การใช้ *Bacillus subtilis* เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดฝักอ่อน

Application of *Bacillus subtilis* for baby corn seed production

พงษ์เดช ภิรมย์อยู่[1], อาภากร หล่องทองหลาง[2], สมพร ชุนห์ลือชานนท์[3], พรรณลดา ติตะบุตร[1], โสภณ วงศ์แก้ว[2], นันทกร บุญเกิด[1], หนึ่ง เตียอำรุง[1*]

Pongdet Piromyou[1], Aphakorn Longtonglang[2], Somporn Chunleuchanon[3], Panlada Tittabutr[1] Sopone Wongkaew[2], Nantakorn Boonkerd[1], Neung Teaumroong[1*]

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดหา Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์แปซิฟิค 283 โดยดำเนินการแยกเชื้อ แบคทีเรีย จากตัวอย่างดินบริเวณรากข้าวโพดในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง นครสวรรค์ สระบุรี และนครราชสีมา แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานในการส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่าแบคทีเรียจำนวน 153 ไอโซเลต มีความสามารถในการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืช (Indole-3-acetic acid: IAA) จำนวน 16 ไอโซเลต ได้คัดเลือกเชื้อ 6 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการเจริญของรากข้าวโพดมา คือ ทดสอบในระดับกระถาง พบว่า ได้ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดสูงสุด คือ ไอโซเลต SUT2 และ SUT3 เมื่อนำไปทดลองในระดับแปลงที่มีการจัดกรรมวิธีใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมี โดยลดอัตราส่วนปุ๋ยเคมีลง 25% และ 50% จากอัตราส่วนแนะนำ พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ลดอัตราส่วนลง มีแนวโน้มทำให้ต้นข้าวโพดมีการเจริญเติบโต และให้ผลผลิตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำเพียงอย่างเดียว การจำแนกชนิดของไอโซเลต SUT3 โดยใช้การอ่านลำดับเบสบนสายดีเอนเอของยีน 16S rDNA พบว่ามีความคล้ายกับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus subtilis*

คำสำคัญ: PGPR, ข้าวโพดฝักอ่อน, ปุ๋ยเคมี

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

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000.
School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000.

[2] สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000.
School of Crop Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000.

[3] สาขาวิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
Department of Soil Science and Conservation, Faculty of Agriculture, Chiangmai University, Chiangmai, 50200.

[*] Corresponding author: neung@sut.ac.th

บทนำ

ในปัจจุบันจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในระบบการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของแบคทีเรียที่เรียกว่า Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ได้มีการศึกษาจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้อย่างกว้างขวาง เพราะมีคุณสมบัติที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น การเป็นปุ๋ยชีวภาพ (Biofertilizers) ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน การผลิตฮอร์โมนพืช ได้แก่ IAA (Indole-3-acetic acid) และคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ระบบรากพืช การประยุกต์ใช้ PGPR ในระบบเกษตรในรูปหัวเชื้อจุลินทรีย์ได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่อง เพราะสามารถใช้ทดแทน หรือลดการใช้ปุ๋ยเคมีและสารเคมีฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคพืช โดยเฉพาะกับระบบเกษตรอินทรีย์ ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ PGPR ทั้งในทวีปยุโรป และสหรัฐอเมริกาอย่างกว้างขวาง และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (หนึ่ง เตียอำรุง และคณะ, 2548)

ข้าวโพดฝักอ่อนนั้นจัดเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่งของประเทศไทย มูลค่าการส่งออกมากกว่า 1,500 ล้านบาทต่อปี พื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ภาคเหนือตอนล่าง และภาคกลาง ปุ๋ยเคมีที่ใช้ในการเพาะปลูก ได้แก่ปุ๋ยสูตร 46-0-0, 15-15-15 และ 16-20-0 การใช้สารเคมี หรือปุ๋ยเคมีมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในดิน น้ำ ห่วงโซ่อาหาร และสุขภาพของมนุษย์เอง หากสามารถลดการใช้ปุ๋ยเคมี โดยนำแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR มาใช้ร่วม น่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมี และสารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชได้ มีรายงานว่าแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* บางสายพันธุ์สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มผลผลิตในข้าวโพดอาหารสัตว์ได้ (Baby et al, 2006) และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีความสามารถป้องกันระบบรากของข้าวโพดอาหารสัตว์จากเชื้อราก่อโรค เช่น *Fusarium* และ *Rhizoctonia* เป็นต้น ดังนั้น การใช้แบคทีเรียในกลุ่ม PGPR จึงเป็นอีกทางเลือกที่ดีสำหรับใช้เป็นปัจจัยการผลิตข้าวโพดฝักอ่อน

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็น PGPR ที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถลดอัตราการใช้ปุ๋ยเคมี โดยมีประสิทธิภาพในส่งเสริมการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวโพดได้เทียบเท่า หรือดีกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีในอัตราปกติ

วิธีการศึกษา

การรวบรวมสายพันธุ์ PGPR

ได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากข้าวโพดในแปลงข้าวโพดฝักอ่อนในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง นครสวรรค์ สระบุรี และนครราชสีมา เพื่อนำมาแยกเชื้อแบคทีเรีย ตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 90 มล. แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 15 นาที จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-4} ถึง 10^{-7} ดูดสารละลายดังกล่าว 0.2 มล. แล้วเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งอาหารไนโตรเจน สูตร LG และ NFB medium (Meunchang et al, 2005) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 3 วัน เก็บรวบรวมแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่ต่างกัน เพื่อการทดลองต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA

ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ที่เติม Tryptophan 2 กรัมต่อลิตร บ่มที่ 28 °ซ เขย่า 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์จากสารละลาย นำส่วนใส 1 มล. ไปวิเคราะห์ปริมาณ IAA โดยเติมสารละลาย Salkowsky reagent (0.01 M $FeCl_2$ in $HClO_4$) 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที โดยทำเช่นเดียวกันในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติที่ไม่ใส่เชื้อลงไป และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร และเปรียบเทียบความเข้มข้นกับสารละลายมาตรฐาน IAA บริสุทธิ์ (Costacurta et al, 1998)

การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

ทดสอบหาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยเทคนิค Acethylene Reduction Assay (ARA) (Hardy et al., 1968) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ไม่เติมแหล่งอาหารไนโตรเจนปริมาตร 7 มล. ในหลอดขนาด 21 มล. บ่มที่ 28 °ซ เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นแทนที่อากาศในหลอดด้วยก๊าซ อะเซธีลีนในปริมาตรร้อยละ 10 ของปริมาตรอากาศ (Head space) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30 °ซ) เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจวัดปริมาณเอธิลีนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gas Chromatography ที่มี Flame Ionization detector และ PE-Alumina column ขนาด 50 ม. x 0.03 มม. x 0.25 ไมโครเมตร (Perkin Elmer, USA) จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวมาย่อยด้วยสารละลาย 10% SDS และทำให้เซลล์แตก ด้วยเครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (Ultrasonic Processor) รุ่น GE100-watt (Sonics and Material Inc.) เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry et al. (1951) และเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสกับปริมาณเอธิลีนบริสุทธิ์

การทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคพืช

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืช 4 สายพันธุ์ คือ *Rhizoctonia solani*, *Verticillium* sp., *Didymella* sp., *Fusarium oxysporum* และแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 1 สายพันธุ์ คือ *Ralstonia solanaceae* โดยเลี้ยงเชื้อราก่อโรคดังกล่าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Potato dextrose agar: PDA) ให้เชื้อราอยู่ตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ ส่วนแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 2 วัน โดยใช้ก้านสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มเชื้อเกลี่ยให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเชื้อไอโซเลต SUT3 ที่เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 3 วัน หยดลงในจานเลี้ยงเชื้อให้ห่างจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช 2 ซม. และตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อในส่วนของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช บ่มไว้จนกว่าเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียจะเจริญ บันทึกข้อมูลเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Clear zone) (Lawongsa et al, 2008)

การทดสอบอิทธิพลของแบคทีเรียต่อการงอกของเมล็ดข้าวโพด

ทำผิวเมล็ดข้าวโพดสายพันธุ์แปซิฟิค 283 จำนวน 100 เมล็ด ให้ปลอดเชื้อ โดยล้างด้วยเอธานอล 95% เวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง แล้วแช่ใน 2% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5-6 ครั้ง นำเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อดังกล่าวมาเพาะในจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษเพาะเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อเช่นกัน ใส่เชื้อแบคทีเรีย PGPR จำนวน 10^6 เซลล์ต่อเมล็ด นำไปวางไว้ที่มืด 6 วัน ตรวจสอบการงอกของเมล็ด และวัดความยาวของราก

การทดสอบผลของเชื้อ PGPR ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดในระดับกระถาง

นำเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการเร่งการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด 6 ไอโซเลตจากการทดลองในข้อ 5 มาทดสอบกับข้าวโพดพันธุ์แปซิฟิค 283 ในกระถางที่มีดิน 10 กก. (pH 6.84, % อินทรียวัตถุ (OM) 1.87, ไนโตรเจนรวม (Total N) 0.28%, ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) 631.33 ppm และ โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable K; 358.83 ppm) วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) 4 ซ้ำ มี 10 กรรมวิธี ได้แก่ Control 1 คือ กรรมวิธีไม่ปลูกเชื้อ, Control 2 คือ ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ, CF คือ กรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมีในอัตราส่วนแนะนำ โดยใช้ปุ๋ยผสมอัตรา 10-10-5 ($N-P_2O_5-K_2O$) กก.ต่อไร่, MI คือ กรรมวิธีที่ใส่เชื้อร่วมกันทุกไอโซเลต และกรรมวิธีที่ใส่เชื้อแต่ละไอโซเลต คือ SUT1, SUT2, SUT3, SUT4, SUT5 และ SUT6 ใส่เชื้อในอัตรา 10^6 เซลล์ต่อเมล็ด

การทดสอบผลของเชื้อ PGPR ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดในระดับแปลงทดลอง

คัดเลือกกรรมวิธีในกระถางซึ่งมีแนวโน้มทำให้ข้าวโพดเจริญเติบโตได้ดี นำมาใช้ทดลองในสภาพแปลงทดลอง ได้แก่กรรมวิธีที่มีการใช้แบคทีเรียไอโซเลต SUT2, SUT3 และเชื้อผสมระหว่าง SUT2 และ SUT3 โดยใช้ผงพีทเป็นวัสดุพาหะ (carrier) มีปริมาณเชื้อ $1.5x10^8$

เซลล์ต่อกรัมพืช โดยใช้ในปริมาณ 350 กรัมต่อไร่ (มีแบคทีเรีย PGPR ต่อเมล็ด ประมาณ 10^6 เซลล์) ปลูกร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมี แต่ลดการใช้ปุ๋ยเคมีลง 25% และ 50% โดยใช้ปุ๋ยผสมอัตรา 10-10-5 (N-P_2O_5-K_2O) 30 กก.ต่อไร่ แบ่งใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง คือ โรยก้นหลุมก่อนปลูก และใส่ครั้งที่ 2 เมื่อข้าวโพดอายุได้ 30 วัน และขนาดแปลงทดลองแต่ละตำรับคือ 5x5 ตรม. วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) โดยทำการทดลองที่จังหวัดเชียงใหม่

การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต SUT3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LG ที่ 28 °ซ เวลา 2 วัน จากนั้นนำไปทดสอบด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี (Microgen™ Bacillus-ID System) สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลตดังกล่าว (Lawongsa et al., 2008) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสดังนี้ FD1 (5' CCG AAT TCG TCG ACA AC GAG TTT GAT C-CT GGC TCA G '3) และ RP2 (5' CCC GGG ATC CAA GCT TAC GGC TAC CTT GT-T ACG ACT T '3) (Weisburg et al., 1991) และตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยวิธี Electrophoresis ใน 1% w/v agarose gel แล้วย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ตรวจแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอดังกล่าว (Macrogen, Korea) ด้วย Big Dye terminator cycle sequencing Kit (Applied BioSystems, USA) และเครื่องรุ่น 3730XL automated DNA sequencing system (Applied BioSystems, USA) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล (GenBank) ด้วยโปรแกรม BlastN 2.0.13

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การรวบรวมและทดสอบประสิทธิภาพของ PGPR ในการสังเคราะห์ IAA และการตรึงไนโตรเจน

การแยกเชื้อจากดินบริเวณรากข้าวโพดในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง นครสวรรค์ สระบุรี และนครราชสีมา ได้เชื้อ 153 ไอโซเลต และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการสังเคราะห์ IAA พบว่าจากแบคทีเรียจำนวน 153 ไอโซเลต มีเพียง 16 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิต IAA ระหว่าง 7.00-3,985.58 ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้สูงสุด คือ SUT1 รองลงมาคือ SUT2 ซึ่งผลิต 3,985.58 และ 1,143.12 ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนที่วิเคราะห์โดยวิธี ARA อยู่ในช่วง 28-360.49 นาโนโมลอะเซธีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง โดยเชื้อไอโซเลต SUT7 ตรึงไนโตรเจนได้มากที่สุดคือ 360.49 นาโนโมลอะเซธีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้มุ่งเน้นไอโซเลตที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน เพราะกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่อย่างอิสระสามารถให้ธาตุอาหารไนโตรเจนแก่พืชได้น้อยมาก เมื่อเทียบกับกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่กับพืชแบบ symbiosis เช่น กลุ่มไรโซเบียม ดังนั้นในการคัดเลือกขั้นต้น จึงใช้เกณฑ์ของการสร้าง IAA เป็นเกณฑ์แรก

ผลของเชื้อ PGPR ต่อการงอกของเมล็ดข้าวโพด

จากการนำ PGPR 16 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้มาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ PGPR ต่อการงอกของเมล็ดข้าวโพด พบว่า เชื้อมีผลทำให้ความยาวส่วนรากและส่วนลำต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยการปลูกเชื้อไอโซเลต SUT3 และ SUT4 ทำให้ข้าวโพดมีความยาวส่วนรากมากที่สุด (11.23 และ 10.52 เซนติเมตร ตามลำดับ) รองลงมาได้แก่ ไอโซเลต SUT2 และ SUT5 (8.56 และ 8.43 เซนติเมตร ตามลำดับ) ส่วนไอโซเลต SUT4 ทำให้ยอดข้าวโพดยาวที่สุด (3.81 ซม.) รองลงมาคือ SUT3 และ SUT6 (2.72 และ 2.69 ซม. ตามลำดับ) ไอโซเลต SUT3 สามารถส่งเสริมความยาวรากข้าวโพดได้มากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการสังเคราะห์ IAA พบว่า ไอโซเลต SUT3 สามาถผลิต IAA ได้ 21 ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลต SUT1 และ SUT2 โดยความเข้มข้นของ IAA ส่งผลต่อการเจริญของรากข้าวโพดได้ดีที่สุดที่ 10 ไมโครโมลาร์

และเมื่อความเข้มข้นที่สูงกว่า 10 มิลลิโมลาร์จะเริ่มยับยั้งการเจริญของรากข้าวโพด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Elsorra et al. (2004) แต่อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้พบว่าไอโซเลต SUT2 สามารถส่งผลต่อการเจริญของรากข้าวโพดรองลงมาจาก SUT3 ทั้งที่ผลิต IAA สูงกว่าระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญของรากข้าวโพดมาก อาจเป็นไปได้ว่า IAA ไม่ใช่ปัจจัยสำคัญเพียงปัจจัยเดียวที่มีผลต่อการงอก และการยืดยาวออกของรากข้าวโพด

ผลของเชื้อ PGPR ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดในระดับกระถาง

เมื่อปลูกเชื้อ PGPR กับข้าวโพดในระดับกระถาง พบว่า ต้นข้าวโพดมีความสูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P\leq0.01$) การเจริญของต้นข้าวโพดที่ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย PGPR (Control 1) ที่ 30 วัน และการเจริญของต้นข้าวโพดที่ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย PGPR แต่มีการให้เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ LG ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ (Control 2) พบว่ามีความสูงเท่ากัน คือ 27.5 ซม. ในส่วนของกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT4 และเชื้อผสม (MI) ทำให้ต้นข้าวโพดมีความสูงมากที่สุดเท่ากับ 32.25 ซม. รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT2, SUT3, SUT6 และการใส่ปุ๋ยเคมี ส่วนกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT1 และไม่ใส่เชื้อ (Control 1 และ Control 2) ต้นข้าวโพดมีความสูงน้อยที่สุด และเมื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวโพดเมื่ออายุ 90 วัน พบว่า กรรมวิธีที่ใส่เชื้อทำให้ความสูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$) กล่าวคือ ต้นข้าวโพดจากกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อผสมให้ความสูงมากที่สุด คือ 118.50 ซม. รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT2 ส่วนการที่ใส่เชื้อ SUT3, SUT4, SUT5 และ SUT6 ต้นข้าวโพดมีความสูงไม่ต่างจากปุ๋ยเคมีสูตรแนะนำ **(Table 1)** ในส่วนของการสะสมน้ำหนักต้น พบว่าต้นข้าวโพดในทุกกรรมวิธีมีน้ำหนักส่วนเหนือดินทั้งน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นในส่วนของราก โดยกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT3 มีน้ำหนักสดรากสูงที่สุด รองลงมาคือการใส่ปุ๋ยเคมี ส่วนกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT1, SUT2, SUT5 และ SUT6 มีน้ำหนักรากสดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่เชื้อผสมมีน้ำหนักรากสดต่ำสุด แต่มีค่ามากกว่ากรรมวิธีที่ไม่ใส่เชื้อ (Control 1 และ Control 2) ในส่วนน้ำหนักแห้งเป็นไปในทำนองเดียวกันกับน้ำหนักสด **(Table 1)**

Table 1 Effect of PGPR inoculation on shoot length and plant weight in pot experiment.

Treatment	Shoot length (cm)		Shoot/Root weight					
	30 days	90 days	Aerial part fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Biomass fresh weight (g)	Aerial part dry weight (g)	Root dry weight (g)	Biomass Dry weight (g)
Control 1	27.50 ^{c}	90.00 ^{c}	500.00	156.75 ^{d}	656.75 ^{c}	92.38	20.64 ^{c}	113.04 ^{c}
Control 2	27.50 ^{c}	90.25 ^{c}	540.00	182.5 ^{cd}	722.50 ^{bc}	94.34	37.81 ^{bc}	132.15 ^{abc}
SUT1	28.75 ^{bc}	97.75 ^{bc}	612.00	277.5 ^{abc}	890.00 ^{ab}	103.48	36.81 ^{bc}	140.28 ^{ab}
SUT2	31.50 ^{ab}	116.50 ^{ab}	625.00	245.0 ^{abcd}	870.00 ^{ab}	110.27	36.40 ^{bc}	146.67 ^{ab}
SUT3	31.00 ^{ab}	106.00 ^{abc}	650.00	310.0 ^{a}	960.00 ^{a}	105.57	54.36 ^{a}	159.92 ^{a}
SUT4	32.25 ^{a}	107.50 ^{abc}	550.00	167.5 ^{d}	717.50 ^{bc}	103.37	27.65 ^{bc}	131.01 ^{abc}
SUT5	29.25 ^{abc}	99.00 ^{abc}	527.50	212.5 ^{bcd}	740.00 ^{bc}	96.99	28.66 ^{bc}	125.65 ^{bc}
SUT6	30.75 ^{ab}	99.75 ^{abc}	587.50	252.5 ^{abcd}	840.00 ^{abc}	103.07	35.37 ^{bc}	138.43 ^{abc}
MI	32.25 ^{a}	118.50 ^{a}	583.25	190.0 ^{cd}	773.25 ^{abc}	113.60	33.47 ^{bc}	147.04 ^{ab}
100%CF	31.50 ^{ab}	108.50 ^{abc}	600.00	290.0 ^{ab}	890.00 ^{ab}	115.12	39.41 ^{ab}	154.54 ^{ab}
F-test	**	*	ns	**	*	ns	*	*
C.V. (%)	6.72	11.78	13.15	26.02	14.93	12.98	30.17	13.42

^{a,b,c} Mean values within a column followed by different letters were significantly different according to DMRT, $P\leq0.05$ (*), $P\leq0.01$ (**), ns = non significant, Control1 = uninoculated, MI = mixed strains and, CF = chemical fertilizer

ผลของเชื้อ PGPR ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดในแปลงทดลอง

การปลูกเชื้อ PGPR ไอโซเลต SUT2, SUT3 และเชื้อผสม (MI) ร่วมกับปุ๋ยเคมีในอัตราต่างๆ ในแปลงทดลอง ระหว่างฤดูแล้ง และฤดูฝน (มกราคม-มิถุนายน และกรกฎาคม-พฤศจิกายน 2550 ตามลำดับ) **(Table 2)** ในฤดูแล้ง การเจริญของต้นข้าวโพดที่ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย PGPR ที่ 30 วัน พบว่ามีความสูงเท่ากับ 3.72 ซม. ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับความสูงของต้นข้าวโพดที่มีการปลูกเชื้อ PGPR ไอโซเลต SUT2, SUT3 และเชื้อผสม (MI) พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกันเมื่อ 60 วันขึ้นไปจนถึง 90 วัน (ระยะเก็บเกี่ยว) โดยที่อายุ 30 วัน กรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อผสมร่วมกับปุ๋ยเคมี 75% ทำให้ต้นข้าวโพดมีความสูงมากที่สุด รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT2 และ SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมี 75% แต่ไม่แตกต่างกับการใช้เชื้อผสมร่วมกับปุ๋ยเคมี 50% และการใช้ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว ส่วนในระยะที่อายุ 60-90 วัน ความสูงของต้นข้าวโพดไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าการใช้เชื้อร่วมกับปุ๋ยเคมีทั้ง 2 อัตรา และการใช้ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียวมีความสูงมากกว่าที่ไม่ใส่ปุ๋ยและเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) น้ำหนักแห้งต้นข้าวโพดในทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับปุ๋ยเคมีในอัตรา 75% ของอัตราแนะนำ ทำให้ต้นข้าวโพดมีน้ำหนักแห้งมากกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตรา 50% สำหรับผลผลิตของเมล็ดข้าวโพดแห้งที่ความชื้น 15% พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ การใช้เชื้อ SUT2 ร่วมกับปุ๋ยเคมี 75% ของอัตราแนะนำ ทำให้ข้าวโพดมีผลผลิตมากที่สุด รองลงมาได้แก่ การใช้เชื้อ SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมี 75% และการใช้เชื้อ SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมี 50% ขณะที่การใช้ปุ๋ยเคมีอย่างเดียวทำให้ข้าวโพดมีผลผลิตอยู่ในระดับเดียวกับการใช้เชื้อ SUT2 ร่วมกับปุ๋ยเคมี 50% และการใช้เชื้อผสมร่วมกับปุ๋ยเคมี 50% แต่ขนาดของเมล็ดจากน้ำหนัก 100 เมล็ด พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตของข้าวโพดในฤดูฝน (กรกฎาคม-พฤศจิกายน 2550) พบว่าข้าวโพดมีความสูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในทุกระยะของการเจริญเติบโต โดยความสูงของต้นข้าวโพดที่ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย PGPR ที่ 30 วัน เท่ากับ 27.95 เซนติเมตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับความสูงของต้นข้าวโพดที่มีการปลูกเชื้อ PGPR ไอโซเลต SUT2, SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 75% และกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ MI ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 75% พบว่าความสูงไม่แตกต่างกัน ส่วน 60 และ 90 วัน พบว่าเมื่อเปรียบเทียบความสูงของต้นข้าวโพดที่ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย PGPR กับกรรมวิธีอื่นๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่มีการใส่ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียวให้ค่าความสูงมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ กรรมวิธีที่ใส่เชื้อ MI ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 75% และกรรมวิธีที่ให้ค่าความสูงน้อยที่สุด คือ SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 50% เมื่อพิจารณาที่น้ำหนักแห้งของต้นข้าวโพด พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และเป็นที่น่าสนใจว่าการใส่ปุ๋ยเคมีอย่างเดียว ทำให้ต้นข้าวโพดมีน้ำหนักแห้งน้อยกว่ากรรมวิธีที่ใส่เชื้อทุกกรรมวิธี ส่วนผลผลิตที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) คือกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 75%, กรรมวิธีที่ใส่เชื้อ MI ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 75% และกรรมวิธีที่ใส่เชื้อ MI ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่ 75% ให้ผลผลิตไม่แตกต่างจากการใส่ปุ๋ยเคมีอย่างเดียว แต่มากกว่าการไม่ใส่เชื้อ

เนื่องจากไอโซเลต SUT3 แสดงความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดฝักอ่อนมากที่สุด จึงได้จำแนกชนิด โดยการอ่านลำดับเบสบนสายดีเอนเอ จากยีน 16S rDNA พบว่าไอโซเลตดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่ร้อยละ 99 (GU971415) รวมทั้งการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ (Microgen™ Bacillus-ID System) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus subtilis* ที่ร้อยละ 97.38 และไอโซเลต SUT3 สามารถยับยั้งราก่อโรคพืช คือ *Rhizoctonia solani, Verticillium* sp., *Fusarium oxysporum* **(Table 3)** ซึ่งเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการงอกและความสมบูรณ์ของเมล็ดและกล้าข้าวโพด เนื่องจากเชื้อรากลุ่มดังกล่าวเป็นเชื้อรา

Table 2 Effect of PGPR on plant yield between dry and rainy seasons.

Treatment	Dry season (January 2006-June 2006)						Rainy season (July 2006-November 2006)					
	Shoot length (cm)			Plant productions			Shoot length			Plant productions		
	30 days	60 days	90 days	Shoot dry weight (g)	Weight/100 seeds (g)	Yield (kg/rai)	30 days	60 days	90 days	Shoot dry weight (g)	Weight/100 seeds (g)	Yield (kg/rai)
control	3.72 ^{d}	22.87	123.33	90.88	20.30	272.37 ^{d}	27.95 ^{bc}	179.30 ^{c}	182.53 ^{c}	97.85	21.88 ^{bc}	657.40 ^{d}
100%CF	9.47 ^{abc}	52.40	145.30	176.38	26.76	406.29 ^{bcd}	39.80 ^{a}	216.20 ^{a}	216.50 ^{a}	72.85	27.58 ^{a}	1214.90 ^{a}
SUT2+75%CF	10.17 ^{ab}	52.00	149.90	157.22	25.50	616.95 ^{a}	29.00 ^{bc}	206.97 ^{ab}	207.40 ^{ab}	131.89	24.46 ^{abc}	962.80 ^{bc}
SUT3+75%CF	10.17 ^{ab}	47.53	134.17	160.38	24.60	511.74 ^{ab}	31.90 ^{ab}	208.23 ^{ab}	209.57 ^{ab}	123.41	27.50 ^{a}	1095.80 ^{ab}
MI+75%CF	10.50 ^{a}	50.27	145.03	163.24	24.27	344.44 ^{cd}	32.30 ^{ab}	211.07 ^{a}	211.83 ^{ab}	146.94	25.55 ^{a}	995.70 ^{abc}
SUT2+50%CF	6.67 ^{cd}	33.43	132.77	138.14	23.43	440.19 ^{bc}	28.57 ^{bc}	206.30 ^{ab}	206.93 ^{ab}	129.2	25.37 ^{ab}	951.5o ^{bc}
SUT3+50%CF	6.73 ^{bcd}	39.80	138.07	145.05	22.20	486.01 ^{abc}	23.37 ^{c}	193.23 ^{bc}	200.33 ^{b}	122.35	21.17 ^{c}	754.80 ^{cd}
MI+50%CF	8.37 ^{abc}	42.63	150.87	138.13	23.33	385.58 ^{bcd}	28.63 ^{bc}	209.67 ^{a}	210.70 ^{ab}	152.00	25.58 ^{a}	979.40 ^{abc}
F-test	*	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	ns	*	*
C.V. (%)	23.87	25.47	9.29	23.87	9.05	16.19	15.03	4.27	3.94	22.41	8.42	14.51

^{a,b,c,d} Mean values within a column followed by different letters were significantly different according to DMRT, $p \leq 0.05$ (*) and ns = non significant, Control = uninoculated, MI = mixed strains, CF = chemical fertilize

Table 3 Characterization of *Bacillus subtilis* (SUT 3).

Isolate	ARA[1/]	IAA	P-solubilization[2/]	Plant Pathogen Antagonism[2/]				
		(µM/mg protein)		*Rhizoctonia solani*	*Verticillium* sp.	*Didymella* sp.	*Fusarium oxysporum*	***Ralstonia***
SUT3	14.01	21	+	+	+	-	+	-

[1/] ARA unit = nmole of acetylene/mg protein/day

[2/] + = can inhibit plant pathogen, - = cannot inhibit plant pathogen

ที่อาศัยอยู่ในดินแล้วก่อให้เกิดโรคในพืช (Soil born disease) เช่น โรคเมล็ดเน่า รากเน่า (seed rots, seedling disease) ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญอย่างหนึ่งในข้าวโพด โดยมีรายงานในทำนองเดียวกันในข้าวโพดอาหารสัตว์ ซึ่งพบว่า *Bacillus subtilis* สามารถยับยั้ง *Fusarium verticillioides, F. moniliforme* และ *Rhizoctonia solani* (Marco et al, 2006) และสามารถผลิตฮอร์โมน (IAA และ cytokinin) ที่ส่งผลต่อการเจริญของข้าวโพดอาหารสัตว์และผักกาดหอม (Elsorra et al, 2004; Arkhipova et al, 2004) ได้เช่นกัน นอกจากนี้ เอนไซม์ ACC-deaminase ที่ถูกผลิตโดย *B. subtilis* สามารถช่วยลดระดับการสร้างเอธีลีนในพืชส่งผลในการลดความเครียดของพืช ดังนั้นจึงสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอาศัยด้วย (Baby et.al. 2006)

สรุป

จากการประยุกต์ใช้ PGPR ในการส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์แปซิฟิค 283 นั้น พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SUT3 ร่วมกับปุ๋ยเคมี โดยลดอัตราส่วนปุ๋ยเคมีลง 25% และ 50% ทำให้ข้าวโพดมีการเจริญเติบโต และให้ผลผลิตไม่แตกต่างกับการใส่ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว ซึ่งน่าจะเกิดจากคุณสมบัติของ PGPR ที่สามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวโพดฝักอ่อน เช่น การผลิตฮอร์โมนพืช การผลิตเอนไซม์ ACC-deaminase และสามารถยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าวโพดบางชนิดได้ เช่น *Fusarium* และ *Rhizoctonia* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเมล็ดและรากเน่า (seed rots, seedling disease) ดังนั้นจึงมีศักยภาพในการผลิตเป็นหัวเชื้อ เพื่อใช้ทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี และสารเคมีป้องกันโรคสาเหตุจากเชื้อรา และแบคทีเรียบางชนิดในข้าวโพดได้ในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

หนึ่ง เตียอำรุง, กมลลักษณ์ เทียมไธสง และนันทกร บุญเกิด. 2548. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). วารสารสุรนารี 12:252-261.

Arkhipova, T. N., S. U. Veselov, A. I. Melentiev, E. V. Martynenko. and G. R. Kudoyarova. 2004. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. Plant Soil. 272:201-209.

Baby, S., A. Muhammad, Z. A. Zahir, and K. Azeem. 2006. Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. Soil Biol. Biochem. 38:2971-2975.

Costacurta, A., P. Mazzafera, and Y. B. Rosato. 1998. Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is increased in the presence of plant leaf extracts. FEMS Microbiol. Lett. 159:215-220.

Elsorra, E. I., H. Bochow., H. Ross, and R. Borriss. 2004. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormone like action of culture filtrates prepared from plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. J. Plant Dis. Protect. 111: 583-597.

Hardy, R. W. F., R. D. Holsten, E. K. Jackson, and R. C. Burns. 1968. The Acetylene ethylene assay for N_2-fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol. 43:1185-1207.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrogh, A. L. Farr, and R. J. Raldall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. The J. Biol. Chemical. 193:265-275.

Marco, K., U. Effmert., G. Berg, and B. Piechulla. 2006. Volatiles of *bacterial antagonists* inhibit mycelial growth of the plant pathogen Rhizoctonia solani. Arch. Microbiol. 187:351-360.

Meunchang, S., S. Panichsakpatana, and R. W. Weaver. 2005. Inoculation of sugar mill by-products compost with N2-fixing bacteria. Plant Soil. 271:219-225.

Lawongsa, P., N. Boonkerd., S. Wongkaew., F. O'Gara, and N. Teaumroong. 2008. Molecular and phenotypic characterization of potential plant growth-promoting *Pseudomonas* from rice and maize rhizospheres. World J. Microbiol. Biotechnol. 24:1877-1884.

Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pellelier, and D. J. Lone. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phytogenetic study. J. Bacteriol. 173:697-703.