต้น (shoot), ราก (root) และโดยรวม (total) ที่ปลูกในสภาวะปกติ (A-C) และในสภาวะขาดน้ำ (D-F) 29
รูปที่ 12 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Ascorbate peroxidase (APX) ในข้าวส่วนลำต้น (shoot), ราก (root) และโดยรวม (total) ที่ปลูกในสภาวะปกติ (A-C) และในสภาวะขาดน้ำ (D-F).. 30
รูปที่ 13 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Catalase (CT) ในข้าวส่วนลำต้น (shoot), ราก (root) และโดยรวม (total) ที่ปลูกในสภาวะปกติ (A-C) และในสภาวะขาดน้ำ (D-F)..... 31

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในเนื้อเยื่อพืชในการเจริญบนอาหารที่มี ACC และความสามารถในการสร้าง IAA..... 13
ตารางที่ 2 แสดงผลคะแนนความเหี่ยวของใบข้าว การฟื้นตัวของข้าว และการผลิตก๊าซ Ethylene ในข้าว..... 25

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและมีการปลูกทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย แต่เป็นที่ทราบกันดีว่าประเทศไทยได้รับผลกระทบจากปัญหาสภาวะโลกร้อนที่ก่อให้เกิดการความแปรปรวนของสภาพอากาศและปริมาณน้ำฝนที่ไม่อาจคาดการณ์ได้ ส่งผลให้เกิดปัญหาแตกต่างกันไปในหลายพื้นที่ เช่น บางพื้นที่ที่เคยมีน้ำอุดมสมบูรณ์กลับเกิดการแล้งจัด ในขณะที่บางพื้นที่กลับมีน้ำท่วมขังเป็นเวลานาน ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาแก่เกษตรกรในการเพาะปลูกข้าว ทำให้ได้ผลผลิตลดลง หรือไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เลยหากต้นข้าวตายลงในสภาวะขาดน้ำ หรือน้ำท่วมขัง ดังนั้นการทำให้พืชสามารถลดความเครียดได้จากสภาวะเหล่านี้จะส่งผลให้พืชสามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมนี้ได้มากขึ้น และลดปัญหาการสูญเสียผลผลิตของเกษตรกร

ทั้งนี้การเจริญของพืช หรือการบรรเทาความเครียดที่เกิดขึ้นในพืชเกิดจากกลไกการทำงานของฮอร์โมนพืชเป็นสำคัญ เมื่อพืชเจริญภายใต้สภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียด พืชจะผลิตฮอร์โมน ethylene เพิ่มมากขึ้น หรืออาจเรียกได้ว่าเป็น stress conditions โดยฮอร์โมน ethylene ที่ถูกผลิตมากขึ้นจะส่งผลในการยับยั้งการเจริญของราก และส่งผลให้การเจริญของพืชโดยรวมลดลงในที่สุด (Abeles et al. 1992) ในขณะที่ฮอร์โมนพืชอื่น ๆ มีส่วนสำคัญในการทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น เช่น ฮอร์โมนในกลุ่ม auxin ที่มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญของราก รวมทั้งมีบทบาทในการป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช หรือฮอร์โมนไซโตไคนิน (cytokinins) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในหลาย ๆ ด้าน เช่น การแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโตของยอด การส่งผ่านของธาตุอาหาร การสร้างคลอโรพลาส การแก่ของพืช การออกดอก รวมทั้งยังมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ (Haberer and Kieber, 2002) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสภาวะเครียดที่เกิดจากปริมาณน้ำในสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม (Pospisilova et al., 2000) ดังนั้นแนวทางการใช้ปุ๋ยชีวภาพโดยการใช้จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายสาร ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่พบในพืชเพื่อใช้ในการสร้างฮอร์โมน ethylene อาจส่งผลให้ปริมาณ ethylene ในพืชลดลง (Glick et al., 1999) เป็นหลักในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ ก็จะสามารถลดความเครียดในพืชที่เกิดจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และหากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติอื่น ๆ ในการส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น การสร้างฮอร์โมนกลุ่ม auxin, cytokinin หรือความสามารถในการตรึงไนโตรเจนด้วย ก็จะสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญได้อีกทางหนึ่ง

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญในเนื้อเยื่อพืชได้ (endophytic bacteria) โดยไม่เป็นอันตรายต่อพืช (Mano and Morisaki, 2008) โดยกลุ่มแบคทีเรียเหล่านี้พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้เช่นกัน โดยพบว่ากลุ่ม endophytic bacteria ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชมีความหลากหลายสูงภายในต้นข้าว (Prakamhang et al., 2009) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบ endophytic bacteria ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase สูง หรือผลิตฮอร์โมนอื่น ๆ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อพืชได้โดยตรง ดังนั้นการพัฒนาปุ๋ยชีวภาพโดยการเลือกใช้กลุ่มของ

แบคทีเรียที่เจริญในเนื้อเยื่อพืช (endophytic bacteria) จะส่งผลดีแก่พืชโดยตรงเนื่องจากเมื่อเชื้อแบคทีเรียเข้าไปเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืชแล้วจะเป็นการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียเมื่อพืชต้องเจริญอยู่ในสภาะที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้พืชยังสามารถนำฮอร์โมนที่ผลิตไปใช้ได้ทันที ลดการสูญเสียสู่สิ่งแวดล้อม เช่น การถูกเจือจางในสภาวะน้ำท่วมขัง เป็นต้น ดังนั้นการหันมาใช้เชื้อแบคทีเรียที่เจริญในเนื้อเยื่อพืช และสามารถปรับระดับฮอร์โมนที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งสำหรับการพัฒนาปุ๋ยชีวภาพ เพื่อใช้กับการปลูกข้าวในสถานการณ์ที่ปริมาณน้ำขาดแคลน หรือมีน้ำท่วมขังที่เกิดจากสภาพอากาศแปรปรวนจากสภาวะโลกร้อน

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase และมีคุณสมบัติอื่น ๆ ในการส่งเสริมการเจริญของพืช

1.2.2 เพื่อให้ทราบถึงผลของการใช้เชื้อแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่คัดเลือกได้ในรูปปุ๋ยชีวภาพต่อการส่งเสริมการเจริญของข้าว การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางชีวเคมีของต้นข้าว ตำแหน่งที่อยู่ของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช รวมทั้งการแสดงออกของยีนในแบคทีเรียอาศัยในเนื้อเยื่อพืชเมื่อปลูกในสภาวะปกติ สภาวะเครียดที่เกิดจากน้ำท่วมขัง และสภาวะขาดแคลนน้ำในระดับกระถาง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการรวบรวมเชื้อแบคทีเรียเจริญได้ในเนื้อเยื่อพืช (endophytic bacteria) เดิมที่มีอยู่จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเจริญได้ในเนื้อเยื่อพืชเพิ่มเติมจากตัวอย่างข้าวที่ปลูกในพื้นที่ต่าง ๆ ทั้งที่มีการทำนาน้ำลึก และนาดอน จากนั้นทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือก endophytic bacteria ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase สูง รวมทั้งตรวจสอบเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรีย คุณสมบัติอื่น ๆ ในการส่งเสริมการเจริญของพืช พร้อมทั้งยืนยันการเป็น endophytic bacteria โดยการตรวจสอบตำแหน่งที่อยู่ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในพืชเมื่อปลูกเชื้อร่วมกับข้าว จากนั้นดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของการใช้ endophytic bacteria ที่คัดเลือกได้ในรูปปุ๋ยชีวภาพ ต่อการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะปกติ สภาวะเครียดที่เกิดจากน้ำท่วมขัง และสภาวะขาดแคลนน้ำ ในระดับกระถาง โดยทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางชีวเคมีของต้นข้าว รวมทั้งตรวจสอบและติดตามจำนวน และตำแหน่งที่อยู่ของ endophytic bacteria ในเนื้อเยื่อพืช และการแสดงออกของยีนที่สำคัญในแบคทีเรียที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืช ระหว่างการเจริญของพืชในสภาวะต่าง ๆ

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1.4.1 ได้เชื้อ endophytic bacteria ที่มีความสามารถในการลดความเครียดที่เกิดจากสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม รวมทั้งมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวเพื่อพัฒนาให้เป็นปุ๋ยชีวภาพ

1.4.2 ได้ทราบถึงผลของการใช้ endophytic bacteria ที่คัดเลือกได้ ต่อการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาวะปกติ หรือการลดความเครียดในพืชเมื่อพบกับสภาวะเครียดที่เกิดจากน้ำท่วมขัง และสภาวะขาดแคลนน้ำในระดับกระถาง

1.4.3 ได้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางชีวเคมีของข้าว เมื่อได้รับอิทธิพลจากการใช้ endophytic bacteria ในการส่งเสริมการเจริญในสภาวะต่าง ๆ

1.4.4 ได้ทราบถึงตำแหน่งของ endophytic bacteria ที่ดำรงชีวิตในเนื้อเยื่อของข้าวระหว่างการเจริญในระยะต่าง ๆ

1.4.5 สามารถตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง

1.4.6 สามารถผลิตบัณฑิตระดับปริญญาเอกได้ 1 คน

1.4.7 หน่วยงานราชการต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น กรมวิชาการเกษตร นักวิชาการ รวมทั้งเกษตรกร สามารถนำองค์ความรู้ไปใช้ประโยชน์ได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การปลูกข้าวในประเทศไทยมักพบกับปัญหาที่เกิดจากสภาวะอากาศเปลี่ยนแปลง เช่น การขาดแคลนน้ำในระหว่างการปลูก หรือน้ำท่วมฉับพลัน หรือน้ำท่วมเป็นเวลานานเนื่องจากฝนตกหนัก ด้วยเหตุนี้ทำให้พืชล้มตายไป หรือผลผลิตที่ได้ลดลงเนื่องจากสภาวะเครียดที่เกิดขึ้นกับต้นข้าว โดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับพืชมักจะเกี่ยวข้องกับปริมาณฮอร์โมนที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากสภาวะแวดล้อม ทั้งนี้ฮอร์โมนเอทธิลีน เป็นฮอร์โมนหลักที่ถูกผลิตออกมามากขึ้นในพืชหากพืชถูกปลูกในสภาวะที่ไม่เหมาะสม หรือสภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียดแก่พืช (stress condition) เช่น ในสภาวะขาดแคลนน้ำ สภาวะน้ำท่วมขัง หรือในสภาวะที่มีการรบกวนจากโรคพืช แมลงศัตรูพืช เป็นต้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ ethylene ในพืชนี้จะส่งผลกระทบต่อการเจริญของระบบราก เร่งการหลุดร่วงของใบ ซึ่งจะส่งผลเสียต่อการเจริญของพืชโดยรวมในที่สุด (Abeles et al. 1992; Spaink, 1997)

จากการศึกษาพันธุกรรมของข้าวที่มีลักษณะทนต่อน้ำท่วม พบยีน *SUB1* เป็นลักษณะพันธุกรรมที่สำคัญที่ทำให้ข้าวทนต่อสภาวะน้ำท่วมได้ ยีน *SUB1* เมื่อถูกสังเคราะห์เป็นโปรตีนจะได้โปรตีนชนิด transcriptional factor ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Ethylene response factors (ERFs) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมโดยการกระตุ้นหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของพืชภายใต้สภาวะเครียด โดยยีน *SUB1* จะถูกกระตุ้นให้แสดงออกจากฮอร์โมน ethylene ที่ผลิตมากขึ้นในพืชระหว่างการเจริญในสภาวะน้ำท่วมขัง โดยการแสดงออกของยีนนี้มีผลต่อเนื่องถึงระบบฮอร์โมนอื่น ๆ ในพืช เช่น มีการสะสมโปรตีน Gibberellin (GA) signaling repressor ทำให้ปริมาณ GA ในพืชลดลงซึ่งส่งผลให้ยับยั้งการเจริญของราก นอกจากนี้ยีน *SUB1* ยังไปกระตุ้น transcription factor ในกลุ่ม AP2/EFR ซึ่งกระตุ้นให้พืชมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนไซโตไคนิน ทั้งนี้ฮอร์โมนไซโตไคนินจะกระตุ้นให้พืชหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนระหว่างสภาวะน้ำท่วมขังได้ โดยกระตุ้นวิถีไกลโคไลซิส เอนไซม์ pyruvate decarboxylase และ เอนไซม์ alcohol dehydrogenase (Jung et al., 2010) ทั้งนี้พบว่าการถ่ายทอดยีน *SUB1* และเพิ่มการแสดงออกของยีนในข้าวที่อ่อนแอต่อภาวะน้ำท่วม สามารถทำให้ข้าวนั้นทนต่อสภาวะน้ำท่วมได้ดีขึ้น (Fukao et al., 2006) ทั้งนี้ Hattori et al. (2011) ได้เสนอกลไก 2 แบบที่สามารถทำให้พืชทนต่อสภาวะน้ำท่วมขังได้ โดยกลไกที่ 1 คือ ต้นข้าวต้องการสงวนพลังงานในการเจริญระหว่างภาวะน้ำท่วมขัง เพื่อรอที่จะเจริญเติบโตต่อไปเมื่อสิ่งแวดล้อมกลับสู่สภาวะปกติ ดังนั้นจึงพยายามยับยั้งการเจริญของราก รวมทั้งลำต้น ซึ่งเป็นลักษณะที่สอดคล้องกับข้าวที่ทนต่อสภาวะน้ำท่วมโดยอาศัยการแสดงออกของยีน *SUB1* แต่อย่างไรก็ตามกลไกนี้ไม่สามารถใช้ได้ผลหากข้าวถูกน้ำท่วมขังเป็นระยะเวลานาน (Singh et al., 2011) ดังนั้นข้าวอาจใช้กลไกที่สองในการทนต่อสภาะน้ำท่วม คือ ข้าวมีการยืดยาวในส่วนของปล้องมากขึ้นจนพ้นระดับน้ำขัง ซึ่งเป็นลักษณะที่พบทั่วไปในข้าวสายพันธุ์ใหม่ส่วนใหญ่ที่ไม่มียีน *SUB1* โดยการยืดของปล้องอาศัยฮอร์โมนเอทธิลีนในการกระตุ้น และต้องอาศัยพลังงานมาก ดังนั้นการกระตุ้นการเพิ่มปริมาณไซโตไคนินจะส่งผลต่อการเจริญของลำต้นข้าว การสังเคราะห์คลอโรพลาสสำหรับใช้ในการสังเคราะห์แสง เพื่อเป็นการสร้างพลังงานให้แก่พืชในสภาวะเครียด สำหรับในสภาวะขาดแคลนน้ำถึงแม้จะยังไม่มีงานวิจัยที่แน่ชัดในข้าว แต่พบว่าฮอร์โมนพืชมีบทบาทสำคัญในการทำให้พืชทนต่อสภาวะขาดแคลนน้ำได้เช่นกัน โดยงานวิจัยของ Merewitz et al. (2011) ที่ทำในพืชตระกูลหญ้าพบว่าการเพิ่มปริมาณไซโตไคนินในพืชสามารถทำให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำได้

ดังนั้นการใช้ปุ๋ยชีวภาพที่มีจุลินทรีย์ที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืชที่มีความสามารถในการลดปริมาณฮอร์โมนเอทิลีนในพืชลงเพื่อลดผลกระทบโดยทั่วไปที่เกิดจากความเครียดของพืช หรือการเพิ่มปริมาณ

ฮอร์โมนอื่น ๆ ที่ช่วยส่งเสริมให้พืชเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดียิ่งขึ้น จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยให้พืชเผชิญกับสภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงได้ดีขึ้น

ทั้งนี้เมื่อกล่าวถึงฮอร์โมนพืช พบว่ามีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของพืชในแต่ละช่วงเวลา รวมทั้งมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งส่งผลต่อการปรับตัวในการเจริญของพืชในสภาวะนั้น ๆ โดยเฉพาะเมื่อพืชเจริญภายใต้สภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียด พืชจะผลิตฮอร์โมน ethylene เพิ่มมากขึ้น หรืออาจเรียกได้ว่าเป็น stress conditions โดยฮอร์โมน ethylene ที่ถูกผลิตมากขึ้นจะส่งผลในการยับยั้งการเจริญของราก และส่งผลให้การเจริญของพืชโดยรวมลดลงในที่สุด (Abeles et al. 1992) ในขณะที่ฮอร์โมนพืชอื่น ๆ มีส่วนสำคัญในการทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น เช่น ฮอร์โมนในกลุ่ม auxin ที่มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญของราก รวมทั้งมีบทบาทในการป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช หรือฮอร์โมนไซโตไคนิน (cytokinins) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในหลาย ๆ ด้าน เช่น การแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโตของยอด การส่งผ่านของธาตุอาหาร การสร้างคลอโรพลาส การแก่ของพืช การออกดอก รวมทั้งยังมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ (Haberer and Kieber, 2002) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสภาะเครียดที่เกิดจากปริมาณน้ำในสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม (Pospisilova et al., 2000)

ดังนั้นแนวทางการใช้ปุ๋ยชีวภาพโดยการใช้จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายสาร ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่พบในพืชเพื่อใช้ในการสร้างฮอร์โมน ethylene อาจส่งผลให้ปริมาณ ethylene ในพืชลดลง (Glick et al., 1999) เป็นหลักในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ ก็จะสามารถลดความเครียดในพืชที่เกิดจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และหากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติอื่น ๆ ในการส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น การสร้างฮอร์โมนกลุ่ม auxin, cytokinin หรือความสามารถในการตรึงไนโตรเจนด้วย ก็จะสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญได้อีกทางหนึ่ง ดังนั้นการใช้ปุ๋ยชีวภาพที่มีคุณสมบัติเหล่านี้จึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจ โดยในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญในเนื้อเยื่อพืชได้ (endophytic bacteria) โดยไม่เป็นอันตรายต่อพืช (Mano and Morisaki, 2008) โดยกลุ่มแบคทีเรียเหล่านี้พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้เช่นกัน โดยพบว่ากลุ่ม endophytic bacteria ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชมีความหลากหลายสูงภายในต้นข้าว (Prakamhang et al., 2009) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบ endophytic bacteria ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase สูง หรือผลิตฮอร์โมนอื่น ๆ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อพืชได้โดยตรง ดังนั้นหากนำมาใช้ในรูปของปุ๋ยชีวภาพสำหรับการปลูกข้าวในสภาวะที่มีน้ำท่วมขัง หรือขาดแคลนน้ำ น่าจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางชีวเคมีภายในพืชที่จะช่วยลดความเครียดที่เกิดกับพืช รวมทั้งช่วยให้การเจริญเติบโต หรือทนอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมนั้น ๆ ได้ดีขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3. วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

ก. เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 1 ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้

3.1 การคัดแยกเชื้อ endophytic bacteria จากเนื้อเยื่อข้าว

ทำการเก็บตัวอย่างข้าว (*Oryza sativa* cultivar Pathumtani 1) ที่ปลูกในเขตพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา จากนั้นนำตัวอย่างข้าวที่ได้มาทำการคัดแยกเชื้อ endophytic bacteria จากเนื้อเยื่อข้าว โดยนำตัวอย่างพืชสดที่เก็บได้มาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นทำการกำจัดเชื้อที่อยู่บริเวณผิวรอบรากภายนอก (surface sterilization) โดยแช่ใน 70% Ethyl alcohol นาน 5 นาที จากนั้นแช่ใน 3% Sodium hypochlorite ที่ผสมกับ 0.3% Tween-80 เป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5-6 ครั้ง เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่เกาะอยู่ภายนอกบริเวณผิวราก แล้วตรวจสอบยืนยันการกำจัดเชื้อปนเปื้อนภายนอกโดยนำชิ้นส่วนของพืชนั้นไปสัมผัสบนอาหาร nutrient agar (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เพื่อยืนยันว่าไม่มีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนที่บริเวณผิวภายนอกของข้าว ตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อปนเปื้อนบริเวณผิวรอบรากถูกนำมาทำการสกัดเชื้อออกจากเนื้อเยื่อของข้าวด้วยการบดโดยใช้ quartz sand ในสารละลาย 0.8% saline solution จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางในระบบ ten-fold dilution โดยนำตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 เท่า มา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ RMR agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 5-7 วัน เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ในเบื้องต้น (Prakamhang et al. 2009) ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันแล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติอื่น ๆ ต่อไป โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ endophytic bacteria ที่คัดแยกได้จากข้าวซึ่งเก็บรวบรวมไว้ ณ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ม.เทคโนโลยีสุรนารี

3.2 การทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการส่งเสริมการเจริญของพืช

3.2.1 การทดสอบเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ทำการคัดเลือกในอาหารเหลว (minimal medium) ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการเลี้ยงโดยเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ ACC ขึ้นไป ขั้นละ 0.5 mM เริ่มจาก 0.5 mM จนถึง 3 mM เพื่อคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ ACC deaminase และใช้ ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญได้ โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญได้ไปทำการทดสอบยืนยันความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase โดยวัดจากค่า ACC deaminase activity (Tittabutr et al., 2008)

3.2.2 การทดสอบเชื้อที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืช กลุ่ม auxin (indole acetic acid, IAA) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลว NB ที่มีการเติม tryptophan 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ late log phase นำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ supernatant ที่ได้ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 5 มิลลิลิตร ของสารละลาย Salkowski reagent

(0.01 M $FeCl_2$ ใน $HClO_4$) แล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีโดยใช้ spectrophotometer ทั้งนี้ใช้สาร IAA บริสุทธิ์ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

ข. เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 2 ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้

3.3 การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวเมื่อปลูกภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม

3.3.1 เตรียมเชื้อ endophytic bacteria ที่คัดเลือกได้โดยเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^9 cells/ml สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อในการทดสอบกับพืช

3.3.2 เตรียมข้าวที่จะทดสอบโดยใช้ข้าวเจ้าสายพันธุ์ปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ไวแสง สามารถปลูกได้ตลอดปี โดยทำการกำจัดเชื้อปนเปื้อนบนผิวเมล็ดข้าว (surface sterilization) ด้วยสารผสมระหว่าง 96% ethanol และ 3% hydrogen peroxide (1:1, v/v) เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3-5 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะจนเกิดราก แล้วจึงนำเมล็ดไปแช่ในหัวเชื้อที่เตรียมไว้เป็นเวลา 1 คืน (สำหรับตำรับควบคุมให้นำเมล็ดไปแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 คืน) ก่อนทำการปลูกในกระถางทดสอบโดยใช้ทรายปลอดเชื้อเป็นวัสดุปลูก (2 กิโลกรัมต่อกระถาง) และใช้น้ำปลอดเชื้อผสมกับสารละลาย Hoagland-Arnon solution ความเข้มข้น 50% เพื่อเป็นสารอาหารแก่พืช โดยรักษาระดับปริมาตรของสารละลายในกระถางให้เหมาะสมต่อการเจริญของต้นข้าวในแต่ละระยะสำหรับการปลูกในสภาวะปกติ โดยทำการปลูกภายใต้ชั้นแสง โดยให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง (ดัดแปลงจากวิธีการของ Arkhipova and Anokhina, 2009) เมื่อข้าวเจริญได้ 2-4 สัปดาห์ จึงเริ่มทำการทดสอบในสภาวะเครียดต่อไป ดังนี้

3.3.2.1 การทดสอบในสภาวะน้ำท่วมขัง ทำได้โดยการทดสอบต่อเนื่องหลังจากข้าวเจริญในสภาวะปกติได้ 4 สัปดาห์ โดยทำการเพิ่มระดับน้ำในกระถางให้สูงขึ้นกว่าสภาวะปกติจนท่วมต้นข้าว เป็นระยะเวลานาน 1 สัปดาห์ จากนั้นลดระดับน้ำให้อยู่ในสภาวะปกติต่อเนื่อง 1 สัปดาห์

3.3.2.2 การทดสอบในสภาวะขาดน้ำ ทำได้โดยการทดสอบต่อเนื่องหลังจากที่ข้าวเจริญในสภาวะปกติได้ 2 สัปดาห์ จะไม่มีการรดน้ำเพิ่มเติมจนกระทั่งน้ำที่อยู่เหนือทรายแห้งไป หลังจากนั้นจึงทำการรดน้ำผสมสารอาหารปริมาตร 150 ml จำนวน 1 ครั้งต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

3.3.3 ทำการตรวจผลการส่งเสริมการเจริญเบื้องต้นของข้าวที่ปลูกภายใต้สภาวะเครียดทั้งสองสภาวะ โดยตรวจสอบน้ำหนักต้น ความยาวต้น น้ำหนักราก และความยาวราก เพื่อใช้ในการประเมินและคัดเลือกเชื้อ endophytic bacteria เพื่อไปทำการทดสอบในขั้นต่อไป พร้อมทั้งจำแนกสายพันธุ์โดยใช้วิธีการอ่านลำดับเบสของยีน 16S rRNA

3.4 การติดตามเชื้อ endophytic bacteria ในเนื้อเยื่อข้าว

ทำการถ่ายทอดพลาสมิด miniTn5-*gus* ที่มียีน β-glucuronidase ให้กับ endophytic bacteria ที่คัดเลือกได้โดยวิธีการ conjugation โดยใช้เป็น Reporter gene ในระบบการติดตาม เพื่อเป็นการยืนยันความสามารถในการเข้าสู่เนื้อเยื่อข้าว และติดตามตำแหน่งที่อยู่ของ endophytic bacteria ในส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยการตัด section ชิ้นส่วนของพืชให้มีขนาดความหนา 30-50 ไมโครเมตร แล้วทำการย้อมตัวอย่างด้วยสาร X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid) เพื่อใช้เป็น substrate ในการย้อมด้วยวิธี Gus-staining นอกจากนี้ทำการยืนยันความสามารถในการเข้าสู่เนื้อเยื่อข้าวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) พร้อมกับตรวจสอบจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อข้าว หลังจากการปลูกเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 7 วัน ภายใต้

สภาวะปกติ โดยใช้เทคนิค Total plate count โดยการทดลองทั้งหมดทำเปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ

3.5 การตรวจสอบผลของการใช้เชื้อ endophytic bacteria ต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางชีวเคมีของพืชที่เกี่ยวข้องกับการเจริญภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะขาดน้ำ

3.5.1 การเตรียมการปลูกข้าว

นำเมล็ดข้าวสายพันธุ์ ปทุมธานี 1 ที่ผ่านการแกะเปลือกแล้วมาทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิว (surface sterilization) โดยแช่ใน 70% เอทานอล เป็นเวลา 5 นาที และ 3% โซเดียมไฮโปคลอไรด์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้ออย่างน้อย 5-6 ครั้ง นำเมล็ดข้าวบ่มในที่มืดจนเมล็ดงอก

3.5.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ทำการปลูกเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่คัดแยกได้และผ่านการทดสอบการส่งเสริมการเจริญของข้าวในเบื้องต้นแล้วคือ ไอโซเลท R64, R48, เทียบกับ SUT9-2 โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract-Mannitol (YEM) (Somasegaran และ Hoben, 1994) ที่ 30 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

3.5.3 การปลูกเชื้อแบรดีไรโซเบียมในข้าว

ทำการแช่เมล็ดข้าวปทุมธานี 1 ที่เมล็ดงอกแล้ว สารละลายเชื้อแบรดีไรโซเบียมซึ่งผ่านการล้างเซลล์เพื่อล้างอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออกด้วย 0.85% NaCl และปรับค่าความขุ่นของเซลล์ เท่ากับ 1.00 ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร แช่เมล็ดข้าวไว้นาน 1 คืน เพื่อให้เชื้อแบรดีไรโซเบียมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช จากนั้นนำไปปลูกในกระถาง Leonard jar ที่บรรจุทรายผสม vermiculite อัตราส่วน 2:1 ส่วน ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และ เติม Hoagland solution ทำการปลูกพืชในห้องควบคุมแสงและอุณหภูมิ (ควบคุมโปรแกรมแสงสว่างให้อยู่ที่แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และมืด 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 300 $\mu E/m^2S$, อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สำหรับชุดการทดลองในสภาวะขาดน้ำ ทำการเท Hoagland solution ออกแล้วปล่อยให้แห้งนาน 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการตรวจสอบผล น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ของข้าวเทียบกับชุดควบคุมใส่เชื้อและไม่ใส่เชื้อในสภาวะปกติ และ สภาวะขาดน้ำ

3.5.4 การตรวจสอบการตอบสนองต่อการขาดน้ำ Drought Sensitivity (DRS) และการฟื้นตัวของพืช Recovery (DRR)

ข้าวในชุดการทดลองสภาวะขาดน้ำ ได้ทำการตรวจสอบ % leaf rolling (ใบเหี่ยว) ตามวิธีการของ IRRI (International Rice Research Institute) หลังจากนั้นทำการเติม Hoagland solution ต่อเนื่องเป็นเวลา 10 วัน เพื่อตรวจสอบการฟื้นตัวของต้นข้าว โดยให้คะแนนใบเหี่ยวในระดับต่าง ๆ ดังนี้

การให้คะแนนใบเหี่ยว SCALE (leaf rolling at vegetative stage)

0 = Leaves healthy

1 = Leaves start to fold (shallow)

3 = Leaves folding (deep V-shape)

5 = Leaves fully cupped (U-shape)

7 = Leaf margins touching (0-shape)

9 = Leaves tightly rolled (V-shape)

3.5.5 การตรวจสอบรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงในต้นข้าว (rice pigments of photosynthetic)

นำใบข้าวมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ทำให้แห้งด้วยความเย็นด้วยเครื่อง Lyophilizer (BETA 2-8 LD, Laurel USA) นำตัวอย่างข้าวแห้ง 5 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง (plant dry weight (DW)) บดให้ละเอียดด้วยโกร่ง และไนโตเจนเหลว นำใส่หลอดทดลองเติมน้ำสะอาด 100 ไมโครลิตร เขย่าทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติม 8 มิลลิลิตร 96% ethanol เขย่านาน 5 นาที แล้วนำไปบ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง ที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที เก็บส่วนใสด้านบน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $A_{648.6}$ $A_{664.2}$ และ A_{470} เพื่อคำนวณหาปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงในต้นข้าวต่อไป (Lichtenthaler H.K.,1987)

การคำนวณหาคลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) จากสมการ

$$c_a = \frac{(13.36\ A_{664.2} - 5.19\ A_{648.6}) * 8.1}{DW} \left[mg/g\ DW\right]$$

การคำนวณหาคลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll b) จากสมการ

$$c_b = \frac{(27.43\ A_{648.6} - 8.12\ A_{664.2}) * 8.1}{DW} \left[mg/g\ DW\right]$$

การคำนวณหาแคโรทีนอยด์ (carotenoid) จากสมการ

$$c_c = \frac{(4.785\ A_{470} + 3.657\ A_{664.2} - 12.76\ A_{648.6}) * 8.1}{DW} \left[mg/g\ DW\right]$$

3.5.6 การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ ROS (Reactive Oxygen Species) scavenging enzymes

3.5.6.1 การตรวจสอบเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)

นำต้นข้าวที่ต้องการตรวจสอบล้างทำความสะอาด ซับน้ำให้แห้งชั่งน้ำหนัก 500 มิลลิกรัม จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดโดยโกร่งและไนโตรเจนเหลว แบ่งตัวอย่างใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 1 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.8) (50 mM Na-PO_4, 1mM EDTA Na_2 และ 2% Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)) เพื่อทำการสกัดเอนไซม์นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 rpm นาน 5 นาที เก็บส่วนใสของสารละลาย (supernatant) เพื่อทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐาน Bradford assay และทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ SOD โดยดูดส่วนใส 20 ไมโครลิตรของตัวอย่างลงใน 96 well plate จากนั้นเติมสารทำปฏิกิริยา 125 ไมโครลิตร (50 mM Na-PO_4 (pH 7.8), 1 mM Nitro blue tetrazolium chloride (NBT), L-methionine, 0.01 M Na_2EDTA และ 0.2 mM Riboflavin) (Banowetz et al., 2004) โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.8) 20 ไมโครลิตร โดยให้ชุดไม่ให้แสงเป็น blank และให้แสงเป็นชุดควบคุม (control) ทำการตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ 560

นาโนเมตร ณ เวลาเริ่มต้นก่อนให้แสง (t=0) และให้แสงสว่างใต้หลอดฟลูออเรสเซนต์ ขนาด 18 วัตต์ เป็นระยะเวลา 10 นาที (t=10) เพื่อเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์จากค่า 50% inhibition ของการเกิดปฏิกิริยาเทียบกับ SOD อ้างอิง จากสมการ (Wang et al., 2012)

กิจกรรมของเอนไซม์ SOD (U/g protein) =

$$\left(\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ blank - ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ blank * 50\%* ปริมาตรสารประกอบในการทำปฏิกิริยา}}\right)/\text{กรัมโปรตีนของตัวอย่าง}$$

3.5.6.2 การตรวจสอบเอนไซม์ Ascorbate peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11)

นำต้นข้าวที่ต้องการตรวจสอบล้างทำความสะอาด ซับน้ำให้แห้งชั่งน้ำหนัก 500 มิลลิกรัม จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดโดยโกร่งและไนโตรเจนเหลว แบ่งผงข้าวใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 1 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) (50 mM Na-PO_4, 1mM Na_2EDTA, 2 mM Ascorbate และ 2% PVPP) เพื่อทำการสกัดเอนไซม์ ปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 rpm นาน 5 นาที เก็บส่วนใสของสารละลาย (supernatant) เพื่อทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐาน Bradford assay และทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ APX โดยดูดส่วนใส 20 ไมโครลิตร ของตัวอย่างลงใน 96 well plate จากนั้นเติมสารทำปฏิกิริยา 180 ไมโครลิตร (50 mM Na-PO_4 (pH 7.0), 1 mM EDTA และ 5 mM ascorbate) โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) 20 ไมโครลิตร เป็นชุดควบคุม (blank) เติม 0.1 มิลิโมลลาร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ก่อนทำการตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตร อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 180 วินาที คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์จากค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง (2.8 mM^{-1} cm^{-1}) (extinction coefficient) จากสมการ (Aebi HE, 1983)

กิจกรรมของเอนไซม์ APX (U/g protein) =

$$\left(\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ blank - ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง * 1000 * ปริมาตรสารประกอบในการทำปฏิกิริยา}}{2.8\ mM^{-1}\ cm^{-1} * \text{ความสูงของ well * เวลา (นาที) *ปริมาตรของตัวอย่าง}}\right)/\text{กรัมโปรตีนของตัวอย่าง}$$

3.5.6.3 การตรวจสอบเอนไซม์ Catalase (CT) (EC 1.11.1.6)

นำต้นข้าวที่ต้องการตรวจสอบล้างทำความสะอาด ซับน้ำให้แห้งชั่งน้ำหนัก 500 มิลลิกรัม จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดโดยโกร่งและไนโตรเจนเหลว แบ่งผงข้าวใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCL (pH7.8), 0.1mM EDTA Na_2, 2 % Triton X-100, 1 mM PMSF และ 2 mM Dithiotheritol (DTT) เพื่อทำการสกัดเอนไซม์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 rpm นาน 5 นาที เก็บส่วนใสของสารละลาย (supernatant) เพื่อทำการตรวจสอบปริมาตรโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐาน Bradford assay และทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ catalase โดยดูดส่วนใส 20 ไมโครลิตร ของตัวอย่างลงใน 96 well plate จากนั้นเติมสารทำปฏิกิริยา 170 ไมโครลิตร (50 mM Na-PO_4 (pH 7.0) และ 0.1 mM EDTA) โดยใช้น้ำ 20 ไมโครลิตร และไม่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นชุดควบคุม (blank) เติม 10 ไมโครลิตร 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ก่อนการทำการตรวจสอบค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ 240 นาโนเมตร อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 180 วินาที คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์จากค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง (39.4 mM^{-1} cm^{-1}) (extinction coefficient) จากสมการ (Aebi HE, 1983)

กิจกรรมของเอนไซม์ CT (U/g protein) =

$$\left(\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ blank - ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง * 1000 * ปริมาตรสารประกอบในการทำปฏิกิริยา}}{\text{39.4 } mM^{-1}\ cm^{-1} \text{ * ความสูงของ well * เวลา (นาที) *ปริมาตรของตัวอย่าง}}\right)/\text{กรัมโปรตีนของตัวอย่าง}$$

3.5.7 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของต้นข้าว

ดำเนินการตรวจสอบโดยใช้ต้นข้าวจากแต่ละตำรับการทดลองในการตรวจสอบความยาวใบ พื้นที่ใบ โดยใช้เครื่องมือวัดพื้นที่ใบ ณ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช รวมทั้งวัดความยาวต้น ความยาวราก จากนั้นนำส่วนของใบ ลำต้น และรากไปอบที่อุณหภูมิ 85°C เพื่อหาน้ำหนักใบแห้ง น้ำหนักต้นแห้ง และน้ำหนักรากแห้งต่อต้น

3.5.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการทดสอบแต่ละสภาวะจะวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยมีจำนวนซ้ำ 5 ซ้ำ และทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละตำรับการทดลองโดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การคัดเลือกเชื้อ endophytic bacteria จากเนื้อเยื่อข้าว

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อคัดแยก และคัดเลือกเชื้อ endophytic bacteria ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญ หรือช่วยลดความเครียดให้กับพืชเมื่อเจริญภายใต้สภาวะเครียดจากการขาดน้ำ และจากสภาวะน้ำท่วมขัง ทั้งนี้จากการทดลองสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในเนื้อเยื่อข้าวที่มีลักษณะแตกต่างกันได้จำนวน 22 ไอโซเลท โดยเมื่อนำมาทดสอบเปรียบเทียบกับเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีความสามารถเป็น endophytic bacteria ในข้าวได้ และสามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวได้เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ โดยเมื่อตรวจสอบความสามารถของการมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในเบื้องต้น โดยการเลี้ยงบนอาหารที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้น 0.5-3.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ในอาหารที่มี ACC ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และมีเชื้อจำนวน 16 ไอโซเลท รวมทั้ง SUTN9-2 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี ACC ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่มีเพียงเชื้อ SUTN9-2 ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี ACC ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และไม่พบเชื้อใดสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของ ACC ที่ 5 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจสอบความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช (IAA) พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้จำนวน 15 ไอโซเลท รวมทั้งเชื้อ SUTN9-2 มีความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช โดยมีเชื้อจำนวน 6 ไอโซเลท สามารถผลิต IAA ได้ในระดับที่สูงกว่าเชื้อ SUTN9-2 (ตารางที่ 1)

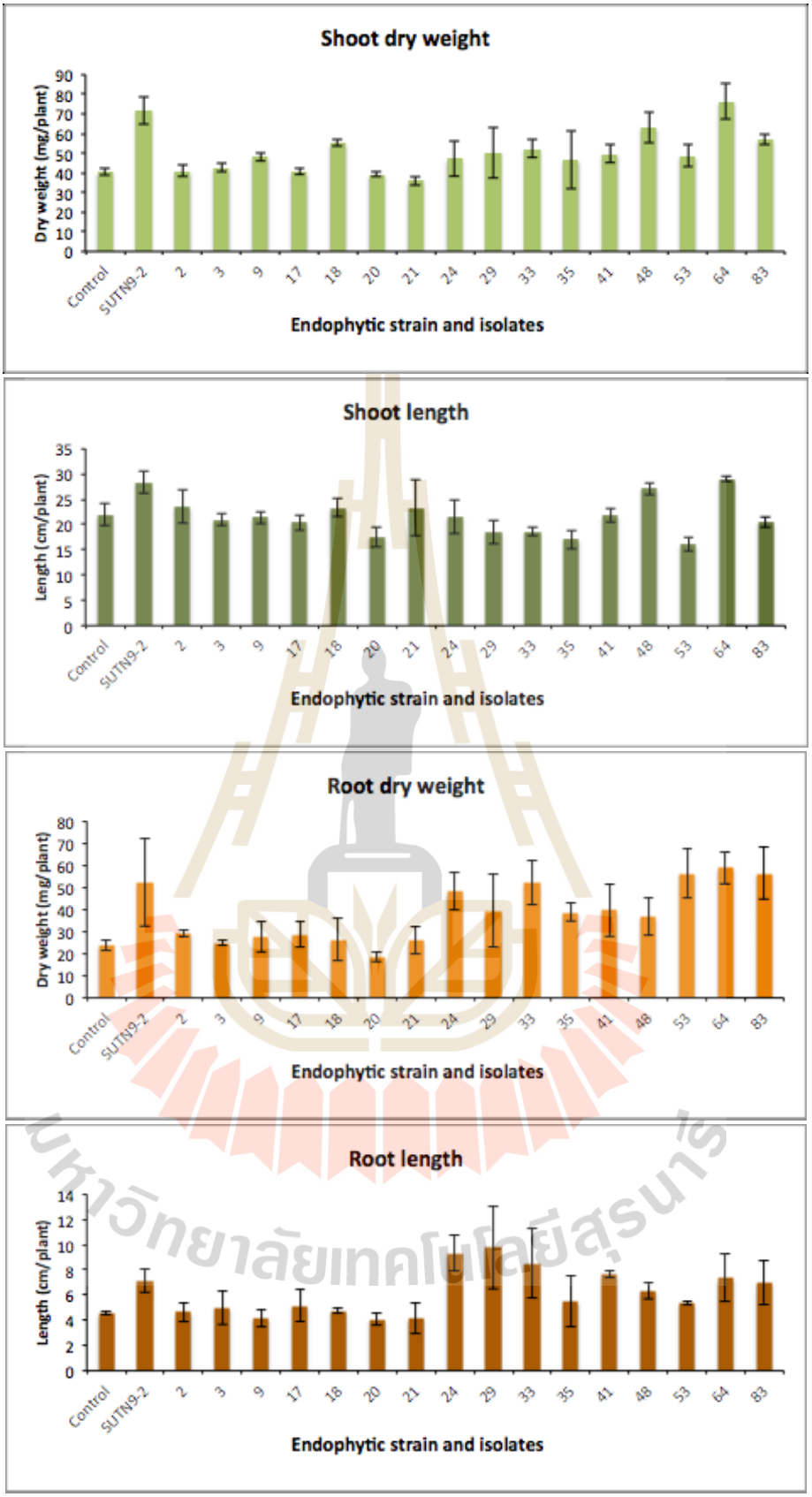
การคัดเลือกเชื้อที่เป็น endophytic bacteria มาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าว เนื่องจากแนวคิดในการเพิ่มประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพ ซึ่งการใช้เชื้อที่มีลักษณะเป็น epiphyte หรือเจริญอยู่รอบ ๆ รากพืช มีโอกาสที่จะเผชิญกับปัจจัยต่าง ๆ ทั้งทางกายภาพ และชีวภาพ ที่อาจทำให้เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ลดจำนวนลง เช่น อุณหภูมิ pH ในดินที่ไม่เหมาะสม รวมทั้งการเผชิญกับจุลินทรีย์อื่นในดินที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะหรือการแข่งขันเพื่อหาอาหารบริเวณรอบ ๆ รากพืช ดังนั้นการใช้เชื้อ endophytic bacteria ซึ่งเข้าอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชได้ จึงเป็นแนวทางที่ลดการเผชิญกับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมภายนอก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงให้ความสำคัญกับการคัดเลือกเชื้อ endophytic bacteria ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เป็นหลัก เนื่องจากเอนไซม์นี้เปลี่ยน ACC ซึ่งเป็นสารที่ใช้สร้างฮอร์โมนเอทธิลีน โดยเมื่อพืชเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสม จะมีการสร้างเอทธิลีนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นโมเลกุลสัญญาณที่หากมีปริมาณสูงจะทำให้พืชเกิดความเครียด ส่งผลต่อการเจริญ และผลผลิตของพืชนั้น ๆ โดยในการทดลองได้ใช้เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ซึ่งเป็น endophytic bacteria ที่อยู่อาศัยในเนื้อข้าวที่สามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวได้เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ เป็นตัวเปรียบเทียบเมื่อทำการทดสอบภายใต้สภาวะเครียดแบบต่าง ๆ จากการทดลองพบว่าเชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญโดยใช้ ACC ที่ระดับ 0.5 มิลลิโมลาร์ ได้แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นมีเชื้อเพียงบางไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่ ACC เมื่อมีความเข้มข้นสูงเกินไปอาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์ อย่างไรก็ตามเชื้อ SUTN9-2 มีความสามารถในการเจริญในอาหารที่มี ACC ที่ความเข้มข้นสูงได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นไปตามผลการทดลองในงานวิจัยที่ผ่านมาที่ SUTN9-2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase สูง (พรรณลดา และคณะ, 2559) แต่ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ที่สูงอาจไม่ได้บ่งบอกถึงความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชภายใต้สภาวะเครียดได้ดีเสมอไป โดยอาจมีกลไกอื่น ๆ ที่ใช้ร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญของพืชด้วย ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจสอบเชื้อที่คัดแยกได้กับพืชต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในเนื้อเยื่อพืชในการเจริญบนอาหารที่มี ACC และความสามารถในการสร้าง IAA

Strain/isolate	Ability to grow on medium containing different concentrations of ACC				IAA production ability
	0.5 mM	1 mM	2.5 mM	5 mM	
SUTN 9-2	+	+	+	-	+
R2	+	+	-	-	-
R3	+	+	-	-	+
R7	+	-	-	-	+
R9	+	+	-	-	-
R14	+	-	-	-	-
R17	+	+	-	-	+
R18	+	+	-	-	-
R20	+	+	-	-	-
R21	+	+	-	-	-
R24	+	+	-	-	++
R26	+	-	-	-	-
R29	+	+	-	-	++
R33	+	+	-	-	++
R35	+	+	-	-	+
R37	+	-	-	-	++
R41	+	+	-	-	+
R48	+	+	-	-	+
R53	+	+	-	-	+
R59	+	-	-	-	++
R64	+	+	-	-	+
R83	+	+	-	-	+
R88	+	-	-	-	++

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จากนั้นเมื่อทำการทดสอบความสามารถของเชื้อที่คัดแยกได้ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวเมื่อปลูกในสภาวะขาดน้ำ โดยตรวจสอบน้ำหนักต้น (น้ำหนักแห้ง) ความยาวต้น น้ำหนักราก (น้ำหนักแห้ง) และความยาวราก พบว่าการปลูกข้าวภายใต้สภาวะขาดน้ำในตำรับควบคุมที่ไม่มีการใช้เชื้อ ให้น้ำหนักต้นอยู่ที่ระดับ 40 มิลลิกรัมต่อต้น ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลท R64 และเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ส่งเสริมให้พืชมีน้ำหนักต้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยให้น้ำหนักต้นสูงที่สุดที่ประมาณ 70 มิลลิกรัมต่อต้น รองลงมาคือแบคทีเรียไอโซเลท R48 ที่ให้น้ำหนักต้นประมาณ 60 มิลลิกรัมต่อกต้น ซึ่งทั้ง 3 เชื้อนี้ให้ผลแตกต่างจากตำรับควบคุมที่ไม่มีการใส่เชื้ออย่างเห็นได้ชัด ผลการทดลองที่ได้จากการตรวจวัดน้ำหนักต้นสอดคล้องกับผลที่ได้จากการตรวจวัดความยาวต้น โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R64 ยังคงให้ความยาวของต้นสูงที่สุดประมาณ 29 เซนติเมตร รองลงมาคือเชื้อ SUTN9-2 และเชื้อไอโซเลท R48 ซึ่งให้ความยาวของต้นประมาณ 27 เซนติเมตร และ 26 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ต้นข้าวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อมีความยาวต้นประมาณ 21 เซนติเมตร และเมื่อตรวจสอบน้ำหนักราก (น้ำหนักแห้ง) พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R64 ยังคงให้น้ำหนักรากสูงสุดที่ประมาณ 60 มิลลิกรัมต่อต้น รองลงมาคือ แบคทีเรียไอโซเลท R83 และ R53 ให้น้ำหนักรากที่ประมาณ 57 มิลลิกรัมต่อต้น และเชื้อไอโซเลท R33 และเชื้อ SUTN9-2 ให้น้ำหนักรากที่ประมาณ 51 มิลลิกรัมต่อต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับข้าวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (น้ำหนักรากที่ประมาณ 23 มิลลิกรัมต่อต้น) แต่เมื่อตรวจสอบความยาวราก พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R29 ให้ความยาวรากสูงสุดที่ประมาณ 10 เซนติเมตร รองลงมาคือแบคทีเรียไอโซเลท R24 และ R33 ซึ่งให้ความยาวรากที่ 8.6 และ 8.1 เซนติเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 1) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากผลการส่งเสริมการเจริญของข้าวภายใต้สภาวะขาดน้ำในเบื้องต้นโดยรวม พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R64, R48 และ SUTN9-2 ส่งผลส่งเสริมการเจริญของข้าวได้ดีที่สุดภายใต้สภาวะขาดน้ำ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase และความสามารถในการสร้างฮอร์โมน IAA โดยเป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อทั้งสามชนิดมีระดับการสร้างฮอร์โมน IAA น้อยกว่าเชื้อแบคทีเรียอื่นที่ทดสอบ แต่กลับพบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะขาดน้ำได้ ในขณะที่เชื้อไอโซเลท R29, R24 และ R33 พบว่าส่งเสริมให้รากมีความยาวเพิ่มขึ้นมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับระดับ IAA ที่มากกว่าเชื้อไอโซเลทอื่น ๆ (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามไม่ได้ส่งเสริมให้พืชเจริญได้ดีที่สุด ทั้งนี้เมื่อสังเกตเปรียบเทียบกับน้ำหนักรากที่น้อยกว่าไอโซเลทอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่ารากมีขนาดเล็กกว่า ซึ่งอาจมีความแข็งแรงไม่มากนัก อย่างไรก็ตามได้ดำเนินการตรวจสอบอิทธิพลของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และเคมีของต้นข้าวในส่วนต่อไป

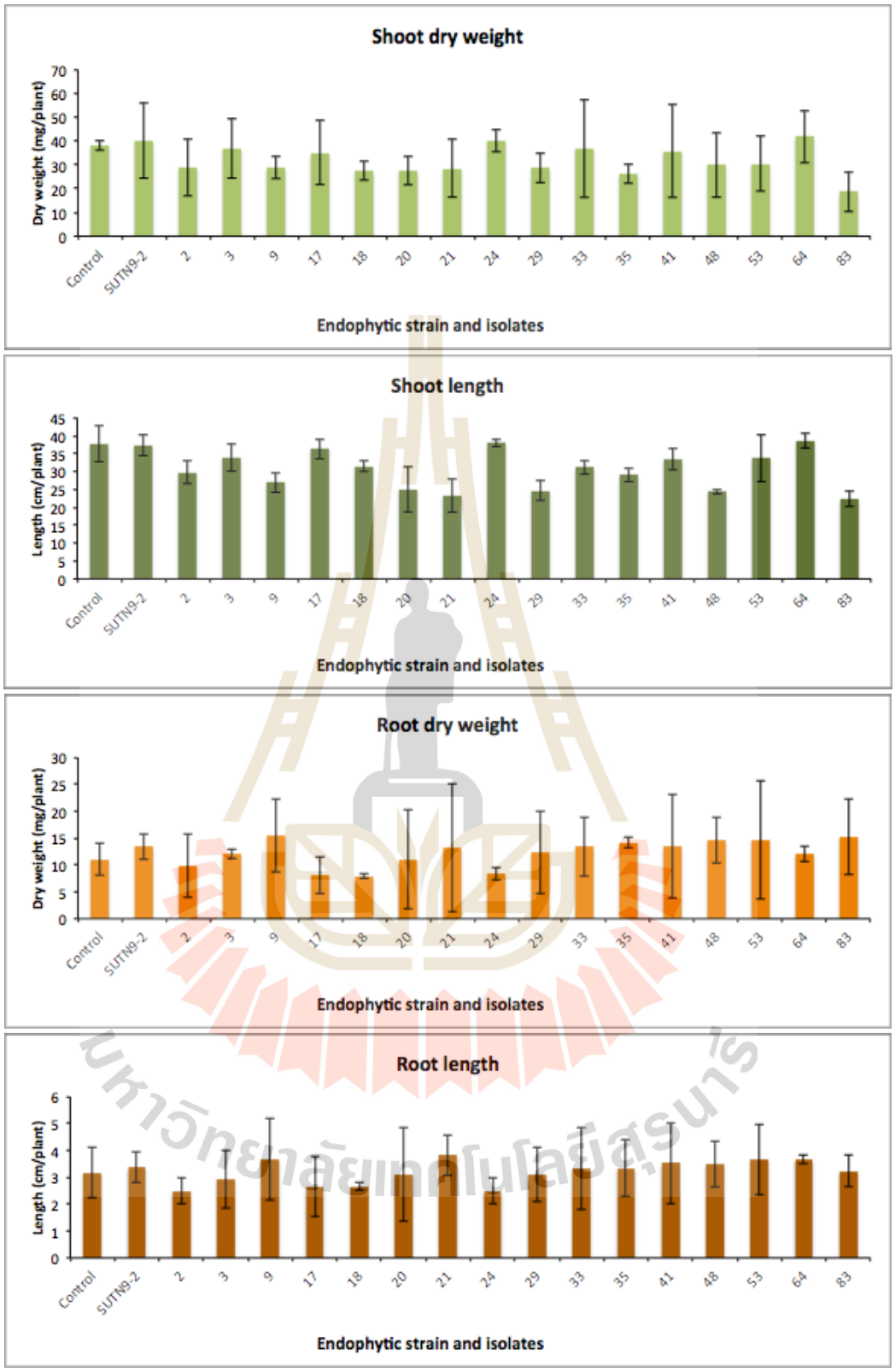


รูปที่ 1 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) เบื้องต้นในการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวภายใต้การปลูกสภาวะขาดน้ำ

ในขณะเดียวกันยังได้ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวเมื่อปลูกภายใต้สภาวะน้ำท่วม โดยเมื่อตรวจวัดน้ำหนักต้นพบว่า การใช้เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R64 ส่งผลทำให้ต้นข้าวมีน้ำหนักต้นสูงที่สุดที่ประมาณ 41 มิลลิกรัมต่อต้น รองลงมาคือ เชื้อ SUTN9-2 และไอโซเลท R24 ให้น้ำหนักต้นที่ประมาณ 39 มิลลิกรัมต่อต้น อย่างไรก็ตามผลน้ำหนักต้นข้าวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับข้าวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (38 มิลลิกรัมต่อต้น) โดยเมื่อตรวจวัดความยาวต้น น้ำหนักรากแห้ง และความยาวราก พบว่าให้ผลไปในทางเดียวกันคือไม่แตกต่างจากข้าวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (รูปที่ 2) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อในกลุ่ม endophytic bacteria ที่ทำการคัดเลือกได้ไม่สามารถส่งผลให้พืชทนความเครียดที่เกิดขึ้นจากสภาวะน้ำท่วมขังได้ แม้ว่างานวิจัยที่ผ่านมาเคยมีรายงานการใช้เชื้อ endophytic bacteria ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในการช่วยให้พืชทนต่อความเครียดที่เกิดจากน้ำท่วมขังได้ (Etesami et al. 2014; Grichko and Glick 2001) แต่อย่างไรก็ตามอาจมีปัจจัยอื่นที่มีผล เช่น สายพันธุ์ข้าว ความเข้ากันได้ของพืชกับแบคทีเรีย จำนวนเชื้อ endophytic bacteria ในเนื้อเยื่อข้าว ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เป็นต้น ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงจะทำการทดสอบภายใต้สภาวะขาดน้ำ เพื่อศึกษาผลของการใช้เชื้อ endophytic bacteria เป็นปุ๋ยชีวภาพ ต่อการเปลี่ยนแปลงด้านชีวเคมี ที่สัมพันธ์กับความสามารถในการลดความเครียดให้กับพืชเมื่อเจริญภายใต้สภาวะขาดน้ำ

4.2 การตรวจสอบและติดตามเชื้อ endophytic bacteria ที่ทำการทดสอบในเนื้อเยื่อข้าว

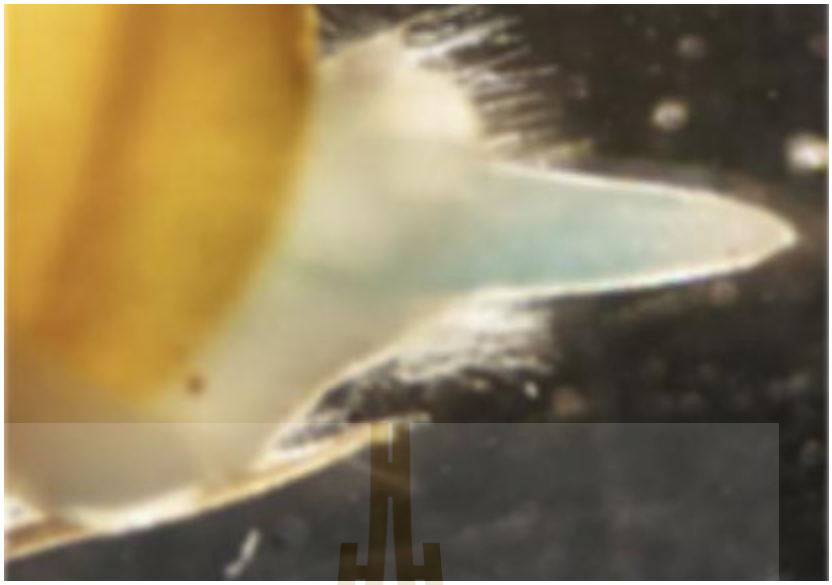
เพื่อยืนยันความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของ endophytic bacteria จึงได้ทำการถ่ายทอดยีน *gusA* เข้าสู่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R48 และ R64 ที่คัดเลือกได้จากการทดลองในเบื้องต้น เชื้อที่ได้รับการถ่ายทอดยีนนี้จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ β-Glucuronidase ที่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid) ให้เป็นสีฟ้าได้เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Gus-staining เพื่อใช้ในการติดตามตำแหน่งที่อยู่ของเชื้อ โดยเมื่อทำการตรวจสอบเนื้อเยื่อพืชบริเวณปลายราก หลังจากปลูกเชื้อไปแล้ว 3 วัน พบการติดสีฟ้าในเนื้อเยื่อข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลท โดยพบแบคทีเรียไอโซเลท R64 ติดสีเข้มกว่ารากข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อ R48 (รูปที่ 3) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อทั้งสองไอโซเลทมีความสามารถในการเป็น endophytic bacteria ในเนื้อเยื่อข้าวได้จริง โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R64 มีความสามารถในการเข้าสู่เนื้อเยื่อข้าวได้ดีกว่าไอโซเลท R48 ซึ่งในการทดลองต่อไปจะได้ทำการตรวจสอบยืนยันจำนวนเชื้อในเนื้อเยื่อข้าวหลัง 30 วัน



รูปที่ 2 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) เบื้องต้นในการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวภายใต้การปลูกสภาวะน้ำท่วม

นอกจากนี้เมื่อทำการตัดเนื้อเยื่อข้าว (section) ในตัวอย่างข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อไอโซเลท R64 แล้วทดสอบ Gus-staining เพื่อตรวจสอบตำแหน่งที่แบคทีเรียเคลื่อนที่เข้ามาอยู่ในเนื้อเยื่อหลังจากปลูกเชื้อไปแล้ว 7 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R64 สามารถเคลื่อนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้จริง โดยพบแบคทีเรียกระจายตัวอยู่ทั้งในช่องว่างระหว่างเซลล์ และภายในเซลล์พืชชั้น cortex, epidermis จนกระทั่งถึงชั้น endodermis ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium diazoefficien* USDA110 ซึ่งเป็นเชื้อที่เข้าสร้างปมกับถั่วเหลือง แต่ไม่มีความสามารถเป็น endophytic bacteria จึงไม่พบสีฟ้าภายในเนื้อเยื่อข้าว (รูปที่ 4) ในกรณีของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ซึ่งในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีคุณสมบัติเป็น endophytic bacteria ได้ จึงทำการตรวจสอบยืนยันความสามารถในการเข้าสู่เนื้อเยื่อข้าวอีกครั้งโดยใช้เทคนิค scanning electron microscope (SEM) เปรียบเทียบกับตัวอย่างข้าวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (รูปที่ 5) ซึ่งผลการทดลองยืนยันได้ว่าเชื้อ SUTN9-2 มีความสามารถในการเข้าสู่เนื้อเยื่อข้าวได้จริง โดยพบแบคทีเรียอยู่ภายในเซลล์พืชอย่างชัดเจน หลังจากทำการปลูกเชื้อให้กับตัวอย่างข้าวไปแล้ว 7 วัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาทดสอบนี้มีคุณสมบัติเป็น endophytic bacteria ได้ โดยเชื้อสามารถเข้าสู่เซลล์พืชได้ทางราก โดยเชื้อแบคทีเรียอาจมีกลไกต่าง ๆ เช่น เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยผนังเซลล์พืช กลไกในการเคลื่อนที่ รวมทั้งกลไกที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองจากระบบภูมิคุ้มกันของพืช (plant immunity) โดยจากงานวิจัยของ Piromyou et al. (2015) พบว่าเชื้อ SUTN9-2 มีการแสดงออกของยีนในกลุ่มเอนไซม์ pectin esterase ที่อาจมีบทบาทในการย่อยสลายผนังเซลล์พืช รวมทั้งการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Type 3 secretion system (T3SS) และ Type 4 secretion system (T4SS) ซึ่งอาจมีบทบาทในการยับยั้ง หรือกระตุ้นสัญญาณ ที่เกี่ยวข้องกับการจดจำของพืช ที่ทำให้แบคทีเรียสามารถอยู่อาศัยในเซลล์พืชได้ โดยเมื่อทำการนับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อข้าวหลังจากการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ยังคงมีชีวิตอยู่ในเซลล์พืชได้ โดยพบว่าเชื้อ Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 มีจำนวนเซลล์อยู่ในข้าวประมาณ 10^3 เซลล์ต่อกรัมของน้ำหนักพืช ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R48 และ R64 มีจำนวนเซลล์อยู่ในข้าวมากกว่า 10^4 และ 10^5 เซลล์ต่อกรัมของน้ำหนักพืช ตามลำดับ (รูปที่ 6) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญภายในเนื้อเยื่อพืชได้แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจำนวนเชื้อที่พบภายในเซลล์พืช ในแต่ละส่วน เช่น ใบ ลำต้น หรือราก ในแต่ละช่วงเวลาอาจมีความแตกต่างกัน และจำนวนเชื้อที่พบนี้อาจส่งผลโดยตรงต่อบทบาทของเชื้อในการลดความเครียดในพืชเมื่อต้องเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ซึ่งจะได้ทำการทดสอบยืนยันบทบาทของเชื้อต่อการเปลี่ยนแปลงทางภายภาพ และทางชีวเคมีของเชื้อในการทดลองต่อไป

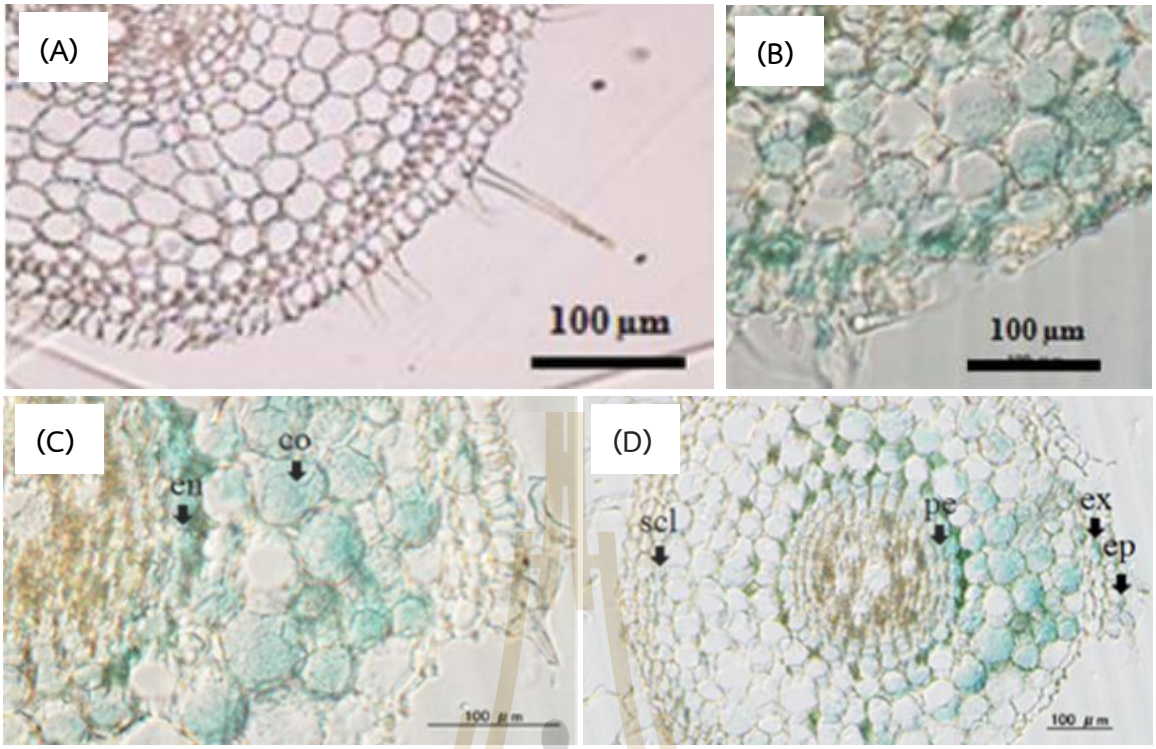
(A)



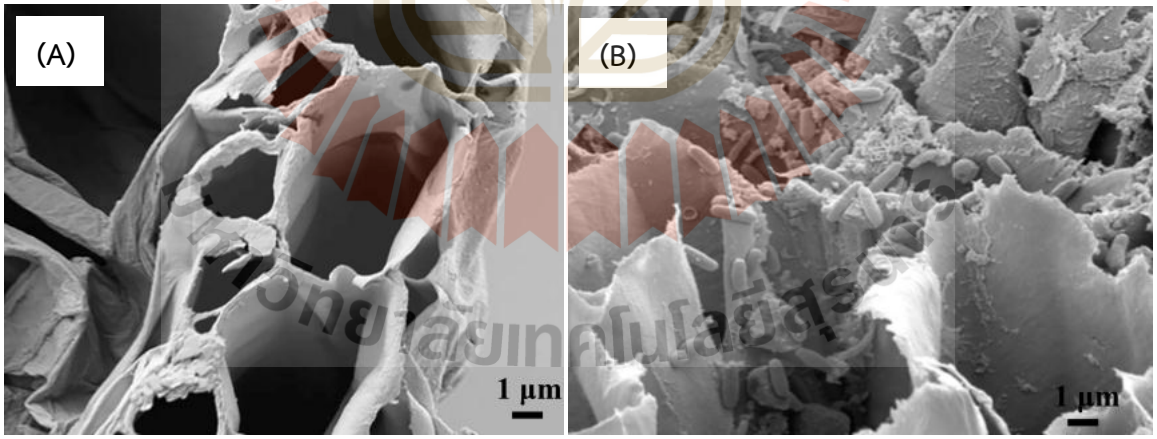
(B)

รูปที่ 3 การย้อมแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) ในรากข้าวที่ปลูกเชื้อด้วยไอโซเลท 48-*gus* (A) และไอโซเลท 64-*gus* (B) ด้วยเทคนิค *gus*-stainning หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 3 วัน ภายใต้สภาวะปกติ

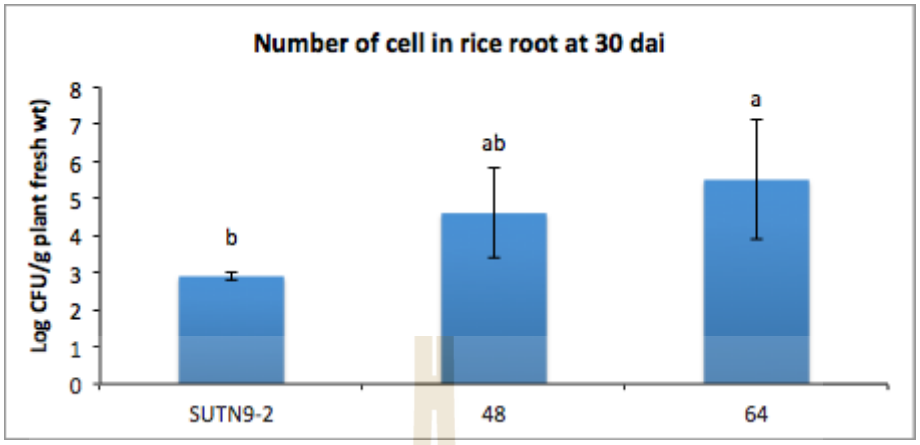
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4 การย้อมแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) ในรากข้าวที่ปลูกเชื้อด้วย *B. diazoefficiens* USDA110-*gus* (A) และไอโซเลท 64-*gus* (B-D) ด้วยเทคนิค gus-stainning หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน ภายใต้สภาวะปกติ



รูปที่ 5 รูปถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope (SEM) ในตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณรากข้าวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (non-inoculation) (A) และที่ปลูกเชื้อด้วย SUTN9-2 (B) ที่ระยะเวลา 7 วันหลังการปลูกเชื้อ ภายใต้สภาวะปกติ



รูปที่ 6 จำนวนแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) ไอโซเลทต่าง ๆ ที่พบในเนื้อเยื่อข้าว หลังจากทำการปลูกเชื้อไปแล้ว 30 วัน ภายใต้สภาวะปกติ

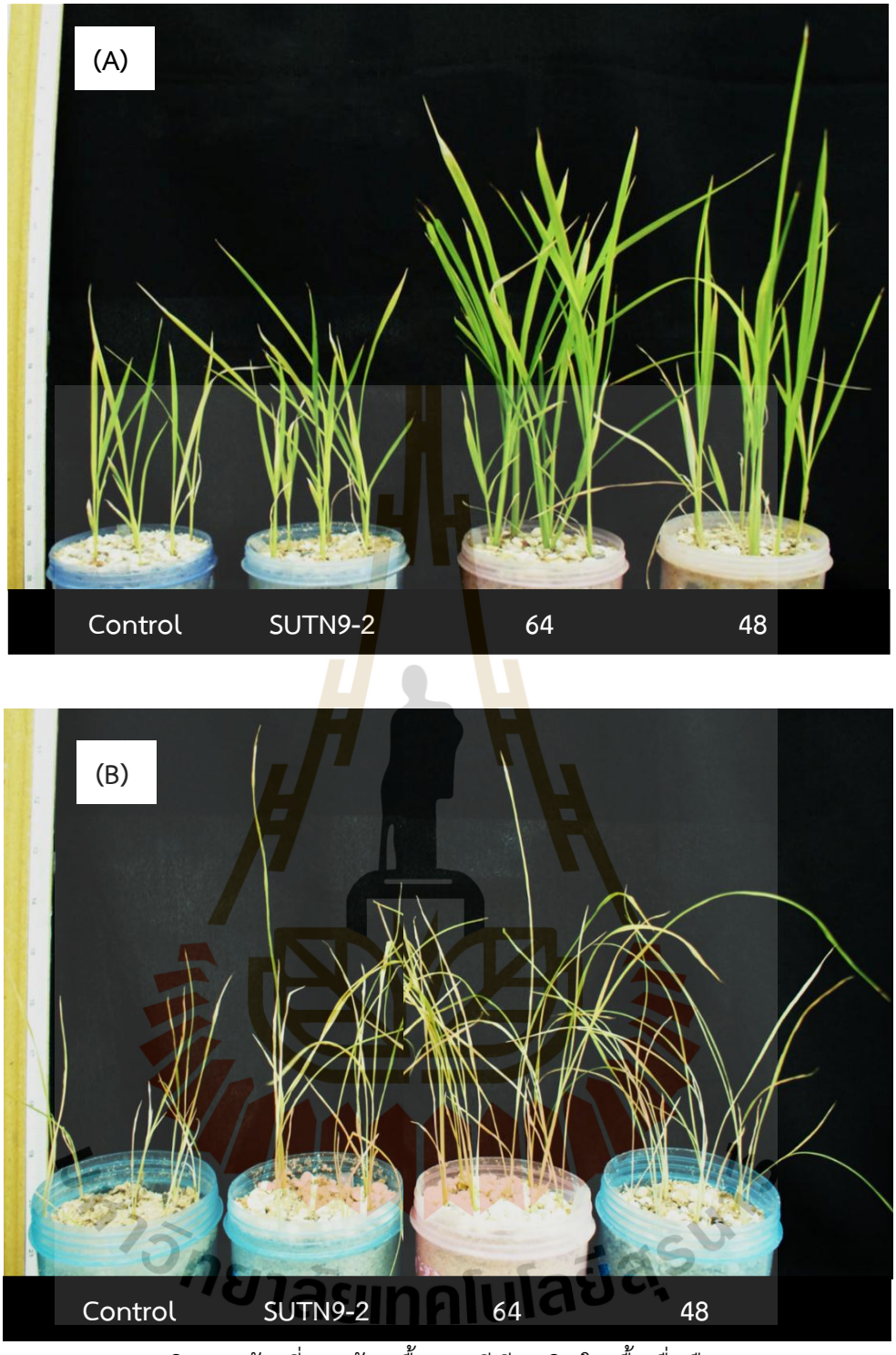
4.3 การตรวจสอบผลของการใช้เชื้อ endophytic bacteria ต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางชีวเคมีของพืชที่เกี่ยวข้องกับการเจริญภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะขาดน้ำ

หลังจากตรวจสอบยืนยันแล้วว่าเชื้อแบรดี้ไรโซเบียมที่คัดเลือกได้เป็น endophytic bacteria ที่สามารถเข้าอยู่อาศัยในข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่ใช้ในการทดสอบได้จริง จึงนำแบรดี้ไรโซเบียมไอโซเลท SUTN9-2, R48 และ R64 มาทำการทดสอบผลที่มีต่อการเจริญของข้าวเมื่อปลูกในสภาวะปกติ และเมื่อเผชิญกับสภาวะขาดน้ำ เพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ในการใช้เชื้อ endophytic bacteria เป็นปุ๋ยชีวภาพให้กับข้าวในสภาวะต่าง ๆ ทั้งนี้ผลการทดลองพบว่า ในสภาวะปกติข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อแบรดี้ไรโซเบียม ไอโซเลท R48 และ R64 ให้น้ำหนักต้นสูงมากกว่าต้นข้าวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (control) และต้นข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อ SUTN9-2 อย่างมีนัยสำคัญ โดยน้ำหนักต้นสูงที่สุดในการทดลองได้จากข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อไอโซเลท R64 อย่างไรก็ตามไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อไอโซเลท R48 (รูปที่ 7A และ 8A) จากนั้นตรวจสอบผลที่เกิดขึ้นเมื่อปลูกข้าวในสภาวะขาดน้ำ ผลการทดลองพบว่าการใช้เชื้อ endophytic bacteria ไม่สามารถช่วยให้พืชเจริญได้เทียบเท่ากับสภาวะปกติ (รูปที่ 7) โดยเมื่อตรวจวัดน้ำหนักต้นพบว่าเชื้อทุกไอโซเลทที่นำมาทดสอบส่งผลให้น้ำหนักต้นข้าวในระดับเดียวกันและไม่แตกต่างจากต้นข้าวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (รูปที่ 8B) อย่างไรก็ตามข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อไอโซเลท R48 และ R64 ยังมีน้ำหนักพืชสูงกว่าตำรับควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (control) และเมื่อทำการตรวจสอบความสามารถในการฟื้นตัวของข้าวจากสภาวะขาดน้ำ ซึ่งมีความสำคัญหากต้นข้าวที่ปลูกเผชิญกับสภาวะแล้ง หรือสภาวะขาดน้ำเพียงชั่วขณะ โดยปริมาณน้ำในวัสดุปลูกยังไม่เกินจุดเหี่ยวถาวรของพืช (permanent wilting point, PWP) หรือระดับความชื้นที่พืชเริ่มแสดงอาการ เหี่ยวและไม่ฟื้นตัวแม้จะอยู่ในบรรยากาศที่ชื้นจัดเป็นเวลาข้ามคืน ดังนั้นพืชที่ยังมีความแข็งแรงจะสามารถกลับมาเจริญต่อไป โดยผลการทดลองพบว่า ต้นข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 มีเปอร์เซ็นต์การฟื้นตัวของต้นข้าวสูงที่สุด (40%) เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การฟื้นตัวของต้นข้าวในตำรับควบคุม (control) ที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ มีการฟื้นตัว 35% ซึ่งไม่แตกต่างจากข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อไอโซเลท R64 ในขณะที่ข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อไอโซเลท R48 มีเปอร์เซ็นต์การฟื้นตัวของต้นข้าวน้อยที่สุด (30%) (รูปที่ 9) ซึ่งสอดคล้องกับผลคะแนนความเหี่ยวของใบที่อยู่ในเกณฑ์ 5-6 คือ ใบมีการม้วนในลักษณะ U-shape จนถึง O-shape อย่างไรก็ตามถึงแม้เชื้อ SUTN9-2 และไอโซเลท R64 จะมี

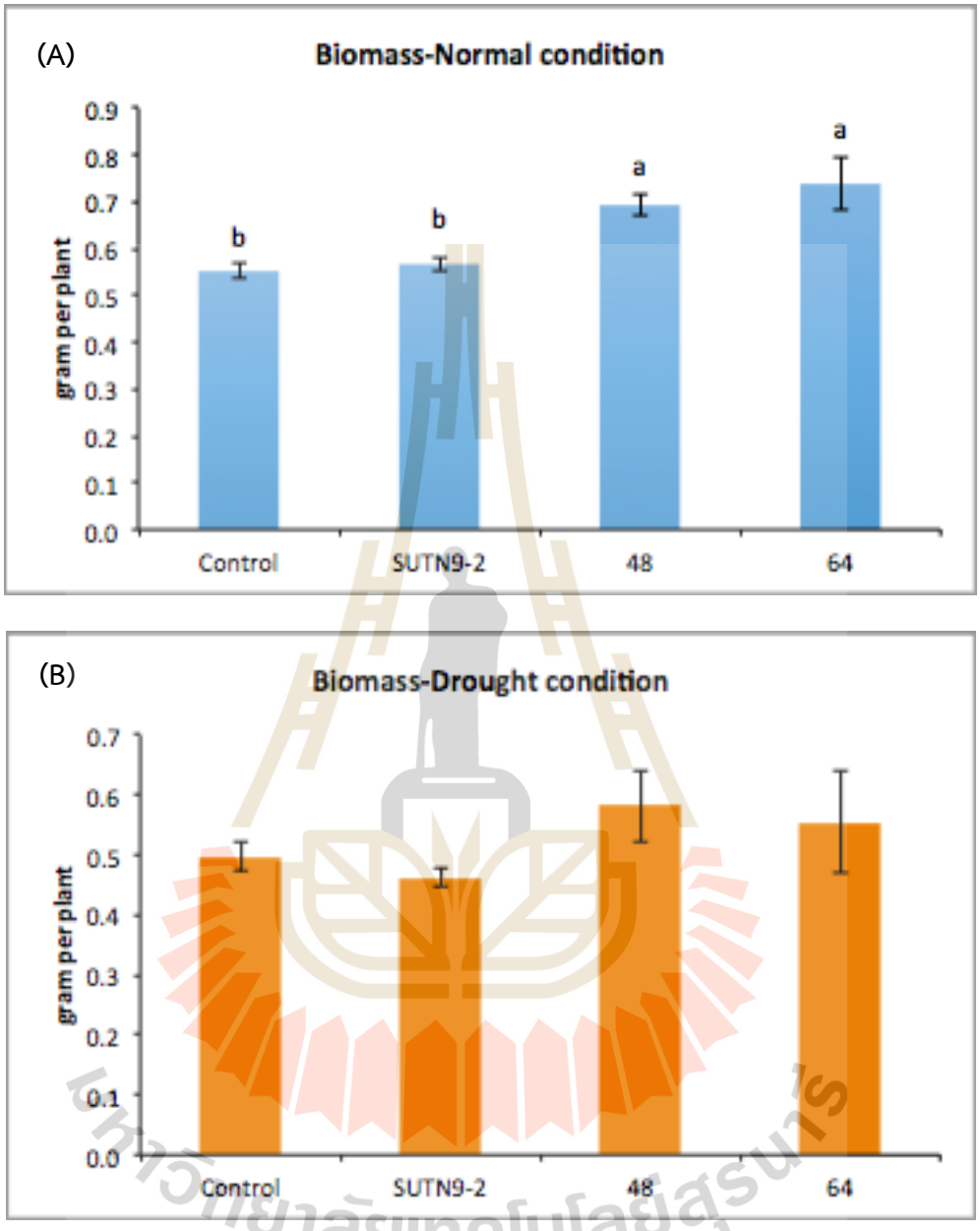
คะแนนความเหี่ยวต่ำที่สุด แต่ก็ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตำรับอื่น ๆ (ตารางที่ 2) และเมื่อตรวจสอบระดับแก๊สเอทธิลีนที่พืชปลดปล่อยออกมาขณะเจริญอยู่ในสภาวะขาดน้ำ ซึ่งปริมาณแก๊สเอทธิลีนนี้สัมพันธ์กับระดับความเครียดของพืช โดยหากพืชมีความเครียดสูงจะมีการสร้างและปลดปล่อยเอทธิลีนออกมาในปริมาณสูง ทั้งนี้ผลการทดลองพบว่า ต้นข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อ SUTN9-2 ตรวจพบการสร้างเอทธิลีนต่ำที่สุด (0.265 พิโคโมลต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งพืชต่อชั่วโมง) ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเอทธิลีนที่ปลดปล่อยจากข้าวในตำรับควบคุม (control) ที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (1.084 พิโคโมลต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งพืชต่อชั่วโมง) ในขณะที่ต้นข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อไอโซเลท R48 และ R64 มีการปลดปล่อยเอทธิลีนไม่แตกต่างจากตำรับควบคุม (ตารางที่ 2)

เห็นได้ว่าในสภาวะปกติการใช้เชื้อแบรดี้ไรโซเบียม ไอโซเลท R48 และ R64 เป็นปุ๋ยชีวภาพให้กับต้นข้าว สามารถส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวได้อย่างมีนัยสำคัญ อาจเนื่องมาจากความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น การสร้างฮอร์โมน IAA ในระดับที่เหมาะสม รวมทั้งความสามารถอื่น ๆ เช่น การตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ การมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase และความสามารถด้านอื่น ๆ ที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป นอกจากนี้ปริมาณของเชื้อแบรดี้ไรโซเบียม ไอโซเลท R48 และ R64 ที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชมีจำนวนมากกว่า 10^4 CFU ต่อกรัมน้ำหนักสดพืช อาจจะเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวได้ดีภายใต้สภาวะปกติ อย่างไรก็ตามความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชเหล่านี้ยังไม่เพียงพอที่จะทำให้ต้นข้าวเจริญได้อย่างปกติเมื่อต้นข้าวเผชิญกับสภาวะขาดน้ำเป็นระยะเวลานาน แต่เป็นที่น่าสนใจเมื่อตรวจสอบความสามารถในการฟื้นตัวของต้นข้าวหลังจากสภาวะการขาดน้ำพบว่าเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ช่วยให้ต้นข้าวมีความฟื้นตัวได้ดีกว่าต้นข้าวในตำรับควบคุมที่ไม่ได้มีการปลูกเชื้อ อีกทั้งระดับของแก๊สเอทธิลีนที่ปลดปล่อยออกมามีปริมาณน้อยกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าต้นข้าวเมื่อเผชิญกับสภาวะขาดน้ำทำให้เกิดความเครียดซึ่งเห็นได้จากแก๊สเอทธิลีนที่ถูกผลิตขึ้นในตำรับควบคุมในปริมาณมาก แต่เมื่อต้นข้าวปลูกด้วยเชื้อ SUTN9-2 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase สูง สามารถช่วยให้พืชลดความเครียดลงได้ ซึ่งเห็นได้จากปริมาณแก๊สเอทธิลีนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อ SUTN9-2 สามารถลดความเครียดให้กับพืช และยังช่วยให้พืชฟื้นตัวจากสภาวะขาดน้ำได้ ทั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของพืชต่อไป

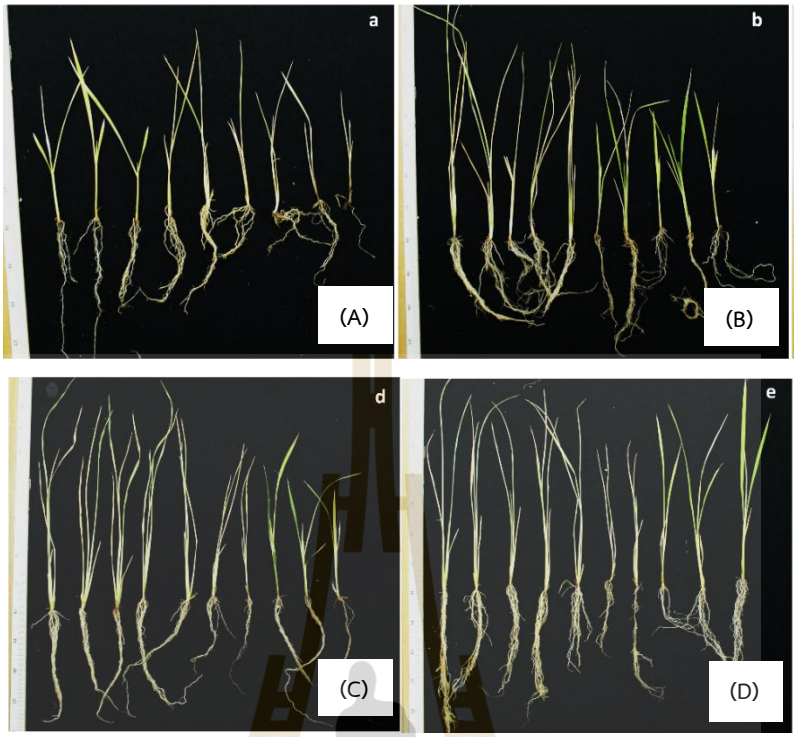
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 7 การทดสอบการเจริญของข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อแบคทีเรียเจริญในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาวะการปลูกแบบ (A) สภาวะปกติ และ (B) สภาวะขาดน้ำ



รูปที่ 8 มวลชีวภาพของข้าวที่ปลูกเชื้อด้วยแบคทีเรียที่เจริญในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) ชนิดต่าง ๆ ภายใต้ (A) สภาวะการให้น้ำปกติ และ (B) สภาวะขาดน้ำ



รูปที่ 9 แสดงภาพข้าวที่ฟื้นตัวและไม่ฟื้นตัวจากสภาวะขาดน้ำเปรียบเทียบระหว่าง (A) ข้าวที่ไม่ทำการปลูกเชื้อ, (B) ข้าวที่ปลูกเชื้อด้วย SUTN9-2, (C) ไอโซเลท 48 และ (D) ไอโซเลท 64

ตารางที่ 2 แสดงผลคะแนนความเหี่ยวของใบข้าว การฟื้นตัวของข้าว และการผลิตก๊าซ Ethylene ในข้าว

ชุดการทดลอง	คะแนนความเหี่ยวของใบ	การฟื้นตัว (%)	ระดับก๊าซ Ethylene (pmol /mg DW/hr)
Control	6.67±1.97^{ns}	35	1.084±0.019 a
SUT9-2_wt	5.67±1.03^{ns}	40	0.265±0.113 b
R48	6.33±1.63^{ns}	30	1.108±0.195 b
R64	5.00±1.26^{ns}	35	1.125±0.180 a

แสดงนัยสำคัญที่ P ≤ 0.05, mean standard error bar (n=10)

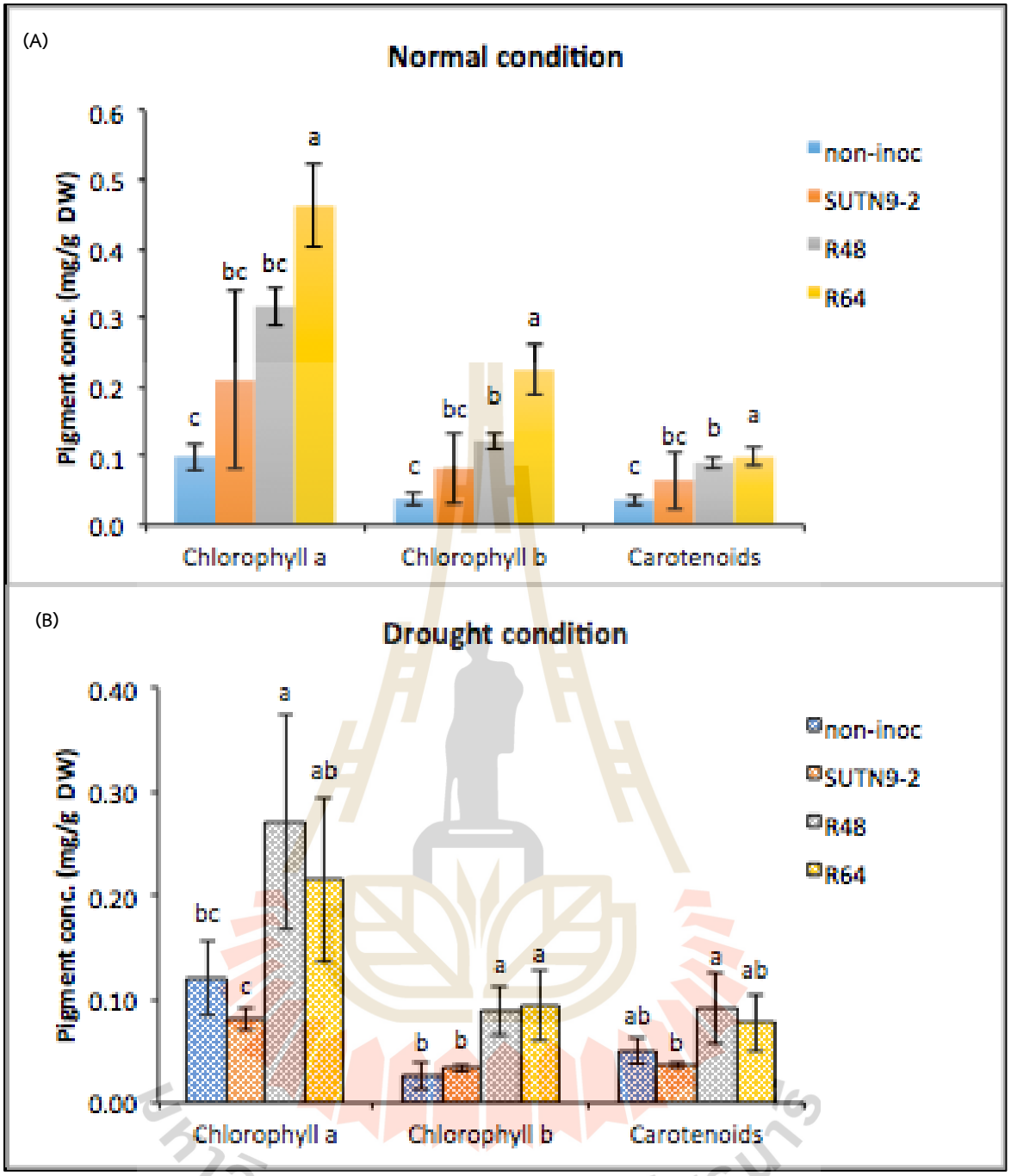
จากนั้นได้ทำการตรวจสอบปริมาณรงควัตถุ chlorophyll a, chlorophyll b และ carotenoids ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงของข้าวที่ปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะขาดน้ำ (รูปที่ 10) โดยพบว่าในใบข้าวมีปริมาณ chlorophyll a มากที่สุด รองลงมาคือ chlorophyll b และ carotenoids ทั้งนี้ในสภาะปกติจะมีตรวจพบปริมาณรงควัตถุ chlorophyll a มีปริมาณลดลงในสภาวะขาดน้ำ ในขณะที่ปริมาณ chlorophyll b และ carotenoids มีปริมาณไม่แตกต่างกันมากนักทั้งในสภาวะปกติ และสภาวะขาดน้ำ อย่างไรก็ตามเห็นได้ชัดเจนว่าต้นข้าวที่ทำการปลูกเชื้อ endophytic bacteria สามารถเพิ่มปริมาณรงควัตถุทั้ง 3 ชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับต้นข้าวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (non-inoculation) ภายใต้การทดลองในสภาวะปกติ โดยการใช้เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R64 ส่งผลให้มีปริมาณรงควัตถุทั้ง 3 ชนิดสูงที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตำรับควบคุม ในขณะที่เชื้อไอโซเลท R48 และ SUTN9-2 ช่วยกระตุ้นให้พืชสร้างรงควัตถุในใบข้าวได้มากขึ้นเช่นกันในลำดับรองลงมา แสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อ endophytic bacteria สามารถช่วยให้พืชมีการสร้างรงควัตถุเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบปริมาณรงควัตถุภายใต้สภาวะขาดน้ำ พบว่าพืชที่ปลูกด้วยแบคทีเรียไอโซเลท R48 มีปริมาณ chlorophyll a สูงที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับที่ไม่ได้มีการปลูกเชื้อ โดยข้าวที่ปลูกเชื้อด้วยแบคทีเรียไอโซเลท R64 ให้ผลรองลงมาแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกันกับปริมาณ chlorophyll b แต่พบว่าปริมาณ carotenoids ไม่มีความแตกต่างกันกับตำรับควบคุม อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าการใช้เชื้อแบคทีเรีย SUTN9-2 ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างรงควัตถุให้กับพืชในสภาวะขาดน้ำได้ ซึ่งผลการทดลองนี้สัมพันธ์กับน้ำหนักต้นข้าวพืชที่ต้นข้าวเมื่อปลูกด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R48 และ R64 ให้น้ำหนักต้นข้าวสูงกว่าข้าวที่ทำการปลูกด้วยเชื้อ SUTN9-2 เมื่อปลูกภายใต้สภาวะขาดน้ำ (รูปที่ 8B) อย่างไรก็ตามกลไกที่แบคทีเรียไอโซเลท R48 และ R64 ส่งเสริมให้พืชมีปริมาณรงควัตถุเพิ่มขึ้นนั้นยังไม่แน่ชัด

เมื่อทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในข้าวที่ปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะขาดน้ำ (รูปที่ 11) โดยเอนไซม์ SOD ทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์พืช ซึ่งอนุมูลอิสระนี้อาจเกิดขึ้นได้จากกระบวนการต่าง ๆ ในเซลล์เมื่อเจริญในสภาวะปกติ และจะมีการผลิตอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นเมื่อพืชเผชิญกับสภาวะเครียดที่เกิดจากสาเหตุต่าง ๆ รวมทั้งเมื่อพืชเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นระดับกิจกรรมของเอนไซม์ SOD จึงเป็นอีกเครื่องบ่งบอกหนึ่งที่ทำให้ทราบระดับความเครียดของพืชที่ปลูกในสภาวะต่าง ๆ จากผลการทดลองพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีระดับสูงที่รากมากกว่าที่ลำต้นข้าว โดยเมื่อตรวจวัดระดับ SOD ในภาพรวม (total SOD activity) เมื่อพืชเจริญในสภาวะปกติ พบว่าข้าวที่ปลูกด้วยเชื้อทั้ง SUTN9-2 ไอโซเลท R48 และ R64 มีระดับกิจกรรมของ SOD สูงกว่าข้าวที่ในตำรับควบคุมที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (non-inoculation) โดยต้นข้าวที่ปลูกเชื้อด้วยแบคทีเรีย R48 มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ SOD สูงที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตำรับอื่น ๆ (รูปที่ 11C) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่ต้นข้าวเมื่อมีการปลูกเชื้อ เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้อาจกระตุ้นให้พืชสร้างอนุมูลอิสระจากการบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช ดังที่ Atkinson และ Urwin (2012) ได้เคยรายงานว่าอนุมูลอิสระที่พืชสร้างขึ้นนี้สามารถเกิดจากอิทธิพลของสิ่งมีชีวิต (biotic factors) ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามหากแบคทีเรียที่เป็นเอนโดไฟท์สามารถเข้าอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อพืช แสดงว่าแบคทีเรียและพืชอาจมีสัญญาณที่สื่อสารระหว่างกันเพื่อไม่ให้อนุมูลอิสระเหล่านี้มายับยั้งการเจริญของ endophytic bacteria ในเนื้อเยื่อพืช แต่เมื่อตรวจสอบระดับกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะขาดน้ำ ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ SOD โดยรวมของพืชที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (รูปที่ 11F) มีระดับสูงขึ้นกว่าพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่าพืชที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อมีระดับความเครียดเพิ่มสูงขึ้นเมื่อปลูกในสภาวะขาดน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่ง

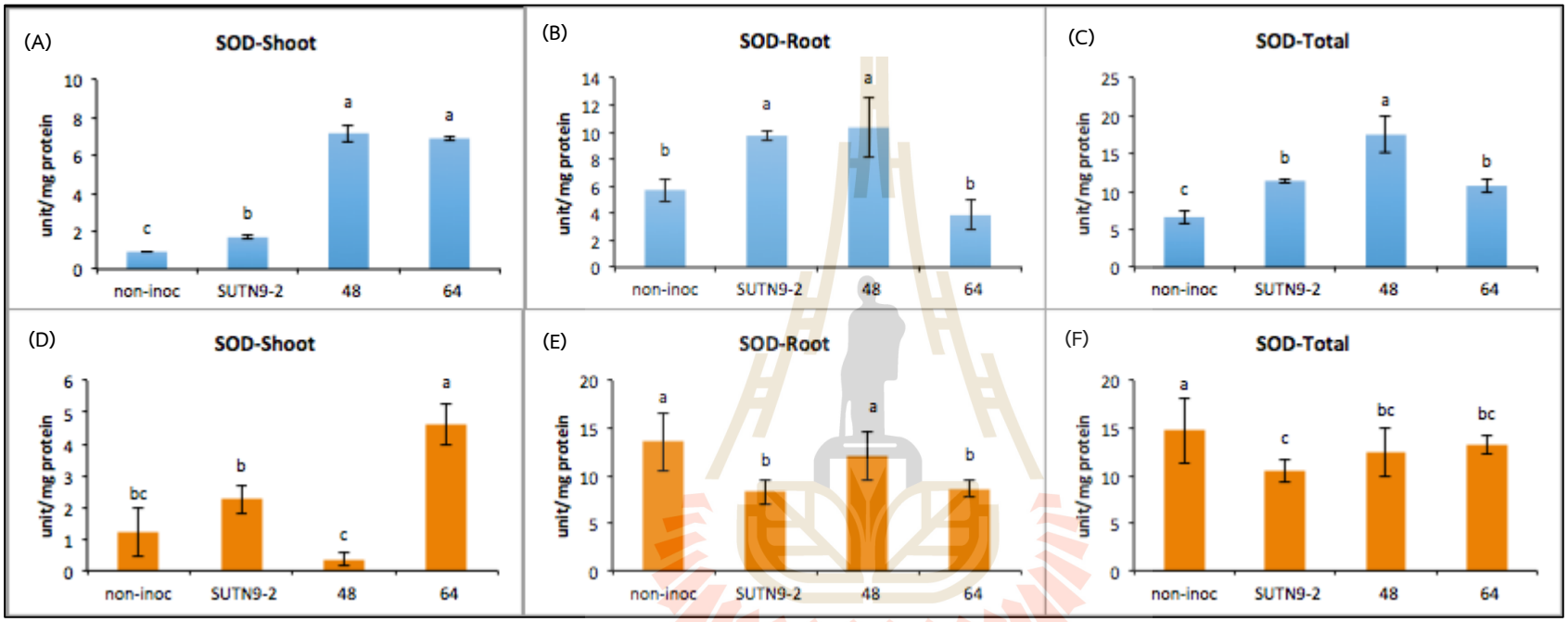
ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในพืชที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อนี้ยังสูงกว่าพืชที่ปลูกด้วยเชื้อ endophytic bacteria ทั้ง 3 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน โดยระดับกิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างจากระดับกิจกรรมของเอนไซม์ในพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะปกติ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 3 ชนิด สามารถช่วยลดระดับความเครียดเมื่อพืชเผชิญกับสภาวะขาดน้ำได้

จากนั้นทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ascorbate peroxidase (APX) (รูปที่ 12) และเอนไซม์ catalase (CT) (รูปที่ 13) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม ROS-scavenging ซึ่งทำหน้าที่ในการเปลี่ยน H_2O_2 ที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ SOD เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้นจากสภาวะต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งหากมี H_2O_2 สะสมอยู่ในเซลล์ในปริมาณมากจะเป็นพิษต่อเซลล์พืช ดังนั้นพืชจึงต้องมีกระบวนการลดปริมาณ H_2O_2 โดยเอนไซม์ APX และ CT จะเปลี่ยน H_2O_2 ให้เป็นออกซิเจน และน้ำ โดยผลการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ APX และ CT เกิดขึ้นสูงในรากมากกว่าในต้น ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับระดับกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ที่เกิดขึ้นในรากมากกว่าในลำต้นเช่นกัน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่รากสัมผัสกับการเปลี่ยนแปลงในสภาวะแวดล้อมได้รวดเร็วกว่า อย่างไรก็ตามระดับกิจกรรมโดยรวมของเอนไซม์ APX ในพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะปกติมีสูงกว่าพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะขาดน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งระดับของเอนไซม์ในพืชที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (non-inoculation) และพืชที่ปลูกเชื้อ SUTN9-2 สูงมากกว่าพืชที่ปลูกเชื้อไอโซเลท R48 และ R64 อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่ภายใต้สภาวะปกติ พืชยังสามารถสร้างเอนไซม์ APX ได้ดี และการปลูกเชื้อ SUTN9-2 อาจมีกลไกในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ APX ได้มากกว่าไอโซเลท R48 หรือ R64 และเมื่อตรวจสอบระดับกิจกรรมของเอนไซม์ APX ในพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะขาดน้ำ พบว่าโดยรวมมีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง อาจเป็นเพราะสภาวะขาดน้ำอาจทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง แต่ยังพบว่าพืชที่มีการปลูกเชื้อไอโซเลท R48 ยังมีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ APX สูงกว่าพืชในตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท R48 อาจมีกลไกในการกระตุ้นการทำงานของ APX ได้มากกว่า จึงส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าตำรับอื่นภายใต้สภาวะขาดน้ำ เช่นเดียวกับระดับกิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CT) ที่เมื่อเผชิญกับสภาวะขาดน้ำทำให้มีระดับกิจกรรมน้อยกว่าในสภาวะปกติ แต่พบว่าพืชที่ปลูกเชื้อทั้ง 3 ตำรับ ไม่ได้กระตุ้นให้พืชมีกิจกรรมของเอนไซม์ CT เพิ่มมากขึ้นทั้งในสภาวะปกติ และสภาวะขาดน้ำ แสดงให้เห็นว่าการที่ endophytic bacteria สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช หรือทำให้พืชทนต่อสภาวะการขาดน้ำได้ไม่ได้มาจากบทบาทของเอนไซม์ CT แต่อาจเป็นบทบาทอื่น ๆ ของเชื้อ เช่น กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ความสามารถในการสร้างฮอร์โมนเร่งการเจริญของพืช หรือเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่ม ROS-scavenging enzyme อื่น ๆ เป็นต้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

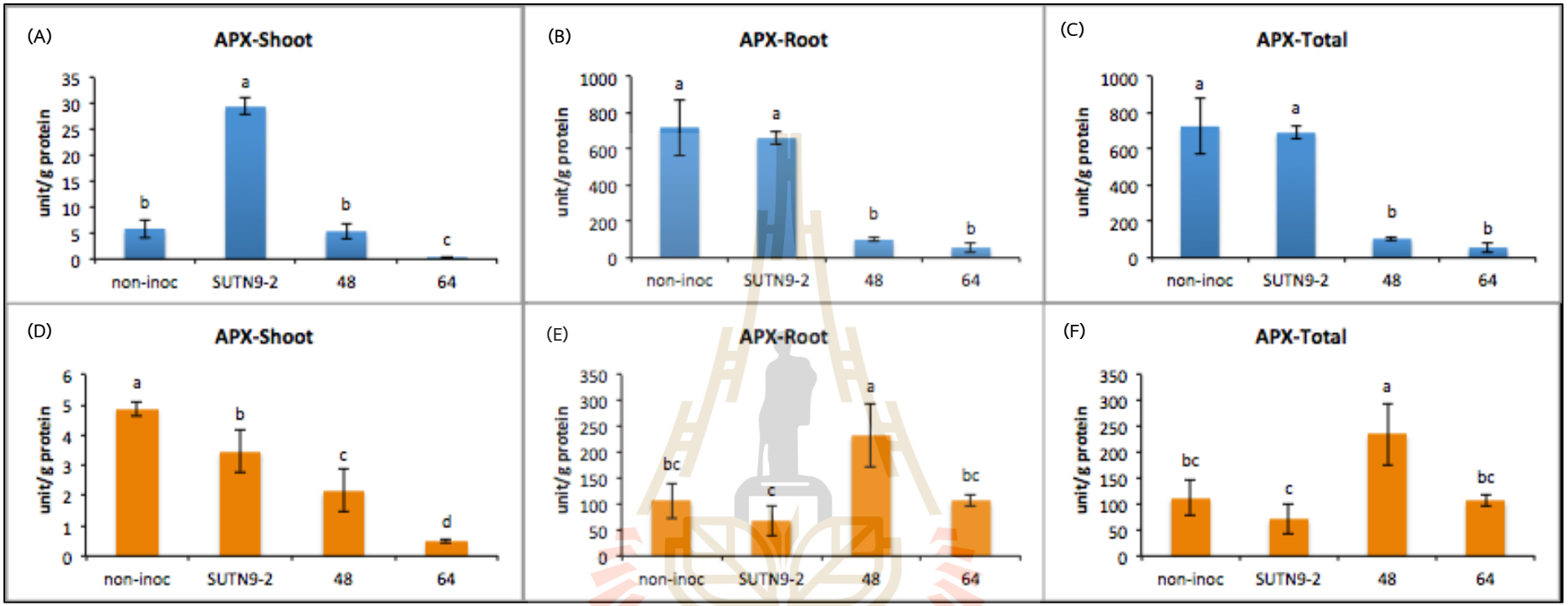


รูปที่ 10 แสดงรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของข้าว คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ ในข้าวที่ปลูกในสภาวะปกติ (A) และสภาวะขาดน้ำ (B)



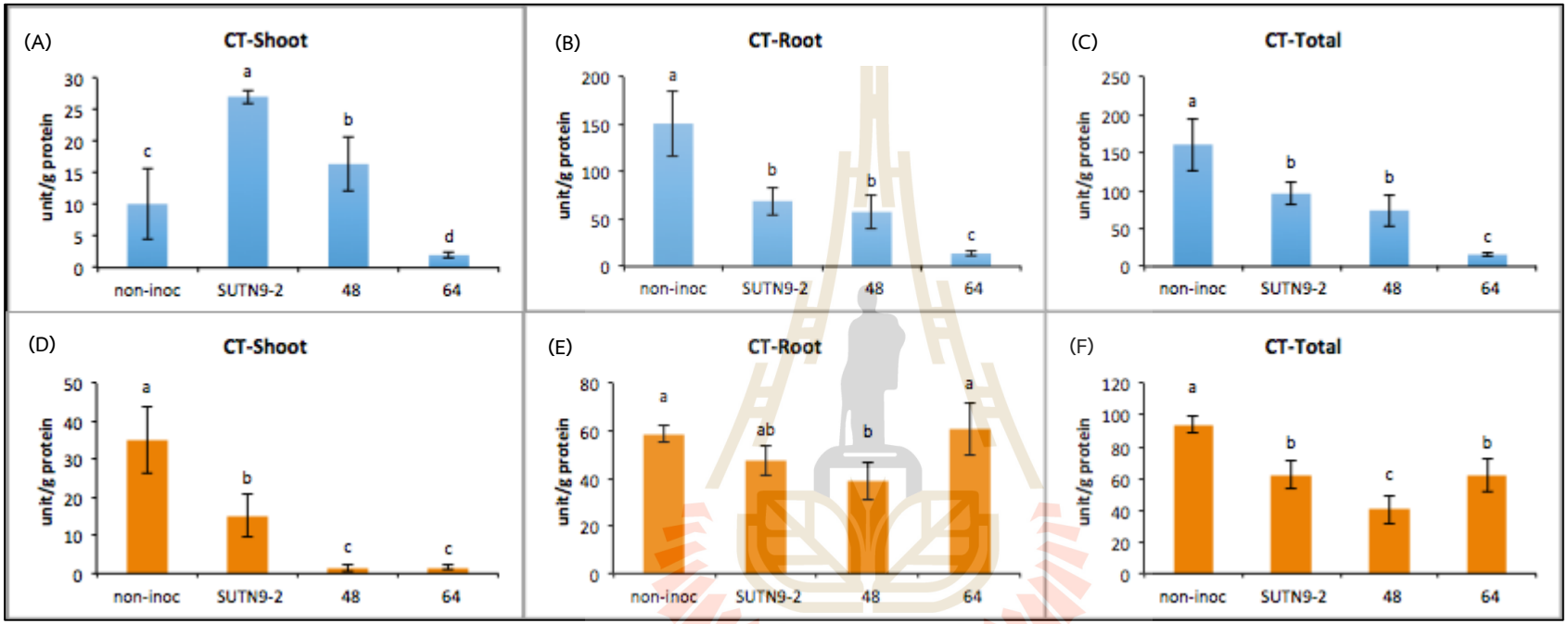
รูปที่ 11 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) ในข้าวส่วนลำต้น (shoot), ราก (root) และโดยรวม (total) ที่ปลูกในสภาวะปกติ (A-C) และในสภาวะขาดน้ำ (D-F)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 12 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Ascorbate peroxidase (APX) ในข้าวส่วนลำต้น (shoot), ราก (root) และโดยรวม (total) ที่ปลูกในสภาวะปกติ (A-C) และในสภาวะขาดน้ำ (D-F)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 13 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Catalase (CT) ในข้าวส่วนลำต้น (shoot), ราก (root) และโดยรวม (total) ที่ปลูกในสภาวะปกติ (A-C) และในสภาวะขาดน้ำ (D-F)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5

บทสรุปการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่ม *Bradyrhizobium* sp. ที่สามารถเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endophytic bacteria) ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase และความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน (IAA) ได้จำนวน 2 ไอโซเลท คือ *Bradyrhizobium* sp. ไอโซเลท R48 และ R64 โดยเมื่อนำมาทดสอบเปรียบเทียบกับเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ที่สามารถเป็น endophytic bacteria ในข้าวได้เช่นกัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อทั้ง 3 ชนิด โดยเฉพาะไอโซเลท R64 มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดีเมื่อเจริญในสภาวะปกติ อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 3 ชนิด ไม่สามารถใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อช่วยให้พืชเจริญได้เมื่อเจริญในสภาวะน้ำท่วมขัง แต่อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มที่จะส่งเสริมการเจริญและทำให้พืชทนต่อความเครียดที่เกิดจากสภาวะขาดน้ำได้ โดยเมื่อตรวจสอบตำแหน่งที่อยู่ของแบคทีเรีย พบว่าเชื้อสามารถเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้จากทางราก และเคลื่อนที่ไปยังส่วนของลำต้นได้ โดยเมื่อตรวจสอบจำนวนของเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อข้าวพบว่า ไอโซเลท R64 มีจำนวนเซลล์ในเนื้อเยื่อข้าวสูงที่สุด ซึ่งอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อมีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และเมื่อนำมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางชีวเคมีของต้นข้าวเมื่อปลูกเชื้อ endophytic bacteria เป็นปุ๋ยชีวภาพในสภาวะขาดน้ำในระดับกระถาง พบว่าถึงแม้เชื้อทั้ง 3 ชนิด จะไม่สามารถทำให้พืชเจริญได้ดีเทียบเท่ากับการเจริญในสภาวะปกติ แต่เชื้อ endophytic bacteria โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซเลท R48 และ R64 มีความสามารถในการกระตุ้นให้พืชสร้างรงควัตถุเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงได้มากขึ้น ในขณะที่เชื้อ SUTN9-2 ถึงแม้ไม่สามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวภายใต้สภาวะการขาดน้ำได้ดีเทียบเท่ากับไอโซเลท R48 หรือ R64 แต่พบว่าสามารถลดความเครียดในพืชได้ดีกว่า โดยพบว่าทำให้มีเปอร์เซ็นต์การฟื้นตัวของข้าวหลังจากสภาวะขาดน้ำได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เชื้อ *Bradyrhizobium* ที่มีคุณสมบัติเป็น endophytic bacteria ในเนื้อเยื่อข้าว อาจจะยังมีประสิทธิภาพเป็นปุ๋ยชีวภาพได้ไม่ดีเพียงพอในแง่ของการส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะขาดน้ำ แต่อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจว่าการใช้เชื้อกลุ่มนี้สามารถทำให้พืชทนต่อสภาวะเครียด และฟื้นตัวจากการขาดน้ำได้ดีกว่าพืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ดังนั้นอาจใช้เชื้อในกลุ่มนี้ร่วมกับการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ หรือปุ๋ยเคมีในระดับต่ำเพื่อเพิ่มธาตุอาหารให้เพียงพอกับพืช ในขณะที่ใช้เชื้อกลุ่มนี้เพื่อเพิ่มการสร้างฮอร์โมน IAA ที่ส่งเสริมการเจริญของราก พร้อมทั้งเชื้อเหล่านี้ยังมีคุณสมบัติลดระดับความเครียดในพืช และเพิ่มการฟื้นตัว เพื่อลดความเสี่ยงต่อการสูญเสียผลผลิตหากต้องเผชิญกับสภาวะการขาดน้ำในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ๆ

บรรณานุกรม

พรรณลดา ติตตะบุตร และคณะ (2559) ประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการปรับปรุงให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิค metabolic evolution เมื่อใช้เป็นหัวเชื้อกับพืชตระกูลถั่วที่ปลูกภายใต้สภาวะเครียด. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abeles F. B., Morgan P. W., Saltveit M. E. 1992. Ethylene in Plant Biology. Academic Press, San Diego.

Aebi HE. (1983). Formulae. In : Bergmeyer HU (Ed.), Methods of Enzymetic Analysis, vol.3. Verlag Chemice, Deerfild Beach FL, pp.583-593.

Arkhipova T. N. and Anokhina N. L. 2009. Effects of wheat plant inoculation with cytokinin-producing microorganisms on plant growth at increasing level of mineral nutrition. *Russian Journal of Plant Physiology 56: 814–819.*

Atkinson NJ, Urwin PE. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. Journal of experimental Botany. 63: 3523-3543.

Bhore S. J., Nithya R., Loh C. Y. 2010. Screening of endophytic bacteria isolated from leaves of Sambung Nyawa [*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds. *Bioinformation* 5: 191-197.

Burbano C. S., Reinhold-Hurek B., Hurek T. 2010. LNA-substituted degenerate primers improve detection of nitrogenase gene transcription in environmental samples. *Environmental Microbiology Reports* 2: 251–257.

Banowetz GM, Dierksen KP, Azevedo MD, Stout R. (2004). Microplate quantification of plant leaf superoxide dismutases. Anal. Biochem. 332: 314-320.

Ellouzia H., Hameda K. B., Celab J., e-Boschb S. M., and Abdelly C. 2011. Early effects of salt stress on the physiological and oxidative status of *Cakile maritima* (halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (glycophyte). Physiologia Plantarum 142: 128–143.

Etesami H, Mirseyed-Hosseini H, Alikhani HA. (2014). Bacterial biosynthesis of 1-aminocyclopropane-1-caboxylate (ACC) deaminase, a useful trait to elongation and endophytic colonization of the roots of rice under constant flooded conditions. Physiology and Molecular Biology of Plants. 20: 425–434.

Fukao T., Xu K., Ronald P. C., Bailey-Serres J. 2006. A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *Plant Cell* 18: 2021–2034.

Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM. (1999). Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press. Waterloo, Ontario, Canada.

Grichko VP, Glick BR. (2001). Amelioration of flooding stress by ACC-deaminase containing plant growth promoting bacteria. Plant Physiol. Biochem. 39:11–17.

Haberer G, Kieber JJ. (2002). Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. Plant Physiology 128: 354–362.

Hattori Y., Nagai K., and Ashikari M**. 2010.** Rice growth adapting to deepwater. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 100–105.

Hinz M., Wilson I. W., Yang J., Buerstenbinder K., Llewellyn D., Dennis E. S., Sauter M., and Dolferus R. Arabidopsis RAP2.2: An ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. Plant Physiology 153: 757–772.IRRI International Rice Research Institute (1996). Standard Evaluation System for Rice (4th ed). Los Banos, Philippines.

Jung K-H., Seo Y-S., Walia H., Cao P., Fukao T., Canlas P. E., Amonpant F., Bailey-Serres J., and Ronald P. C. 2010. The submergence tolerance regulator *Sub1A* mediates stress responsive expression of AP2/ERF transcription factors. *Plant Physiology* 152: 1674–1692.

Lichtenthaler HK. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomenbranes. Methods in Enzymology. 148:350-382.

Mano H, Morisaki H. (2008). Endophytic bacteria in the rice plant. Microbes Environ. 23:109-17.

Merewitz E. B., Gianfagna T., and Huang B. 2011. Photosynthesis, water use, and root viability under water stress as affected by expression of SAG12-ipt controlling cytokinin synthesis in *Agrostis stolonifera*. *Journal of Experimental Botany* 62: 383–395.

Piromyou P, Greetatorn T, Teamtisong K, Okubo T, Shinoda R, Nuntakij A, Tittabutr P, Boonkerd N, Minamisawa K, Teaumroong N. (2015). Preferential association of

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

endophytic bradyrhizobia with different rice cultivars and its implications for rice endophyte evolution. Applied and Environmental Microbiology. 81:3049-3061.

Pospisilova J, Synkova H, Rulcova J. (2000). Cytokinin and water stress. Biologia Plantarum 43: 321-328.

Prakamhang J, Minamisawa K, Teamtaisong K, Boonkerd N, Teaumroong N. (2009). The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Applied Soil Ecology. 42: 141-149.

Singh S., Mackill D. J., Ismail A. M. 2011. Tolerance of longer-term partial stagnant flooding is independent of the *SUB1* locus in rice. *Field Crops Research* 121: 311–323.

Somasegaran P, Hoben HJ. (1994). Handbook for Rhizobia: Methods in legume-*Rhizobium* technology. Spring-Verlag, New York.

Spaink H.P. (1997). Ethylene as a regulator of Rhizobium infection. *Trends in Plant Sci*ence 2: 203-204.

Tereshonok D. V., Stepanova A. Yu., Dolgikh Yu. I., Osipova E. S., Belyaev D. V., Kudoyarova G. R., Vysotskaya L. B., and Vartapetian B. B. 2011. Effect of the *ipt* gene expression on wheat tolerance to root flooding. *Russian Journal of Plant Physiology.* 58: 799–807.

Tittabutr P., Awaya J. D., Li Q. X. and Borthakur D. 2008. The cloned 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene from *Sinorhizobium* sp. strain BL3 in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 promotes nodulation and growth of *Leucaena leucocephala*. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 141-150.

Wang CJ, Yang W, Wang C, Gu C, Niu DD, Liu HX, Wang YP, Guo JH. (2012). Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains. PLoS One 7, e52565.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี