เอนโดไฟติกแบคทีเรียและผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว

Endophytic Bacteria and Their Effects on Improve Growth of Rice

สุจิตตรา ปะนันโต[1], ภาคภูมิ ตันเตชสาธิต[2], ศิริลักษณ์ จิตรอักษร[3], รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ[4] และ กรรณิการ์ สัจจาพันธ์[1*]

Sujittra Pananto[1], Phakphoom Tantachasatid[2], Siriluck Jitacksorn[3], Rungsarid Kaveeta[4] and Kannika Sajjaphan[1*]

บทคัดย่อ: การศึกษาในครั้งนี้ทำการแยกเอนโดไฟติกแบคทีเรียจากรากข้าวพันธุ์ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี ได้จำนวน 34 ไอโซเลต คัดเลือกไอโซเลตที่สมบูรณ์จำนวน 13 ไอโซเลต เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชพบว่า เอนโดไฟติกแบคทีเรียมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตระหว่าง 421.7 - 465.9 ไมโครกรัม/มล. การผลิตออกซิน (IAA) 8.0 - 21.9 ไมโครกรัม/มล. และการผลิตจิบเบอริลลิน 143.7 - 292.1 ไมโครกรัม/มล. และเลือกเอนโดไฟติกแบคทีเรียไอโซเลต KJHSB-9 มาทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับเบสกับ *Bacillus safensis* ที่ระดับความเหมือน 98% ทำการทดสอบการใช้ประโยชน์จากไอโซเลต KJHSB-9 ต่อการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี พบว่าการใช้เอนโดไฟติกแบคทีเรีย KJHSB-9 ร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและปุ๋ยฟอสฟอรัส ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว โดยเพิ่มความสูง ปริมาณการแตกกอ จำนวนรวงต่อกอ และผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 5.83%, 42.62%, 43.27% และ 38.42% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่ใส่ปุ๋ย (ควบคุม) และเพิ่มความสูง ปริมาณการแตกกอ จำนวนรวงต่อกอ และผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 3.15%, 22.56%, 2.55% และ 9.94% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัส
คำสำคัญ: เอนโดไฟติกแบคทีเรีย, การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช, ข้าว

ABSTRACT: Thirteen isolates were obtained from the rice roots of Khao Jow Hawm Suphan Buri variety and tested for plant growth promotion ability. All of these isolates were able to solubilize tricalcium phosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) in the range of 421.7-465.9 μg/ml to produce auxin and gibberellin in the ranges of 8.0-21.9 μg/ml and 143.7-292.1 μg/ml, respectively. Overall, the results showed that the isolate KJHSB-9 was the most efficient. Sequence analysis of the PCR product indicated that the 16S rDNA gene of the isolate KJHSB-9 was 98% identical to the same region of *Bacillus safensis*. The KJHSB-9 was inoculated onto Pathum Thani 1 and Khao Jow Hawm Suphan Buri rice varieties to examine the plant growth promotion ability in pot experiments. The results indicated that the application of N and P fertilizers with the endophytic bacteria KJHSB-9 resulted in enhanced height of rice, number of tillering, number of ears/plants, and grain yield by 5.83%, 42.62%, 43.27% and 38.42% respectively, when compared with the control. Moreover, the results indicated that the application of N and P fertilizers with KJHSB-9 resulted in enhanced height of rice, number of tillering, number of ears/plants, and grain yield by 3.15%, 22.56%, 2.55% and 9.94%, respectively, when compared with the application of N and P without KJHSB-9.
Keywords: endophytic bacteria, plant growth promotion, rice

[1] ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Cha-tuchak, Bangkok, 10900

[2] คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร 47000
Faculty of Natural Resources and Agro-Industry Kasetsart University, Chalermphrakiat Sakonnakhon Province Campus Moung District, Sakonnakhon Province, 47000

[3] กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
Microbiology Research Group, Department of Agriculture, Cha-tuchak, Bangkok, 10900

[4] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Cha-tuchak, Bangkok, 10900

* Corresponding author: agrkks@ku.ac.th

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นธัญพืชที่สำคัญที่สุดของโลกเนื่องจากประชากรทั้งหมดในโลกมากกว่า 50% บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก (Hossain and Fischer, 1995; Ladha et al., 1998) ประกอบกับสถานการณ์ในปัจจุบันประชากรของโลกมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง เป็นผลทำให้ปริมาณความต้องการผลผลิตข้าวเพิ่มสูงขึ้น สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติได้ประมาณการปริมาณความต้องการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในปี ค.ศ.2020 เพิ่มขึ้นเป็นอย่างน้อย 2 เท่าของปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน (International Rice Research Institute, 1993) สำหรับการผลิตข้าวเพื่อให้ได้ผลผลิตข้าวที่เพียงพอต่อการบริโภคของประชากรโลก นอกจากปัจจัยด้านธาตุอาหารพืช การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้านอื่นๆ มีความสำคัญเช่นเดียวกัน เช่น การกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช การยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ปัจจุบันมีนักวิทยาศาสตร์และเกษตรกรให้ความสนใจเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร เช่น การใช้จุลินทรีย์เพื่อการปรับปรุงบำรุงดิน การใช้จุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และการใช้จุลินทรีย์เพื่อการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ปัจจุบันจึงมีการศึกษาแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้านต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชอาศัย คือ เอนโดไฟติกแบคทีเรีย (endophytic bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้ชีวิตทั้งหมดหรือบางช่วงอยู่ในเนื้อเยื่อพืช แล้วให้ประโยชน์แก่พืชอาศัยโดยไม่ทำอันตรายหรือก่อให้เกิดโรคแก่พืช แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชที่มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับพืช และได้รับประโยชน์ในแง่มีการแข่งขัน แย่งแหล่งคาร์บอนหรืออาหารน้อย และพืชอาศัยช่วยป้องกันสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมให้แก่แบคทีเรีย (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998) ในปัจจุบันมีการศึกษาเอนโดไฟติกแบคทีเรียในพืช โดยใช้วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล พบว่ามีความหลากหลายทางสปีชีส์ของเอนโดไฟติกแบคทีเรียในพืช และยังพบว่าเอนโดไฟติกแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและผลผลิต ยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ละลายฟอสเฟต และยังช่วยหาไนโตรเจนในรูปที่เป็นประโยชน์ให้กับพืช (assimilable nitrogen) (de Matos Nogueira et al., 2001) ตัวอย่างเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการให้ไนโตรเจนแก่พืช ได้แก่ *Serratia marcesens* อาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ (Jame et al., 2000; Ladha et al., 1995) และ aerenchyma ของราก ใบ และลำต้นข้าว (Gyaneshwar et al., 2001) นอกจากนี้ยังพบว่า มีเอนโดไฟติกแบคทีเรียบางกลุ่มช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ โดยช่วยให้พืชหลั่ง phytohormones ไปสู่พื้นผิวราก ทำให้เพิ่มการดูดซึมธาตุอาหาร โดยมีรายงานว่า *Herbaspirillum seropedicae* Z67 (James et al., 2002), *Herbaspirillum* sp. B501 (Zakria et al., 2007), *Serratia marcescens* IRBG500 (Gyaneshwar et al., 2001), *Herbaspirillum seropedicae* และ *Burkholderia* spp. (Baldani et al., 2001) ส่งผลให้น้ำหนักของผลผลิตของข้าวเพิ่มขึ้นมากกว่าตำรับควบคุม และมีการพบ *Pantoea agglomerans* YS19 สามารถตรึงไนโตรเจนในอาหาร N free medium และผลิตฮอร์โมนพืช (ออกซิน กรดแอบไซซิก จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน) ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอาศัยได้ (Feng, 2006) นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนโดไฟติกแบคทีเรียเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคในข้าวและพืชอื่นๆ (Mukhopadhyay et al., 1996; Padgham et al., 2005)

ข้าวนอกจากเป็นอาหารหลักของคนกว่าครึ่งโลก ข้าวยังเป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่มีความสำคัญต่อรายได้และความเป็นอยู่ของชาวไทย พื้นที่เกษตรกรรมส่วนใหญ่ใช้สำหรับปลูกข้าว และผลผลิตข้าวของไทยใช้เพื่อการบริโภคภายในและส่งออก สร้างรายได้ให้แก่ประเทศอย่างมหาศาล ซึ่งคุณภาพข้าวไทยหอม นุ่ม และค่อนข้างเหนียว ทำให้ผู้บริโภคภายใน และต่างประเทศมีแนวโน้มความต้องการบริโภคเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี ซึ่งเป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง ปลูกได้ทั้งในฤดูนาปี และนาปรัง ให้ผลผลิตประมาณ 700 กิโลกรัม/

ไร่ ตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยดีปานกลาง ต้านทานต่อโรคและแมลงบางชนิดดีกว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 เช่น โรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง เพลี้ยจักจั่นสีเขียว และเพลี้ยกระโดดหลังขาว ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดแยกเอนโดไฟติกแบคทีเรียในรากข้าวที่มีความสามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี เพื่อเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตของข้าวแบบยั่งยืน

วิธีการศึกษา

การทดลองที่ 1 การแยกและศึกษาลักษณะของเอนโดไฟติกแบคทีเรียจากรากข้าว

1.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกแบคทีเรียจากรากข้าว

เก็บตัวอย่างรากข้าวพันธุ์ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี โดยเก็บตัวอย่างจากข้าวในแปลงทดลองศูนย์วิจัยข้าวจังหวัด สุพรรณบุรี นำรากข้าวที่เก็บมาทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวราก โดยล้างน้ำให้สะอาด ระวังอย่าให้รากขาด ซับด้วยกระดาษทิชชู ชั่งรากข้าวหนัก 1 กรัม นำไปแช่ใน 1% Chloramine T นาน 15 นาที หลังจากนั้นล้างรากด้วย Phosphate buffer saline (PBS) 1 ครั้ง นำรากและ glass bead ใส่ขวดปากแคบขนาด 150 มล. ที่มี PBS ปริมาตร 100 มล. เขย่าเป็นเวลา 20 นาที โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที จากนั้นล้างรากด้วย PBS 4 ครั้ง นำรากข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยขั้นตอนที่กล่าวมาทำการหาเอนโดไฟติกแบคทีเรีย โดยบดรากข้าวในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย 1% Chloramine T นาน 1 นาที กับ PBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายใสมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, …,10^{-7} ด้วย PBS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ไป spread บนอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ทำการนับเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง NA (Barraquio et al.,1997) หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์และรักษาแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไว้ใน 25% glycerol ที่อุณหภูมิ -21 องศาเซลเซียส เพื่อการศึกษาในขั้นต่อไป

1.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

การทดสอบความสามารถในการผลิตออกซินของแบคทีเรีย

นำเอนโดไฟติกแบคทีเรีย จำนวน 13 ไอโซเลต ที่คัดเลือกได้ เลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 5 มล. บ่มในเครื่องเขย่า ความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ปรับค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 แล้วนำเซลล์เริ่มต้นมา 0.25 มล. ใส่ลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มล. ในหลอดใหม่ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อครบ 2 วัน เติม Trytrophan ที่มีความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ออกซิน นำไปบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนสารละลายใสมาทดสอบการผลิตออกซินด้วยวิธี Salkowski colouring reagent (Fernando et al., 2007 และ Ravikumar et al., 2004) แล้ววัดปริมาณการผลิตออกซินด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectophotometer) ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

การทดสอบความสามารถในการผลิตจิบเบอเรลลินของแบคทีเรีย

เตรียมแบคทีเรียตามวิธีการทดสอบความสามารถในการผลิตออกซิน จนได้สารละลายใสที่ได้หลังจากการเติม Trytrophan นำสารละลายใสนั้นมาทดสอบการผลิตจิบเบอเรลลินด้วยวิธีการของ Paleg (1965) โดยนำสารละลายใสปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมลงใน

หลอดทดลองที่มี 0.5 M zing acetate ปริมาตร 0.2 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำมาเติม 0.5 M potassium ferrocyanide ปริมาตร 0.2 มล.นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมาเติม 5% HCl ในอัตราส่วน 1:1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 75 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง Spectrophotometer รุ่น T60 ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้ 5% HCl เป็น blank ในการวัดปริมาณการผลิตจิบเบอเรลลิน นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (Vikram et al., 2007)

การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง National botanical research institutes phosphate growth medium (NBRIP) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. สังเกตการเกิดวงใสรอบๆ โคโลนีที่เกิดขึ้น เนื่องจากการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย และนำมาทดสอบต่อด้วยการวัดปริมาณการละลายฟอสเฟตด้วยวิธี vanado-molybdate assay (Hesse, 1971)

1.3 การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA

นำตะกอนเซลล์ ปริมาตร 1 มล. มาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มล. เติม NaOH ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และวางบนน้ำแข็งทันทีนาน 3 นาที หลังจากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใส ส่วนบน ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดใหม่เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่เตรียมได้ดังกล่าวมาข้างต้น มาทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบคือ ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร 10X buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร universal primer ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (341F 5'-CCTACG-GGAGGCAGCAG-3' และ 928R 5'-CCCCGCAAT-TCCTTTGAGTT-3') ปริมาตรอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ Taq DNA Polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำที่ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (Sajjaphan et al., 2010) โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle TC512 (Techne, UK) นำผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ไป วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Macrogen (Seoul, Korea) หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ ได้มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลของ Genbank ด้วยโปรแกรม Blastn

การทดลองที่ 2 การทดสอบการใช้ประโยชน์จากเอนโดไฟติกแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว

2.1 การทดสอบการเข้าสู่รากข้าวของเอนโดไฟติกแบคทีเรีย

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรีที่ปลอกเปลือกแล้วมาฆ่าเชื้อด้วย 30% chloramine T เป็นเวลา 45 นาที ล้างด้วย 70% ethanol เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปเพาะบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) สังเกตรากข้าวงอก นำข้าวที่รากงอกแล้วย้ายไปลงในอาหารกึ่งเหลว N-free medium (NFMM) (Mae and Ohira, 1981) นำเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่มีความเข้มข้น 10^8 เซลล์/มล. ปริมาตร 1 มล. ใส่ลงเมล็ดข้าวที่รากงอกแล้ว 1 เมล็ด บ่มเป็นเวลา 14 วัน นำไป

ตรวจหาเอนโดไฟติกแบคทีเรียโดย วิธีของ Barraquio et al. (1997)

2.2 การเตรียมเอนโดไฟติกแบคทีเรีย

นำเอนโดไฟติกแบคทีเรีย KJHSB- 9 มาทดสอบการใช้ประโยชน์ โดยทำการเลี้ยงไอโซเลต KJHSB-9 ในอาหารเหลว Rennie ralate medium (RMR) (Rennie,1981) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ปรับค่า OD_{600} ให้ได้ค่าเท่ากับ 1.0 หรือ 10^8 เซลล์/มล.

2.3 การทดสอบความสามารถของเอนโดไฟติกแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว

ทำการทดลองในชุดดินสระบุรี โดยเก็บดินที่ระดับความลึก 0-20 ซม. โดยวางแผนการทดลอง แบบ 2 x 3 Factorial in Completely Randomized Design 6 ตำรับการทดลอง 3 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 คือ ชนิดของพันธุ์ข้าว ได้แก่ ข้าวปทุมธานี 1 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี ปัจจัยที่ 2 คือ แหล่งของสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ไม่ใส่ปุ๋ย (ควบคุม) ปุ๋ยไนโตรเจน และปุ๋ยฟอสฟอรัสปุ๋ยไนโตรเจน และปุ๋ยฟอสฟอรัสร่วมกับเอนโดไฟติกแบคทีเรีย KJHSB- 9

ทำการวิเคราะห์สมบัติของดินก่อนปลูกพบว่าชุดดินสระบุรี มีปฏิกิริยาเป็นกรดเล็กน้อย pH เท่ากับ 6.34 มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่ำ เท่ากับ 0.19% ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่ำ เท่ากับ 8.10 มล./กก. และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ต่ำถึงเหมาะสม เท่ากับ 143.40 มล./กก. คำนวณอัตราการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยโพแทสเซียมอยู่ในระดับที่เพียงพอต่อความต้องการของข้าว ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 46-0-0 เพิ่มจำนวน 1.3 กก./ไร่ ฟอสฟอรัส 0-46-0 จำนวน 0.6 กก./ไร่ แบ่งใส่ 3 ครั้ง คือ ระยะปักดำ (หลังปักดำ 15 วัน) ใส่ระยะข้าวแตกกอ (30 วันหลังใส่ปุ๋ยครั้งแรก) และใส่ระยะข้าวกำเนิดช่อดอก (สถาบันวิจัยข้าว, 2547) โดยใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และฟอสฟอรัสเฉพาะตำรับการทดลองปุ๋ยไนโตรเจน และปุ๋ยฟอสฟอรัส ปุ๋ยไนโตรเจนและปุ๋ยฟอสฟอรัสร่วมกับเอนโดไฟติกแบคทีเรีย KJHSB- 9

การเตรียมต้นกล้าและดินปลูกข้าว การเตรียมต้นกล้านำเมล็ดข้าวที่ทำการฆ่าเชื้อมาแช่กับเอนโดไฟติกแบคทีเรีย 10^8 เซลล์/มล. ปริมาตร 1 มล./เมล็ด เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นนำไปเพาะเป็นต้นกล้าจนกระทั่งกล้าข้าวอายุ 21 วัน การเตรียมดินปลูกข้าว ทำการฆ่าเชื้อดินปลูกด้วยการอบด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จำนวน 3 ครั้ง บรรจุดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 5 กก./กระถาง และบ่มดินในสภาพขังน้ำเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นปักดำกล้า จำนวน 3 ต้น/กระถาง ดูแลระดับน้ำในกระถางให้สูงจากผิวดิน 10 -15 ซม. ตลอดระยะเวลาปลูกทำการวัดความสูง จำนวนหน่อ/ต้น ที่ระยะแตกกอ ระยะกำเนิดช่อดอก ระยะออกดอก และระยะเก็บเกี่ยว แล้วทำการเก็บเกี่ยวข้าวเมื่อข้าวแก่ อายุประมาณ 120 วัน นำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักผลผลิตเมล็ด และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การแยกและศึกษาลักษณะของเอนโดไฟติกแบคทีเรียจากรากข้าว

1.1 การแยกแบคทีเรียจากรากข้าวและการทดสอบความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

แยกเอนโดไฟติกแบคทีเรีย จากรากข้าวพันธุ์ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี (KJHSB) ได้จำนวน 34 ไอโซเลต พบว่า แบคทีเรียจาก 34 ไอโซเลตที่แยกได้จากรากข้าว มีความสามารถในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน โคโลนีส่วนใหญ่มีลักษณะกลม ใส และมีระยะเวลาในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน การศึกษาในขั้นต่อไปจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสมบูรณ์ของโคโลนี และมีระยะเวลาการเจริญเติบโตได้ภายใน 2 วัน จำนวน 13 ไอโซเลต มาทำการศึกษาความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตโดย พบว่า ทั้ง 13 ไอโซเลต มีความสามารถในการละลาย

ฟอสเฟตอยู่ระหว่าง 421.7-465.9 ไมโครกรัม/มล. และไอโซเลต KJHSB-9 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตสูงที่สุด คือ 465.9 ไมโครกรัม/มล. ความสามารถในการผลิตออกซิน อยู่ระหว่าง 8.0-21.9 ไมโครกรัม/มล. โดยไอโซเลต KJHSB-12 มีความสามารถในการผลิตออกซินสูงสุด คือ 21.9 ไมโครกรัม/มล. ความสามารถในการผลิตจิบเบอเรลลินอยู่ระหว่าง 143.7-292.1 ไมโครกรัม/มล. โดยไอโซเลต KJHSB-3 มีความสามารถในการผลิตจิบเบอเรลลิน 292.1 ไมโครกรัม/มล. (Table 1) โดยภาพรวมพบว่าเอนโดไฟติกแบคทีเรียไอโซเลต KJHSB-9 มีความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในระดับสูง กล่าวคือ สามารถละลายฟอสเฟต ผลิตออกซิน (IAA) และผลิตจิบเบอเรลลิน ได้ 465.9 ไมโครกรัม/มล., 12.0 ไมโครกรัม/มล. และ 161.4 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ จึงได้นำไอโซเลต KJHSB-9 มาทำการศึกษาผลของการใช้ประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของข้าวต่อไป

Table 1 Quantity of Phosphate solubilization ability, IAA production and Gibberellins production by some representative endophytic bacterial isolates

Isolate	Phosphate solubilizing ability (µg.ml)	IAA production (µg.ml)	Gibberellins production (µg.ml)
KJHSB-1	444.6	16.3	162.0
KJHSB-2	443.8	11.9	151.8
KJHSB-3	-	8.0	292.1
KJHSB-4	-	21.1	243.1
KJHSB-5	-	17.2	160.0
KJHSB-6	-	-	160.3
KJHSB-7	-	17.2	164.1
KJHSB-8	461.7	18.2	182.1
KJHSB-9	465.9	12.0	161.4
KJHSB-10	447.1	12.9	151.7
KJHSB-11	421.7	15.7	167.6
KJHSB-12	449.2	21.9	155.8
KJHSB-13	430.9	18.9	143.7

1.3 การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA

การระบุชนิดของไอโซเลต KJHSB-9 โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย KJHSB-9 มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank คือ *Bacillus safensis* strain FO-036b (NR041794.1) ที่ระดับความเหมือน 98%

การทดลองที่ 2 การทดสอบการใช้ประโยชน์จากเอนโดไฟติกแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว

2.1 การทดสอบการเข้าสู่รากข้าวของเอนโดไฟติกแบคทีเรีย

การทดสอบการเข้าสู่รากข้าวของไอโซเลต KJHSB- 9 พบว่าหลังจากการใส่แบคทีเรียกับรากข้าว 14 วัน พบว่า เอนโดไฟติกแบคทีเรียเข้าสู่รากข้าวได้

ทั้งข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี โดยมีจำนวนแบคทีเรียเข้าสู่รากข้าวปทุมธานี 1 จำนวน $3.2x10^3$ เซลล์/มล. และเข้าสู่รากข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี จำนวน $4.6x10^3$ เซลล์/มล. ผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าแบคทีเรียที่นำมาศึกษาเป็นเอนโดไฟติกแบคทีเรีย สอดคล้องกับรายงานของ Mano and Morisaki (2008) โดยกล่าวว่า เอนโดไฟติกแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากพืช หรือเข้าไปอาศัยอยู่ในส่วนต่างๆ ของพืชได้ และจากการศึกษาของ Munusamy et al. (2007) ได้ใส่แบคทีเรีย *Burkholderia vietnamensis* ที่มีความเข้มข้นของเซลล์10^8 เซลล์/มล. จำนวน 1 มล. กับข้าว 4 สายพันธุ์ หลังจากใส่แบคทีเรีย 1, 5, 10 และ 15 วัน ทำการแยกแบคทีเรียบริเวณรากข้าว พบแบคทีเรียในรากข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ มีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา โดยพบจำนวนแบคทีเรียมากที่สุดหลังจากทำการใส่แบคทีเรีย 15 วัน จำนวน $1.5x10^8$ - $1.5x10^9$ เซลล์/กรัม โดยน้ำหนักสด

2.2 การทดสอบความสามารถของเอนโดไฟติกแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว

การทดสอบความสามารถของเอนโดไฟติกแบคทีเรียไอโซเลต KJHSB-9 ร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และพันธุ์ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี ปรากฏผลดังนี้

ความสูงของข้าว พบว่าที่ระยะแตกกอและที่ระยะกำเนิดช่อดอก พันธุ์ข้าวมีอิทธิพลทำให้ความสูงที่ระยะดังกล่าวแตกต่างกันทางสถิติ (Table 2) โดยข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรีมีความสูงมากกว่าข้าวปทุมธานี 1 ในขณะที่แหล่งของสารส่งเสริมการเจริญเติบโตไม่มีอิทธิพลอย่างเด่นชัดต่อความสูงของข้าวที่ระยะดังกล่าว สังเกตได้จากข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ไม่ได้รับการใส่ปุ๋ย (ควบคุม) และที่ได้รับสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากแหล่งต่างๆ มีความสูงไม่แตกต่างกัน โดยที่ระยะแตกกอ ข้าวปทุมธานี 1 มีความสูงเฉลี่ย 55.05 ซม. ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรีมีความสูงเฉลี่ย 60.23 ซม. ส่วนที่ระยะกำเนิดช่อดอก ข้าวปทุมธานี 1 มีความสูงเฉลี่ย 87.23 ซม. ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรีมีความสูงเฉลี่ย 93.29 ซม. อย่างไรก็ตามผลของแหล่งของสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชแสดงอิทธิพลให้เห็นอย่างชัดเจนที่ระยะออกดอกและระยะเก็บเกี่ยวโดยพบว่าพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรีมีความสูงไม่แตกต่างกันในทางสถิติแต่ข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ได้รับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสร่วมกับ KJHSB-9 มีความสูงมากกว่าข้าวที่ไม่ได้รับการใส่ปุ๋ย (ควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ได้รับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัส และการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสร่วมกับ KJHSB-9 มีความสูงไม่แตกต่างกันในทางสถิติโดยมีความสูงเฉลี่ย 114.28, 117.89 ซม. ตามลำดับ และข้าวที่ไม่ได้รับการใส่ปุ๋ย (ควบคุม) มีความสูงเฉลี่ย 111.39 ซม. ที่ระยะเก็บเกี่ยว (Table 2)

ส่วนจำนวนหน่อ/กอ พบว่าทั้งพันธุ์ข้าวและแหล่งของสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมีผลทำให้จำนวนหน่อ/กอที่ระยะแตกกอแตกต่างกันทางสถิติ โดยพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 มีจำนวนหน่อ/กอ 5.30 หน่อ มากกว่าข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรีที่มีจำนวน 4.82 หน่อ อย่างมีนัยสำคัญ และข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสร่วมกับ KJHSB-9 มีจำนวนหน่อ/กอ 6.73 หน่อ มากกว่าข้าวที่ไม่ได้รับการใส่ปุ๋ย (ควบคุม) ที่มีจำนวน 4.28 หน่อ และข้าวที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัส 4.17 หน่อ อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แต่ที่ระยะกำเนิดช่อดอกระยะออกดอกและระยะเก็บเกี่ยวนั้นเฉพาะแหล่งของสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเท่านั้นที่มีผลทำให้จำนวนหน่อ/กอ แตกต่างกันทางสถิติ ดังเช่น ที่ระยะกำเนิดช่อดอก พันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรีมีจำนวนหน่อ/กอ ไม่แตกต่างกันในทางสถิติแต่เมื่อข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสร่วมกับ KJHSB-9 มีจำนวนหน่อ/กอ 10.50 หน่อมากกว่าข้าวที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสซึ่งมีจำนวน 9.34 หน่อ และข้าวที่ไม่ได้รับการใส่ปุ๋ย (ควบคุม) 8.11 หน่อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับระยะออกดอกและระยะเก็บ

เกี่ยว พบว่าข้าวปทุมธานี 1 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณ มีจำนวนหน่อ/กอ ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ โดยข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสร่วมกับ KJHSB-9 มีจำนวนหน่อ/กอ มากกว่าข้าวที่ไม่ได้รับการใส่ปุ๋ย (ควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ได้รับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสร่วมกับ KJHSB-9 มีจำนวนหน่อ/กอ ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ โดยระยะเก็บเกี่ยวมีจำนวนหน่อ/กอ เท่ากับ 7.89, 9.67 หน่อ/กอ ตามลำดับและข้าวที่ไม่ได้รับการใส่ปุ๋ย (ควบคุม) มีจำนวนหน่อ/กอ เฉลี่ย 6.78 หน่อ/กอ **(Table 3)**

จำนวนรวง/กอ พบว่าแหล่งของสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวมีอิทธิพลต่อจำนวนรวง/กอ อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นข้าวปทุมธานี 1 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี ที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสร่วมกับ KJHSB-9 มีจำนวนรวง/กอ 8.84 รวง มากกว่าข้าวที่ได้ปุ๋ยรับไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มีจำนวนรวง/กอ 8.62 รวง และข้าวที่ไม่ได้รับการใส่ปุ๋ย (ควบคุม) มีจำนวนรวง/กอ 6.17 รวง **(Table 4)**

ผลผลิตน้ำหนักของเมล็ดข้าวทั้งหมด พบว่าทั้งพันธุ์ข้าวและแหล่งของสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวมีผลทำให้ได้ผลผลิตน้ำหนักเมล็ดข้าวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี มีน้ำหนักเมล็ดข้าวมากกว่าข้าวปทุมธานี 1 อย่างมีนัยสำคัญ และข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสร่วมกับ KJHSB-9 มีน้ำหนักเมล็ดข้าวทั้งหมดมากกว่าข้าวที่ไม่ได้รับการใส่ปุ๋ย (ควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญ และข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ได้รับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัส, ปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสร่วมกับ KJHSB-9 มีน้ำหนักเมล็ดข้าวทั้งหมดไม่แตกต่างกันในทางสถิติ โดยมีน้ำหนักเมล็ดข้าวทั้งหมดเฉลี่ย 31.56, 34.70 กรัม ตามลำดับและข้าวที่ไม่ได้รับการใส่ปุ๋ย (ควบคุม) มีน้ำหนักเมล็ดข้าวทั้งหมดเฉลี่ย 22.81 กรัม **(Table 5)**

จากผลการทดลองเป็นที่สังเกตได้ชัดเจนว่า ตำรับการทดลองที่ใช้ปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสร่วมกับ KJHSB-9 ส่งเสริมการเจริญเติบโตด้านความสูง การแตกกอ จำนวนรวง/กอ และผลผลิต ได้มากกว่าข้าวที่ไม่ได้รับการใส่ปุ๋ย (ควบคุม) **(Table2-5)** ทั้งนี้เนื่องจากเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ช่วยให้รากข้าวแตกแขนงมาก สามารถดูดธาตุอาหารได้มากขึ้นซึ่งส่งผลให้ข้าวมีความสูง จำนวนการแตกกอ และผลผลิตของข้าวเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Riggs, et al. (2001) ซึ่งได้ทำการใส่ *Herbaspirillum seropedicae* กับเมล็ดข้าวโพดที่ปลูกในโรงเรือนทดลอง พบว่าแบคทีเรียที่ใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมี ผลผลิตเพิ่มขึ้น 49-82% ส่วนไม่ใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมีผลผลิตเพิ่มขึ้น 16% ซึ่งเอนโดไฟติกแบคทีเรียอาจเป็นส่วนหนึ่งที่เป็นปัจจัยในการทำให้ปุ๋ยเคมีเป็นประโยชน์มากขึ้น เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Martin, et al. (2002) ซึ่งได้ทำการใส่ *Azospirillum brasilense* กับต้นข้าวสาลี พบว่าต้นข้าวสาลีที่ใส่ *Azospirillum brasilense* ให้ผลผลิตสูงกว่าข้าวสาลีที่ไม่มีการใส่แบคทีเรีย เนื่องจาก *Azospirillum brasilense* จะเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดธาตุอาหารของรากมากขึ้น ส่วน จักรพลและอรรจนา (2554) ได้ศึกษาเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสารคล้าย IAA มาใช้เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของข้าวอินทรีย์ โดยพ่นแบคทีเรียก่อนเพาะเมล็ด และหลังเพาะเมล็ดข้าว 14 และ 28 วัน ที่ปลูกในท่อซีเมนต์ พบว่าต้นข้าวมีการแตกกอสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในสภาพแปลงนาพ่นแบคทีเรียให้กับต้นกล้าข้าวในวันที่ปักดำนา และ 14 วันหลังดำนา พบว่าต้นข้าวเจริญเติบโตได้ดีขึ้นและผลผลิตเพิ่มขึ้น และการศึกษาของชนิกานต์ (2544) ที่ทำการศึกษาใส่ *Azospirillum* sp. CM15 และ *Azospirillum* sp. CM44 ทำให้ข้าวมีความสูง น้ำหนักแห้งของลำต้นและของรากมากที่สุด และแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ยังสามารถเพิ่มจำนวนกอของข้าวที่ปลูกในดินได้อย่างมีนัยสำคัญที่ระยะ 45 และ 75 วัน หลังย้ายปลูก

Table 2 Effect of Nitrogen fertilizer Endophytic Bacteria and Nitrogen fertilizer with Endophytic Bacteria on Shoot length of Rice

Rice growth stage	Rice varieties	Shoot lengh (CM)			
		Treatment			
		C	N+P	N+B+P	Mean
Tillering stage	Pathum Thani 1	55.48	54.87	54.79	55.05b[1/]
	KhaoJow Hawm Suphan Buri	61.93	61.93	56.83	60.23a
	Mean	58.71	58.40	55.81	
F-test : Rice varieties(R) =** , FertilizerSource(F) =ns, RxF= ns, C.V. = 4.72%					
Panicle initiation stage	Pathum Thani 1	83.86	88.59	89.23	87.23b[1/]
	KhaoJow Hawm Suphan Buri	91.53	96.49	91.86	93.29a
	Mean	87.70	92.54	90.54	
F-test : Rice varieties(R) =** , FertilizerSource(F) =ns, RxF= ns, C.V.=4.00 %					
Flowering stage	Pathum Thani 1	97.44	102.78	107.22	102.48
	KhaoJow Hawm Suphan Buri	103.78	104.56	107.89	105.41
	Mean	100.61B[1/]	103.67AB	107.56A	
F-test : Rice varieties(R) =ns , FertilizerSource(F) =* , RxF= ns, C.V. = 3.22%					
Harvest stage	Pathum Thani 1	108.67	113.33	117.89	113.30
	KhaoJow Hawm Suphan Buri	114.11	115.22	117.89	115.74
	Mean	111.39B[1/]	114.28AB	117.89A	
F-test : Rice varieties(R) =ns , FertilizerSource(F) =* , RxF= ns, C.V.=2.74%					

[1/ 2/]Different letters in same column or same rows indicate significant difference by Duncan's Multiple Range Test ($P > 0.05$) ns =not significant, * =significant at $P \leq 0.05$, ** =significant at $P \leq 0.01$

C= Contron N+P = Nitrogen and Phosphorus N+B+P = Nitrogen with Endophytic Bacteria and Phosphorus

Table 3 Effect of Nitrogen fertilizer Endophytic Bacteria and Nitrogen fertilizer with Endophytic Bacteria on Number of tillers of Rice

Rice growth stage	Rice varieties	Number of tillers			
		Treatment			
		C	N+P	N+B+P	Mean
	Pathum Thani 1	4.44	4.56	6.89	5.30a[1/]
Tillering stage	KhaoJow Hawm Suphan Buri	4.11	3.78	6.56	4.82b
	Mean	4.28B[2/]	4.17B	6.73A	
F-test : Rice varieties(R) =* , FertilizerSource(F) =**, RxF= ns , C.V. =8.52 %					
Panicle initiation stage	Pathum Thani 1	8.33	10.00	10.67	9.67
	KhaoJow Hawm Suphan Buri	7.89	8.67	10.33	8.96
	Mean	8.11C[2/]	9.34B	10.50A	
F-test : Rice varieties(R) =* , FertilizerSource(F) =* , RxF= * , C.V. =14.41 %					
Flowering stage	Pathum Thani 1	6.56	8.44	9.56	8.19
	KhaoJow Hawm Suphan Buri	7.00	8.00	10.33	8.44
	Mean	6.78B[1/]	8.22AB	9.95A	
F-test : Rice varieties(R) =ns , FertilizerSource(F) =* ,RxF= ns , C.V. =19.89 %					
Harvest stage	Pathum Thani 1	6.56	8.44	9.56	8.19
	KhaoJow Hawm Suphan Buri	7.00	7.33	9.78	8.04
	Mean	6.78B[1/]	7.89AB	9.67A	
F-test : Rice varieties(R) =ns , FertilizerSource(F) =* ,RxF= ns, C.V. =18.95 %					

[1/ 2/]Different letters in same column or same rows indicate significant difference by Duncan's Multiple Range Test ($P > 0.05$) ns =not significant, * =significant at $P \leq 0.05$, ** =significant at $P \leq 0.01$

C= Contron N+P = Nitrogen and Phosphorus N+B+P = Nitrogen with Endophytic Bacteria and Phosphorus

Table 4 Effect of Nitrogen fertilizer Endophytic Bacteria and Nitrogen fertilizer with Endophytic Bacteria on Number of ears/plant of Rice

Rice varieties	Number of ears/plant			
	Treatment			
	C	N+P	N+B+P	Mean
Pathum Thani 1	6.00	8.56	8.78	7.78
KhaoJow Hawm Suphan Buri	6.33	8.67	8.89	7.96
Mean	6.17B[1/]	8.62B	8.84A	
F-test : Rice varieties(R) =ns , FertilizerSource (F) =** ,RxF= ns, CV 12.81 (%)				

[1/ 2/]Different letters in same column or same rows indicate significant difference by Duncan's Multiple Range Test ($P > 0.05$) ns =not significant, * =significant at $P \leq 0.05$, ** =significant at $P \leq 0.01$

C= Contron N+P = Nitrogen and Phosphorus N+B+P = Nitrogen with Endophytic Bacteria and Phosphorus

Table 5 Effect of Nitrogen fertilizer Endophytic Bacteria and Nitrogen fertilizer with Endophytic Bacteria on yieldof Rice

Rice varieties	Grain weight (g)			
	Treatment			
	C	N+P	N+B+P	Mean
Pathum Thani 1	17.02	30.11	32.04	26.39b[1/]
KhaoJow Hawm Suphan Buri	28.59	33.01	37.35	32.98a
Mean	22.81B[2/]	31.56AB	34.70A	

F-test : Rice varieties(R) =* , FertilizerSource (F) =* ,RxF= ns , CV 22.45 (%)

[1/ 2/]Different letters in same column or same rows indicate significant difference by Duncan's Multiple Range Test (P > 0.05) ns =not significant, * =significant at P ≤ 0.05, ** =significant at P ≤ 0.01

C= Contron N+P = Nitrogen and Phosphorus N+B+P = Nitrogen with Endophytic Bacteria and Phosphorus

สรุป

จากการศึกษาพบว่า เอนโดไฟติกแบคทีเรีย ไอโซเลต KJHSB-9 มีความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช กล่าวคือ สามารถละลายฟอสเฟต ผลิตออกซิน และผลิตจิบเบอเรลลิน ได้ 465.9 ไมโครกรัม/มล., 12.0 ไมโครกรัม/มล., 161.4 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย KJHSB-9 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus safensis* strain FO-036b ที่ระดับความเหมือน 98% และ สามารถเข้าสู่รากข้าวได้ทั้งข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เอนโดไฟติกแบคทีเรีย KJHSB-9 ร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและปุ๋ยฟอสฟอรัส ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว โดยเพิ่มความสูง ปริมาณการแตกกอ จำนวนรวงต่อกอ และผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 5.83%, 42.62%, 43.27% และ 38.42% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่ใส่ปุ๋ย(ควบคุม) และเพิ่มความสูง ปริมาณการแตกกอ จำนวนรวงต่อกอ และผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 3.15%, 22.56%, 2.55% และ 9.94% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.) และศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร (CASAF) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

จักรพล มหากลั่น และอรรจนา ด้วงแพง. 2554. ผลของเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่สร้างสารคล้ายไอเอเอต่อการเจริญเติบโตของข้าวอินทรีย์. ว. วิทย์. กษ. 42(2): 65-68.

ชนิกานต์ คุ้มนก. 2544. แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในข้าวพันธุ์ปลูกและข้าวป่าในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สถาบันวิจัยข้าว. 2547. คำแนะนำการใช้ปุ๋ยเคมีในนาข้าวตามค่าวิเคราะห์ดิน กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

Barraquio, W.L., L. Revilla, and J.K. Ladha. 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. Plant Soil. 194: 15-24.

Baldani, V.L.D., J.I. Baldani, and J. Döbereiner. 2001. Inoculation ofrice plants with the endophytic diazatrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. Biol. Fertil. Soils. 30: 485-491.

de Matos Nogueira, E., F. Vinagre, H.P. Masuda, C. Vargas, V.L.M. de Pádua, F.R. da Silva, R.V. dos Santos, J.I. Baldani, P.C.G. Ferreira, and A.S. Hemerley. 2001. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans.* Genet. Mol. Biol. 24: 199-206.

Feng, Y., D. Shen, and W. Song. 2006. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS 19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. J. Appl. Microbiol. 100: 938-945.

Fernando, L. W. R., P. D. Quadros, F. A. O. Camargo, and E. W. Triplett. 2007. Screening of diazotrophic bacteria Azopirillum spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. J. Microbiol. Biotechnol. 23: 1377-1383.

Gyaneshwar, P., E.K. James, N. Mathan, P.M. Reddy, B. Reinhold-Hurek, and J.K. Ladha. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 183: 2634-2645.

Hesse, P.R. 1971. Total elemental analysis and some trace elements. A test book of soil chemical analysis: 371-475.

Hossain, M. and K.S. Fischer. 1995. Rice research for food security and sustainable agriculturaldevelopment in Asia : Achievements and future challenges. Geo Journal. 35: 286-295.

International Rice Research Institute (IRRI). 1993. Rice in human nutrition. 26: 166 p.

James, E. K., P. Gyaneshwar, N. Manthan, W.L. Barraquio, P.M. Reddy, P.PM. Ianetta, F.L. Olivares, and J.K. Ladha. 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillumseropedicae* Z67. Mol. Plant Microbe Interact. 15: 894-906.

James, E.K., P. Gyaneshwar, W.L. Barraquio, N. Mathan and J. K. Ladha. 2000. Endophyticdiazotrophs associated with rice. pp. 119 -140. In: J.K. Ladha and P.N. Reddy, eds. The quest for nitrogen fixation in rice.IRRI. Makati City. Philippines.

Ladha, J.K., G.J.D. Kirk, S. Bennett, P.M. Reddy, and U. Singh. 1998. Opportunities for increased nitrogen-use efficiency from improved lowland rice germplasm. Field CropsRes. 56: 41-72.

Ladha, J.K. and M.B. Peoples. 1995. Management of biological nitrogen fixation for the development of more productive and sustainable agricultural systems. Plant Soil. 174: 1-286.

Mae, T. and K. Ohira. 1981. The remobilization of nitrogen related to leaf growth and senescence in rice plants (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Physiol. 22: 1067-1074.

Mano, H. and H. Morisaki. 2008. Endophytic bacteria in rice plant. Microbes Environ. 23: 109-117.

Martin, D. E. and B. Reinhold-Hurek. 2002. Distinct roles of PII-like signal transmitter oroteins and amtB in regulation of nif gene expression, nitrogenase activity, and posttranslational modification of NifH in Azoarcus sp. Strain BH72. J. Bacteriol. 184(8): 2251-2259.

Mukhopadhyay, K., N.K. Garrison, D.M. Hinton, C.W. Bacon, G.S. Khush, H.D. Peck, and N. Datta. 1996. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. Mycopathologia. 134: 151-159.

Munusamy, G., J. Balandreau, S.W. Kwon, H.Y. Weon, and C. Lakshminarasimhan. 2007. Effects of the Inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and Related Endophytic Diazotrophic Bacteria on GrainYield of Rice. J. Microbial Ecol. 55: 21-37.

Padgham, J., L. Huong, and R..A. Sikora. 2005. Opportunities for nematode biocontrol in lowland rainfed rice using bacterial endophytes. P. 293. In: Tielkes, E., C. Hülsebusch, I. Häuser, A. Deininger and K. Becker (ed.), The global food and product chain-dynamics, innovations, conflicts, strategies: International research on food security, natural resource management and rural development; book of abstracts/Tropentag 2005 Stuttgart- Hohenheim, Oct. 11-13, 2005. University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.

RavikumarS., K. Kathiresan, T.M. Ignatiammal, M. B. Selvam, and S. Shanthy. 2004. Nitrogen-fixing azotobacters from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers. J. of Exp. Marine Biol.Ecol. 312: 5-17.

Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek. 1998. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study theirfunction. Crit. Rev. Plant Sci. 17: 29-54.

Rennie, R. J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. Can J. Microbiol. 27: 8-14.

Riggs, PJ., MK. Chelius, AL. Iniguez, SM. Karppler, and EW. Triplett. 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. Aust J. plant Physiol. 28: 829-836.

Sajjaphan K., P. Heepngoen, M.J. Sadowsky, and N. Boonkerd. 2010. Arthrobacter sp. Strain KU001 Isolated from a Thai Soil Degrades Atrazine in the Presence of Inorganic Nitrogen Sources. J. Microbiol. Biotechnol. 20(3): 602-608.

Vikram, A., H. Jamzehzarghani, A.R. Alagawadi, P.U. Krishnaraj, and B.S. Chandrashekar. 2007. Production of plant growth promoting substances by phosphate solibilizing bacteria isolated from Vertisols. J. Plant sci. 2: 326-333.

Zakria, M., J. Njoloma, Y. Saeki, and S. Akao. 2007. Colonization and nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp. strain B501 gfp1 and assessment of its growthpromoting ability in cultivated rice. Microbes Environ. 22: 197-206.