



การคัดกรองแบบที่เรียเอนโดไฟต์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช
เพื่อพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์สำหรับการเพาะปลูกสตรอว์เบอร์รี



ดลฤดี บุญญาภิสิทธิ์

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช
เพื่อพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์สำหรับการเพาะปลูกสตรอว์เบอร์รี



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช
เพื่อพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์สำหรับการเพาะปลูกสตรอว์เบอร์รี"
ของ ดลฤดี บุญญาภิสิต
ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มธุรส ชัยหาญ)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จวงจันทร์ จำปาทอง)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภา หอมหวล)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐนิตา บุญสร้างสม)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กวี สุจิตฺติ)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์สำหรับการเพาะปลูกสตรอว์เบอร์รี
ผู้วิจัย	ดลฤดี บุญญาภิสิทธิ์
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จวงจันทร์ จำปาทอง
กรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภา หอมหวล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐนิตา บุญสร้างสม
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร, มหาวิทยาลัย นเรศวร, 2565
คำสำคัญ	แบคทีเรียเอนโดไฟต์, แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช, ฤทธิ์ ต้านเชื้อรา, สารชีวภัณฑ์, สตรอว์เบอร์รี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอว์เบอร์รีที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราบางชนิด จากการศึกษาพบว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากไหลสตรอว์เบอร์รี จำนวน 117 ไอโซเลต มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตเมื่อทดสอบด้วยวิธี Molybdenum-blue method โดยไอโซเลต DB021 มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุดเท่ากับ 234.64 ± 2.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า ไอโซเลต DB041 สามารถผลิต IAA ได้มากที่สุดเท่ากับ 322.10 ± 0.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำน้ำเลี้ยงส่วนใสมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Salkowski's Reagent ในการทดสอบด้วยวิธี dual culture พบว่า ไอโซเลต DB065 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Rhizoctonia solani* 1406 ได้ดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ $42.67 \pm 1.59\%$ ในขณะที่ไอโซเลต DB071 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Fusarium* sp. FB3-3 และ *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 ได้ดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ $43.05 \pm 0.18\%$ และ $54.92 \pm 0.26\%$ ตามลำดับ จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากสารละลายส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว 5 ชนิดด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า ส่วนใสของไอโซเลต DB071 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร T2 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราที่ทดสอบได้ทุกชนิด จากการศึกษาประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในระดับโรงเรือนพบว่า แบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ DB016, DB021 และ DB041 มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รี พบว่าเมื่อเติมแบคทีเรียร่วมกับวัสดุปลูกและปุ๋ยเคมี สามารถ

ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รีได้ดีกว่าชุดควบคุม เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลต ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้ดังนี้ คือ *Bacillus subtilis* DB016, *Bacillus siamensis* DB051 และ DB071, *Microbacterium enclense* DB021, *Pseudomonas aeruginosa* DB065, *Enterobacter quasirogerkampii* DB035, *Enterobacter* sp. DB041 และ DB044 การศึกษานี้เป็นการรายงานในระดับหลอดทดลอง ครั้งแรกของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอว์เบอร์รีที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ไอโซเลตที่มีศักยภาพดีที่สุดจะนำไปทดสอบประสิทธิภาพในระดับแปลงปลูกเพื่อลดความรุนแรงของโรคและช่วยเพิ่มผลผลิตของสตรอว์เบอร์รีตามหลักการการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (GAP)



Title	SCREENING OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIAL ENDOPHYTES AND BIOCONTROL AGENTS FOR STRAWBERRY CULTIVATION
Author	Dolrudee Boonyapisit
Advisor	Assistant Professor Juangjun Jumpathong, Ph.D.
Co-Advisor	Assistant Professor Wipa Homhaul, Ph.D. Assistant Professor Thanita Boonsrangsom, Ph.D.
Academic Paper	M.S. Thesis in Agricultural Biotechnology, Naresuan University, 2022
Keywords	plant growth promoting-bacteria, antifungal activity, biocontrol agents, strawberry, endophytic bacteria

ABSTRACT

The objective of this research was to isolate endophytic bacteria from strawberry runners and to screen for plant growth-promoting properties and antifungal activity. A total of 117 isolates of bacterial endophytes showed soluble phosphate activity when tested by the Molybdenum-blue method. Isolate DB021 had the highest phosphate solubility efficiency at 234.64 ± 2.64 $\mu\text{g/ml}$. Also, isolate DB041 had the highest IAA production of 322.10 ± 0.87 $\mu\text{g/ml}$ when tested with the Salkowski's Reagent. Dual culture assay results revealed that antagonism of DB065 against *Rhizoctonia solani* 1406 showed the highest percentage of inhibition (42.67 ± 1.59). Furthermore, DB071 inhibited growth of *Fusarium* sp. FB3-3 and *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 by $43.05 \pm 0.18\%$ and $54.92 \pm 0.26\%$, respectively. In this study, the cell-free supernatant obtained from five different media were tested against *Rhizoctonia solani* 1406, *Fusarium* sp. FB3-3 and *C. gloeosporioides* DBCS-01. The agar well diffusion assay showed that DB071 cultivated in T2 medium inhibited mycelial growth of the three fungal pathogens. To study the efficacy of endophytic bacteria at the greenhouse level, it was found that three isolates (DB016, DB021 and DB041), were effective in promoting the growth of strawberry plants when mixed with chemical fertilizers. Based on 16S rRNA gene

sequence analysis, eight bacterial isolates were classified as follows: *Bacillus subtilis* DB016, *B. siamensis* DB051 and DB071, *Enterobacter quasiroegenkampii* DB035, *Enterobacter* sp. DB041 and DB044, *Microbacterium enclense* DB021, and *Pseudomonas aeruginosa* DB065. This is the first in vitro study of endophytic bacteria isolated from strawberry runners with the potential to enhance plant growth. The most promising isolates will now be evaluated for their effectiveness at field study to reduce disease and promote strawberry production based on Good Agricultural Practices (GAP).



ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จวงจันทร์ จำปาทอง ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้อุดหนุนให้ค่าตอบแทนค่าเวลาอันมีค่ามาเป็นทีปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการ วิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภา หอมหวล กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐนิตา บุญสร้างสม กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รวมถึงขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มธุรส ชัยหาญ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กวี สัจจุพิไล กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยภายใต้โครงการ “พัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.)” รหัสโครงการ วิจัย “6022093” ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภททุนผู้ช่วยวิจัยระดับปริญญาโทเพื่ออุตสาหกรรมและวิสาหกิจชุมชนท่องเที่ยวเชิงเกษตรเขาคว่ำซึ่งเป็นผู้ร่วมให้ทุน

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ

ดลฤดี บุญญาภิสิทธิ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญภาพ.....	ฒ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	2
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ลักษณะทั่วไปของสตรอว์เบอร์รี.....	4
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสตรอว์เบอร์รี.....	4
การขยายพันธุ์สตรอว์เบอร์รี.....	5
การปลูกและการบำรุงสตรอว์เบอร์รี.....	6
โรคทั่วไปของสตรอว์เบอร์รี.....	6

เอนโดไฟต์	8
การเข้าสู่เซลล์พืชอาศัย	9
ความสัมพันธ์ระหว่างพืช เอนโดไฟต์ และเชื้อสาเหตุโรค	10
บทบาทของแบคทีเรียเอนโดไฟต์.....	11
การผลิตกรดอินโดล-3-แอซีติก	12
ความสามารถในการละลายฟอสเฟตในดิน	14
การผลิตซิเดอโรฟออร์.....	16
ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค.....	17
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	18
<i>Bacillus subtilis</i>	18
<i>Enterobacter</i> sp.	20
<i>Microbacterium</i> sp.....	21
การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	24
กลุ่มตัวอย่าง.....	24
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	24
เครื่องมือ	24
อุปกรณ์.....	25
สารเคมี.....	26
อาหารเลี้ยงเชื้อ	26
วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
1. การแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรีอว์เบอร์รี สายพันธุ์พระราชทาน 80.....	26

2. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง	27
3. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว	27
4. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอสซีติก.....	28
5. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบโดยวิธี dual culture bioassay	29
6. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบโดยวิธี agar well diffusion.....	30
7. การจำแนกชนิด และวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์.....	31
8. การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รีด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในระดับโรงเรือน.....	32
การวิเคราะห์ข้อมูล	33
บทที่ 4 ผลการวิจัย	34
1. การแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอว์เบอร์รี สายพันธุ์พระราชทาน 80	34
2. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง.....	34
3. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว.....	36
4. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการผลิตกรดอินโดล-3-แอสซีติก (IAA)	38

5. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อราทดสอบโดยวิธี dual culture bioassay	40
6. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อราทดสอบโดยวิธี agar well diffusion	42
7. การจำแนกชนิด และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์	45
8. การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รี่ด้วย แบคทีเรียเอนโดไฟต์ในระดับโรงเรือน	54
บทที่ 5 บทสรุป.....	64
สรุปผลการวิจัย.....	64
อภิปรายผลการวิจัย.....	65
ข้อเสนอแนะ	70
บรรณานุกรม.....	71
ภาคผนวก.....	86
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	87
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี.....	89
ภาคผนวก ค การเตรียมกราฟมาตรฐาน.....	91
ภาคผนวก ง การทดสอบในระดับโรงเรือน	95
ภาคผนวก จ ภาพการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตร อว์เบอร์รี่ด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในระดับโรงเรือน	101
ประวัติผู้วิจัย	106

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ค่าดัชนีการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง.....	35
ตาราง 2 ความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว PVK	37
ตาราง 3 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซีติก	38
ตาราง 4 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซีติก (ต่อ).....	39
ตาราง 5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบโดยวิธี dual culture	40
ตาราง 6 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราโดยวิธี agar well diffusion	43
ตาราง 7 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับเบสของยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูล EzBioCloud	46
ตาราง 8 ลักษณะรูปร่างโคโลนี ลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	47
ตาราง 9 ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย <i>Enterobacter</i> sp. DB035.....	48
ตาราง 10 ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย <i>Enterobacter</i> sp. DB041	49
ตาราง 11 ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย <i>Enterobacter</i> sp. DB044	50
ตาราง 12 ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. DB016	51
ตาราง 13 ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. DB051	52
ตาราง 14 ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. DB071	53

ตาราง 15	น้ำหนักสดและแห้งของต้นและรากของสตรอว์เบอร์รี เมื่ออายุครบ 112 วัน...55
ตาราง 16	จำนวนไหลของต้นสตรอว์เบอร์รีของแต่ละกรรมวิธี.....56
ตาราง 17	จำนวนใบของต้นสตรอว์เบอร์รีของแต่ละกรรมวิธี58
ตาราง 18	ความยาวก้านใบของต้นสตรอว์เบอร์รีของแต่ละกรรมวิธีในเวลา 112 วัน.....59
ตาราง 19	ความสูงทรงพุ่มของต้นสตรอว์เบอร์รีของแต่ละกรรมวิธีในเวลา 112 วัน.....60
ตาราง 20	พื้นที่ใบของต้นสตรอว์เบอร์รีของแต่ละกรรมวิธีในเวลา 112 วัน.....61
ตาราง 21	จำนวนดอกของต้นสตรอว์เบอร์รีของแต่ละกรรมวิธีในเวลา 112 วัน63
ตาราง 22	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน IAA.....91
ตาราง 23	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน KH_2PO_493
ตาราง 24	การตรวจนับปริมาณของแบคทีเรีย96
ตาราง 25	ผลการทดสอบการปฏิบัติของเชื้อแบคทีเรีย98
ตาราง 26	ส่วนผสมของวัสดุปลูก.....99

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 ส่วนประกอบของต้นสตรอว์เบอร์รี	5
ภาพ 2 ลักษณะอาการโรคเหี่ยวของสตรอว์เบอร์รี.....	7
ภาพ 3 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลสตรอว์เบอร์รี.....	7
ภาพ 4 ลักษณะอาการของโรครากเน่าคอดิน A) อาการเน่าบริเวณคอราก B) อาการเน่าบริเวณราก และ C) อาการเน่าบริเวณใบ	8
ภาพ 5 สมมติฐานแสดงความสมดุลของกลไกภูมิคุ้มกันระหว่างความรุนแรงของเอนโดไฟต์และการตอบสนองเมื่อพืชสร้างกลไกการป้องกันตนเองซึ่งผลดังกล่าวทำให้การเข้าสู่เซลล์พืชได้โดยที่พืชไม่แสดงอาการผิดปกติ.....	10
ภาพ 6 โครงสร้างโมเลกุลของกรดอินโดล-3-แอซีติก.....	12
ภาพ 7 กลไกการละลายฟอสเฟตในดินโดยจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต.....	15
ภาพ 8 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ <i>Bacillus subtilis</i> ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า.....	19
ภาพ 9 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ <i>Enterobacter</i> sp. ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า.....	21
ภาพ 10 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ <i>Microbacterium enclense</i> ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า.....	22
ภาพ 11 ตำแหน่งการวางเชื้อราและแบคทีเรียทดสอบ.....	30
ภาพ 12 ลักษณะของต้นสตรอว์เบอร์รีที่ทำการเก็บตัวอย่าง.....	34
ภาพ 13 แบคทีเรียที่มีความสามารถในละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium	36

ภาพ 14 TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบเปรียบเทียบกับ IAA มาตรฐาน (ชุดควบคุม).....	39
ภาพ 15 ความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา	41
ภาพ 16 วงใสยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>Rhizoctonia solani</i> 1406 โดยวิธี agar well diffusion	42
ภาพ 17 วงใสยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>Fusarium</i> sp. FB3-3 โดยวิธี agar well diffusion	44
ภาพ 18 วงใสยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> DBCS-01 โดยวิธี agar well diffusion	44
ภาพ 19 กราฟมาตรฐานของ IAA เลี้ยงในอาหาร YM ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร...92	
ภาพ 20 กราฟมาตรฐานของ IAA เลี้ยงในอาหาร YM ที่มีการเติม L-tryptophan ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร.....	92
ภาพ 21 กราฟมาตรฐานของ KH_2PO_4 ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร.....	94
ภาพ 22 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง NA.....	96
ภาพ 23 ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย	97
ภาพ 24 การปฏิบัติของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	98
ภาพ 25 วัสดุปลูก.....	99
ภาพ 26 ขั้นตอนการปลูกไหลสตรอว์เบอร์รี.....	100
ภาพ 27 แบคทีเรียที่ทำการบรรจุลงในขวดยา	100
ภาพ 28 ปุ๋ยสูตรเสมอ 15-15-15	100
ภาพ 29 ต้นสตรอว์เบอร์รี หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 0	101
ภาพ 30 ต้นสตรอว์เบอร์รี หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 14	101

ภาพ 31 ต้นศตวรรษเบอร์รี่ หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 28	102
ภาพ 32 ต้นศตวรรษเบอร์รี่ หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 42	102
ภาพ 33 ต้นศตวรรษเบอร์รี่ หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 56	103
ภาพ 34 ต้นศตวรรษเบอร์รี่ หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 70	103
ภาพ 35 ต้นศตวรรษเบอร์รี่ หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 84	104
ภาพ 36 ต้นศตวรรษเบอร์รี่ หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 98	104
ภาพ 37 ต้นศตวรรษเบอร์รี่ หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 112.....	105



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

จังหวัดเพชรบูรณ์เป็นจังหวัดหนึ่งในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยมีสภาพภูมิประเทศล้อมรอบด้วยภูเขา สภาพภูมิอากาศแตกต่างกันมากในแต่ละฤดูกาล กล่าวคืออากาศมักจะร้อนมากในฤดูร้อน และหนาวเย็นจัดในฤดูหนาว ด้วยสภาพแวดล้อม และภูมิอากาศที่เหมาะสม ทำให้เขาถือเป็นแหล่งเพาะปลูกพืชพันธุ์ต่างๆ และในปัจจุบันรัฐบาลได้มีการส่งเสริมการท่องเที่ยวเชิงเกษตรมากขึ้น มุ่งเน้นการส่งเสริมนโยบายการท่องเที่ยว โดยแบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ 1) เชิงอุตสาหกรรม ซึ่งรูปแบบของการท่องเที่ยวเชิงเกษตรนั้น เป็นการเปิดให้นักท่องเที่ยว เข้ามาชมแปลงปลูก เพื่อสัมผัสวิถีเกษตรกรรม และเก็บผลสตอร์วเบอร์รี่สด 2) เชิงการศึกษาเชิงลึก ได้มีหน่วยงานที่เกี่ยวข้องพยายามส่งเสริมให้มีการผลิตสตอร์วเบอร์รี่ที่ปลอดภัย เพื่อให้ผู้บริโภคนั้นมีสุขภาพที่ดี ตามนโยบาย “พักเขาค้อ 1 คืน อายุยืนไป 1 ปี” มีจุดมุ่งหมายเพื่อกระตุ้นเศรษฐกิจท้องถิ่นโดยใช้พืชพันธุ์ทางการเกษตรที่ปลูกได้ในสภาพพื้นที่สูง ในการปลูกสตอร์วเบอร์รี่เพื่อส่งเสริมการท่องเที่ยวเชิงเกษตรนั้น พบว่าผลผลิตที่ได้ประสบภาวะปัญหาศัตรูพืช ทำให้เกษตรกรผู้เพาะปลูกส่วนใหญ่ใช้สารเคมีฉีดพ่นกำจัดศัตรูพืชเหล่านั้นจนเป็นที่วิตกกังวลว่า การใช้สารเคมีที่ผิดวิธีและมากจนเกินไป อาจก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีต่างๆ และก่อให้เกิดผลเสียต่อผู้บริโภค รวมถึงการสะสมของสารเคมีที่ตกค้างอยู่ในธรรมชาติ จากปัญหาดังกล่าวทำให้งานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์เพื่อช่วยลดปัญหาการใช้ปุ๋ยเคมี และสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม

ในงานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากบริเวณเนื้อเยื่อไหลสตอร์วเบอร์รี่ในพื้นที่บ้านไร่ไอน์สตอร์วเบอร์รี่ ตำบลเขาค้อ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ เพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ เนื่องจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อและรอบรากพืชมีความสัมพันธ์กับพืชในเชิงบวก คือ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช แข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรค ทำให้เกิดความสมดุลและเหมาะสมต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิต (Trevet and Hollis 1948; Reinhold-Hurek and Hurek, 1998) การศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในพืชได้รับการรายงานเพิ่มมากขึ้น (Hallmann and Berg, 2006) โดยมีการรายงานการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากพืชปลูกเกษตรกรรมเชิงเดี่ยว (mono cropping) พบว่าความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต เช่น ตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ ชนิดของพืช ลักษณะพันธุกรรมของพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคในพืช ปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียเอนโดไฟต์และจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช กลไกการปกป้อง

ตัวเองของพืชและวิธีการทำเกษตรกรรม เป็นต้น ด้วยความสำคัญของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการพัฒนาทางด้านเกษตรกรรม โดยเฉพาะการทำเกษตรแบบอินทรีย์ ทำให้มีการศึกษาและรายงานเกี่ยวข้องกับการนำแบคทีเรียเอนโดไฟต์มาใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคในพืช จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจในการนำแบคทีเรียเอนโดไฟต์มาศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบ เช่น แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและมีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตในดิน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้ประโยชน์จากฟอสฟอรัสในดิน และสามารถยับยั้งเชื้อราบางชนิด โดยขั้นตอนสุดท้ายจะเป็นการศึกษาประสิทธิภาพในระดับโรงเรือน ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้จะนำมาใช้พิจารณาเพื่อเป็นแนวทางในการทดสอบในระดับแปลงปลูกต่อไป

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอว์เบอร์รี
2. เพื่อคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสตรอว์เบอร์รี
3. เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราบางชนิด
4. เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสตรอว์เบอร์รี และความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราบางชนิด
5. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในระดับโรงเรือน

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาคูณสมบัติของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และการยับยั้งเชื้อราบางชนิด เพื่อนำมาเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นหัวเชื้อต้นแบบสำหรับการพัฒนาในรูปแบบผลิตภัณฑ์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของสตรอว์เบอร์รี

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทราบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์ที่มีแหล่งอาศัยในท้องถิ่นที่แยกได้จากไหลสตรอว์เบอร์รีที่แข็งแรงในการสร้างสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช
2. เป็นแนวทางในการนำแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้มาช่วยลดการใช้สารเคมี

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. แบคทีเรียเอนโดไฟต์ (Endophytic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่ใช้ชีวิตทั้งหมดหรือบางส่วนอยู่ในเนื้อเยื่อพืช แล้วให้ประโยชน์แก่พืชอาศัยโดยไม่ทำอันตรายหรือก่อให้เกิดโรคแก่พืช
2. แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถช่วยดูดซึมหรือละลายธาตุอาหารต่างๆ ในดินที่ละลายน้ำได้ยาก ให้สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น เพื่อช่วยให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอีกด้วย
3. ปุ๋ยชีวภาพ (Bio-fertilizer) เป็นปุ๋ยที่ได้จากการนำจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ที่สามารถสร้างธาตุอาหารหรือช่วยให้ธาตุอาหารเป็นประโยชน์กับพืชได้ เมื่อใช้คลุกกับเมล็ดพืชและดินหรือต้นพืช จุลินทรีย์จะไปอาศัยอยู่บริเวณรากพืชหรือในต้นพืช
4. การท่องเที่ยวเชิงเกษตร (Green tourism) เป็นการท่องเที่ยวที่มุ่งเน้นทางด้านการเรียนรู้วิถีเกษตรกรรมของชาวชนบท โดยเน้นการมีส่วนร่วมของนักท่องเที่ยวในการดำเนินกิจกรรมให้เกิดการเรียนรู้ด้านการเกษตร และวิถีการดำรงชีวิต วัฒนธรรม ประเพณี และเป็นการนำเอาทรัพยากรที่มีอยู่มาทำให้เกิดประโยชน์ต่อชุมชน และตัวของเกษตรกรเอง

สมมติฐานของการวิจัย

1. ไหลสตรอว์เบอร์รีเป็นแหล่งอาศัยของแบคทีเรียเอนโดไฟต์บางชนิดที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และมีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในสตรอว์เบอร์รีได้
2. แบคทีเรียเอนโดไฟต์บางชนิดที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อทดสอบในระดับโรงเรือนแสดงผลลัพธ์ไปในทิศทางเดียวกัน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

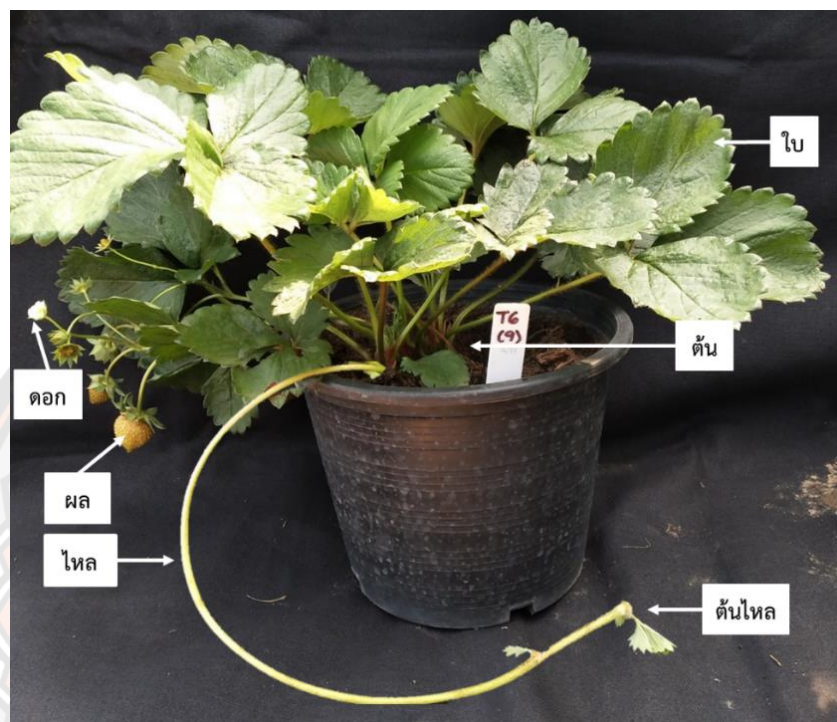
ลักษณะทั่วไปของสตรอว์เบอร์รี

สตรอว์เบอร์รี (*Fragaria × ananassa* Duch.) เป็นลูกผสมตามธรรมชาติของ *Fragaria chiloensis* Duch. และ *Fragaria virginiana* Duch. (Sakila et al., 2007) ซึ่ง อยู่ใน วงศ์ Rosaceae ปัจจุบันสตรอว์เบอร์รีเป็นหนึ่งในผลไม้ที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในโลก (Biswas et al., 2007) สตรอว์เบอร์รีสายพันธุ์พระราชทาน 80 ได้ถูกคัดเลือกครั้งแรกในฤดูกาลผลิตปี พ.ศ. 2545 ที่แปลงทดลองของสถานีวิจัยดอยปุย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ โดยเป็นการนำเมล็ดพันธุ์ลูกผสมจากประเทศญี่ปุ่นเข้ามาเพาะและปลูกทดสอบตามโปรแกรมการผสมพันธุ์ของโครงการวิจัยการผสมพันธุ์และคัดเลือกสตรอว์เบอร์รี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 เป็นต้นมา สตรอว์เบอร์รีพันธุ์ สายพันธุ์พระราชทาน 80 ก็ได้ถูกขยายต้นพันธุ์โดยวิธีผลิตต้นไหลแบบธรรมดา และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลอดโรค เพื่อใช้ปลูกทดสอบในพื้นที่แปลงทดลองของสถานีเกษตรหลวงอ่างขาง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ในปี พ.ศ. 2547 เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลเพิ่มเติมทางด้านการเจริญเติบโต การให้ผลผลิต คุณภาพของผลผลิต และรสชาติ ที่พึงพอใจด้วยการใช้วิธีการสุ่มจากตัวแทนผู้บริโภค ความทนทานต่อศัตรูพืช รวมทั้งการผลิตไหลและต้นไหล สำหรับการขยายต้นพันธุ์ให้แก่เกษตรกร ในปี พ.ศ. 2553 โครงการหลวงได้นำสตรอว์เบอร์รี สายพันธุ์พระราชทาน 80 มาส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเพื่อการค้า เนื่องจากมีลักษณะเด่น คือ ผลสุกมีกลิ่นหอม ผิวผลมีสีแดงสด รสชาติหวาน และรูปร่างของผลสวยงาม และที่สำคัญเป็นพันธุ์ที่นิยมรับประทานสด (ณรงค์ชัย พิพัฒน์ธนวงศ์ และคณะ, 2554)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสตรอว์เบอร์รี

สตรอว์เบอร์รีจัดอยู่ในกลุ่มของพืชล้มลุก แตกกิ่งก้านแผ่ปกคลุมดิน โดยต้นของสตรอว์เบอร์รีประกอบด้วย ราก (Root) คือ ส่วนที่เจริญต่อจากลำต้น และโคนใบ โดยทั่วไปมีรากหลักประมาณ 20-30 ราก ลำต้น (Crown) คือ ส่วนแกนกลางหลักเป็นที่ยึดเกาะของก้านใบ ดอก และผล ไหล (Runner หรือ Stolon) คือ ส่วนที่เจริญเติบโตมาจากต้นแม่ของสตรอว์เบอร์รี สามารถผลิตเส้นไหลได้ประมาณ 10-15 เส้นต่อหนึ่งต้น ต้นไหล (Runner plant หรือ Daughter plant) คือ ต้นอ่อนของต้นสตรอว์เบอร์รีที่เกิดขึ้นใหม่จากไหลเจริญเติบโตจนมีใบและราก ใบ (Leaf) มีรูปร่างทรงรีเว้า ขอบใบหยัก มีความกว้าง 6.5-8.0 เซนติเมตร และความยาว 8.5-9.0 เซนติเมตร มีจำนวนใบมากกว่า 25 ใบต่อต้น ดอก (Flower) มีกลีบดอกสีขาว มีทั้งดอกตัวผู้ ดอกตัวเมีย และดอกสมบูรณ์เพศ มีจำนวนช่อดอกเฉลี่ย 8 ช่อต่อต้น ผล (Fruit) มีรูปร่างเป็นทรงกรวยถึงทรงกลมปลายแหลม

และเมล็ด (Seed) คือ ส่วนที่สามารถนำไปเพาะพันธุ์ได้ มีเปลือกแข็งห่อหุ้มรังไข่ เป็นส่วนฐานของเกสรตัวเมีย อยู่เสมอกับผิวของผลไม่จมหรือนูนเกินผิวของผล (สุรางคนา ไม้ตราวัฒนา, 2557; มนตรี แสนสุข, 2559) (ภาพ 1)



ภาพ 1 ส่วนประกอบของต้นสตรอว์เบอร์รี

ที่มา: ดลฤดี บุญญาภิสิทธิ์, 2565

การขยายพันธุ์สตรอว์เบอร์รี

สตรอว์เบอร์รีมีลักษณะพิเศษกว่าพืชชนิดอื่น คือ สามารถขยายพันธุ์ได้ 4 วิธี ได้แก่ 1) การเพาะเมล็ด 2) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3) การแยกต้น 4) การใช้ต้นไหล สำหรับการปลูกโดยใช้ต้นไหลนั้นเหมาะสำหรับการขยายพันธุ์เพื่อการค้า เนื่องจากประหยัดต้นทุน และมีโอกาสกลายพันธุ์น้อย ช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการปลูก คือ ช่วงฤดูหนาวที่มีช่วงแสงต่อวันสั้น และมีอุณหภูมิต่ำ การปลูกโดยใช้ต้นไหล คือ ช่วงเดือนกันยายน-ตุลาคม สำหรับการปลูกในช่วงเวลาอื่นเป็นการปลูกพืชสร้างต้นแม่พันธุ์เพื่อผลิตไหลในการปลูกรุ่นต่อไป ระยะห่างในการปลูก ระยะห่างระหว่างต้น 25-30 เซนติเมตร และระยะปลูกระหว่างแถว 30-40 เซนติเมตร (สุรางคนา ไม้ตราวัฒนา, 2557; คงกฤษ อินทแสน, 2558)

การปลูกและการบำรุงสตอร์วเบอร์รี่

เนื่องจากการปลูกสตอร์วเบอร์รี่ต้องอาศัยการดูแลเอาใจใส่เป็นพิเศษ มีทั้งการบำรุงเพื่อให้ต้นมีความแข็งแรง โดยการบำรุงนั้นต้องดูที่ระยะการเจริญเติบโต ซึ่งมีหลายปัจจัยในการดูแล ได้แก่ สภาพอากาศ ระยะการปลูก ปริมาณน้ำ และการให้ปุ๋ยมีความสำคัญต่อพืชมาก เมื่อทำการปลูกสตอร์วเบอร์รี่เสร็จให้รดน้ำทันที ในช่วง 14 วัน หลังจากการย้ายปลูกให้รดน้ำทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ในช่วง 60 วัน เป็นระยะที่เริ่มมีช่อดอก ให้รดน้ำวันละ 2 ครั้ง ช่วงเช้าและเย็น เพราะหากขาดน้ำในช่วงนี้จะทำให้ผลผลิตลดลง ในช่วง 90 วัน เป็นระยะเกิดผล ให้รดน้ำ 3-4 ครั้งต่อสัปดาห์ และในช่วง 120 วัน เป็นระยะที่เริ่มเก็บผลผลิตในชุดที่ 1 และเริ่มมีช่อดอกในชุดต่อไปทยอยออกมาเรื่อยๆ ให้รดน้ำวันละ 2 ครั้ง ในส่วนของการให้ปุ๋ย หลังจากย้ายปลูก 7-15 วัน ให้ปุ๋ยสูตร 46-0-0 โดยละลายในน้ำอัตราส่วน 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หลังจากย้าย 21 วัน ให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ในอัตรา 5-10 กรัมต่อต้น เมื่อย้ายปลูกครบ 30 วัน ให้ปุ๋ยสูตร 12-24-12 ในอัตรา 10-12 กรัมต่อต้น และช่วง 45 วัน ให้ปุ๋ย 13-13-21 ในอัตรา 10 กรัมต่อต้น และฉีดปุ๋ยเกล็ดสูตร 10-20-30 เสริม หลังจากเก็บเกี่ยวผลผลิตชุดแรกให้ฉีดปุ๋ยเกล็ดสูตร 11-45-11 เพื่อกระตุ้นดอกชุดที่สอง และควรฉีดพ่นธาตุอาหารเสริม ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม และโบรอน เป็นต้น อย่างน้อยเดือนละ 1 ครั้ง ตลอดช่วงการปลูก (สุรางคนา ไม้ตราวัฒนา, 2557; คงฤช อินทแสน, 2558)

โรคทั่วไปของสตอร์วเบอร์รี่

เนื่องจากการปลูกสตอร์วเบอร์รี่นั้นอยู่ในช่วงของปลายฤดูฝนซึ่งมีความชื้นในอากาศสูงทำให้เกิดการระบาดของโรคได้ง่าย โดยโรคที่พบในสตอร์วเบอร์รี่ส่วนใหญ่มีสาเหตุเกิดมาจากเชื้อรา ในการระบาดของโรคสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของต้น สาเหตุการเกิดโรคระบาดนั้นมีหลายปัจจัย ได้แก่ ต้นสตอร์วเบอร์รี่ที่เกิดโรค แมลงต่างๆ ที่เป็นพาหะ และสภาพแวดล้อม (ณรงค์ชัย พิพัฒน์ธนวศ์, 2554) โรคที่สำคัญของสตอร์วเบอร์รี่มีดังนี้

1) โรคเหี่ยว

สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp. ลักษณะอาการของต้นสตอร์วเบอร์รี่เมื่อได้รับเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยว ต้นจะเริ่มเหี่ยว ใบเปลี่ยนจากเขียวเป็น สีน้ำตาลแห้ง เนื้อเยื่อพืชจะมีสีน้ำตาลเข้ม และตายอย่างรวดเร็ว (Koike and Bolda, 2013) (ภาพ 2) วิธีการป้องกันและรักษาให้หมั่นสำรวจแปลงอย่างสม่ำเสมอ ปรับพื้นที่ปลูกให้มีการระบายน้ำที่ดี ควรหลีกเลี่ยงการปลูกซ้ำในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคติดต่อกันหลายปี และก่อนปลูกในแปลงใหม่ให้รองกันหลุมด้วยปุ๋ยอินทรีย์ที่ผสมจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. และ *Bacillus subtilis* ประมาณ 1-2 กำมือ (คลินิกพืช กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืช และปัจจัยการผลิต สำนักวิจัย และพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1, 2562)



ภาพ 2 ลักษณะอาการโรคเหี่ยวของสตรอว์เบอร์รี

ที่มา: Koike and Bolda, 2013

2) โรคแอนแทรคโนส

สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ลักษณะอาการเมื่อต้นสตรอว์เบอร์รีได้รับเชื้อราสาเหตุโรคเกิดเป็นจุดแผลฝักเล็กเข้าทำลายเนื้อเยื่อจนแห้งเป็นสีน้ำตาลดำ เมื่อเกิดบริเวณลำต้นจะมีอาการเหี่ยวและเน่า ถ้าเกิดที่ต้นแม่พันธุ์จะติดต่อไปยังต้นไหลที่ยังไม่เกิดราก ทำให้ต้นไหลอ่อนแอ ถ้าเกิดบริเวณผลจะมีแผลกลม สีน้ำตาลดำและเนื้อผลยุบลงทำให้ผลเน่าเป็นสีดำ (Freeman and Katan, 1997) (ภาพ 3) วิธีการป้องกันและดูแลรักษาควรใช้ดินและวัสดุปลูกที่สะอาด ใช้ต้นแม่พันธุ์สตรอว์เบอร์รี และต้นไหลที่ปลอดโรค ให้หมั่นตรวจแปลงอย่างสม่ำเสมอ หากพบอาการควรใช้แอนทราโคล (Antracol[®]) เป็นสารป้องกันและกำจัดโรคพืช สลับกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราบาวิสติน (Bavistin[®]) และงดให้ปุ๋ยไนโตรเจน (สุรางคนา ไม้ตราวัฒนา, 2557)



ภาพ 3 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลสตรอว์เบอร์รี

ที่มา: ดลฤดี บุญญาภิสิทธิ์, 2565

3) โรคเน่าคอดิน

สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ลักษณะอาการจะมีการเหี่ยวบริเวณโคนต้น เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชตาย ในกรณีที่ได้รับเชื้ออย่างรุนแรงสามารถทำให้ต้นตายได้ (Sharon et al., 2007) และสามารถแพร่เชื้อจากต้นแม่พันธุ์ไปยังต้นไหลได้ (Maas, 1984) (ภาพ 4) วิธีการป้องกันและดูแลรักษา ให้พ่นหรือรดน้ำปุ๋ยไนโตรเจนในแปลงกล้าก่อนการย้ายปลูกลงและทุก 7 วัน ในแปลงปลูกลง จนกว่าจะเก็บผลผลิต ก่อนการปลูกลงให้รองก้นหลุมด้วยปุ๋ยหมักที่ผสมด้วยเชื้อปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. และ *Bacillus subtilis* 1-2 กำมือ สำรองแปลงอย่างสม่ำเสมอ เมื่อพบต้นที่แสดงอาการเหี่ยวหรือเน่าให้ทำการถอนและขุดดินพร้อมต้นเน่าหรือเหี่ยว และพ่นด้วยสารเคมีเพื่อหยุดการระบาด เช่น สารเมทาแลกซิล (Metalaxyl®) สารป้องกันและกำจัดโรคพืช (คลินิกพืช กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืช และปัจจัยการผลิต สำนักวิจัย และพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1, 2562)



ภาพ 4 ลักษณะอาการของโรครากเน่าคอดิน A) อาการเน่าบริเวณคอราก B) อาการเน่าบริเวณราก และ C) อาการเน่าบริเวณใบ

ที่มา: Vojvodić et al., 2018

เอนโดไฟต์

เอนโดไฟต์ หมายถึง “การอยู่หรือปรากฏในพืช” เป็นคำที่ใช้นิยามถึง การอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิตกับพืชเป็นแหล่งอาศัย (Host) ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวมีหลายลักษณะ เช่น การอยู่ร่วมกันแบบเอื้อประโยชน์ซึ่งกันของสิ่งมีชีวิตสองชนิด (Symbiosis) ซึ่งสิ่งมีชีวิตนั้นมีบทบาทแตกต่างกัน เช่น การทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายในธรรมชาติ (Saprobic) การเป็นปรสิต (Parasitic) หรือบางครั้งรวมถึงการอยู่แบบภาวะพึ่งพิงกัน (Mutualistic relationship) เป็นต้น จากการศึกษาเกี่ยวกับเอนโดไฟต์พบว่า จุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา แอคติโนมัยซีต สามารถอาศัยอยู่ในบริเวณต่างๆ ของชิ้นส่วนพืชได้ และสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ มีความสัมพันธ์ต่อพืชอาศัยทางใดทางหนึ่งตามที่ได้กล่าวมา โดยในปี 2005 Schulz and Boyle ได้อธิบายว่า เชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟต์นั้นอาศัยอยู่ในพืชโดยที่

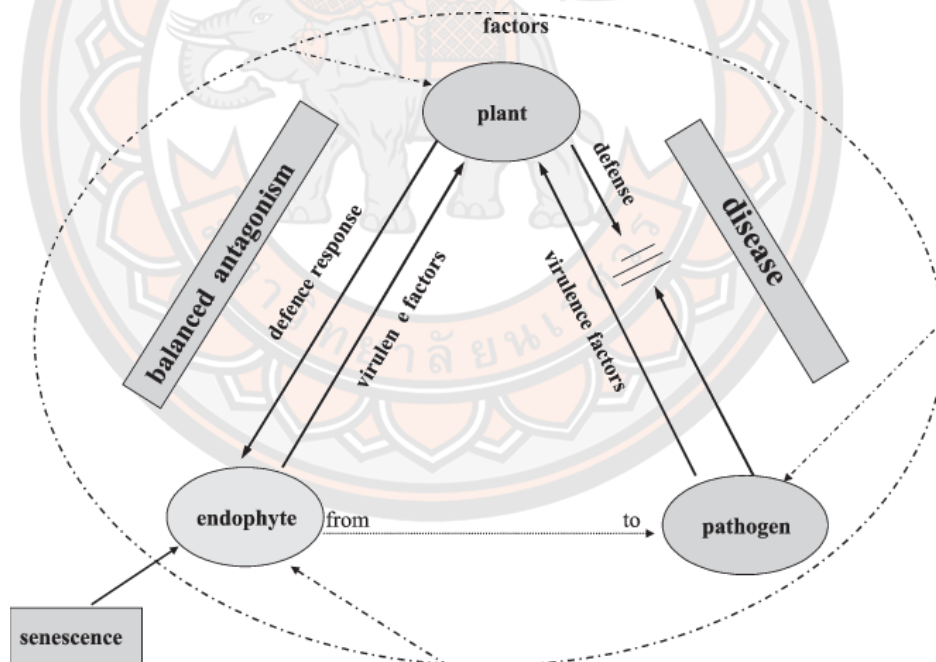
สภาพของพืชนั้นแข็งแรงสมบูรณ์ ในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง ดังนั้นการเข้าอยู่อาศัยภายในเซลล์พืชนั้นขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยและสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ นักวิทยาศาสตร์จึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวเพื่อนำเอนโดไฟต์มาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรและเทคโนโลยีชีวภาพ แบคทีเรียเอนโดไฟต์ได้มีการศึกษาตีพิมพ์เผยแพร่เป็นครั้งแรกในช่วงปี 1870 และได้รับการศึกษาทบทวนอีกครั้งในปี ค.ศ. 1948 โดย Trevet and Hollis ในการรายงานการศึกษานั้นระบุว่าแบคทีเรียอาศัยอยู่ในรากต้นมันฝรั่งซึ่งความสัมพันธ์นั้นไม่ได้เกี่ยวข้องกับการอยู่ร่วมกันแบบเอื้อประโยชน์ซึ่งกันของสิ่งมีชีวิตสองชนิด หลังจากนั้นได้มีการศึกษาเกี่ยวกับชนิด และความหลากหลายของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในพืชชนิดอื่นๆ อีกมากมาย โดยมุ่งเน้นศึกษากลุ่มของแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำให้พืชสร้างกลไกการป้องกันตัวเองจากปัจจัยที่มีชีวิต (Biotic factor) และไม่มีชีวิต (Abiotic factor) (Hallmann and Berg, 2006)

การเข้าสู่เซลล์พืชอาศัย

การเข้าสู่เซลล์พืชอาศัยของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ เนื่องจากสารที่พืชอาศัยปลดปล่อยออกมา แบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถนำมาใช้เป็นสารอาหารได้ โดยวิธีการเข้าสู่เซลล์พืชอาศัยของแบคทีเรียเอนโดไฟต์มีทั้งหมด 3 วิธี ได้แก่ 1) การเกิดจากบาดแผลของเนื้อเยื่อพืชบริเวณนั้น 2) การผลิตเอนไซม์ที่ช่วยให้แบคทีเรียเข้าสู่ผนังเซลล์พืชได้ 3) การอาศัยพาหะ เช่น แมลง ซึ่งในระยะแรกของการเข้าอาศัยในพืชแบคทีเรียเจริญเติบโตโดยใช้เศษชิ้นส่วน (Plant debris) และเซลล์ในชั้นที่ตายแล้ว (Dead cortex cells) ซึ่งแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่พบนั้นมีหลากหลายสายพันธุ์ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ฤดูกาลและสภาพแวดล้อมของแหล่งอาศัย เป็นต้น เมื่อมีการเข้าสู่เซลล์รากพืชในระยะแรกแบคทีเรียจะเข้าอาศัยอยู่ระหว่างเซลล์แล้วเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ ภายในเซลล์ จากนั้นจึงเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณเนื้อเยื่อของท่อลำเลียง (Hurek et al., 1994; Hallmann et al., 1997; Kobayashi and Palumbo, 2000) นอกจากนี้ แบคทีเรียบางชนิดอาศัยโครงสร้างแฟลกเจลลา (Flagella) ในการเคลื่อนที่ไปยังบริเวณต่างๆ เพื่อเข้าสู่เซลล์ (Campodónico et al., 2010; Mukherjee and Kearns, 2014; Ludueña et al., 2018) การดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับพืชอาศัยนั้น มีการพิสูจน์แล้วว่าแบคทีเรียสามารถกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำพืชให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อโรคที่เข้ามาทำลาย และสามารถเจริญอยู่ได้ในสภาวะอากาศที่ไม่เหมาะสม แบคทีเรียเอนโดไฟต์หลายชนิด สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดย 1) การตรึงไนโตรเจน 2) การสร้างสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น ฮอโมนพืช และ 3) การผลิตสารเมแทบอลิต์ และกลไกปฏิบัติต่อจุลินทรีย์สาเหตุโรคและปรสิตต่างๆ (Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Jasim et al., 2014; Jabborova et al., 2020)

ความสัมพันธ์ระหว่างพืช เอนโดไฟต์ และเชื้อสาเหตุโรค

ในการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียเอนโดไฟต์พบว่า แบคทีเรียเข้าไปอยู่ในพืชโดยไม่ทำให้เกิดอาการของโรค โดยกลไกการเข้าสู่เซลล์พืชนั้นมีความซับซ้อนอย่างมากเนื่องจากแบคทีเรียต้องฝ่าฟันอุปสรรคจากการที่พืชสร้างกลไกเพื่อปกป้องตัวเอง อย่างไรก็ตาม นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการตั้งสมมติฐานซึ่งเกิดจากการรวบรวมผลการศึกษาและการเก็บข้อมูลพบว่า การเข้าสู่เซลล์พืชโดยที่พืชไม่ปรากฏอาการใดๆ นั้นเกิดขึ้นจากความสมดุลของกลไกภูมิคุ้มกันระหว่างพืชอาศัยและเอนโดไฟต์ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงพบได้เหมือนกันทั้งในเชื้อสาเหตุโรคและเอนโดไฟต์ กล่าวคือแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์เพื่อช่วยในการเข้าสู่เซลล์พืช ดังนั้นพืชจึงตอบสนองโดยการสร้างกลไกการป้องกันเช่นเดียวกันกับการต่อต้านเชื้อสาเหตุโรค ความสัมพันธ์ในเชิงภูมิคุ้มกันที่สมดุลเป็นการแสดงออกที่พืช และเอนโดไฟต์สร้างขึ้นมาในช่วงเวลาขณะใดขณะหนึ่ง ซึ่งมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม คือ ปัจจัยที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต รวมถึงความทนทานของสิ่งมีชีวิตทั้งสองต่อปัจจัยเหล่านี้ สมมติฐานดังกล่าวแสดงได้ดังภาพ 5



ภาพ 5 สมมติฐานแสดงความสมดุลของกลไกภูมิคุ้มกันระหว่างความรุนแรงของเอนโดไฟต์และการตอบสนองเมื่อพืชสร้างกลไกการป้องกันตนเองซึ่งผลดังกล่าวทำให้การเข้าสู่เซลล์พืชได้โดยที่พืชไม่แสดงอาการผิดปกติ

ที่มา: Schulz and Boyle, 2005

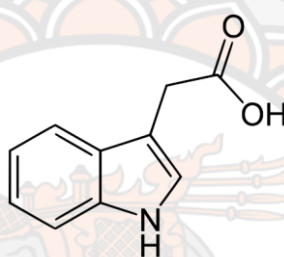
บทบาทของแบคทีเรียเอนโดไฟต์

แบคทีเรียเอนโดไฟต์มีความสำคัญต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย รวมถึงระบบนิเวศที่แตกต่างกัน นอกจากบทบาทดังกล่าวแล้ว เอนโดไฟต์ยังช่วยกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น การรุกรานจากเชื้อโรคและศัตรูพืชชนิดอื่นๆ ถึงแม้ว่าเอนโดไฟต์นั้นมีบทบาทในการควบคุมโรคพืชด้วยกลไกภูมิคุ้มกัน ทว่า การศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านั้นมีความจำเป็นต้องได้รับการศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์ทั้งในทางการเกษตร การแพทย์ และเภสัชกรรม ปัจจุบันสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเอนโดไฟต์ที่เป็นที่รู้จัก ได้แก่ ฮอริโมนพืชกลุ่มต่างๆ เอนไซม์ ชิเตอร์โรฟอรัส และสารปฏิชีวนะ รวมทั้งสารที่มีโมเลกุลต่ำ เป็นต้น ได้มีการรายงานถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจำนวนมาก ได้แก่ การผลิตสาร IAA การละลายฟอสเฟต การตรึงไนโตรเจน และสารในกลุ่มของยาปฏิชีวนะ (Jasim et al., 2013; Khan et al., 2014; Afzal et al., 2017) จากการทบทวนวรรณกรรมโดย Suman et al. (2016) แสดงให้เห็นถึงการให้ประโยชน์จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตสาร IAA การละลายฟอสเฟต และยังสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้โดยพบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีการรายงานส่วนใหญ่จัดอยู่ในจีโนส *Enterobacter* sp. (Tahir et al., 2013), *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Microbacterium* sp., และ *Penibacillus* sp. (Ji et al., 2014) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้

1. แบคทีเรียที่สามารถผลิตฮอริโมนพืชกลุ่มต่างๆ เช่น ออกซิน (Auxins), ไซโทไคนิน (Cytokinins), จิบเบอเรลลิน (Gibberellins), เอทิลีน (Ethylene) และกรดแอบไซซิก (Abscisic acids; ABA) (Frankenberger and Arshad, 1995)
2. แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แล้วถูกขับออกมาภายนอกเซลล์เมื่อทำปฏิกิริยากับสารอาหาร ทำให้สารอาหารมีโมเลกุลเล็กลงจนสามารถซึมเข้าสู่เซลล์ได้ (Extracellular enzyme) ได้แก่ *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus* และ *Micrococcus* (El-Deeb et al., 2012)
3. แบคทีเรียที่สามารถผลิตชิเตอร์โรฟอรัสได้มีหลายจีโนส เช่น *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* และ *Streptomyces* (Sujatha and Ammani, 2013)
4. แบคทีเรียที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น สารในกลุ่มเพปไทด์โดย *Bacillus* (Harrison et al., 1991) และ *Pseudomonas* ในบางสายพันธุ์ (Miller et al., 1998)

การผลิตกรดอินโดล-3-แอซีติก

กรดอินโดล-3-แอซีติก (Indole-3-acetic acid; IAA) เป็นอนุพันธ์ของ indole ที่มีหมู่ carboxymethyl group (ภาพ 6) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Regulating Chemicals; PGRC) ที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซินซึ่งมีสารหลายชนิด ชนิดแรกที่ค้นพบ คือ IAA ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเองโดยมีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นการเจริญรากและทำให้ต้นอ่อนเจริญได้ดี (Santoyo et al., 2016) ทั้งนี้แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถผลิต IAA โดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน (Spaepen and Vanderleyden, 2011; Ludueña et al., 2018) ซึ่งมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (พีรเดช ทองอำไพ, 2529; พันทวี มาไพโรจน์, 2532)



ภาพ 6 โครงสร้างโมเลกุลของกรดอินโดล-3-แอซีติก

ที่มา: Han et al., 2018

กลไกการสังเคราะห์กรดอินโดล-3-แอซีติกของจุลินทรีย์

Spaepen and Vanderleyden (2011) ได้สรุปไว้ว่า แบคทีเรียที่แยกจากพืชประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิต IAA ได้ โดยสารตั้งต้นที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ IAA คือ ทริปโตเฟน (Tryptophan) ดังนั้นการเพิ่ม Tryptophan ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงส่งผลทำให้เชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิต IAA ได้สูงขึ้น ในการสังเคราะห์ Tryptophan สารประกอบตั้งต้น คือ คลอริสเมต (Chorismate) ถูกควบคุมโดยยีน Trp สังเคราะห์จากฟอสโฟอินอลไพรูเวต (Phosphoenolpyruvate) และอิริโทส-4-ฟอสเฟต (Erythrose-4-phosphate) ในชีววิถีชิคิเมต (Shikimate) ซึ่งเป็นชีววิถีทั่วไปในชีวสังเคราะห์ของกลุ่มที่มีหมู่ R เป็นสารประกอบอะโรมาติก (Aromatic) เรียกว่า Aromatic amino acid ได้แก่ ฟีนิลอะลานิน (Phenylalanine), ไทโรซีน (Tyrosine), ทริปโตเฟน (Tryptophan) และสารทุติยภูมิอีกหลายชนิด ขั้นตอนสุดท้ายได้ Tryptophan เป็นสารตั้งต้นในวิถีการสังเคราะห์ IAA ต่อไป ด้วยวิถีที่แตกต่างกัน การสังเคราะห์ IAA โดยใช้ Tryptophan เป็นสารตั้งต้นมีทั้งหมด 5 วิธี ดังนี้ 1) วิถี Indole-3-acetamide (IAM) การสังเคราะห์ IAM ซึ่งจากยีนที่สร้างเอนไซม์ทั้งสองนั้นเป็นลักษณะของยีนที่อยู่ในแบคทีเรียก่อโรคในพืช เช่น *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae*

และ *Pantoea agglomerans* เป็นต้น 2) วิถี Indole-3 pyruvate (IPA) การสังเคราะห์ IPA มีแบคทีเรียบางกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อพืชซึ่งมีความสามารถในการสังเคราะห์ IPA ได้ด้วย เช่น *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobiums*, *Cyanobacteria*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* และ *Rhizobium* เป็นต้น 3) วิถี Tryptamine (TAM) การสังเคราะห์วิถี TAM ได้ในแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus cereus* และ *Azospirillum* เป็นต้น 4) วิถี Indole-3-acetonitrile (IAN) การสังเคราะห์วิถี IAN พบได้ใน *Agrobacterium* และ *Rhizobium* spp. 5) วิถี Tryptophan side-chain oxidase (TSO) การสังเคราะห์วิถี TSO พบได้ใน *Pseudomonas fluorescens* stain CHA0 (Spaepen and Vanderleyden, 2011)

การใช้จุลินทรีย์ผลิตกรดอินโดล-3-แอซีติก

ในปี ค.ศ. 2007 Spaepen et al. พบว่า แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชบางชนิดสามารถสังเคราะห์ IAA และส่งออกมานอกเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้พืชเจ้าบ้านสามารถนำ IAA ไปใช้ในการช่วยการเจริญเติบโตได้ ในการสังเคราะห์ IAA ต้องมีกรดอะมิโนทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ ซึ่งมีแบคทีเรียหลายชนิดที่มีการรายงานว่า สามารถผลิต IAA ได้ เช่น *Acetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* และ *Xanthomonas* (Ahmad et al., 2008; Taghavi et al., 2009) เป็นต้น การศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชมีการรายงานจำนวนมาก เช่น ข้าว และพืชทรงพุ่มที่เจริญในเขตร้อนและแห้งแล้ง (Ji et al., 2014; Afzal et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากส่วนขยายพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเชอร์รี่ป่า (*Prunus avium* L.) ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชอร์รี่ป่า (Quambusch et al., 2014) สำหรับผลจากการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากส่วนขยายพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสตอร์วเบอร์รี่ในการผลิต IAA พบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 15 สายพันธุ์ที่สามารถผลิต IAA ได้ (Dias et al., 2009) และ Mohite (2013) ได้ทำการแยกเชื้อจากดินรอบรากพืชและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต IAA พบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้ นอกจากนี้ มีการรายงานของ Fouda et al. (2021) ที่ทำการศึกษาการแยกและคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากพุลคาเรีย (*Pulicaria incisa* (Lam.) DC) พบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้ทั้งหมดจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Agrobacterium fabrum*, *Acinetobacter radioresistant*, *Brevibacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus barengoltzii* และ *Burkholderia cepacia* โดย *B. cereus* BI-8 และ *B. subtilis* BI-10 มีความสามารถในการผลิต IAA ได้สูงมีค่าเท่ากับ 117 และ 108 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ความสามารถในการละลายฟอสเฟตในดิน

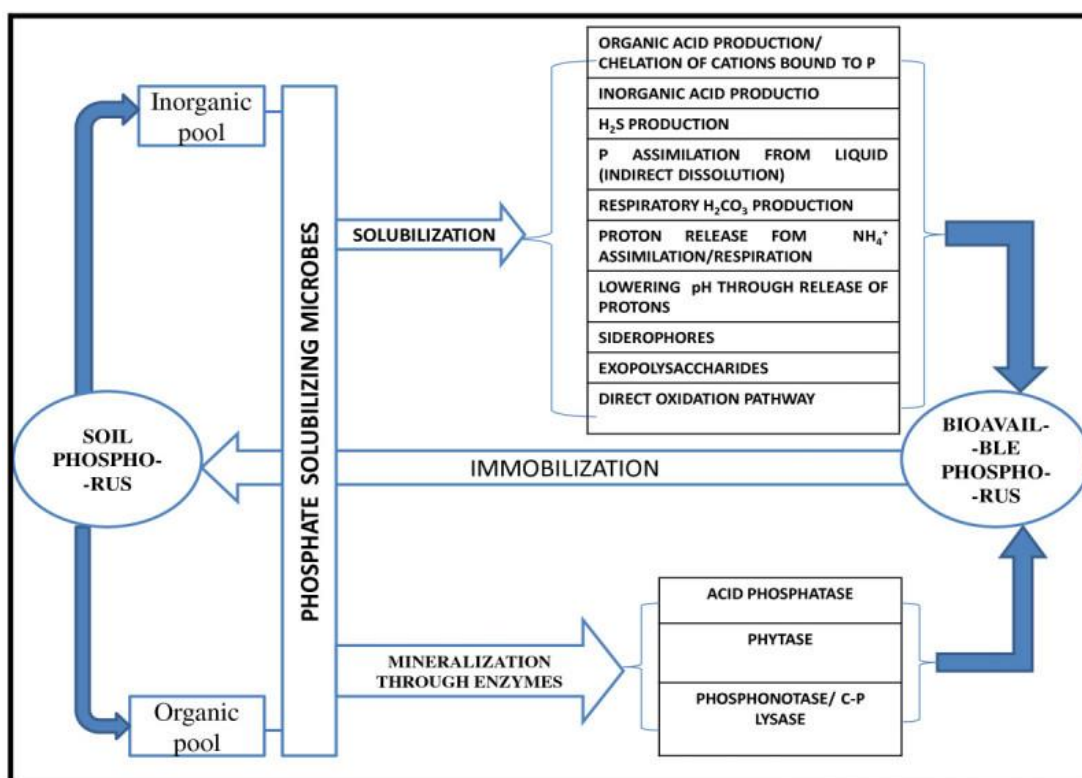
ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของรากพืช โดยธาตุฟอสฟอรัส จะช่วยให้รากของพืชแข็งแรง และแผ่กระจายได้รวดเร็วขึ้น ฟอสฟอรัสในดินที่จะเป็นประโยชน์ต่อพืช ได้ ต้องอยู่ในรูปของสารประกอบที่เรียกว่า ฟอสเฟตไอออน ($H_2PO_4^-$ และ HPO_4^{2-}) ซึ่งจะต้องละลาย อยู่ในน้ำในดิน สารประกอบของฟอสฟอรัสในดินมีอยู่เป็นจำนวนมากแต่ส่วนใหญ่ละลายน้ำยาก เป็น ธาตุที่ไม่ค่อยเคลื่อนที่ในดิน ซึ่งทำให้พืชนำไปใช้ได้ยาก เมื่อพืชขาดฟอสฟอรัสทำให้ต้นแคระแกร็น ใบ มีสีเขียวคล้ำ ใบด้านล่างมีสีม่วงตามบริเวณขอบใบ รากของพืชชะงักการเจริญเติบโต ทำให้พืชไม่ออก ดอกและผล จึงได้มีการแก้ปัญหาดินขาดฟอสฟอรัสโดยการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์เข้ามาช่วยใน การละลายฟอสเฟต (Yadav and Dadarwal., 1997) โดยฟอสฟอรัสในดิน สามารถแบ่งตาม องค์ประกอบทางเคมีได้เป็น 2 แบบ คือ 1) อินทรีย์ฟอสเฟต (Organic phosphate) ซึ่งในดินมี อินทรีย์ฟอสฟอรัสอยู่ระหว่าง 20-80 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ส่วนมากอยู่ในรูป ของอินโนซิทอลฟอสเฟต (Inositol phosphate) มีประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ ของอินทรีย์ ฟอสฟอรัส และ 2) อนินทรีย์ฟอสเฟต (Inorganic phosphate) แบ่งออกเป็น 2 แบบ 1) ดินกรด ได้แก่ ธาตุเหล็ก (Iron) และอะลูมิเนียมฟอสเฟต (Aluminium phosphate) และ 2) ดินด่าง ได้แก่ แคลเซียมฟอสเฟต (Calcium phosphate) และแมกนีเซียมฟอสเฟต (Magnesium phosphate)

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการแปรสภาพฟอสฟอรัสจะมีทั้งกลุ่มที่ทำหน้าที่เปลี่ยนอินทรีย์ ฟอสเฟต และอนินทรีย์ฟอสเฟตที่อยู่ในรูปไม่เป็นประโยชน์ต่อพืชให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ใน กรณีของสารอินทรีย์ฟอสเฟตอยู่ในรูปไม่เป็นประโยชน์ต่อพืชจะอยู่ในรูปของฟิทิน และกรด ฟอสฟอรัส จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะสร้างเอนไซม์ ฟิเตส (Phytase), ฟอสฟาเทส (Phosphatase), นิวคลีโอไทเดส (Nucleotidases) และกลีเซอรอลฟอสฟาเทส (Glycerol Phosphatase) เพื่อ แปรสภาพอินทรีย์ฟอสเฟตให้อยู่ในรูปของอนินทรีย์ฟอสเฟตที่เรียกว่า ออโรฟอสเฟต (Ortho-phosphate) ซึ่งเป็นชนิดโมโน (Mono) และไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dihydrogen Phosphate) จุลินทรีย์ดังกล่าว ได้แก่ แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* และราในสกุล *Aspergillus*, *Thiobacillus*, *Penicillium* และ *Rhizopus* เป็นต้น ซึ่งมีการรายงานแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในจีนัส *Bacillus* หลาย ชนิดที่แยกได้จากมะเขือเทศและพริกมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตเมื่อทดสอบบนอาหารแข็ง Pikovaskaya's medium (Amaresan et al., 2012) ในระยะเวลาต่อมา ได้มีรายงานการแยก แบคทีเรียในจีนัส *Enterobacter*, *Pseudomonas* และ *Microbacterium* ที่สามารถละลาย ฟอสเฟตได้ด้วยเช่นกัน (Ali et al., 2014; Eljounaidi et al., 2016; Borah et al., 2021)

กลไกการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์

โดยทั่วไปวัฏจักรฟอสฟอรัสในพื้นที่เกษตรกรรมจะเป็นวัฏจักรแบบเปิด เนื่องจากมีการใส่ทั้ง ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ลงในดินเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดตามที่ต้องการ นอกจากมีการเกิดปฏิกิริยาการ

ตรึงฟอสฟอรัสโดยกระบวนการทางเคมีในดินแล้ว ยังมีจุลินทรีย์ในดินที่จัดเป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากการดำเนินกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระบวนการต่างๆ ได้แก่ การละลายสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟตด้วยกรดอินทรีย์ (Solubilization) และการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟตด้วยเอนไซม์ (Mineralization) และการตรึงฟอสฟอรัส (Immobilization) โดยการดูดซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ (ภาพ 7)



ภาพ 7 กลไกการละลายฟอสเฟตในดินโดยจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

ที่มา: Sharma et al., 2013

การใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน

ในการแก้ปัญหาดินขาดฟอสฟอรัสที่มีประโยชน์ต่อพืชสามารถทำได้โดยใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต ซึ่งมีอยู่ในดินอยู่แล้วแต่อาจมีไม่มากพอที่จะทำให้เกิดฟอสฟอรัสที่มีประโยชน์เพียงพอต่อความต้องการของพืชเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (ธงชัย มาลา, 2550) โดยจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ได้รับความสนใจศึกษาพัฒนาจากหลายประเทศเพื่อนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับเพิ่มธาตุฟอสฟอรัสในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ (อาภารัตน์, 2549) การนำจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตมาใช้ในทางการเกษตร โดยอาจจะใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่เป็นประชากรเดิมในพื้นที่ แต่ถ้าจุลินทรีย์ท้องถิ่นไม่มีประสิทธิภาพพออาจชักนำ

จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตต่างถิ่นที่มีประสิทธิภาพดี เช่น *Bacillus* และ *Pseudomonas*, ที่มีการเจริญเติบโตบริเวณรอบรากพืชมาใส่เพิ่มเติมในพื้นที่โดยการคลุกกับเมล็ดพันธุ์พืชหรือจุ่มรากของกล้าพืชก่อนที่จะนำลงปลูก จุลินทรีย์กลุ่มเอนโดไฟต์คาดว่าจะมีบทบาทนี้เช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการบวนการเปลี่ยนรูปฟอสเฟตซึ่งมีอิทธิพลต่อการปลดปล่อยฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช

กลไกในการปลดปล่อยฟอสฟอรัสให้เป็นประโยชน์กับพืชแตกต่างกันออกไป (Salehrastin, 1999) กระบวนการดังกล่าว ได้แก่ กระบวนการทำให้เกิดกรด (Acidification) กระบวนการคีเลต (Chelation) และกระบวนการแลกเปลี่ยน (Exchange) (Gerke, 1992; Nahas, 1996; Dadarwal, 1997; Yadav and Dadarwal, 1997; อ้างอิงโดยสุภาพร จันรุ่งเรือง, 2553) หากดินในแปลงปลูกสตรอว์เบอร์รีขาดฟอสเฟตในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชจะส่งผลต่อต้นทุนการผลิตที่สูงมาก เนื่องจากต้องใช้ปุ๋ยฟอสเฟตในปริมาณสูง ในปี 2555 ไตรธานี เยี่ยมอ่อน และคณะ ได้ศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยด้วยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตพบว่า แบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดมี 19 ไอโซเลต และมี 4 ไอโซเลต ที่มีค่ากิจกรรมการละลายฟอสเฟตสูง เมื่อนำไปทดสอบในระดับโรงเรือนพบว่า *Bacillus aryabhatai* UT-KKU-26 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ดีที่สุด จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์มีโอกาสนำมาพัฒนาเป็นหัวเชื้อชีวภัณฑ์ได้จากการรายงานที่ผ่านมาเป็นแนวทางในการศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟต์เพื่อประยุกต์ใช้ในการปลูกสตรอว์เบอร์รีจึงต้องศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมและสภาพการทำเกษตรกรรมที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของเชื้อดังกล่าวอีกด้วย

การผลิตซิเดอร์โรฟอรัส

ซิเดอร์โรฟอรัสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (200–2000 ดาลตัน) ผลิตโดยจุลินทรีย์ และพืชในสภาพที่มีปริมาณธาตุเหล็กที่ต่ำ (Schwyn and Neilands, 1987) บทบาทหลักของซิเดอร์โรฟอรัส คือ การจับไอออนของเหล็ก (Fe (III)) เพื่อใช้ในกระบวนการทางชีวภาพ นอกจากนี้ซิเดอร์โรฟอรัสยังสามารถจับกับโมเลกุลของโลหะชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย สารประกอบดังกล่าวมีโครงสร้างที่หลากหลาย และมีคุณสมบัติที่เฉพาะเจาะจงจึงทำให้ซิเดอร์โรฟอรัสได้รับความสนใจเพื่อนำมาศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมทางชีวภาพ (Biocontrol) ไบโอเซนเซอร์ (Biosensors) การบำบัดสารมลพิษด้วยวิธีทางชีวภาพ (Bioremediation) และสารคีเลต (Chelation agents) รวมถึงคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช แบคทีเรียในกลุ่ม PGPR มีรายงานว่าสามารถผลิตซิเดอร์โรฟอรัสได้ เช่น *Bacillus subtilis* CAS15 สามารถผลิตซิเดอร์โรฟอรัสในกลุ่ม Catechol ได้ (Yu et al., 2011) และ *Pseudomonas fluorescens* สามารถผลิตซิเดอร์โรฟอรัสในกลุ่ม Hydroxymate ที่มีชื่อว่า Ferribactin (Maurer and Keller-Schierlein, 1968)

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค

เนื่องจากสตรอว์เบอร์รีนั้นมีส่วนขยายพันธุ์ คือ ไหลที่เลื้อยไปตามดิน หากการดูแลไม่ดี โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝน ซึ่งอากาศมีความชื้นสูง ทำให้เกิดน้ำขังซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคโคนเน่าได้ ดังนั้นแบคทีเรียเอนโดไฟต์จะต้องมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ เพื่อช่วยป้องกันพืชจากการทำลายของเชื้อรา โดยมีกลไกทางอ้อมได้หลายรูปแบบ เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะและสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ การแก่งแย่งแข่งขันเพื่อแย่งอาหารและพื้นที่ รวมถึงการผลิตเอนไซม์ที่ทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา (Dunlap et al., 2011; Hussain and Khan, 2021) แบคทีเรียเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมทางชีวภาพ ได้แก่ จีโนส *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Streptomyces* เป็นต้น (Berg and Hallmann, 2006) แบคทีเรียในจีโนส *Bacillus* ได้รับการศึกษาและเป็นที่ยอมรับว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้หลายชนิด (de Curtis et al., 2010; Zhang et al., 2011) เช่น *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp. และ *R. solani* (Cui et al., 2020; Hussain and Khan, 2021) ซึ่งมีการรายงานว่า สารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่ผลิต คือ สารในกลุ่มลิโปเปปไทด์ (Lipopeptide) เช่น เซอร์แฟกทิน (Surfactin), อิทูริน (Iturin), เฟนจีซิน (Fengycin) และสารในกลุ่มโพลีคีไทด์ (Polyketide) เช่น Macrolactin (Cossus et al., 2021) มีการรายงานว่าแบคทีเรียจีโนส *Bacillus*, *Enterobacter* และ *Pseudomonas* ยังสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสเพื่อทำลายผนังเซลล์เชื้อราเพื่อป้องกันตนเองและพืชอาศัย (Cherin et al., 1995; Susilowati et al., 2011) นอกจากนี้มีการศึกษาแบคทีเรีย *B. siamensis* และ *B. subtilis* ได้รายงานว่าจะสามารถผลิตสารกลุ่ม lipopeptide ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคในจีโนส *Colletotrichum*, *Fusarium* และ *Rhizoctonia* ได้ (Dunlap et al., 2011; Hussain and Khan 2021; Huang et al., 2022)

การควบคุมโรคพืชโดยวิธีธรรมชาติ

การควบคุมโรคพืชโดยวิธีธรรมชาติเป็นการเลียนแบบธรรมชาติเพื่อการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต จึงมีการแข่งขันหรือการส่งเสริมซึ่งกันและกัน ดังนั้นการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีธรรมชาติ จึงเป็นการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมายับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชไม่ให้อันตรายต่อพืชนั่นเอง โดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชมีกลไกยับยั้งโรค 4 ประการ คือ

1. การแข่งขัน หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถเจริญเติบโตแข่งขันกับเชื้อโรคได้ดี จนเชื้อโรคไม่สามารถเจริญก่อโรคให้เกิดโรคหรือครอบครองพื้นที่อาศัยในพืช หรือในดินบริเวณรอบรากหรือส่วนที่อยู่เหนือดินของพืช

2. การเป็นปรสิต หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้าไปอาศัยหรือหาอาหารในเซลล์ของเชื้อโรคพืช ทำให้เชื้อโรคลดความรุนแรง
3. การทำลายชีวิต หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายชีวิตของเชื้อโรค
4. การชักนำให้พืชต้านทานโรค หมายถึง การที่เชื้อปฏิปักษ์หรือส่วนใดส่วนหนึ่งของเชื้อปฏิปักษ์ สามารถไปกระตุ้นหรือชักนำให้พืชสร้างความต้านทานต่อโรคขึ้นมา (Odum, 1953; Pal et al., 2006; นิพนธ์ ทวีชัย, 2550)

ในปัจจุบันพบว่า มีการนำเชื้อจุลินทรีย์มาพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์โดยมุ่งเน้นเรื่องการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค ในปี 2006 El-Hassan and Gowen ได้นำชีวภัณฑ์ที่ใช้ *Bacillus subtilis* ผสมลงในตัวพาชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ผงทัลคัม และฟิท โดยมีคาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสหรือซีเอ็มซี (Carboxymethyl cellulose; CMC) เป็นสารเพิ่มการยึดเกาะ มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentil* สาเหตุโรคเหี่ยวของถั่วแขก โดยใช้ถั่วแขก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ Precoz สายพันธุ์อ่อนแอ และ Idlib-2 สายพันธุ์ต้านทานพบว่า มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคเหี่ยวได้ดีที่สุดในพันธุ์อ่อนแอ และในปี 2554 ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี และคณะ รายงานเกี่ยวกับการพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปแบบเม็ดเจลที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์และสามารถสลายทางชีวภาพได้พบว่า เม็ดอัลจินตเจลสามารถเพิ่มการอยู่รอดของแบคทีเรียต่อแสงยูวี ค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิสูงได้ และแบคทีเรียที่ปลดปล่อยออกมาในดินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ได้ นอกจากนี้ชีวภัณฑ์เม็ดเจลมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่รอดมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการแยกและคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากพุลิกาเรียพบว่า *B. cereus* BI-8 และ *B. subtilis* BI-10 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค ได้แก่ *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* และ *Pythium ultimum* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตั้งแต่ 20-52.6 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งสองชนิดนี้จึงถูกใช้เป็นสารตั้งต้นทางชีวภาพสำหรับเมล็ดข้าวโพด (Fouda et al., 2021)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Bacillus subtilis

Bacillus เป็นแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram-positive) สามารถเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า (flagella) ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) แต่บางชนิดเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน

(facultative anaerobe) เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน (Thermoduric bacteria) สร้างเอนโดสปอร์ (spore forming bacteria) โดยสปอร์แบคทีเรียของ *Bacillus* จะทนต่อความร้อน ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ดี (Gordon, 2019) (ภาพ 8)

Bacillus subtilis (Ehrenberg, 1835; Cohn, 1872)

Kingdom: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Bacilli

Order: Bacillales

Family: Bacillaceae

Genus: *Bacillus*

Species: *B. subtilis*



ภาพ 8 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ

Bacillus subtilis ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า

ที่มา: ดลฤดี บุญญาภิสิทธิ์, 2565

Bacillus เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการกำจัดศัตรูพืชและควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด ซึ่งแบคทีเรียที่นำมาผลิตเป็นสารกำจัดศัตรูพืชชีวภาพมีหลายรูปแบบ ขึ้นอยู่กับศัตรูเป้าหมาย *Bacillus* ออกฤทธิ์ยับยั้งแมลงศัตรูพืช โดยการสร้างสารพิษ delta-endotoxin ซึ่งมีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง โดยมีการผลิตจำหน่ายมากที่สุด คือ *Bt*

ในส่วนของ การควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุที่เกิดจากเชื้อรา พบว่า *Bacillus* เช่น *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilis*, และ *B. subtilis* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค

รวมทั้งช่วยในการกระตุ้นความต้านทานของพืชต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชอีกด้วย (วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, 2560) นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1999 Marten et al. รายงานว่าแบคทีเรียปฏิบัณช์ *Bacillus subtilis* B2g ซึ่งอยู่ในรูปแบบต่างๆ เช่น แกรนูล สารแขวนลอยสปอร์ (Spore suspension) และคลุกเมล็ด (Seed treatment) สามารถทำลายเชื้อรา *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ได้ผลดี และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของทานตะวัน กะหล่ำปลี และแตงกวาได้ ในปี 2012 de Melo Pereira et al. ได้ศึกษากลุ่มของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากผลสตรอว์เบอร์รี่โดยใช้เทคนิค Repetitive extragenic palindromic (rep)-PCR พบว่า สามารถตรวจพบยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pantoea*, และ *Pseudomonas* และเมื่อเตรียมหัวเชื้อ *Bacillus subtilis* NA-108 เพื่อทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสตรอว์เบอร์รี่ในระดับโรงเรือนพบว่า แบคทีเรียดังกล่าวมีผลทำให้จำนวนใบ ความสูงของลำต้น น้ำหนักของรากแห้ง และน้ำหนักของลำต้นแห้งเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้มีการศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus pumilus* INR7 พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Induced systemic resistance (ISR) ในพืชเพื่อลดความรุนแรงของโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย (Yi et al., 2013; Jeong et al., 2014)

Enterobacter sp.

Enterobacter เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน (Rod-shaped) ไม่สร้างสปอร์ (Non-spore forming) และออกซิเดส (Oxidase negative) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม (Coliform) อยู่ในกลุ่ม Facultative anaerobe สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน อาจไม่เคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่ด้วย Peritrichous flagella สร้างแคปซูล ทำให้เกิดเมือก (Slime former) (Mezzatesta et al., 2012) (ภาพ 9)

Enterobacter sp. (Hormaeche and Edwards, 1960)

Kingdom: Bacteria

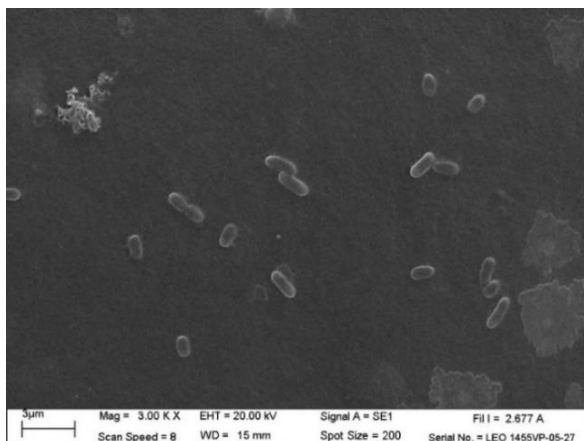
Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Enterobacterales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Enterobacter*



ภาพ 9 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ *Enterobacter* sp. ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า

ที่มา: ดลฤดี บุญญาภิสิทธิ์, 2565

Microbacterium sp.

Microbacterium อยู่ในวงศ์ *Microbacteriaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ (nonspore-forming) (Collins et al., 1983) (ภาพ 10)

Microbacterium sp. (Orla-Jensen, 1919)

Kingdom: Bacteria

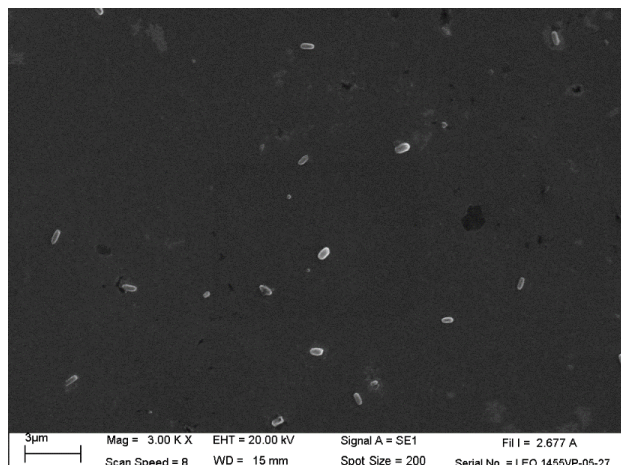
Phylum: Actinobacteria

Class: Actinobacteria

Order: Micrococcale

Family: Microbacteriaceae

Genus: *Microbacterium*



ภาพ 10 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ *Microbacterium enclense* ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า

ที่มา: ดลฤดี บุญญาภิสิทธิ์, 2565

Microbacterium เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคพืช และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งมีการรายงานในปี 2009 โดย Cottyn et al. พบว่าเชื้อ *Microbacterium* ที่ทำการแยกได้จากเมล็ดข้าวมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่เป็นสาเหตุโรคในข้าว และมีการแยกแบคทีเรียจากต้นอะราบิโดพซิส พบว่า *Microbacterium yannici* G72 มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งช่วยทำให้ต้นพืชมีขนาดใหญ่และมีก้านช่อดอกที่ยาวขึ้น (Schwachtje et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า *Microbacterium* มีความสามารถในการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าวอีกด้วย (Ji et al., 2014)

การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์

การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์นั้น เป็นการสร้างความมั่นคงยั่งยืนทางการเกษตรอย่างหนึ่ง การศึกษาเกี่ยวกับการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในระยะแรกนั้น มุ่งเน้นเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรม ซึ่งการศึกษานั้นอาศัยหลักการและเทคนิคทางด้านจุลชีววิทยา ผู้ศึกษามักนำชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชมาทำการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว จากนั้นจึงทำการแยกให้บริสุทธิ์จนได้โคลนเดี่ยวเพื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติที่สนใจ เช่น การศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นเพื่อป้องกันตนเองจากเชื้อโรคโดยใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ มักทำการเคลือบผิวที่เมล็ดหรือผสมแบคทีเรียลงไปในดินในกระถาง ในการศึกษาเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตในสตรอว์เบอร์รี่พบว่า ได้มีการศึกษาในระดับโรงเรียนที่ปลูกสตรอว์เบอร์รี่แบบอินทรีย์ โดยใช้แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus*

และ *Pseudomonas* ทำการจุ่มราก และการฉีดพ่นด้วยหัวเชื้อในรูปแบบหัวเชื้อบริสุทธิ์ชนิดเดียว และหัวเชื้อผสมระหว่างสองสายพันธุ์ ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้แบคทีเรียดังกล่าว ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น และพบว่าปริมาณของแร่ธาตุฟอสฟอรัส เหล็ก ทองแดง และสังกะสี เพิ่มมากขึ้น ในส่วนของต้นสตรอว์เบอร์รี นอกจากนี้ เมื่อศึกษาปริมาณแร่ธาตุในดินพบว่า ปริมาณของฟอสฟอรัส เหล็ก โพแทสเซียม และแมกนีเซียม ซึ่งอยู่ในรูปที่ละลายได้ในดินสูงขึ้นอีกด้วย (Esitken et al., 2010) แบคทีเรียรอบรากข้าวบาร์เลย์และราสปเบอร์รี่สายพันธุ์ป่า ได้แก่ แบคทีเรียในจิ้นัส *Bacillus* และ *Paenibacillus* ได้มีรายงานว่า แบคทีเรียดังกล่าวส่งผลต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของสตรอว์เบอร์รีให้สูงขึ้น (Erturk et al., 2012) การใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์เพื่อควบคุมโรคพืชมีกนิยม ทดสอบด้วยการฉีดหัวเชื้อแบคทีเรียใกล้บริเวณที่ปรากฏอาการของโรค เช่น แบคทีเรียเอนโดไฟต์ใน จิ้นัส *Bacillus* ซึ่งช่วยทำให้เกิดกระบวนการ Induced systemic resistance (ISR) เช่น *Bacillus pumilus* INR7 นั้น ได้รับการศึกษาในระดับแปลงปลูก และนำมาจดทะเบียนการค้าโดยบริษัท Yield Shield ซึ่งผลิตภายใต้การควบคุมของบริษัท Bayer Crop Science (Jeong et al., 2014) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากรากคาโนลา และทดสอบศักยภาพในการ เป็นปุ๋ยชีวภาพพบว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากรากคาโนลาอยู่ในกลุ่มจิ้นัส *Bacillus*, *Neobacillus*, *Peribacillus*, *Pseudomonas* และ *Terribacillus* เมื่อทำการทดลองในระดับโรงเรือนโดยใช้ดิน เกษตรพบว่า แบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าคาโนลาได้ อย่างมีประสิทธิภาพ จากรายงานนักวิจัยจึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนา *Paenibacillus* และ *Peribacillus* เป็นปุ๋ยชีวภาพมากที่สุด เนื่องจากมีการสร้างสปอร์ซึ่งเป็นลักษณะที่ได้เปรียบเมื่อกำหนดสูตรปุ๋ย ชีวภาพ (Martínez-Hidalgo et al., 2021)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

คัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากตัวอย่างไหลสตรีวเบอร์รี สายพันธุ์พระราชทาน 80 จำนวน 10 ตัวอย่าง จากบ้านไร่ไถ่อ่อนสตรีวเบอร์รี ตำบลเขาค้อ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ (16°35'48"N 101°0'14"E)

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ

- 1) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave)
- 2) เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)
- 3) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance)
- 4) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precision Balance)
- 5) เครื่องเขย่า (Shaker)
- 6) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 7) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 8) เครื่องกวนสารละลาย (Hot plate stirrer)
- 9) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 10) เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)
- 11) กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ (Stereoscopic microscope)
- 12) กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ (Compound light microscope)
- 13) ตู้ดูดควันไอสารเคมี (Fume hood)
- 14) ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ (Incubator)
- 15) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 16) ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety Cabinet)
- 17) ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)
- 18) ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 19) ตู้ยูวี (UV cabinet)

อุปกรณ์

- 1) ท่างถ่ายเชื้อ (Inoculating loop)
- 2) ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner Stainless)
- 3) ไฟแช็ค (Lighter)
- 4) ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Rack)
- 5) ถุงพลาสติก (Plastic bag)
- 6) หนังสยาง (Rubber band)
- 7) ช้อนตักสารเคมี (Spatula)
- 8) สำลี (Cotton wool)
- 9) โกร่ง (Mortar & Pestle)
- 10) จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 11) หลอดทดลอง (Test tube)
- 12) แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)
- 13) ปิเปต (Pipette)
- 14) กระบอกตวง (Cylinder)
- 15) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 16) บีกเกอร์ (Beaker)
- 17) แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
- 18) หลอดแคปิลารี (Capillary)
- 19) แผ่นดิสก์ (Disc), Whatman™
- 20) ไซริงค์กรองสารแบบปลอดเชื้อ (Sterile Syringe Filter 0.22 μm), Johnson®
- 21) กระบอกฉีดยา (Syring), Nipro
- 22) แผ่นTLC (Thin layer chromatography), Merck KGaA®, Germany
- 23) กระถาง ขนาด 8 นิ้ว (Pot; 8 inches)
- 24) บัวรดน้ำพลาสติก (Plastic watering can)
- 25) พีทมอส (Peat moss)
- 26) ขุยมะพร้าว (Coconut husk)
- 27) ขวดยมน้ำ ขนาด 60 มิลลิลิตร (Plastic bottle, BML 60 ml)

สารเคมี

- 1) เอทิลแอลกอฮอล์ 95% (Ethyl Alcohol 95%), เคมีภัณฑ์
- 2) ทวิน 80 (Tween 80), OmiPur[®]
- 3) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$; Analytical reagent grade), QRëC[®]
- 4) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ($NaClO$), Loba Chemie[®]
- 5) ไอเอิร์น (III) คลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$; Analytical reagent grade), Loba Chemie[®]
- 6) กรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$; Analytical reagent grade), Kemaus[®]
- 7) เอทิล อะซิเตท ($CH_3COOC_2H_5$; Commercial), ACI Labscan[®]
- 8) กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4 ; Analytical reagent grade), J.T. Baker[®]
- 9) แอล-ทริปโตเฟน (L-Tryptophan), Himedia[®]
- 10) ไตรแคลเซียม ฟอสเฟต (tri-calcium phosphate), Ajax Finechem
- 11) ไซโคลเฮกซิมิด (Cycloheximide), Goldbio
- 12) ปุ๋ยสูตรเสมอ 15-15-15

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone soya Broth, Himedia[®]
- 2) อาหารเลี้ยงเชื้อ King's B agar, Himedia[®]
- 3) อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani Broth, Himedia[®]
- 4) อาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's Agar, Himedia[®]
- 5) อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth, Himedia[®]
- 6) อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth, Himedia[®]
- 7) อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Malt Broth (YM Broth), Himedia[®]

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอว์เบอร์รี สายพันธุ์พระราชทาน 80

ทำการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอว์เบอร์รี ที่เก็บได้จากพื้นที่แปลงปลูกของบ้านไร่โออุนสตรอเบอร์รี ตำบลเขาค้อ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ จำนวน 10 ตัวอย่าง เริ่มต้นโดยการนำไหลสตรอว์เบอร์รีมาล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีการเติมสารละลาย 1% ทวิน 80 นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงแช่ในสารละลาย 70% เอทิลแอลกอฮอล์เป็นเวลา 1 นาที ทำการฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย 2.5% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ($NaClO$) นำไปเขย่าบน

เครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทำการล้างด้วยสารละลาย 70% เอทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 30 วินาที และล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจำนวน 3 รอบ (เก็บน้ำกลั่นสุดท้ายที่ใช้ในการฆ่าเชื้อไว้สำหรับเกลี่ยบนอาหารเพื่อตรวจสอบว่าสามารถฆ่าเชื้อที่ผิวได้) นำตัวอย่างมาผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาบดโดยมีการเติมสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.03 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสารละลายสำหรับการแยกแบคทีเรียด้วยวิธีการทำให้เจือจาง (Serial dilution) ในการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์นั้น ให้ทำการเกลี่ย (Spread plate) สารละลายจากไหลสตรอว์เบอร์รี่ที่เจือจางเท่ากับ 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} ลงบนอาหาร Tryptic soya agar (TSA) อาหาร King's B agar และอาหาร Luria-Bertani (LB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-3 สัปดาห์ สังเกตการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารทุกวัน แล้วแยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการเก็บรักษาเชื้อในสารละลายกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 25% ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป (Rojas-solis et al., 2018)

2. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง

นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากขั้นตอนที่ 1 มาเลี้ยงบนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟอสเฟตด้วยการวางชิ้นวุ้นบนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium (PVK) ที่มี tri-calcium phosphate เป็นองค์ประกอบ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลวันที่ 3 และวันที่ 7 วัน เมื่อสังเกตเห็นบริเวณวงใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทำการวัดรัศมีของบริเวณใส และรัศมีของโคโลนี เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณหาอัตราการละลายฟอสเฟต (Halo: Colony ratio) ดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{Halo: Colony ratio} = \frac{\text{รัศมีบริเวณใสรอบโคโลนี (มิลลิเมตร)}}{\text{รัศมีโคโลนี (มิลลิเมตร)}}$$

คำนวณค่า Halo: Colony ratio ทุกซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ยสุดท้ายของแต่ละเชื้อแบคทีเรียมาเปรียบเทียบกัน บันทึกผลการทดลองแล้วนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ (Ruangsanka, 2014)

3. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว

นำโคโลนีของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำมาวัดค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยให้มีค่าความขุ่น เท่ากับ 0.1 (ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย เท่ากับ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้มาทำการถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรีย

ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว PVK ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยมีชุดควบคุม คือ อาหารเหลวที่ปราศจากแบคทีเรีย นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บันทึกผล และนำตัวอย่างปริมาตร 40 มิลลิลิตร ไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำเลี้ยงที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ โดยใช้วิธีโมลิบดีนัมบลู (Molybdenum-blue method) (Murphy and Riley, 1962) ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกรดแอสคอร์บิกปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันวางทิ้งไว้ เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณของฟอสฟอรัสที่วิเคราะห์ได้เป็นหน่วยไมโครกรัมฟอสเฟตต่อมิลลิลิตร ตามสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่าง (ไมโครกรัมฟอสเฟตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{Z \times \text{ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)}}$$

**Z คือ ค่าความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในตัวอย่างที่คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ปริมาตรสุดท้าย คือ 25 มิลลิลิตร

ปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ คือ 1 มิลลิลิตร

4. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก

4.1 ทำการทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตามวิธีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นโดย Rashid et al. (2012) โดยนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตมาเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast Malt Broth (YM Broth) และอาหารเหลว YM ที่มีส่วนประกอบของ 0.1% แอล-ทริปโตเฟน (L-Tryptophan) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ได้มาทำการทดสอบโดยดูตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติมด้วย Salkowski's reagent (2% 0.5 โมลต่อลิตร เพอร์ริคคลอไรด์ (FeCl_3) ใน 35% กรดเปอร์คลอริก (HClO_4) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และใช้สารละลายมาตรฐาน IAA เป็นชุดควบคุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลอง (Mohite, 2013)

4.2 การสกัดสาร IAA ของแบคทีเรีย และหาตำแหน่งสารด้วยเทคนิค Thin layer chromatography; TLC

4.2.1 การสกัดสาร IAA ของแบคทีเรีย

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้สูงมาทำการเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่มีส่วนประกอบของ 0.1% แอล-ทริปโตเฟน (L-Tryptophan) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำเลี้ยงที่ได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) อัตราส่วน 1:1 โดยทำการสกัดซ้ำจำนวน 3 รอบ แล้วทำการระเหยแห้งสารด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4.2.2 หาตำแหน่งสารด้วยเทคนิค Thin layer chromatography; TLC

เตรียมแผ่น TLC (Silica gel 60 F254) ให้มีความยาว 5 เซนติเมตร และความกว้างตามความเหมาะสม ใช้หลอดแคปิลารี (Capillary) ขนาดเล็กดูดสารสกัดตัวอย่างจุด (Spot) ลงบนแผ่น TLC ให้ห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร และรอให้สารสกัดแห้ง จากนั้นทำการดีเวลอปแผ่น TLC ในแทงค์ (Tank) หรือภาชนะที่บรรจุด้วยสารละลายที่ทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (บิวทานอล (3): เอทิล อะซิเตท (5):เอทานอล (1):น้ำ (1)) แล้วนำแผ่น TLC ที่ผ่านการดีเวลอปมาสังเกตด้วยตาเปล่า และนำไปส่องภายใต้แสง UV ด้วยตู้ยูวี (UV cabinet) ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เพื่อดูลักษณะของการทึบแสง หรือการเกิดควENCHING) และส่องภายใต้แสง UV ที่มีความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เพื่อดูลักษณะการเรืองแสงของสารที่เป็นองค์ประกอบ และพ่นด้วยสาร Salkowski's Reagent เพื่อศึกษาสาร IAA ซึ่งจะปรากฏสีชมพู

5. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบโดยวิธี dual culture bioassay

นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* 1406, *Fusarium* sp. FB3-3 และ *C. gloeosporioides* DBCS-01 ด้วยวิธีการ dual culture bioassay โดยนำเชื้อราเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นจะขึ้นวุ้นอาหาร PDA ที่มีเชื้อเจริญอยู่ด้วยพลาสติกปิเปต (Pasteur Pipette) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำขึ้นวุ้นดังกล่าววางบนอาหาร PDA งานใหม่ โดยมีระยะห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 2 เซนติเมตร และทำการปลูกแบคทีเรียเอนโดไฟต์โดยใช้ห่วงเชี่ยเชื้อ (Inoculating loop) ขีดแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบการเป็น

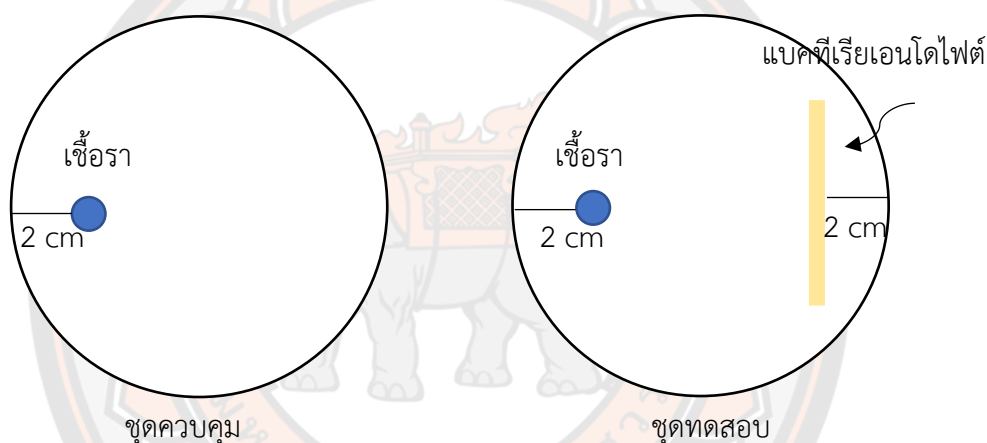
ปฏิบัติปลงบนอาหารให้มีระยะห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 2 เซนติเมตร (ภาพ 11) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4-14 วัน บันทึกผลการเจริญเติบโตของเชื้อราโดยการวัดรัศมีการเจริญเติบโตของเชื้อรา และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Montealegre et al., 2003) บันทึกผลการทดลองนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent inhibition of radial growth ; PIRG)

$$\text{จากสูตร เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100$$

เมื่อ R_1 คือ ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราในชุดควบคุม

R_2 คือ ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราโรคนชุดทดสอบ



ภาพ 11 ตำแหน่งการวางเชื้อราและแบคทีเรียทดสอบ

ที่มา: ดัดแปลงจาก Khleekorn and Wongrueng, 2014

6. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบโดยวิธี agar well diffusion

ศึกษาการออกฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา *Rhizoctonia solani* 1406, *Fusarium* sp. FB3-3 และ *C. gloeosporioides* DBCS-01 โดยนำแบคทีเรียเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ชนิด ได้แก่ T1 (Kwon and Kim, 2014), T2 (Sohn et al., 2008), T3 (Yan et al., 2016; Li et al., 2016), NB (Guo et al., 2014) และ LB (Li et al., 2012) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำเลี้ยงที่ได้กรองผ่านไซริงค์กรองสารแบบปลอดเชื้อ ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

เนื่องจากการทดสอบนี้มีทั้งเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ (*Rhizoctonia solani* 1406) และสร้างสปอร์ (*Fusarium* sp. FB3-3 และ *C. gloeosporioides* DBCS-01) จึงแบ่งการทดสอบเชื้อรา ออกเป็น 2 แบบ ดังนี้

1) การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา *Rhizoctonia solani* 1406

ทำการเตรียมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* 1406 โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโต จากนั้นเจาะบริเวณเส้นใยเชื้อราวางตรงกลางบนอาหาร PDA งานเพาะเชื้อใหม่ จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ด้วยด้านท้ายของพลาสติกเจอร์ปิเปต แล้วจึงเติมน้ำเลี้ยงที่ได้ของแต่ละตัวอย่างลงในหลุม หลุมละ 20 ไมโครลิตร โดยใช้สารต้านเชื้อรา cycloheximide ที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อแผ่นดิสก์ เป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลองชั่วโมงที่ 96 (Jumpathong et al., 2019)

2) การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา *Fusarium* sp. FB3-3 และ *C. gloeosporioides* DBCS-01

ทำการเตรียมเชื้อรา *Fusarium* sp. FB3-3 และ *C. gloeosporioides* DBCS-01 โดยเลี้ยงเชื้อรา บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-10 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโต และสร้างสปอร์ โดยในการทดสอบให้เตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่มีความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิเมตร ตรวจนับจำนวนสปอร์เชื้อราโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) จากนั้นหยดสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง PDA งานใหม่ ทำการป้าย (Swab) ให้ทั่วอาหาร PDA ทั้งไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ด้วยด้านท้ายของพลาสติกเจอร์ปิเปต เติมน้ำเลี้ยงที่ได้ของแต่ละตัวอย่างลงในหลุม หลุมละ 20 ไมโครลิตร โดยใช้สารต้านเชื้อรา cycloheximide ที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อแผ่นดิสก์ เป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลองชั่วโมงที่ 48 โดยวัดขนาดบริเวณวงใสที่เกิดขึ้นรอบหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ (inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตร

7. การจำแนกชนิด และวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์

นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้มาทำการศึกษาสัณฐานวิทยา และปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรีย โดยเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์บนอาหารแข็ง NA สังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษาลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมแกรม และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API 20E และ API 50CH (BioMérieux, France) (Sutthisa, 2002) และแปลผลการทดลองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป apiweb™

จำแนกชนิดด้วยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยส่งวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลีใต้) ในการศึกษาชิ้น เริ่มต้นจากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนบริเวณ 16S rRNA โดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primer 1 คู่ 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3' และ 1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3' ซึ่งมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (2) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำทั้งหมดจำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำชิ้นส่วนที่ได้นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสโดยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส (ABI Prism 3730XL DNA analyzer) จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับเบสของยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud และระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ศึกษา จากนั้นส่งตัวอย่างแบคทีเรียเพื่อฝากเก็บรักษาที่ศูนย์ชีววัสดุประเทศไทย (Thailand Bioresource Research Center; TBRC) และรับรหัสฝาก (รหัส TBRC)

8. การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รีด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในระดับโรงเรือน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) โดยการเตรียมต้นกล้าสตรอว์เบอร์รี สายพันธุ์พระราชทาน 80 ที่แข็งแรงสมบูรณ์ มีใบอย่างน้อย 4 ใบขึ้นไป สภาพแข็งแรง ปราศจากอาการโรค ทำการปลูกบนกระถางที่มีขนาด 8 นิ้ว ใช้วัสดุปลูก (ภาคผนวก ง) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวนทั้งสิ้น 11 กระถาง รูปแบบการทดลองประกอบด้วย 8 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุมลบ)

กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016 (50 มิลลิลิตร)

กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021 (50 มิลลิลิตร)

กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041 (50 มิลลิลิตร)

กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016 และปุ๋ยสูตรเสมอ (25 มิลลิลิตร:2.5 กรัม)

กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021 และปุ๋ยสูตรเสมอ (25 มิลลิลิตร : 2.5 กรัม)

กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041 และปุ๋ยสูตรเสมอ (25 มิลลิลิตร : 2.5 กรัม)

กรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ (กรรมวิธีควบคุมบวก) (5 กรัม)

ในการทดลองมีการให้หัวเชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และปุ๋ยเคมีทุก 14 วัน บันทึกผลการทดลองโดยการบันทึกจำนวนใบ จำนวนไหล จำนวนดอก ความยาวของก้านใบ ความสูงของทรงพุ่ม พื้นที่ใบ น้ำหนักสดและแห้งของราก และน้ำหนักสดและแห้งของต้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Complete Randomized Design; CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผลจากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป



บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอว์เบอร์รี สายพันธุ์พระราชทาน 80

จากการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากตัวอย่างไหลสตรอว์เบอร์รีของ จำนวน 10 ตัวอย่าง (ภาพ 12) โดยการนำไหลสตรอว์เบอร์รี มาทำการฆ่าเชื้อผิว และแยกเชื้อด้วยการทำ serial dilution พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 264 ไอโซเลต โดยแบ่งตามอาหาร ได้ดังนี้ อาหาร Tryptic soya agar (TSA) จำนวน 69 ไอโซเลต อาหาร King's B agar (KB) จำนวน 88 ไอโซเลต และ อาหาร Luria-Bertani agar (LB) จำนวน 107 ไอโซเลต (DB ย่อมาจาก Dolrudee Boonyapisit)



ภาพ 12 ลักษณะของต้นสตรอว์เบอร์รีที่ทำการเก็บตัวอย่าง

2. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง

จากการทดสอบเบื้องต้นโดยการจุด (Spot) แบคทีเรียจำนวน 264 ไอโซเลต บนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium พบว่า มีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง ได้ จำนวน 117 ไอโซเลต เมื่อทำการคำนวณค่าดัชนีการละลายฟอสเฟตในวันที่ 3 พบว่า แบคทีเรีย ไอโซเลต DB052, DB021 และ DB048 มีค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต เท่ากับ 3.87 ± 0.21 , 3.35 ± 0.07 และ 2.71 ± 0.29 ตามลำดับ และการคำนวณค่าดัชนีการละลายฟอสเฟตในวันที่ 7 พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต DB021, DB048 และ DB069 มีค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต เท่ากับ 3.13 ± 0.01 , 3.12 ± 0.43 และ 3.33 ± 0.58 ตามลำดับ (ตาราง 1, ภาพ 13) จากนั้นนำแบคทีเรียจำนวน 117 ไอโซ

ล

ต

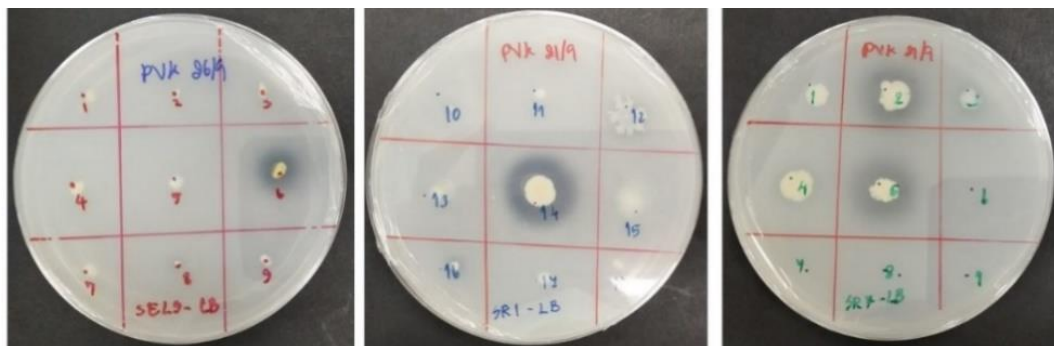
ไปทำการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวด้วย

วิธีการมอลิบดีนัมบลู (Molybdenum-blue method) และทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) โดยการทำปฏิกิริยาด้วย Salkowski's reagent

ตาราง 1 ค่าดัชนีการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง

ไอโซเลต	ค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต (Halo: Colony ratio)	
	วันที่ 3	วันที่ 7
DB021	3.35±0.07 ^b	3.13±0.01 ^a
DB035	1.18±0.11 ^g	1.68±0.08 ^{ghi}
DB036	1.75±0.00 ^f	1.75±0.00 ^{fgh}
DB039	1.48±0.13 ^{fg}	2.13±0.00 ^{bcdef}
DB041	1.67±0.00 ^f	1.92±0.17 ^{defgh}
DB044	1.39±0.17 ^{fg}	1.66±0.10 ^{hi}
DB046	1.67±0.21 ^f	2.14±0.28 ^{bcdef}
DB048	2.71±0.29 ^c	3.12±0.43 ^a
DB051	1.40±0.05 ^{fg}	1.33±0.07 ⁱ
DB052	3.87±0.21 ^a	2.25±0.22 ^{bcde}
DB056	2.17±0.29 ^{de}	2.53±0.23 ^b
DB059	2.42±0.25 ^{cd}	2.09±0.16 ^{cdefg}
DB065	1.61±0.18 ^{fg}	1.60±0.04 ^{hi}
DB067	2.43±0.19 ^{cd}	2.46±0.07 ^{bc}
DB069	3.21±0.65 ^b	3.33±0.58 ^a
DB070	1.79±0.32 ^{ef}	1.89±0.06 ^{efgh}
DB071	1.40±0.05 ^{fg}	1.68±0.16 ^{ghi}
DB075	2.35±0.15 ^{cd}	2.23±0.40 ^{bcde}
DB077	2.18±0.29 ^{de}	2.33±0.17 ^{bcd}

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P < 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test



ภาพ 13 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium

3. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว

จากการนำโคโลนีของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่เกิดบริเวณวงใสรอบโคโลนี จำนวน 117 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว โดยใช้วิธี Molybdenum-blue method พบว่า มีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวที่มีปริมาณการละลายฟอสเฟตมากกว่า 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 22 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวสูงที่สุด คือ แบคทีเรียไอโซเลต DB021 รองลงมา ไอโซเลต DB086 และไอโซเลต DB093 มีค่าเท่ากับ 234.64 ± 4.58 , 226.88 ± 15.35 และ 210.25 ± 1.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการบันทึกค่า pH ของส่วนใสที่ได้หลังจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว PVK ที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.00 เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน พบว่า มีค่า pH ระหว่าง 3.98-5.44 ดังตาราง 2

ตาราง 2 ความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว PVK

ไอโซเลต	ค่า pH ของส่วนใส		ปริมาณการละลายฟอสเฟต* (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
	ก่อนการเลี้ยงเชื้อ	หลังการเลี้ยงเชื้อ	
DB002	7.00	5.33	157.21±5.89 ^{fg}
DB003	7.00	4.97	165.83±8.17 ^{ef}
DB004	7.00	4.30	202.11±3.32 ^b
DB005	7.00	4.15	186.30±13.65 ^{cd}
DB007	7.00	5.38	150.68±8.65 ^g
DB015	7.00	5.32	161.72±3.88 ^{efg}
DB016	7.00	5.04	175.31±3.62 ^{de}
DB017	7.00	4.79	165.42±2.54 ^{ef}
DB021	7.00	4.27	234.64±4.58 ^a
DB025	7.00	4.61	179.66±5.35 ^d
DB031	7.00	3.96	197.52±5.72 ^{bc}
DB036	7.00	5.08	186.84±5.24 ^{cd}
DB040	7.00	5.06	174.80±3.39 ^{de}
DB045	7.00	4.20	186.91±0.43 ^{cd}
DB046	7.00	5.10	160.43±7.00 ^{fg}
DB055	7.00	4.27	186.91±0.43 ^{cd}
DB056	7.00	4.75	160.36±0.21 ^{fg}
DB058	7.00	5.36	153.92±5.22 ^{fg}
DB059	7.00	5.30	156.45±1.48 ^{fg}
DB061	7.00	5.44	155.04±20.84 ^{fg}
DB086	7.00	3.98	226.88±15.35 ^a
DB093	7.00	4.12	210.25±1.75 ^b

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P < 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test

4. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซีติก (IAA)

จากการนำโคโลนีของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่เกิดบริเวณวงใสรอบโคโลนี จำนวน 117 ไอโซเลต มาทำการทดสอบการผลิต IAA โดยการทำให้ปฏิกิริยาด้วย Salkowski's reagent พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM Broth มีปริมาณ IAA ที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 14.62-67.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM Broth ที่มีการเติม 0.1% L-tryptophan มีค่าปริมาณ IAA ที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 108.74-329.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้สูงที่สุด คือ ไอโซเลต DB041 รองลงมา ไอโซเลต DB035 และ DB044 มีค่าเท่ากับ 329.47 ± 1.51 , 271.64 ± 3.23 และ 271.56 ± 1.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตาราง (3-4)

ตาราง 3 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซีติก

ไอโซเลต	ปริมาณ IAA ที่ผลิต* (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	อาหารเหลว Yeast Malt Broth (ปราศจาก L-tryptophan)	อาหารเหลว Yeast Malt Broth (เติม 0.1% L-tryptophan)
DB007	31.67 ± 2.29^{efg}	234.01 ± 1.50^c
DB016	28.21 ± 1.38^{efgh}	210.62 ± 1.95^d
DB017	14.62 ± 2.57^h	112.68 ± 0.68^{hi}
DB021	49.76 ± 1.56^{bc}	204.18 ± 1.73^d
DB023	34.62 ± 7.98^{def}	145.48 ± 0.73^e
DB035	29.95 ± 27.01^{efg}	271.64 ± 3.23^b
DB041	56.00 ± 3.66^{ab}	329.47 ± 1.51^a
DB042	20.04 ± 0.58^{gh}	122.19 ± 1.93^g
DB043	22.85 ± 1.22^{fgh}	118.97 ± 1.73^{gh}
DB044	46.72 ± 0.34^{bcd}	271.56 ± 1.60^b
DB047	20.20 ± 0.49^{gh}	118.44 ± 1.19^{gh}
DB048	20.82 ± 0.45^{fgh}	108.74 ± 6.88^i
DB049	37.41 ± 2.46^{cde}	232.32 ± 9.97^c
DB051	67.59 ± 3.38^a	263.94 ± 0.79^b

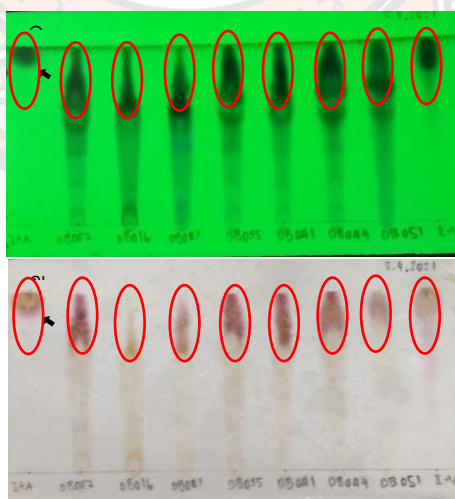
หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test

ตาราง 4 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซีติก (ต่อ)

ไอโซเลต	ปริมาณ IAA ที่ผลิต* (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	อาหารเหลว Yeast Malt Broth (ปราศจาก L-tryptophan)	อาหารเหลว Yeast Malt Broth (เติม 0.1% L-tryptophan)
DB091	15.20±2.01 ^h	132.15±8.96 ^f
DB093	35.03±8.01 ^{def}	117.43±6.52 ^{gh}
DB097	49.91±7.59 ^{bc}	120.59±5.39 ^{sh}

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test

จากการตรวจสอบการผลิต IAA ของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ DB007, DB016, DB021, DB035, DB041, DB044 และ DB051 ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography โดยใช้สารละลายมาตรฐาน IAA ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุม เมื่อนำไปสังเกตภายใต้แสง UV พบว่า มีลักษณะการเกิดการทึบแสง (ภาพ 14ก) เมื่อพ่นด้วย Salkowski's Reagent พบว่า มีลักษณะเกิดแถบเป็นสีชมพู-เหลือง (ภาพ 14ข)



ภาพ 14 TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบเปรียบเทียบกับ IAA มาตรฐาน (ชุดควบคุม)

ก) ภาพถ่ายภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

ข) ภาพถ่ายหลังจากพ่นด้วย Salkowski's Reagent

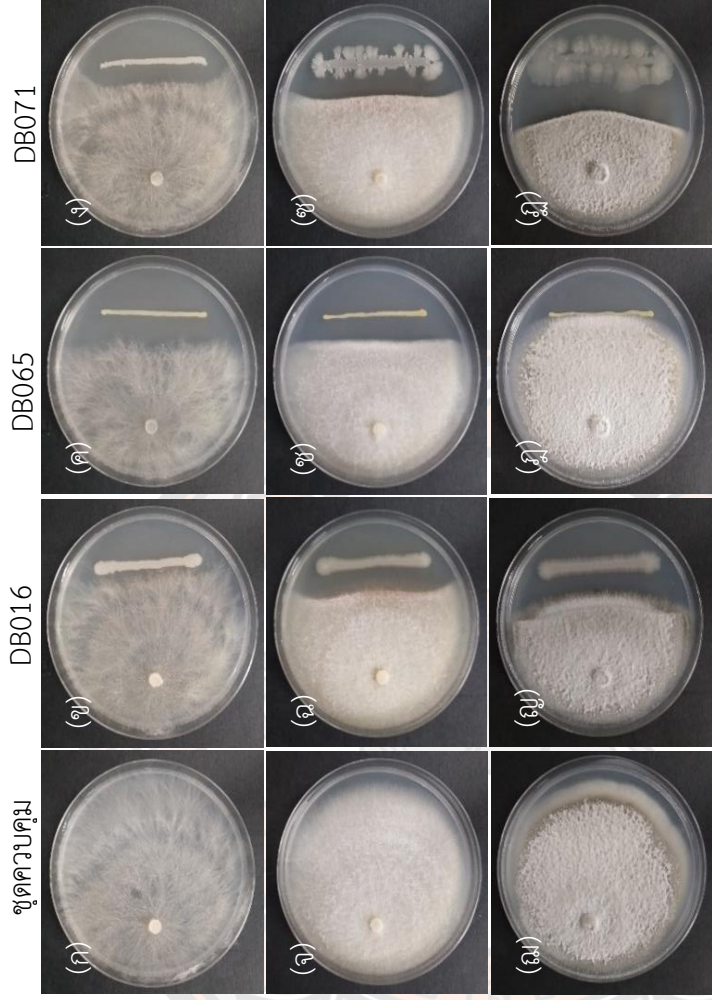
5. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบโดยวิธี dual culture bioassay

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน (1) ผลการทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว (2) (ตาราง 3) และความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการผลิต IAA (3) (ตาราง 4-5) มาทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราโดยวิธี dual culture bioassay พบว่า เพอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราจากแบคทีเรียไฮโซเลต DB065, DB041 และ DB071 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* 1406 ได้เท่ากับ 42.67 ± 2.75 , 38.58 ± 1.02 และ 37.61 ± 1.02 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียไฮโซเลต DB071, DB065 และ DB016 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium* sp. FB3-3 ได้เท่ากับ 43.05 ± 0.32 , 38.72 ± 0.52 และ 29.71 ± 0.78 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และแบคทีเรียไฮโซเลต DB071, DB051 และ DB016 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 ได้เท่ากับ 54.92 ± 0.45 , 45.66 ± 0.79 และ 41.12 ± 2.26 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 5, ภาพ 15)

ตาราง 5 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบโดยวิธี dual culture

ไฮโซเลต	เพอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา*		
	<i>Rhizoctonia solani</i> 1406	<i>Fusarium</i> sp. FB3-3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> DBCS-01
DB016	31.41 ± 1.70^c	29.71 ± 0.78^c	41.12 ± 2.26^b
DB021	2.56 ± 4.43^d	0.00 ± 0.00^g	5.87 ± 3.54^f
DB035	36.53 ± 2.25^b	20.59 ± 2.61^e	27.89 ± 1.78^c
DB041	38.58 ± 1.02^b	22.56 ± 0.32^d	14.34 ± 7.73^{de}
DB044	28.61 ± 0.79^c	10.09 ± 0.35^f	12.19 ± 0.82^e
DB051	31.00 ± 0.33^c	28.27 ± 0.95^c	45.66 ± 0.79^b
DB065	42.67 ± 2.75^a	38.72 ± 0.52^b	18.29 ± 1.20^d
DB071	37.61 ± 1.02^b	43.05 ± 0.32^a	54.92 ± 0.45^a

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P < 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test



Rhizoctonia solani

Fusarium sp. FB3-3

Colletotrichum gloeosporioides
DBCS-01

ภาพ 15 ความสามารถของแมคทีเรียในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

ก-ง: การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizoctonia solani* 1406 บนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 4 วัน

จ-ช: การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Fusarium* sp. FB3-3 บนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 10 วัน

ฉ-ฎ: การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 บนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 14 วัน

6. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบโดยวิธี agar well diffusion

จากการนำน้ำเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว 5 ชนิด (สูตร T1, T2, T3, NB และ LB) มาทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* 1406, *Fusarium* sp. FB3-3 และ *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 พบว่าน้ำเลี้ยงของแบคทีเรียไอโซเลต DB071 ในอาหารเหลวสูตร T2 เพียงชนิดเดียวที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* 1406 ได้ โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเท่ากับ 21.15 ± 0.29 มิลลิเมตร ในขณะที่ชุดควบคุม (cycloheximide ความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อดิสก์) มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเท่ากับ 20.80 ± 0.72 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ 16)

เมื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium* sp. FB3-3 และ *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 ด้วยการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราเพื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าน้ำเลี้ยงจากไอโซเลต DB071 ในอาหารสูตร T2 มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium* sp. FB3-3 สูงที่สุด เท่ากับ 18.53 ± 0.87 มิลลิเมตร รองลงมาคือ น้ำเลี้ยงจากไอโซเลต DB016 ในอาหารสูตร T2 มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา เท่ากับ 18.25 ± 0.38 มิลลิเมตร (ภาพ 17) นอกจากนี้พบว่า น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB016 ในอาหารสูตร T2 มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 ได้ดีที่สุด เท่ากับ 25.23 ± 0.40 มิลลิเมตร (ตาราง 6, ภาพ 18)



ภาพ 16 วงใสยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* 1406

โดยวิธี agar well diffusion

ก) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB071 อาหารเหลวสูตร T2

ข) ชุดควบคุม (cycloheximide ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อดิสก์)

ตาราง 6 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราโดยวิธี agar well diffusion

น้ำเลี้ยง ^f		เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (มิลลิเมตร) ^{¥, €}		
		<i>Rhizoctonia solani</i> 1406	<i>Fusarium</i> sp. FB3-3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> DBCS-01
DB016	(T1)	0.00±0.00	17.10±0.72 ^b	23.63±0.93 ^{ab}
	(T2)	0.00±0.00	18.25±0.38 ^{ab}	25.23±0.40 ^a
	(T3)	0.00±0.00	0.00±0.00	12.33±0.40 ^{ij}
	(LB)	0.00±0.00	0.00±0.00	11.57±0.31 ^j
	(NB)	0.00±0.00	0.00±0.00	14.27±1.67 ^{gh}
DB021	(T1)	0.00±0.00	0.00±0.00	23.73±0.58 ^{ab}
	(T2)	0.00±0.00	0.00±0.00	17.83±1.37 ^{ef}
DB051	(T1)	0.00±0.00	0.00±0.00	23.82±0.53 ^{ab}
	(T2)	0.00±0.00	0.00±0.00	21.05±0.40 ^c
	(T3)	0.00±0.00	0.00±0.00	13.77±1.21 ^{hi}
DB071	(T1)	0.00±0.00	17.33±0.15 ^b	23.17±0.40 ^b
	(T2)	21.15±0.29 ^a	18.53±0.87 ^a	23.97±1.40 ^{ab}
	(T3)	0.00±0.00	0.00±0.00	19.97±1.59 ^{cd}
	(LB)	0.00±0.00	0.00±0.00	15.80±0.75 ^g
	(NB)	0.00±0.00	0.00±0.00	17.50±0.26 ^f
ชุดควบคุม*	-	20.80±0.72 ^a	0.00±0.00	19.20±1.10 ^{de}

หมายเหตุ: [¥]ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test

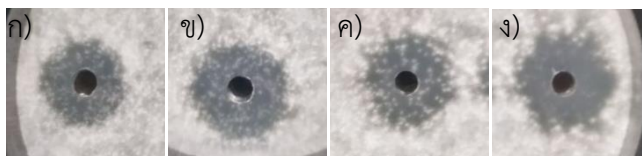
[€] บันทึกผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* 1406 ชั่วโมงที่ 96

Fusarium sp. FB3-3 และ *C. gloeosporioides* DBCS-01 ชั่วโมงที่ 48

^f T1 (Kwon and Kim, 2014), T2 (Sohn et al, 2008), T3 (Yan et al., 2016;

Li et al., 2016), NB (Guo et al., 2014) และ LB (Li et al., 2012)

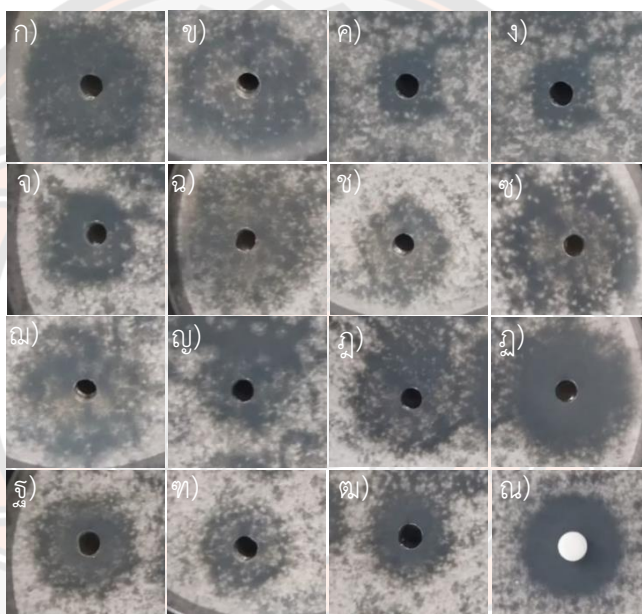
* ชุดควบคุม คือ cycloheximide ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อดิสก์



ภาพ 17 วงใสยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium* sp. FB3-3

โดยวิธี agar well diffusion

- ก) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB016 อาหารเหลวสูตร T1 ข) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB016 อาหารเหลวสูตร T2
ค) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB071 อาหารเหลวสูตร T1 ง) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB071 อาหารเหลวสูตร T2



ภาพ 18 วงใสยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01

โดยวิธี agar well diffusion

- ก) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB016 อาหารเหลวสูตร T1 ข) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB016 อาหารเหลวสูตร T2
ค) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB016 อาหารเหลวสูตร T3 ง) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB016 อาหารเหลวสูตร LB
จ) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB016 อาหารเหลวสูตร NB ฉ) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB021 อาหารเหลวสูตร T1
ช) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB021 อาหารเหลวสูตร T2 ซ) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB051 อาหารเหลวสูตร T1
ฌ) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB051 อาหารเหลวสูตร T2 ญ) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB051 อาหารเหลวสูตร T3
ฎ) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB071 อาหารเหลวสูตร T1 ฏ) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB071 อาหารเหลวสูตร T2
ฐ) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB071 อาหารเหลวสูตร T3 ท) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB071 อาหารเหลวสูตร LB
ฒ) น้ำเลี้ยงไอโซเลต DB071 อาหารเหลวสูตร NB

ณ) ชุดควบคุม (cycloheximide ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อดิสก์)

7. การจำแนกชนิด และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์

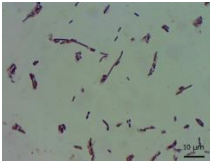
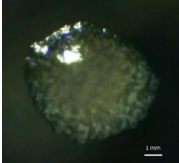

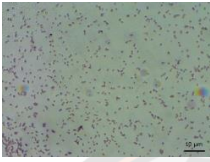
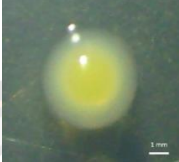
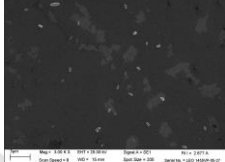
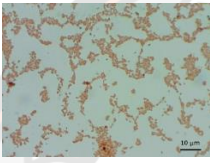
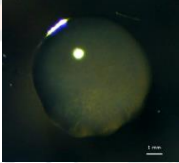
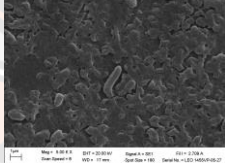
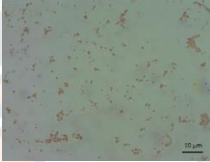
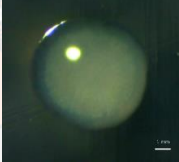
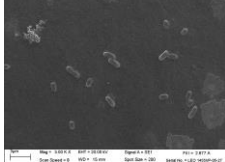
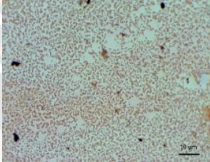
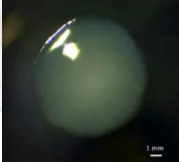
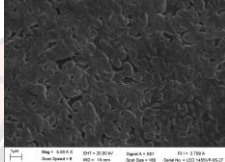
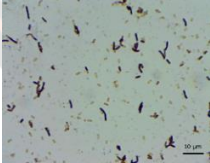
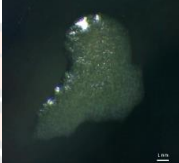
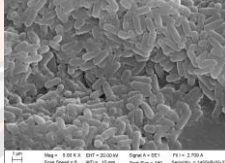
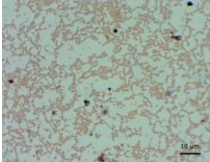

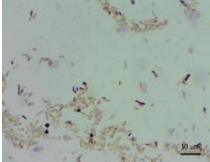
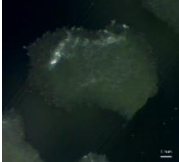
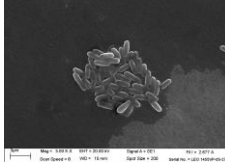
ผลจากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบ จากการทดลองที่ 2-6 พบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลต โดยแบ่งออกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต DB016, DB051 และ DB071 และแบคทีเรียแกรมลบ 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต DB021, DB035, DB041 DB044 และ DB065 เมื่อนำมาศึกษาลักษณะรูปร่างโคโลนี ลักษณะของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่า มีทั้งหมดจำนวน 4 จีโนม ได้แก่ *Bacillus*, *Microbacterium*, *Enterobacter* และ *Pseudomonas* โดยในจีโนม *Bacillus* มีจำนวน 3 ไอโซเลต คือ *Bacillus subtilis* DB016, *Bacillus siamensis* DB051 และ DB071 จีโนม *Microbacterium* มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ *Microbacterium enclense* DB021 จีโนม *Enterobacter* มีจำนวน 3 ไอโซเลต คือ *E. quasiroggkampii* DB035, *Enterobacter* sp. DB041 และ *Enterobacter* sp. DB044 และจีโนม *Pseudomonas* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ *Pseudomonas aeruginosa* DB065 ดังตาราง 7 และตาราง 8

ตาราง 7 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับเบสของยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูล EzBioCloud

ไอซีเลต	เลขทะเบียน	สายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิด	ความเหมือน (%) [*]	ความสมบูรณ์ (%)	แบคทีเรีย
DB016	ON394615	<i>Bacillus subtilis</i> strain NCIB 3610	99.86	100	<i>Bacillus subtilis</i>
DB021	ON394616	<i>Microbacterium enclense</i> strain NIO-1002	100	100	<i>Microbacterium enclense</i>
DB035	MK530207	<i>Enterobacter quasirogekampii</i> strain WCHEC1-1060	99.86	100	<i>Enterobacter quasirogekampii</i>
DB041	MK537359	<i>Enterobacter chengduensis</i> strain WCHEC1-C4	99.86	100	<i>Enterobacter</i> sp.
DB044	MK537360	<i>Enterobacter chengduensis</i> strain WCHEC1-C4	99.73	100	<i>Enterobacter</i> sp.
DB051	ON394617	<i>Bacillus siamensis</i> strain KCTC 13613	99.86	100	<i>Bacillus siamensis</i>
DB065	ON394618	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain JCM 5962	100.00	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
DB071	ON394619	<i>Bacillus siamensis</i> strain KCTC 13613	99.86	100	<i>Bacillus siamensis</i>

หมายเหตุ: * คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนจากการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล EzBioCloud

ตาราง 8 ลักษณะรูปร่างโคโลนี ลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ไอโซเลต	ย้อมสีแกรม	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะของเซลล์
DB016			
DB021			
DB035			
DB041			
DB044			
DB051			
DB065			-
DB071			

จากการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20E และแปรผลการทดลองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป apiweb™ พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต DB035, DB041 และ DB044 จัดจำแนกเป็น *Enterobacter cloacae* โดยมีเปอร์เซ็นต์การจัดจำแนก (% ID) เท่ากับ 97.7 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 9), 99.3 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 10) และ 98.6 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 11) ตามลำดับ และการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 50CH พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต DB016, DB051 และ DB071 จัดจำแนกเป็น *Bacillus subtilis/ B. amyloliquefaciens* โดยมีเปอร์เซ็นต์การจัดจำแนก (% ID) เท่ากับ 98.4 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 12), 99.9 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 13) และ 99.9 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 14) ตามลำดับ

ตาราง 9 ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย *Enterobacter* sp. DB035

Characteristics	stain DB035	Characteristics	stain DB035
Gram Test	Gram -	Tryptophan deaminase	-
Straight rod	+	Indole production	-
Endospore formation	-	Voges-Proskauer reaction	+
Motility	+	Gelatinase	-
Facultative anaerobic	+	Glucose	+
Oxidase Test	-	Mannitol	+
β -galactosidase	+	Inositol	-
Arginine-dihydrolase	+	Sorbitol	+
Lysine decarboxylase	-	Rhamnose	+
Ornithine decarboxylase	+	Sucrose	+
Citrate utilization	+	Melibiose	+
H ₂ S Production	-	Amygdalin	+
Urease	-	Arabinose	+

หมายเหตุ: จัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20E และแปรผลการทดลองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป apiweb™

ตาราง 10 ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย *Enterobacter* sp. DB041

Characteristics	stain DB041	Characteristics	stain DB041
Gram Test	Gram -	Tryptophan deaminase	-
Straight rod	+	Indole production	-
Endospore formation	-	Voges-Proskauer reaction	+
Motility	+	Gelatinase	-
Facultative anaerobic	+	Glucose	+
Oxidase Test	-	Mannitol	+
β -galactosidase	+	Inositol	-
Arginine-dihydrolase	+	Sorbitol	+
Lysine decarboxylase	-	Rhamnose	-
Ornithine decarboxylase	+	Sucrose	+
Citrate utilization	+	Melibiose	+
H ₂ S Production	-	Amygdalin	+
Urease	-	Arabinose	+

หมายเหตุ: จำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20E และแปรผลการทดลองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป apiweb™

ตาราง 11 ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย *Enterobacter sp.* DB044

Characteristics	stain DB044	Characteristics	stain DB044
Gram Test	Gram -	Tryptophan deaminase	-
Straight rod	+	Indole production	-
Endospore formation	-	Voges-Proskauer reaction	+
Motility	+	Gelatinase	-
Facultative anaerobic	+	Glucose	-
Oxidase Test	-	Mannitol	+
β -galactosidase	+	Inositol	-
Arginine-dihydrolase	+	Sorbitol	+
Lysine decarboxylase	-	Rhamnose	+
Ornithine decarboxylase	+	Sucrose	+
Citrate utilization	+	Melibiose	+
H ₂ S Production	-	Amygdalin	+
Urease	-	Arabinose	+

หมายเหตุ: จำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20E และแปรผลการทดลองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป apiweb™

ตาราง 12 ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. DB016

Characteristics	stain DB016	Characteristics	stain DB016
Gram Test	Gram +	Amygdaline	-
Straight rod	+	Arbutine	+
Endospore formation	+	Esculine	+
Motility	+	Salicine	+
Facultative anaerobic	+	Cellubiose	+
Glycerol	+	Maltose	+
Erythritol	-	Lactose	-
D-Arabinose	-	Melibiose	+
L-Arabinose	+	Saccharose	+
Ribose	+	Trehalose	+
D-Xylose	+	Inuline	+
L-Xylose	-	Melezitose	-
Adonitol	-	D-Raffinose	+
β -methyl-xyloside	-	Amidon	+
Galactose	-	Glycogene	+
D-Glucose	+	Xylitol	-
D-Fructose	+	β -Gentiobiose	-
D-Manose	+	D-Turanose	+
L-Sorbose	-	D-Lyxose	-
Rhamnose	-	D-Tagatose	-
Dulcitol	-	D-Fucose	-
Inosital	+	L-Fucose	-
Manitol	+	D-arabitol	-
Sorbitol	+	L-arabitol	-
α -methyl-D-Mannoside	-	Gluconate	-
α -methyl-D-Glucoside	+	2-ceto-gluconate	-
NAcetyl glucosamine	+	5-ceto-gluconate	-

หมายเหตุ: จำแนกด้วยชุดทดสอบ API 50CH และแปลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป apiweb™

ตาราง 13 ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. DB051

Characteristics	stain DB051	Characteristics	stain DB051
Gram Test	Gram +	Amygdaline	+
Straight rod	+	Arbutine	+
Endospore formation	+	Esculine	+
Motility	+	Salicine	+
Facultative anaerobic	+	Cellubiose	+
Glycerol	+	Maltose	+
Erythritol	-	Lactose	+
D-Arabinose	-	Melibiose	+
L-Arabinose	+	Saccharose	-
Ribose	+	Trehalose	+
D-Xylose	+	Inuline	-
L-Xylose	-	Melezitose	-
Adonitol	-	D-Raffinose	+
β -methyl-xyloside	-	Amidon	-
Galactose	-	Glycogene	-
D-Glucose	+	Xylitol	-
D-Fructose	+	β -Gentiobiose	-
D-Manose	+	D-Turanose	+
L-Sorbose	-	D-Lyxose	-
Rhamnose	-	D-Tagatose	-
Dulcitol	-	D-Fucose	-
Inosital	+	L-Fucose	-
Manitol	+	D-arabitol	-
Sorbitol	+	L-arabitol	-
α -methyl-D-Mannoside	-	Gluconate	-
α -methyl-D-Glucoside	+	2-ceto-gluconate	-
NAcetyl glucosamine	-	5-ceto-gluconate	-

หมายเหตุ: จำแนกด้วยชุดทดสอบ API 50CH และแปลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป apiweb™

ตาราง 14 ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. DB071

Characteristics	stain DB071	Characteristics	stain DB071
Gram Test	Gram +	Amygdaline	+
Straight rod	+	Arbutine	+
Endospore formation	+	Esculine	+
Motility	+	Salicine	-
Facultative anaerobic	+	Cellubiose	+
Glycerol	+	Maltose	+
Erythritol	-	Lactose	+
D-Arabinose	-	Melibiose	+
L-Arabinose	+	Saccharose	+
Ribose	+	Trehalose	+
D-Xylose	+	Inuline	-
L-Xylose	-	Melezitose	-
Adonitol	-	D-Raffinose	+
β -methyl-xyloside	-	Amidon	-
Galactose	-	Glycogene	-
D-Glucose	+	Xylitol	-
D-Fructose	+	β -Gentiobiose	-
D-Manose	+	D-Turanose	+
L-Sorbose	-	D-Lyxose	-
Rhamnose	-	D-Tagatose	-
Dulcitol	-	D-Fucose	-
Inosital	+	L-Fucose	-
Manitol	+	D-arabitol	-
Sorbitol	+	L-arabitol	-
α -methyl-D-Mannoside	-	Gluconate	-
α -methyl-D-Glucoside	+	2-ceto-gluconate	-
NAcetyl glucosamine	-	5-ceto-gluconate	-

หมายเหตุ: จำแนกด้วยชุดทดสอบ API 50CH และแปลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป apiweb™

จากการจำแนกชนิดด้วยการศึกษาสัณฐานวิทยา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และวิเคราะห์ ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ของพืช และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบ จึงได้คัดเลือก *Bacillus subtilis* DB016, *Microbacterium enclense* DB021 และ *Enterobacter* sp. DB041 เพื่อทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รีด้วยแบคทีเรีย เอนโดไฟต์ในระดับโรงเรือน

8. การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รีด้วยแบคทีเรีย เอนโดไฟต์ในระดับโรงเรือน

จากผลการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รีด้วย แบคทีเรียไอโซเลต DB016, DB021 และ DB041 ในระดับโรงเรือน เมื่อต้นสตรอว์เบอร์รีหลังย้าย ปลุกในกระถางอายุ 14, 28, 42, 56, 70, 84 และ 98 วัน ให้ทำการรดหัวเชื้อแบคทีเรีย จากการชั่ง น้ำหนักของสตรอว์เบอร์รี เมื่อครบระยะเวลา 112 วัน พบว่า น้ำหนักสดของต้นสตรอว์เบอร์รีของ กรรมวิธีที่ 2 มีน้ำหนักสูงสุด เท่ากับ 68.25 ± 8.02 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทดสอบและกรรมวิธีควบคุม และน้ำหนักแห้งของต้นสตรอว์เบอร์รีของกรรมวิธีที่ 2 มีน้ำหนักแห้งสูงสุดมีค่าเท่ากับ 27.75 ± 0.96 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีทดสอบ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ 1 น้ำหนักสดของรากสตรอว์เบอร์รีของ กรรมวิธีที่ 1 สูงที่สุดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 50.00 กรัม และน้ำหนักแห้งของรากสตรอว์เบอร์รีของกรรมวิธี ที่ 4 สูงที่สุดค่าเฉลี่ยเท่ากับ 32.50 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความ เชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทดสอบ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ 1 (ตาราง 15)

จากการนับจำนวนไหลพบว่า ไหลเริ่มมีการผลิตในวันที่ 14 หลังจากการย้ายลงปลูกใน กระถาง ซึ่งในวันที่ 14 และ 28 กรรมวิธีที่ 6 มีจำนวนไหลสูงสุดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.00 ไหล และเริ่ม หยุดการผลิตไหลในช่วงวันที่ 70 แต่ในขณะที่กรรมวิธีที่ 6 ยังมีการผลิตไหลในวันที่ 84 มีจำนวนไหล เฉลี่ยเท่ากับ 0.25 ไหล (ตาราง 16) ซึ่งมีจำนวนลดน้อยลงเนื่องจากระยะเวลาดังกล่าวอยู่ในช่วงเดือน ธันวาคมซึ่งเป็นช่วงที่มีเวลากลางวันสั้นกว่ากลางคืนและมีอุณหภูมิที่ต่ำ โดยปัจจัยดังกล่าวส่งผลต่อ จำนวนการผลิตไหลของสตรอว์เบอร์รี (พิทยา สรวมศิริ, 2540)

ตาราง 15 น้ำหนักสดและแห้งของต้นและรากของสตอร์วเบอร์รี่ เมื่ออายุครบ 112 วัน

กรรมวิธี*	น้ำหนัก (กรัม)*			
	ต้นสด	ต้นแห้ง	รากสด	รากแห้ง
กรรมวิธีที่ 1	13.00±0.00 ^d	8.00±0.00 ^b	50.00±5.72 ^a	31.25±6.18 ^a
กรรมวิธีที่ 2	68.25±8.02 ^a	27.75±0.96 ^a	46.25±4.50 ^a	29.00±1.41 ^{ab}
กรรมวิธีที่ 3	53.75±4.03 ^{abc}	24.50±1.29 ^a	47.00±4.32 ^a	28.75±1.50 ^{ab}
กรรมวิธีที่ 4	42.75±7.14 ^c	23.75±0.96 ^a	49.00±3.37 ^a	32.50±4.20 ^a
กรรมวิธีที่ 5	52.25±13.05 ^{abc}	23.50±3.00 ^a	32.25±5.38 ^b	22.50±2.38 ^b
กรรมวิธีที่ 6	58.00±3.74 ^{abc}	26.50±1.73 ^a	29.75±5.19 ^b	21.50±3.42 ^b
กรรมวิธีที่ 7	64.50±23.95 ^{ab}	26.50±3.32 ^a	49.00±9.56 ^a	26.50±4.73 ^{abc}
กรรมวิธีที่ 8	47.50±15.78 ^{bc}	25.50±5.51 ^a	31.00±7.16 ^b	23.25±4.72 ^{bc}

หมายเหตุ: * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test ระบุค่าที่ทำให้ตัวอักษรต่างกัน * กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกขาเชื้อ, กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016, กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021, กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041, กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ และกรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ

ตาราง 16 จำนวนไหลของต้นสตรอว์เบอร์รี่ของแต่ละกรรมวิธี

กรรมวิธี*	จำนวนวันหลังย้ายปลูกในกระถาง (วัน)*						
	14	28	42	56	70	84	
กรรมวิธีที่ 1	1.50±0.58 ^{ab}	1.00±0.00 ^b	0.25±0.50 ^c	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00	
กรรมวิธีที่ 2	1.50±0.58 ^{ab}	1.50±0.58 ^{ab}	1.25±0.50 ^a	0.25±0.50 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00	
กรรมวิธีที่ 3	1.50±0.58 ^{ab}	1.50±0.58 ^{ab}	1.00±0.00 ^{ab}	0.25±0.50 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00	
กรรมวิธีที่ 4	1.25±0.50 ^{ab}	1.50±0.58 ^{ab}	1.25±0.50 ^a	0.25±0.50 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00	
กรรมวิธีที่ 5	1.50±0.58 ^{ab}	1.50±0.58 ^{ab}	1.00±0.00 ^{ab}	1.00±0.82 ^a	1.25±0.96 ^a	0.00±0.00	
กรรมวิธีที่ 6	2.00±0.00 ^a	2.00±0.00 ^a	1.25±0.50 ^a	0.50±0.58 ^{ab}	0.75±1.50 ^{ab}	0.25±0.50	
กรรมวิธีที่ 7	1.00±0.00 ^b	1.50±0.58 ^{ab}	1.25±0.50 ^a	1.00±0.82 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00	
กรรมวิธีที่ 8	1.50±0.58 ^{ab}	1.50±0.58 ^{ab}	0.50±0.58 ^{bc}	0.25±0.50 ^{ab}	0.25±0.50 ^{ab}	0.00±0.00	

หมายเหตุ: * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test ระบุค่าที่ทำให้ตัวอักษรต่างกัน * กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกขาเชื้อ, กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016, กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021, กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041, กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ และกรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ

จากการนับจำนวนใบพบว่า จำนวนใบเริ่มมีจำนวนแตกต่างกันในวันที่ 56 โดยวันที่ 56 และ วันที่ 70 กรรมวิธีที่ 8 มีจำนวนใบสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 10.00 ± 0.00 ใบ และ 15.25 ± 0.96 ใบ ตามลำดับ วันที่ 84 กรรมวิธีที่ 3 มีจำนวนใบสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 14.75 ± 2.63 ใบ และในวันที่ 98 และ 112 กรรมวิธีที่ 8 มีจำนวนใบสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 15.50 ± 3.12 ใบ และ 19.25 ± 4.35 ใบ ตามลำดับ โดยจำนวนใบของสตรอร์วเบอร์รี่ของกรรมวิธีที่ 1 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีทดสอบ ซึ่งเห็นได้ชัดในช่วงของวันที่ 56 และ 70 เนื่องจากกรรมวิธีที่ 1 (ชุดควบคุม) ไม่มีการให้ปุ๋ย และหัวเชื้อแบคทีเรีย จึงทำให้ต้นนั้นแคระแกรนไม่เจริญเติบโต (ตาราง 17)

จากการวัดความยาวก้านใบของต้นสตรอร์วเบอร์รี่พบว่า วันที่ 14, 28 และ 42 กรรมวิธีที่ 4 มีความยาวสูงที่สุดเท่ากับ 14.25 ± 0.50 , 11.50 ± 0.41 และ 12.50 ± 0.58 เซนติเมตร ตามลำดับ วันที่ 56 กรรมวิธีที่ 5 มีความยาวสูงที่สุดเท่ากับ 11.00 ± 0.82 เซนติเมตร วันที่ 70 กรรมวิธีที่ 6 มีความยาวสูงที่สุดเท่ากับ 10.75 ± 0.87 เซนติเมตร วันที่ 84 กรรมวิธีที่ 8 มีความยาวสูงที่สุดเท่ากับ 14.00 ± 1.41 เซนติเมตร วันที่ 98 กรรมวิธีที่ 3 มีความยาวสูงที่สุดเท่ากับ 14.00 ± 0.82 เซนติเมตร และวันที่ 112 กรรมวิธีที่ 8 มีความยาวสูงที่สุดเท่ากับ 14.75 ± 2.22 เซนติเมตร (ตาราง 18)

จากการวัดความสูงทรงพุ่มของต้นสตรอร์วเบอร์รี่พบว่า วันที่ 14 กรรมวิธีที่ 3 มีความสูงที่สุดเท่ากับ 16.50 ± 0.58 เซนติเมตร วันที่ 28 กรรมวิธีที่ 2 มีความสูงที่สุดเท่ากับ 16.75 ± 0.50 เซนติเมตร วันที่ 42 กรรมวิธีที่ 4 มีความสูงที่สุดเท่ากับ 15.50 ± 0.58 เซนติเมตร วันที่ 56 กรรมวิธีที่ 5 มีความสูงที่สุดเท่ากับ 15.50 ± 1.29 เซนติเมตร วันที่ 70 กรรมวิธีที่ 6 มีความสูงที่สุดเท่ากับ 16.13 ± 0.25 เซนติเมตร วันที่ 84 กรรมวิธีที่ 8 มีความสูงที่สุดเท่ากับ 18.50 ± 1.29 เซนติเมตร วันที่ 98 กรรมวิธีที่ 5 มีความสูงที่สุดเท่ากับ 18.50 ± 3.11 เซนติเมตร และวันที่ 112 กรรมวิธีที่ 8 มีความสูงที่สุดเท่ากับ 18.25 ± 2.36 เซนติเมตร (ตาราง 19)

จากการวัดพื้นที่ใบของต้นสตรอร์วเบอร์รี่พบว่า วันที่ 14 กรรมวิธีที่ 6 มีพื้นที่ใบสูงที่สุดเท่ากับ 25.04 ± 2.21 และ 54.95 ± 2.57 ตารางเซนติเมตร วันที่ 28 กรรมวิธีที่ 2 มีพื้นที่ใบสูงที่สุดเท่ากับ 56.71 ± 4.34 ตารางเซนติเมตร วันที่ 42 กรรมวิธีที่ 6 มีพื้นที่ใบสูงที่สุดเท่ากับ 57.21 ± 3.14 ตารางเซนติเมตร วันที่ 56 กรรมวิธีที่ 5 มีพื้นที่ใบสูงที่สุดเท่ากับ 57.92 ± 2.83 ตารางเซนติเมตร วันที่ 70 กรรมวิธีที่ 7 มีพื้นที่ใบสูงที่สุดเท่ากับ 50.80 ± 3.92 ตารางเซนติเมตร วันที่ 84 และ 98 กรรมวิธีที่ 3 มีพื้นที่ใบสูงที่สุดเท่ากับ 62.81 ± 2.30 และ 61.04 ± 3.61 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ และวันที่ 112 กรรมวิธีที่ 4 มีพื้นที่ใบสูงที่สุดเท่ากับ 61.88 ± 7.52 ตารางเซนติเมตร (ตาราง 20)

ตาราง 17 จำนวนใบของต้นสตอร์วเบอร์รี่ของแต่ละกรรมวิธี

กรรมวิธี*	จำนวนวันหลังย้ายปลูกในกระถาง (ใบ)*							
	56	70	84	98	112			
กรรมวิธีที่ 1	4.25±0.50 ^d	5.50±0.58 ^f	6.00±0.00 ^c	5.75±0.50 ^d	6.75±0.50 ^b			
กรรมวิธีที่ 2	8.50±0.58 ^b	11.00±0.82 ^{cde}	13.25±1.26 ^{ab}	14.75±1.71 ^{ab}	16.75±0.96 ^a			
กรรมวิธีที่ 3	6.75±0.50 ^c	10.50±2.08 ^{de}	14.75±2.63 ^a	12.25±0.96 ^c	18.00±0.82 ^a			
กรรมวิธีที่ 4	6.75±0.96 ^c	10.00±1.41 ^e	13.00±1.86 ^{ab}	11.25±1.50 ^c	15.5±1.29 ^a			
กรรมวิธีที่ 5	9.00±0.82 ^b	12.75±1.26 ^{ab}	12.00±1.63 ^{ab}	11.75±0.96 ^c	16.25±4.43 ^a			
กรรมวิธีที่ 6	9.25±0.50 ^{ab}	12.25±0.50 ^{bcd}	12.50±1.29 ^{ab}	11.50±0.58 ^c	16.00±2.45 ^a			
กรรมวิธีที่ 7	8.75±0.50 ^b	13.25±0.96 ^a	11.00±0.82 ^b	13.00±0.82 ^{bc}	16.25±2.99 ^a			
กรรมวิธีที่ 8	10.00±0.00 ^a	15.25±0.96 ^a	12.75±3.40 ^{ab}	15.50±3.12 ^a	19.25±4.35 ^a			

หมายเหตุ: * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test ระบุค่าที่ทำให้ตัวอักษรต่างกัน * กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ, กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016, กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021, กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041, กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ และกรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ

ตาราง 18 ความยาวก้านใบของต้นสตอร์วเบอรรีของแต่ละกรรมวิธีในเวลา 112 วัน

กรรมวิธี*	จำนวนวันหลังย้ายปลูกในกระถาง (เซนติเมตร)*									
	14	28	42	56	70	84	98	112		
กรรมวิธีที่ 1	13.25±0.50 ^{bc}	11.25±0.50 ^{ab}	10.25±0.50 ^{bc}	10.00±0.82 ^{abc}	5.13±1.25 ^c	4.75±0.96 ^c	4.13±0.25 ^c	5.13±1.03 ^c		
กรรมวิธีที่ 2	13.75±0.50 ^{ab}	11.13±0.25 ^{ab}	11.00±0.00 ^b	10.25±0.50 ^{ab}	7.75±0.50 ^b	12.50±1.29 ^{ab}	13.25±1.50 ^{ab}	13.50±0.58 ^a		
กรรมวิธีที่ 3	13.25±0.50 ^{bc}	10.75±1.71 ^{ab}	11.25±0.96 ^b	8.50±1.00 ^c	7.38±0.75 ^b	12.50±0.58 ^{ab}	14.00±0.82 ^a	12.75±0.96 ^b		
กรรมวิธีที่ 4	14.25±0.50 ^a	11.50±0.41 ^a	12.50±0.58 ^a	10.75±1.71 ^a	7.75±0.29 ^b	12.25±0.50 ^b	12.5±0.58 ^{ab}	11.50±0.58 ^b		
กรรมวิธีที่ 5	13.25±0.50 ^{bc}	11.00±0.82 ^{ab}	9.50±1.00 ^c	11.00±0.82 ^a	10.25±1.32 ^a	12.75±0.50 ^{ab}	13.75±0.50 ^a	12.5±1.29 ^b		
กรรมวิธีที่ 6	13.75±0.50 ^{ab}	11.25±0.96 ^{ab}	9.50±0.58 ^c	9.75±0.96 ^{abc}	10.75±0.87 ^a	12.75±1.26 ^{ab}	11.50±1.00 ^b	11.50±0.58 ^b		
กรรมวิธีที่ 7	13.25±0.50 ^{bc}	10.75±0.87 ^{ab}	10.75±0.50 ^b	10.75±0.50 ^a	10.25±0.87 ^a	12.00±0.82 ^b	12.50±1.29 ^{ab}	12.75±1.71 ^b		
กรรมวิธีที่ 8	12.88±0.63 ^c	10.00±0.00 ^b	9.50±0.58 ^c	9.00±0.82 ^{bc}	9.62±0.48 ^a	14.00±1.41 ^a	13.75±2.06 ^a	14.75±2.22 ^a		

หมายเหตุ: * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test ระบุค่าที่ทำให้ตัวอักษรต่างกัน * กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกขาเชื้อ, กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016, กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021, กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041, กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ และกรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ

ตาราง 19 ความสูงทรงพุ่มของต้นสตอร์วเบอร์รี่ของแต่ละกรรมวิธีในเวลา 112 วัน

กรรมวิธี*	จำนวนวันหลังย้ายปลูกในกระถาง (เซนติเมตร)*										
	14	28	42	56	70	84	98	112			
กรรมวิธีที่ 1	16.00±0.00 ^{ab}	14.75±0.50 ^{cd}	15.00±0.00 ^{ab}	11.50±1.00 ^d	7.50±0.58 ^e	6.63±0.75 ^c	6.50±1.00 ^b	5.50±0.58 ^d			
กรรมวิธีที่ 2	15.75±0.50 ^{abc}	16.75±0.50 ^a	14.50±1.73 ^{abc}	13.25±0.96 ^c	12.25±0.50 ^{cd}	15.25±1.26 ^b	17.75±0.50 ^a	17.25±0.96 ^a			
กรรมวิธีที่ 3	16.50±0.58 ^a	15.50±0.58 ^{bcd}	13.50±0.58 ^{bcd}	13.25±0.50 ^c	12.00±0.00 ^d	17.50±0.58 ^a	17.50±1.29 ^a	16.00±0.82 ^{ab}			
กรรมวิธีที่ 4	15.25±0.50 ^{bc}	15.75±0.50 ^{abc}	15.50±0.58 ^a	13.75±0.50 ^{bc}	12.25±0.50 ^{cd}	16.75±0.96 ^{ab}	16.75±0.50 ^a	17.75±2.06 ^a			
กรรมวิธีที่ 5	15.75±0.50 ^{abc}	14.50±0.58 ^{cd}	14.50±1.00 ^{abc}	15.50±1.29 ^a	14.50±2.38 ^b	18.25±1.26 ^a	18.50±3.11 ^a	13.75±1.71 ^c			
กรรมวิธีที่ 6	15.00±0.82 ^c	16.00±0.41 ^{ab}	14.25±0.50 ^{abc}	15.00±0.00 ^{ab}	16.13±0.25 ^a	16.75±0.50 ^{ab}	17.00±0.82 ^a	15.00±0.82 ^{bc}			
กรรมวิธีที่ 7	16.00±0.82 ^{ab}	15.38±1.25 ^{bcd}	13.25±1.50 ^{cd}	14.50±1.00 ^{abc}	13.75±0.50 ^{bc}	17.25±1.71 ^a	17.75±1.26 ^a	17.50±1.00 ^a			
กรรมวิธีที่ 8	15.25±0.50 ^{bc}	13.25±0.96 ^e	12.5±0.96 ^d	15.00±0.82 ^{ab}	15.00±1.41 ^{ab}	18.50±1.29 ^a	16.75±1.26 ^a	18.25±2.36 ^a			

หมายเหตุ: * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test ระบุค่าที่ทำให้ตัวอักษรต่างกัน * กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ, กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016, กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021, กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041, กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ และกรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ

ตาราง 20 พื้นที่เบของต้นสตรอว์เบอร์รี่ของแต่ละกรรมวิธีในเวลา 112 วัน

กรรมวิธี*	จำนวนวันหลังย้ายปลูกในกระถาง (ตารางเซนติเมตร)*										
	14	28	42	56	70	84	98	112			
กรรมวิธีที่ 1	52.88±3.81 ^{ab}	53.29±1.44 ^a	41.54±1.78 ^c	35.50±1.86 ^e	26.40±4.04 ^d	17.75±2.38 ^d	19.56±4.85 ^b	12.63±1.52 ^a			
กรรมวิธีที่ 2	50.48±0.98 ^{abc}	56.71±4.34 ^a	49.42±4.52 ^b	46.96±3.36 ^d	39.13±6.63 ^c	49.38±5.26 ^c	56.33±2.00 ^a	50.65±1.60 ^{abc}			
กรรมวิธีที่ 3	54.94±2.60 ^a	54.96±1.79 ^a	55.25±3.22 ^a	46.88±2.98 ^d	41.83±4.23 ^{bc}	62.81±2.30 ^a	61.04±3.61 ^a	52.21±2.64 ^{ab}			
กรรมวิธีที่ 4	54.88±1.92 ^a	55.69±2.49 ^a	54.58±4.62 ^a	51.77±3.81 ^{bc}	45.11±1.07 ^{abc}	54.21±2.29 ^{bc}	60.10±1.21 ^a	61.88±7.52 ^a			
กรรมวิธีที่ 5	53.25±4.29 ^{ab}	56.59±4.06 ^a	56.29±2.70 ^a	57.92±2.83 ^a	47.09±4.28 ^{ab}	55.04±2.96 ^{bc}	61.00±8.49 ^a	51.96±2.23 ^{ab}			
กรรมวิธีที่ 6	54.95±2.57 ^a	54.88±3.85 ^a	57.21±3.14 ^a	54.91±2.50 ^{ab}	43.59±2.61 ^{bc}	50.77±4.60 ^{bc}	58.63±8.42 ^a	51.75±8.50 ^{ab}			
กรรมวิธีที่ 7	49.42±3.18 ^{bc}	53.77±3.37 ^a	56.63±0.72 ^a	54.91±1.91 ^{ab}	50.80±3.92 ^a	56.96±0.64 ^{ab}	60.29±6.63 ^a	49.25±11.94 ^{bc}			
กรรมวิธีที่ 8	46.21±1.62 ^c	42.63±4.29 ^b	45.96±4.17 ^{bc}	48.23±1.85 ^{cd}	41.58±4.96 ^{bc}	54.13±7.49 ^{bc}	52.04±9.17 ^a	40.07±10.22 ^c			

หมายเหตุ: * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test ระบุค่าที่ทำให้ตัวอักษรต่างกัน * กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ, กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกรวมกับ DB016, กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021, กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041, กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ และกรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ

จากการนับจำนวนดอกในวันที่ 42 พบว่า กรรมวิธีที่ 7 มีจำนวนดอกสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 1.25 ± 0.50 ดอก ในวันที่ 42 และวันที่ 56 กรรมวิธีที่ 8 มีจำนวนดอกสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 7.25 ± 0.96 และ 2.75 ± 1.26 ดอก ตามลำดับ วันที่ 84 กรรมวิธีที่ 6 มีจำนวนดอกสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 6.50 ± 1.29 ดอก วันที่ 98 กรรมวิธีที่ 2 มีจำนวนดอกสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 5.25 ± 1.26 ดอก และ วันที่ 112 กรรมวิธีที่ 7 มีจำนวนดอกสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 6.00 ± 2.16 ดอก (ตาราง 21)



ตาราง 21 จำนวนดอกของต้นสตอร์วเบอร์รี่ของแต่ละกรรมวิธีในเวลา 112 วัน

กรรมวิธี*	จำนวนวันหลังย้ายปลูกในกระถาง (ดอก)*					
	42	56	70	84	98	112
กรรมวิธีที่ 1	0.50±0.00	3.25±0.50 ^b	2.25±2.87	2.00±0.82 ^c	1.50±1.00 ^c	0.25±0.50 ^c
กรรมวิธีที่ 2	1.00±0.00	6.75±0.50 ^a	1.50±0.58	2.25±0.50 ^c	5.25±1.26 ^a	4.50±1.00 ^{ab}
กรรมวิธีที่ 3	1.00±0.00	6.75±0.50 ^a	2.00±1.41	4.50±0.58 ^{ab}	2.75±0.50 ^{abc}	4.00±0.82 ^{ab}
กรรมวิธีที่ 4	0.75±0.25	6.00±2.00 ^a	2.25±0.96	5.25±0.50 ^{ab}	2.25±0.50 ^{bc}	3.25±0.96 ^b
กรรมวิธีที่ 5	1.00±0.00	6.50±1.29 ^a	2.25±0.96	5.00±4.83 ^{ab}	4.25±1.89 ^{abc}	5.00±2.16 ^{ab}
กรรมวิธีที่ 6	0.75±0.50	6.00±0.82 ^a	1.00±0.50	6.50±1.29 ^a	4.25±1.71 ^{abc}	3.00±0.82 ^b
กรรมวิธีที่ 7	1.25±0.50	6.25±1.50 ^a	0.96±0.48	4.00±2.16 ^{ab}	2.50±1.29 ^{abc}	6.00±2.16 ^a
กรรมวิธีที่ 8	1.00±0.00	7.25±0.96 ^a	2.75±1.26	6.50±3.00 ^a	4.50±3.70 ^{ab}	3.50±1.91 ^b

หมายเหตุ: * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test ระบุค่าที่ทำให้ตัวอักษรต่างกัน * กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ, กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016, กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021, กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041, กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ, กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ และกรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ

บทที่ 5

บทสรุป

จากการศึกษาการคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์สำหรับการเพาะปลูกสตรอว์เบอร์รี โดยมีการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่างๆ และการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในระดับโรงเรือน โดยผู้วิจัยได้สรุปผลการทดลอง ดังนี้

สรุปผลการวิจัย

1. ในการศึกษาสามารถแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากไหลสตรอว์เบอร์รีในพื้นที่ของบ้านไร่ ไออุ่นสตรอเบอร์รีได้ทั้งหมดจำนวน 264 ไอโซเลต โดยแบ่งตามอาหาร ได้ดังนี้ อาหาร Tryptic soya agar (TSA) จำนวน 69 ไอโซเลต อาหาร King's B agar (KB) จำนวน 88 ไอโซเลต และ อาหาร Luria-Bertani agar (LB) จำนวน 107 ไอโซเลต ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวจัดอยู่ในจีนัส *Bacillus*, *Enterobacter*, *Microbacterium* และ *Pseudomonas*

2. เมื่อทำการคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสตรอว์เบอร์รีบนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium พบว่า มีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งได้ จำนวน 117 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวที่มีปริมาณการละลายฟอสเฟตมากกว่า 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนทั้งสิ้น 22 ไอโซเลต ในการศึกษาพบว่า ไอโซเลต DB021 มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 234.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ แบคทีเรียเอนโดไฟต์ดังกล่าวได้นำมาทดสอบความสามารถในการผลิต IAA พบว่าแบคทีเรียจำนวน 17 ไอโซเลต สามารถผลิต IAA ได้อยู่ในช่วง 108.74-329.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไอโซเลต DB041 สามารถผลิต IAA ได้มากที่สุดเท่ากับ 329.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. จากการศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสตรอว์เบอร์รี การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว ความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการผลิต IAA และลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน มาทำการทดสอบความสามารถการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วยวิธี dual culture bioassay พบว่า ไอโซเลต DB065 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* 1406 ได้ดีที่สุดมีค่าเท่ากับ 42.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลต DB071 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

Fusarium sp. FB3-3 และ *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 ได้ดีที่สุดมีค่าเท่ากับ 43.05 และ 54.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราจากน้ำเลี้ยงที่ได้จากแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า น้ำเลี้ยงของแบคทีเรียไอโซเลต DB071 ในอาหารเหลวสูตร T2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* 1406 และ *Fusarium* sp. FB3-3 ได้ โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเท่ากับ 21.15 และ 18.53 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าน้ำเลี้ยงไอโซเลต DB016 ในอาหารสูตร T2 มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 ได้ดีที่สุด เท่ากับ 25.23 มิลลิเมตร

4. เมื่อนำแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ มาทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้ดังนี้ คือ *Bacillus subtilis* DB016, *Bacillus siamensis* DB051, *Bacillus siamensis* DB071, *Microbacterium enclense* DB021, *Pseudomonas aeruginosa* DB065, *Enterobacter quasiroegenkampii* DB035, *Enterobacter* sp. DB041 และ *Enterobacter* sp. DB044 ซึ่งแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลตนี้ มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสตรอว์เบอร์รี และความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในสตรอว์เบอร์รี ในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับโรงเรือน

5. จากการศึกษาประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ DB016, DB021 และ DB041 ในระดับโรงเรือนพบว่า มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รี เมื่อเติมแบคทีเรียร่วมกับวัสดุปลูกและปุ๋ยเคมี สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รีได้ดีกว่าชุดควบคุม

อภิปรายผลการวิจัย

จากการแยกแบคทีเรียจากไหลสตรอว์เบอร์รี เพื่อคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสตรอว์เบอร์รีในพื้นที่ของบ้านไร่ไถ่ฮันสตรอเบอร์รี และความสามารถของแบคทีเรียในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราทดสอบ สำหรับใช้ทดสอบหัวเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในระดับโรงเรือน สามารถอภิปรายผลการวิจัยได้ดังนี้

1. แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากไหลสตรอว์เบอร์รีมีจำนวน 264 ไอโซเลต จากการคัดกรองเบื้องต้นบนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium พบว่า มีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งได้ จำนวน 117 ไอโซเลต เมื่อนำมาสังเกตลักษณะโคโลนิบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ลักษณะของโคโลนีที่ได้มีหลายลักษณะ โดยสามารถจัดเป็นกลุ่มได้ทั้งหมด 11 กลุ่ม โดยแบคทีเรียดังกล่าวจัดอยู่ในจีนัส *Bacillus*, *Microbacterium*, *Enterobacter* และ *Pseudomonas* ซึ่งมีรายงานว่าเป็นจีนัสที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

(Majeed et al., 2015; Egamberdieva et al., 2017; Barman and Dkhar, 2019) นอกจากนี้ จินัส *Bacillus* และ *Pseudomonas* ยังเป็นที่ยอมรับว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราบางชนิดและนำมาใช้ในการควบคุมโรคโดยชีววิธี (Devi et al., 2017; Xie et al., 2021) นอกจากนี้ แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชในจินัสดังกล่าวได้นำมาใช้ในการเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรในพืชปลูกได้หลายชนิดอีกด้วย

2. เมื่อคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสตรอว์เบอร์รี่พบว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง PVK ได้ทั้งหมด 117 ไอโซเลต โดยมีค่าดัชนีการละลายฟอสเฟตอยู่ในช่วง 0.99-3.33 เมื่อพิจารณาค่าดัชนีการละลายฟอสเฟตตามวิธีการคำนวณของ Ruangsanka (2014) พบว่า วิธีการดังกล่าวเป็นเพียงวิธีการอย่างง่ายเพื่อใช้คัดกรองเบื้องต้นเท่านั้น สำหรับวิธีโหมลิบดินัมบลูนั้นเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษากิจกรรมการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า *Microbacterium enclense* DB021 มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaur et al. (2011) ซึ่งรายงานว่แบคทีเรียในจินัส *Microbacterium* คือ *M. paraoxydans* ที่แยกได้จากดินรอบรากข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ดี นอกจากนี้ การศึกษาคุณสมบัติดังกล่าวพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. strains T-34, *Enterobacter* sp. strains T-41 และ *Azospirillum* sp. strains WS-1 ที่แยกได้จากบริเวณรอบรากต้นข้าวสาลีมีค่าการละลายฟอสเฟตที่สูงอยู่ระหว่าง 218.1-298.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. strains T-34 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุด (Tahir et al., 2013)

แบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตในดินได้ สามารถเปลี่ยนอินทรีย์ฟอสฟอรัส และอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปไม่เป็นประโยชน์ต่อพืชให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์โดยการสร้างเอนไซม์ Phytase, Phosphatase, Nucleotidases และ Glycerophosphatase เพื่อเปลี่ยนรูปอินทรีย์ฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปของอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่เรียกว่า ออโรฟอสเฟต (Behera et al., 2014) นอกจากนี้กลไกการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียส่วนมากจะเกิดจากการสร้างกรด และปลดปล่อยออกมาละลายฟอสเฟตในดิน โดยกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียสามารถสร้างและปลดปล่อยออกมาได้แก่ กรดฟอร์มิก อะซิติก โพรปิโอนิก แลคติก ไกลโคลิก พูมาริก และซักซินิก เป็นต้น (Gyaneshwar et al., 2002) โดยกระบวนการที่แบคทีเรียเปลี่ยนรูปฟอสเฟตให้ไปอยู่ในรูปที่ละลายได้นี้ทำให้เกิดกรดอินทรีย์ขึ้น กรดอินทรีย์จะเปลี่ยนรูปแคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO})_2$) ให้เป็นรูปโมโนและไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (HPO_4^{2-} และ H_2PO_4) ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (ธงชัย มาลา, 2546) โดยในการศึกษานี้ได้ทำการบันทึกค่า pH ของส่วนใสที่ได้หลังจากการบ่มเชื้อพบว่า มีค่า pH ลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งอาจเกิดจากแบคทีเรียปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาจากเซลล์ จากนั้นกรดอินทรีย์จะเข้าทำลายโครงสร้างของฟอสเฟตที่ถูกตรึงทำให้ฟอสเฟตเปลี่ยนรูปอยู่ในรูปที่

พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ จากค่า pH ที่ลดลงแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียอาจผลิตกรดและเกิดการละลายฟอสฟอรัสมากขึ้น ตามรายงานการศึกษาของ Banik and Dey (1982) พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus firmus* B-7650 และ B-7651 มีการผลิตกรด 2-ketogluconic, succinic และ oxalic เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว sucrose-calcium นอกจากนี้ยังมีการรายงานที่ *Enterobacter aerogenes* สามารถผลิตกรด gluconic ได้ (Stella and Halimi, 2015) จากการทดลองนี้ ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในจิ้งนัส *Bacillus* และ *Enterobacter* เหมาะสำหรับนำมาศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเนื่องจากมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตเมื่อทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ

3. จากการศึกษาเมื่อนำส่วนใสของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว Yeast Malt Broth และ Yeast Malt Broth ที่มีการเติม 0.1% L-tryptophan พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิต IAA ได้มากกว่าเมื่อเติม 0.1 % L-tryptophan ลงใน YM Broth แสดงให้เห็นว่า tryptophan มีส่วนทำให้แบคทีเรียผลิต IAA ได้ดีกว่าซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Idris et al. (2007) นอกจากนี้ Spaepen and Vanderleyden (2011) ได้สรุปไว้ว่า แบคทีเรียที่แยกจากพืชประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิต IAA ได้ โดยสารตั้งต้นที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ IAA คือ Tryptophan ดังนั้นการเพิ่ม Tryptophan ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงส่งผลทำให้แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิต IAA ได้สูงขึ้น โดยการสังเคราะห์ IAA โดยใช้ Tryptophan เป็นสารตั้งต้นมีทั้งหมด 5 วิธี จากการทดลองอาจมีการสังเคราะห์ด้วย วิธี Indole-3 pyruvate (IPA) การสังเคราะห์ IPA มีแบคทีเรียบางกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อพืชซึ่งมีความสามารถในการสังเคราะห์ IPA ได้ด้วย เช่น *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* และ *Cyanobacteria* เป็นต้น แบคทีเรียเอนโดไฟต์หลายชนิดเจริญอยู่ภายในเซลล์พืชอาศัยและผลิต IAA ทำให้รากเจริญได้ดีและช่วยเพิ่มพื้นที่รากเพื่อนำสารอาหารและแร่ธาตุในดินมาใช้ประโยชน์ (Spaepen et al., 2007) เช่น แบคทีเรีย *Enterobacter* sp. MSR1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากรากต้นอัลฟัลฟา (*Medicago sativa*) สามารถผลิต IAA ได้ (Khalifa et al., 2016) นอกจากนี้ ยังมีการรายงานที่ *Microbacterium arthrosphaerae* ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นมะเขือเทศเชอร์รี่ (*Lycopersicon esculentum*) มีความสามารถในการผลิต IAA ได้ (Zazou et al., 2016) อีกทั้ง Corretto et al. (2020) ได้มีการรายงานที่ *Microbacterium* ที่แยกได้จากพืชและสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย รวมถึงบริเวณที่ปนเปื้อนโลหะหนัก พบว่า นอกจากจะผลิต IAA ได้แล้ว *Microbacterium* หลายสายพันธุ์สามารถผลิต siderophores, ACC deaminase, และสามารถละลายฟอสเฟตได้อีกด้วย โดย *Microbacterium* ที่แยกได้จากบริเวณที่ปนเปื้อนโลหะสามารถเจริญอยู่รอดในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักได้

4. แบคทีเรียเอนโดไฟต์นอกจากมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชซึ่งเป็นกลไกทางตรงแล้ว ยังสามารถป้องกันพืชจากการทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคซึ่งเป็นกลไกทางอ้อมได้อีกด้วย (Brader et al., 2014) เมื่อทำการศึกษาศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วยวิธี dual culture bioassay พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* DB065 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* 1406 ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shanmugaiyah et al. (2010) มีรายงานว่า *P. aeruginosa* MML2212 สามารถผลิต phenazine-1-carboxamide (PCN) เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* ได้ นอกจากนี้แบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* อีกหลายชนิดยังนำมาศึกษาศึกษาการควบคุมเชื้อก่อโรคในดิน เช่น *P. aeruginosa* (GRC~1) ที่แยกเชื้อได้จากรากมันฝรั่งสามารถผลิต siderophore ชนิด hydroxamate และกรด hydrocyanic สำหรับยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ (Gupta et al., 1999) นอกจากนี้ Devi et al. (2017) ได้รายงานว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ *P. aeruginosa* AL2-14B มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* และ *Fusarium oxysporum* โดยการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค

แบคทีเรียจีนัส *Bacillus* เป็บบัคทีเรียที่มีการรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด (Ongena and Jacques, 2008) ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ด้วยวิธี agar well diffusion ผลจากการศึกษาพบว่า *Bacillus subtilis* DB016 และ *Bacillus siamensis* DB071 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium* sp. FB3-3 และ *Colletotrichum gloeosporioides* DBCS-01 ได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ โดย *Bacillus siamensis* DB071 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทดสอบทุกชนิดได้เมื่อทดสอบน้ำเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารสูตร T2 ซึ่งสูตรอาหารที่ได้คัดเลือกเพื่อนำมาใช้ในการทดสอบนั้นคัดเลือกมาจากการรายงานการผลิตสารต่างๆ โดยอาหารเหลวสูตร T1 (ภาคผนวก ก) มีการรายงานว่าเมื่อทำการเลี้ยง *Bacillus subtilis* JW1 ในอาหารเหลวสูตร T1 พบว่ามีความสามารถในการผลิต surfactin และ cyclic lipopeptide (Kwon and Kim, 2014) และ Sohn et al. (2008) ได้รายงานว่า เมื่อทำการเลี้ยง *Bacillus* sp. AT28 ในอาหารเหลวสูตร T2 (ภาคผนวก ก) พบว่าสามารถผลิตสาร macrolactins ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีคีไทด์ (Wu et al. 2021)

การผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับ *Bacillus* แต่ละสายพันธุ์ Li et al. (2016) ได้ทำการศึกษา *B. subtilis* B5 ในอาหารเหลว LB พบว่ามีการผลิตสารในกลุ่ม macrolactin ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีคีไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* และจากการศึกษา *B. subtilis* บางสายพันธุ์ พบว่ามีการผลิตสารกลุ่ม lipopeptide ได้ตั้งแต่หนึ่งชนิดขึ้นไปเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวต่างชนิดกัน (Dunlap et al., 2011; Kwon and Kim, 2014) แบคทีเรียจีนัส *Bacillus* เช่น *B. subtilis* และ *B. siamensis* รายงานว่า สามารถผลิตสารกลุ่ม

lipopeptide ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคในจิ้งนัส *Colletotrichum*, *Fusarium* และ *Rhizoctonia* ได้ (Dunlap et al., 2011; Hussain and Khan, 2021; Huang et al., 2022) ดังนั้น *Bacillus subtilis* DB016 และ *Bacillus siamensis* DB071 ควรได้รับการศึกษาและยืนยันชนิดของสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราในลำดับต่อไป

สำหรับ *Microbacterium enclense* DB021 นั้น จัดอยู่ในจิ้งนัส *Microbacterium* ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ไม่แตกต่างจาก *Bacillus subtilis* DB016 และ *Bacillus siamensis* DB071 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร T1 แบบที่เรียจิ้งนัส *Microbacterium* ได้รับการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมโดย Ouertani et al. (2020) รายงานว่ามียีนสำคัญหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับบทบาทส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การผลิตไลติกเอนไซม์รวมถึงยีนที่สังเคราะห์สารประกอบโพลีคีไทด์ แสดงให้เห็นว่า *Microbacterium enclense* DB021 อาจเป็นตัวแทนของจิ้งนัสดังกล่าวที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคพืชสำหรับสตรอว์เบอร์รี่ต่อไป

5. จากการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ จำนวน 3 โอลิโกลิต ได้แก่ *Bacillus subtilis* DB016, *Microbacterium enclense* DB021 และ *Enterobacter* sp. DB041 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รี่ในระดับโรงเรือน แสดงให้เห็นว่า กรรมวิธีที่มีการใช้วัสดุปลูกร่วมกับ DB016, วัสดุปลูกร่วมกับ DB021, วัสดุปลูกร่วมกับ DB041, วัสดุปลูกร่วมกับ DB016 และปุ๋ยสูตรเสมอ, วัสดุปลูกร่วมกับ DB021 และปุ๋ยสูตรเสมอ, วัสดุปลูกร่วมกับ DB041 และปุ๋ยสูตรเสมอ และวัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ ทำให้ต้นสตรอว์เบอร์รี่มีการเจริญเติบโตมากกว่ากรรมวิธีที่ใช้เพียงวัสดุปลูกฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจเป็นเพราะต้นสตรอว์เบอร์รี่ได้รับธาตุอาหารที่ละลายออกมาจากปุ๋ยเคมี หรือแบคทีเรียมีส่วนช่วยละลายธาตุอาหารในส่วนที่ถูกตรึงในดิน ให้ปลดปล่อยออกมาและช่วยเพิ่มธาตุอาหารที่มีประโยชน์ ทำให้พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการเจริญเติบโตได้ ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียที่นำมาศึกษาในครั้งนี้สามารถละลายฟอสเฟต และผลิต IAA ได้ จึงช่วยส่งเสริมให้รากของสตรอว์เบอร์รี่แตกแขนงมาก สามารถดูดธาตุอาหารได้มากขึ้น ผลจากการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รี่ด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์พบว่า น้ำหนักแห้งของรากกรรมวิธีที่ 4 (*Enterobacter* sp. DB041) มีน้ำหนักสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 32.50 กรัม ซึ่ง Khalifa et al. (2016) รายงานว่า การปลูกเชื้อ *Enterobacter* sp. MSR1 ร่วมกับเมล็ดถั่วลิ้นเต่า (*Pisum sativum*) สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญในส่วนของรากถั่วลิ้นเต่าได้เมื่อเปรียบเทียบความยาวรากและน้ำหนักแห้งของรากของชุดทดลองกับชุดควบคุม นอกจากนี้ de Melo Pereira et al. (2012) ระบุว่า *B. subtilis* NA-108 ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของสตรอว์เบอร์รี่เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของส่วนต่างๆ ของพืชกับชุดควบคุม และแบคทีเรียอาจเป็นส่วนหนึ่งที่เป็นปัจจัยในการทำให้ปุ๋ยเคมีเป็นประโยชน์มากขึ้น โดยช่วยละลายธาตุอาหารในปุ๋ยเคมีส่วนที่ถูกตรึงในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำทำให้พืชสามารถนำไปใช้งานได้มากขึ้น

จากผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ และในระดับโรงเรือนแสดงให้เห็นว่า แבקทีเรียเอนโตไฟต์ที่แยกได้จากไหลสตรอร์เบอร์รี่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอร์เบอร์รี่ได้ ดังนั้นผลการวิจัยครั้งนี้เป็นแนวทางในการใช้แบคทีเรียสำหรับพัฒนาเป็นต้นแบบปุ๋ยชีวภาพและสารชีวภัณฑ์เพื่อใช้ในการเพาะปลูกสตรอร์เบอร์รี่ในอนาคต และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีและปุ๋ยเคมีในการปลูกสตรอร์เบอร์รี่อีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียเพิ่มเติมก่อนนำไปทำการทดสอบในระดับภาคสนาม เช่น การทนทานต่อแสงยูวี ความร้อน การมีชีวิตรอดในดิน ความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เป็นต้น
2. ควรศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นสตรอร์เบอร์รี่เพิ่มเติม รวมถึงการใช้ส่วนผสมต่างๆ เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของหัวเชื้อ
3. ควรนำต้นสตรอร์เบอร์รี่หลังการทดสอบในระดับโรงเรือนมาทำการแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อสตรอร์เบอร์รี่ในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบในระดับโรงเรือน
4. ควรนำดินที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที มาทำการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ในดิน ก่อนทำการปลูกสตรอร์เบอร์รี่เพื่อเติมหัวเชื้อแบคทีเรียและปุ๋ยเคมี
5. ควรทำการศึกษาในระดับโรงเรือนและในระดับแปลงปลูกอย่างน้อย 3 ปี เพื่อใช้ข้อมูลที่ได้ในการตัดสินใจพัฒนาเป็นต้นแบบปุ๋ยชีวภาพและสารชีวภัณฑ์เพื่อใช้ในการเพาะปลูกสตรอร์เบอร์รี่ต่อไป

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- ไตรธานี เยี่ยมอ่อน, นันทวัน ฤทธิเดช, ประสิทธิ์ ใจศิลป์ และ โสภณ บุญลือ. (2555). การส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยด้วยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในสภาพเรือนทดลอง. วารสารแก่นเกษตร. 40(3), 185-193.
- คงกฤษ อินทแสง. (2558). การปลูกสตรอเบอรี่. เอกสารวิชาการเกษตร. ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการอาชีพการเกษตร จังหวัดกาญจนบุรี (เกษตรเกษตรที่สูง).
- คลินิกพืช กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืช และปัจจัยการผลิต สำนักวิจัย และพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1. (2562). โรคเหี่ยวสตรอเบอรี่. สืบค้นเมื่อวันที่ 4 กุมภาพันธ์ 2562 จาก <http://oard1.doa.go.th/pdf>.
- ณรงค์ชัย พิพัฒน์ธนวงศ์, เบ็ญ จาริชาติ ทองยี่น, เวช เต้จ๊ะ, สาวิตรี ทิววงศ์ และ Hiroshi Akagi. (2554). สตรอว์เบอร์รี่พันธุ์พระราชทาน 80. ข่าวสารเกษตรศาสตร์. 56(1): 22-28.
- ธงชัย มาลา. (2546). ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 300 หน้า.
- ธงชัย มาลา. (2550). ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ : เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิพนธ์ ทวีชัย. (2550). การควบคุมโรคพืชโดยวิธีธรรมชาติ. หน้า 20-24. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- พิทยา สรวมศิริ. (2540). การตอบสนองของสตรอเบอรี่พันธุ์ไทโอแก้วต่อ อุณหภูมิ, จิบเบอเรลลิก แอซิด และเอทธิฟอน. วารสารเกษตร. 13(3): 201-208.
- พีรเดช ทองอำไพ. (2529). ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มนตรี แสนสุข. (2559). สตรอเบอรี่ พันธุ์พระราชทาน 80. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : นานาสำนักรพิมพ์.
- ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี, อัจฉรา เฟื่องหนู, มานะ กาญจนมณีเสถียร, วิวัฒน์ พิษญากร และจารุณี หนูมาก. (2554). การพัฒนาเชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์ในรูปแบบเจลปิดที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์นานและสลายตัวทางชีวภาพเพื่อใช้ควบคุมโรคพืช. รายงานวิจัย. คณะเกษตรศาสตร์และคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. (2560). ราบปฏิบักร์สำหรับควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน: มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ตีพิมพ์ครั้งที่ 1:212.

- สุภาพร จันรุ่งเรือง, เบญจมาศ รสโสภา และกรรณิการ์ สัจจาพันธ์. (2553). ผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี2. วิทยาลัยการศึกษาด้านการเกษตร. 8(1), 1-14.
- สุรางคณา ไม้ตราวัฒนา. (2557). สตรอร์วเบอร์รี่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักงานทรัพย์สินส่วนพระมหากษัตริย์.
- Afzal, I., Iqar, I., Shinwari, Z. K., & Yasmin, A. (2017). Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L. *Plant Growth Regulation*, 81(3), 399-408.
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.
- Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 160-167.
- Amaresan, N., Jayakumar, V., Kumar, K., & Thajuddin, N. (2012). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annum*) seedling growth. *Annals of Microbiology*, 62(2), 805-810.
- Banik, S., & Dey, B. K. (1982). Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. *Plant and Soil*, 69(3), 353-364.
- Barman, D., & Dkhar, M. S. (2019). Plant Growth-Promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Costus speciosus* in tropical deciduous forest of eastern Himalaya. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89(3), 841-852.
- Behera, B. C., Singdevsachan, S. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 97-110.

- Berg, G., & Hallmann, J. (2006). Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In *Microbial root endophytes* (pp. 53-69). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Biswas, M. K., Islam, R., & Hossain, M. (2007). Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus culture. *Plant cell, tissue and organ culture*, 90(1), 49-54.
- Borah, M., Das, S., Bora, S. S., Boro, R. C., & Barooah, M. (2021). Comparative assessment of multi-trait plant growth-promoting endophytes associated with cultivated and wild *Oryza* germplasm of Assam, India. *Archives of Microbiology*, 203(5), 2007-2028.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 30-37.
- Campodónico, V. L., Llosa, N. J., Grout, M., Döring, G., Maira-Litrán, T., & Pier, G. B. (2010). Evaluation of flagella and flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccines. *Infection and Immunity*, 78(2), 746-755.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S., & Chet, I. (1995). Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1720-1726.
- Cohn, F. (1872). Untersuchungen über Bakterien. Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 1 Heft 2.
- Collins, H. M. (1983). An empirical relativist programme in the sociology of scientific knowledge.
- Corretto, E., Antonielli, L., Sessitsch, A., Höfer, C., Puschenreiter, M., Widhalm, S., ... & Brader, G. (2020). Comparative genomics of *Microbacterium* species to reveal diversity, potential for secondary metabolites and heavy metal resistance. *Frontiers in Microbiology*, 1869.
- Cossus, L., Roux-Dalvai, F., Kelly, I., Nguyen, T. T. A., Antoun, H., Droit, A., & Tweddell, R. J. (2021). Interactions with plant pathogens influence lipopeptides production and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strain PTB185. *Biological Control*, 154, 104497.

- Cottyn, B., Debode, J., Regalado, E., Mew, T. W., & Swings, J. (2009). Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(3), 885-897.
- Cui, L., Yang, C., Wei, L., Li, T., & Chen, X. (2020). Isolation and identification of an endophytic bacteria *Bacillus velezensis* 8-4 exhibiting biocontrol activity against potato scab. *Biological Control*, *141*, 104156.
- Dadarwal, K. R. (1997). *Biotechnological approaches in soil microorganisms for sustainable crop production*. Scientific publishers.
- de Curtis, F., Lima, G., Vitullo, D., & De Cicco, V. (2010). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* on tomato by delivering antagonistic bacteria through a drip irrigation system. *Crop Protection*, *29*(7), 663-670.
- de Melo Pereira, G. V., Magalhães, K. T., Lorenzetii, E. R., Souza, T. P., & Schwan, R. F. (2012). A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. *Microbial ecology*, *63*(2), 405-417.
- Devi, K. A., Pandey, G., Rawat, A. K. S., Sharma, G. D., & Pandey, P. (2017). The endophytic symbiont—*Pseudomonas aeruginosa* stimulates the antioxidant activity and growth of *Achyranthes aspera* L. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1897.
- Dias, A. C., Costa, F. E., Andreote, F. D., Lacava, P. T., Teixeira, M. A., Assumpção, L. C., ... & Melo, I. S. (2009). Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(2), 189-195.
- Dunlap, C. A., Schisler, D. A., Price, N. P., & Vaughn, S. F. (2011). Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of Fusarium head blight. *The Journal of Microbiology*, *49*(4), 603-609.
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Shurigin, V. V., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2017). Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1887.

- Ehrenberg, C. (1834). Dritter Beitrag zur Erkenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. *Berlin: Konigl. Akad. d. Wiss.*, 1833, 145-336.
- El-Deeb, B., Bazaid, S., Gherbawy, Y., & Elhariry, H. (2012). Characterization of endophytic bacteria associated with rose plant (*Rosa damascena trigintipeta*) during flowering stage and their plant growth promoting traits. *Journal of Plant Interactions*, 7(3), 248-253.
- El-Hassan, S. A., & Gowen, S. R. (2006). Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. *Journal of Phytopathology*, 154(3), 148-155.
- Eljounaidi, K., Lee, S. K., & Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—review and future prospects. *Biological Control*, 103, 62-68.
- Erturk, Y., Ercisli, S., & Cakmakci, R. (2012). Yield and growth response of strawberry to plant growth-promoting rhizobacteria inoculation. *Journal of plant nutrition*, 35(6), 817-826.
- Esitken, A., Yildiz, H. E., Ercisli, S., Donmez, M. F., Turan, M., & Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia horticulturae*, 124(1), 62-66.
- Fouda, A., Eid, A. M., Elsaied, A., El-Belely, E. F., Barghoth, M. G., Azab, E., ... & Hassan, S. E. D. (2021). Plant growth-promoting endophytic bacterial community inhabiting the leaves of *Pulicaria incisa* (Lam.) DC inherent to arid regions. *Plants*, 10(1), 76.
- Frankenberger, W. T., & Arshad, M. (2020). *Phytohormones in soils: microbial production and function*. CRC Press.
- Freeman, S., and Katan, T. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology*, 87, 516-521.

- Gerke, J. (1992). Phosphate, aluminium and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 155(4), 339-343.
- Gordon, R. E. (2019). *The genus bacillus* (pp. 65-82). CRC Press.
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192.
- Guo, Q., Dong, W., Li, S., Lu, X., Wang, P., Zhang, X., ... & Ma, P. (2014). Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiological Research*, 169(7-8), 533-540.
- Gupta, C. P., Sharma, A., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* (GRC~ 1) as a strong antagonist of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum*. *CYTOBIOS-CAMBRIDGE-*, 183-189.
- Gyaneshwar, P., Naresh Kumar, G., Parekh, L. J., & Poole, P. S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and soil*, 245(1), 83-93.
- Hallmann, J., & Berg, G. (2006). Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. *Microbial Root Endophytes*, 15-31.
- Hallmann, J., & Berg, G. (2006). Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. In *Microbial root endophytes* (pp. 15-31). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian journal of microbiology*, 43(10), 895-914.
- Harrison, L., Teplow, D. B., Rinaldi, M., & Strobel, G. (1991). Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity. *Microbiology*, 137(12), 2857-2865.
- Hormaeche, E., & Edwards, P. R. (1960). A proposed genus Enterobacter. *International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy*, 10(2), 71-4.

- Huang, Y., Zhang, X., Xu, H., Zhang, F., Zhang, X., Yan, Y., ... & Liu, J. (2022). Isolation of lipopeptide antibiotics from *Bacillus siamensis*: A potential biocontrol agent for *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 99(999), 1-9.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Van Montagu, M., & Kellenberger, E. (1994). Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *Journal of bacteriology*, 176(7), 1913-1923.
- Hussain, T., & Khan, A. A. (2021). Biocontrol prospective of *Bacillus siamensis*-AMU03 against Soil-borne fungal pathogens of potato tubers. *Indian Phytopathology*, 1-11.
- Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., & Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(6), 619-626.
- Jabborova, D., Annapurna, K., Fayzullaeva, M., Sulaymonov, K., Kadirova, D., Jabbarov, Z., & Sayyed, R. Z. (2020). Isolation and characterization of endophytic bacteria from ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Ann. Phytomed*, 9, 116-121.
- Jasim, B., Jimtha, C.J., Jyothis, M. and Radhakrishnan, E.K. (2013). Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*. *Plant Growth Regulation*, 71(1), 1-11.
- Jasim, B., Joseph, A. A., John, C. J., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. *3 Biotech*, 4(2), 197-204.
- Jeong, H., Choi, S. K., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2014). Genome sequence of the plant endophyte *Bacillus pumilus* INR7, triggering induced systemic resistance in field crops. *Genome announcements*, 2(5).
- Ji, S. H., Gururani, M. A., & Chun, S. C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological research*, 169(1), 83-98.

- Jumpathong, J., Nuengchamnong, N., Masin, K., Nakaew, N., & Suphrom, N. (2019). Thin layer chromatography-bioautography assay for antibacterial compounds from *streptomyces* sp. TBRC 8912, a newly isolated actinomycin D producer. *Chiang Mai Journal of Science*, *46*, 839-849.
- Kaur, G., Kaur, J., Dadhich, S., & Cameotra, S. (2011). Phosphate solubilizing bacteria *Microbacterium paraoxydans* isolated from the rhizospheric system of wheat (*Triticum aestivum*). *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research*, *12*, 157-168.
- Khalifa, A. Y., Alsyeeh, A. M., Almalki, M. A., & Saleh, F. A. (2016). Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *23*(1), 79-86.
- Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., ... & Lee, I. J. (2014). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology*, *52*(8), 689-695.
- Khan, M., Salman, M., Jan, S. A., & Shinwari, Z. K. (2021). Biological control of fungal phytopathogens: A comprehensive review based on *Bacillus* species. *MOJ Biology and Medicine*, *6*, 90-92.
- Khleekorn, S., & Wongrueng, S. (2014). Evaluation of antagonistic bacteria inhibitory to *Colletotrichum musae* on banana. *J. Agric. Technol*, *10*(2), 383-390.
- Kobayashi, D. Y., & Palumbo, J. D. (2000). Bacterial Endophytes and Their. *Microbial endophytes*, *2000*, 99-233.
- Koike, S. and Bolda, M. (2013). *Fusarium* wilt of strawberry: second soilborne threat in California. Retrieved 6 December 2020, from <https://ucanr.edu/blogs/blog-core/posted/tail.cfm?postnum=11101>.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W. L., Mendes, R., Geraldi, I. O., Pizzirani-Kleiner, A. A., & Azevedo, J. L. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental microbiology*, *6*(12), 1244-1251.

- Kwon, J. W., & Kim, S. D. (2014). Characterization of an antibiotic produced by *Bacillus subtilis* JW-1 that suppresses *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 13-18.
- Li, L., Ma, M., Huang, R., Qu, Q., Li, G., Zhou, J., ... & Luo, J. (2012). Induction of chlamydospore formation in *Fusarium* by cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* C2. *Journal of Chemical Ecology*, 38(8), 966-974.
- Li, W., Tang, X. X., Yan, X., Wu, Z., Yi, Z. W., Fang, M. J., ... & Qiu, Y. K. (2016). A new macrolactin antibiotic from deep sea-derived bacteria *Bacillus subtilis* B5. *Natural Product Research*, 30(24), 2777-2782.
- Ludueña, L. M., Anzuay, M. S., Angelini, J. G., McIntosh, M., Becker, A., Rupp, O., ... & Taurian, T. (2018). Strain Serratia sp. S119: A potential biofertilizer for peanut and maize and a model bacterium to study phosphate solubilization mechanisms. *Applied Soil Ecology*, 126, 107-112.
- Maas, J. L. (1984). Compendium of strawberry diseases. St. Paul, Minnesota, USA.: *The American Phytopathological Society Press*, pp. 138.
- Majeed, A., Abbasi, M. K., Hameed, S., Imran, A., & Rahim, N. (2015). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology*, 6, 198.
- Marten, P., Brückner, S., & Lüth, P. (1999). Wachstumsförderung verschiedener Kulturpflanzen und biologische Bekämpfung phytopathogener Pilze durch *Bacillus subtilis* B2g: Plant growth promotion of different cultivated plants and biological control of soilborne phytopathogenic fungi by *Bacillus subtilis* strain B2g. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 74-81.
- Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J. D., Sánchez-Juanes, F., Rivas, R., Mateos, P. F., Santa Regina, I., ... & Velázquez, E. (2021). Identification of Canola Roots Endophytic Bacteria and Analysis of Their Potential as Biofertilizers for Canola Crops with Special Emphasis on Sporulating Bacteria. *Agronomy*, 11(9), 1796.

- Maurer, B., Muller, A., KELLERSC. W, & Zahner, H. (1968). Ferribactin a siderochrome from *Pseudomonas fluorescens* migula. *ARCHIV FUR MIKROBIOLOGIE*, 60(4), 326.
- Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future microbiology*, 7(7), 887-902.
- Miller, C. M., Miller, R. V., Garton-Kenny, D., Redgrave, B., Sears, J., Condrón, M. M., ... & Strobel, G. A. (1998). Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. *Journal of applied microbiology*, 84(6), 937-944.
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(3), 638-649.
- Montealegre, J. R., Reyes, R., Pérez, L. M., Herrera, R., Silva, P., & Besoain, X. (2003). Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(2), 115-127.
- Mukherjee, S., & Kearns, D. B. (2014). The structure and regulation of flagella in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Genetics*, 48, 319-340.
- Murphy, J. A. M. E. S., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31-36.
- Nahas, E. (1996). Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(6), 567-572.
- Odum, E. P. (1953). Fundamentals of ecology. xii, 387 pp. W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, and London, England.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125.
- Orla-Jensen, S. (1919). *The lactic acid bacteria* (Vol. 3, No. 2). Høst.

- Ouertani, R., Ouertani, A., Mahjoubi, M., Bouselmi, Y., Najjari, A., Cherif, H., ... & Neifar, M. (2020). New plant growth-promoting, chromium-detoxifying *Microbacterium* species isolated from a tannery wastewater: performance and genomic insights. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 521.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens.
- Quambusch, M., Pirttilä, A. M., Tejesvi, M. V., Winkelmann, T., & Bartsch, M. (2014). Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy-and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. *Tree Physiology*, 34(5), 524-533.
- Rashid, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied soil ecology*, 61, 217-224.
- Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (1998). Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in microbiology*, 6(4), 139-144.
- Rojas-Solís, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., del Carmen Rocha-Granados, M., Macías-Rodríguez, L., & Santoyo, G. (2018). *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 46-52.
- Ruangsanka, S. (2014). Identification of phosphate-solubilizing fungi from the asparagus rhizosphere as antagonists of the root and crown rot pathogen *Fusarium oxysporum*. *Science Asia*, 40(1), 16-20.
- Sakila, S., Ahmed, M. B., Roy, U. K., Biswas, M. K., Karim, R., Razvy, M. A., ... & Hoque, A. (2007). Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) a newly introduced crop in Bangladesh. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 2(2), 151-154.
- Salehrastin, N. (1999). Biological fertilizers. *Scientific Journal of Soil and Water*, 12(3).
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99.

- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological research*, 109(6), 661-686.
- Schwachtje, J., Karojet, S., Kunz, S., Brouwer, S., & van Dongen, J. T. (2012). Plant-growth promoting effect of newly isolated rhizobacteria varies between two *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Signaling & Behavior*, 7(6), 623-627.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Shanmugaiyah, V., Mathivanan, N., & Varghese, B. (2010). Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 703-711.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587.
- Sohn, M. J., Zheng, C. J., & Kim, W. G. (2008). Macrolactin S, a new antibacterial agent with Fab G-inhibitory activity from *Bacillus* sp. AT28. *The Journal of antibiotics*, 61(11), 687-691.
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(4), a001438.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), 425-448.
- Stella, M., & Halimi, M. (2015). Gluconic acid production by bacteria to liberate phosphorus from insoluble phosphate complexes. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 43(1), 41-53.
- Sujatha, N., & Ammani, K. (2013). Siderophore production by the isolates of fluorescent Pseudomonads. *International Journal of Current Research and Review*, 5(20), 1.
- Suman, A., Yadav, A. N., & Verma, P. (2016). Endophytic microbes in crops: diversity and beneficial impact for sustainable agriculture. In *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity* (pp. 117-143). Springer, New Delhi.

- Susilowati, A. R. I., Wahyudi, A. T., Lestari, Y., Suwanto, A., & Wiyono, S. (2011). Potential *Pseudomonas* isolated from soybean rhizosphere as biocontrol against soilborne phytopathogenic fungi. *HAYATI Journal of Biosciences*, 18(2), 51-56.
- Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., ... & van der Lelie, D. (2009). Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and environmental microbiology*, 75(3), 748-757.
- Tahir, M., Mirza, M. S., Zaheer, A., Dimitrov M. R., Smidt, H. and Hameed, S. (2013). Isolation and identification of phosphate solubilizer *Azospirillum*, *Bacillus* and *Enterobacter* strains by 16S rRNA sequence analysis and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 7(9), 1284-1292.
- Trevet, I.W., Hollis, J.P., (1948) Bacteria in storage organs of healthy plants. *Phytopathology*, 38, 960-967.
- Vojvodić, M., Tanović, B., Mihajlović, M., Mitrović, P., Vico, I., & Bulajić, A. (2018). Molecular identification and characterization of binucleate *Rhizoctonia* spp. associated with black root rot of strawberry in Serbia. *Pesticidii fitomedicina*, 33(2), 97-107.
- Wu, T., Xiao, F., & Li, W. (2021). Macrolactins: biological activity and biosynthesis. *Marine Life Science & Technology*, 3(1), 62-68.
- Xie, Z., Li, M., Wang, D., Wang, F., Shen, H., Sun, G., ... & Sun, X. (2021). Biocontrol efficacy of *Bacillus siamensis* LZ88 against brown spot disease of tobacco caused by *Alternaria alternata*. *Biological Control*, 154, 104508.
- Yadav, K. S., & Dadarwal, K. R. (1997). Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms. *Biotechnological approaches in soil microorganisms for sustainable crop production*, 293-308.
- Yan, X., Zhou, Y. X., Tang, X. X., Liu, X. X., Yi, Z. W., Fang, M. J., ... & Qiu, Y. K. (2016). Macrolactins from marine-derived *Bacillus subtilis* B5 bacteria as inhibitors of inducible nitric oxide and cytokines expression. *Marine Drugs*, 14(11), 195.

- Yi, H. S., Yang, J. W., & Ryu, C. M. (2013). ISR meets SAR outside: additive action of the endophyte *Bacillus pumilus* INR7 and the chemical inducer, benzothiadiazole, on induced resistance against bacterial spot in field-grown pepper. *Frontiers in plant science*, 4, 122.
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 138-145.
- Zazou, K., Tifrit, A., Chama, Z., Kaldi, A., Tounssi, S., & Abbouni, B. (2016). Isolation and characterization of *Microbacterium arthrosphaerae* and its effect on tomato culture growth. *Der Pharm. Lett*, 8(8), 1-8.
- Zhang, N., Wu, K., He, X., Li, S. Q., Zhang, Z. H., Shen, B., ... & Shen, Q. R. (2011). A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. *Plant and Soil*, 344(1), 87-97.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร T1 (Kwon and Kim, 2014)

soluble starch	10	กรัม
glucose	20	กรัม
meat extract	1	กรัม
yeast extract	4	กรัม
NaCl	2	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.05	กรัม
Soybean meal	25	กรัม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันโดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 750 มิลลิลิตร คนให้ละลายจากนั้นนำไปวัดค่า pH เท่ากับ 7 ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เทใส่ภาชนะปิดฝา ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. สูตรอาหาร T2 (Sohn et al., 2008)

soluble starch	10	กรัม
glucose	20	กรัม
beef extract	1	กรัม
yeast extract	4	กรัม
NaCl	2	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.25	กรัม
Soybean meal	25	กรัม
CaCO ₃	2	กรัม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันโดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 750 มิลลิลิตร คนให้ละลายจากนั้นนำไปวัดค่า pH เท่ากับ 7 ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เทใส่ภาชนะปิดฝา ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3. สูตรอาหาร T3 (Yan et al., 2016; Li et al., 2012)

soluble starch	5	กรัม
yeast extract	10	กรัม
K ₂ HPO ₄	10	กรัม
NaNO ₃	5	กรัม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันโดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 750 มิลลิลิตร คนให้ละลายจากนั้นนำไปวัดค่า pH เท่ากับ 7 ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เทใส่ภาชนะปิดฝา ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

4. สูตรอาหาร Pilkovskaya's (PVK) medium (Pikovskaya, 1948; Nautiyal, 1999)

Glucose	10	กรัม
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	กรัม
NaCl	0.2	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O,	0.1	กรัม
KCl	0.2	กรัม
yeast extract	0.5	กรัม
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.002	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.002	กรัม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันโดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 750 มิลลิลิตร คนให้ละลายจากนั้นนำไปวัดค่า pH เท่ากับ 7 ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เทใส่ภาชนะปิดฝา ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี

1. Salkowski's reagent (2% 0.5M FeCl₃ in 35% HClO₄ solution) (Gordon and Weber, 1951)

35 % HClO ₄	50	มิลลิลิตร
0.5M FeCl ₃	1	มิลลิลิตร

สารละลาย ferric chloride 0.5 M ได้โดยใช้สูตร molarity

น้ำหนักโมเลกุล (MW.) =162, molarity (M) =0.5, ปริมาตร (V) =100 มิลลิลิตร

สูตร

$$\frac{g \times 1000 \text{ ml}}{\text{MW}} = M \times V$$

$$g = \frac{(0.5M \times 100 \text{ ml}) \times 162 \text{ g}}{1000\text{ml}}$$

$$g = 8.10 \text{ g}$$

ชั่ง FeCl₃ จำนวน 8.10 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 75 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย 35% perchloric (HClO₄)

ตวง 70 % HClO₄ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเทน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร และเทกรดลงให้น้ำกลั่นเทเข้าๆและคนจนกว่าจะครบ 50 มิลลิลิตร

หมายเหตุ: ต้องเตรียมสารละลายใน Hood และการเตรียมต้องเทกรดใส่ น้ำ ใช้ภาชนะที่บรรจุควรเป็นขวดสีชาห่อด้วยฟอยด์ เก็บในตู้เย็น และการเตรียมแต่ละครั้งไม่ควรเตรียมเกิน 24 ชั่วโมง

2. การเตรียมน้ำยาฟันท Anisaldehyde-sulfuric reagent

1. สารเคมีและปริมาณที่ใช้

methanol (AR)	85	มิลลิลิตร
acetic acid	10	มิลลิลิตร
sulphuric acid	5	มิลลิลิตร
anisaldehyde	0.5	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายโดยการผสม Methanol ปริมาตร 85 มิลลิลิตร กับ acetic acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติม sulphuric acid ลงไป ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม Anisaldehyde sulfuric reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3. การเตรียมการสำหรับทำปฏิกิริยา (น้ำยา develop สี)

1. ชั่ง ammonium molybdate 2.4 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
2. ชั่ง potassium antimonyl tartrate 0.0582 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร
3. ตวง H_2SO_4 5N dilute Conc. H_2SO_4 ปริมาตร 27.8 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร
4. เทสารข้อ 1 และ 2 ลงในข้อ 3 จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร
5. ชั่ง ascorbic acid จำนวน 2.112 กรัม ใส่ลงในข้อ 4 (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกา

ทดลอง)

ภาคผนวก ค การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐาน IAA (Ahmad, 2008)

1. เตรียม stock solution ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง IAA 10 มิลลิกรัม เติมเอทานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพื่อละลาย IAA จากนั้นเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย IAA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน IAA ในหลอดทดลองโดยดูด IAA จาก stock solution ดังตารางที่ 22

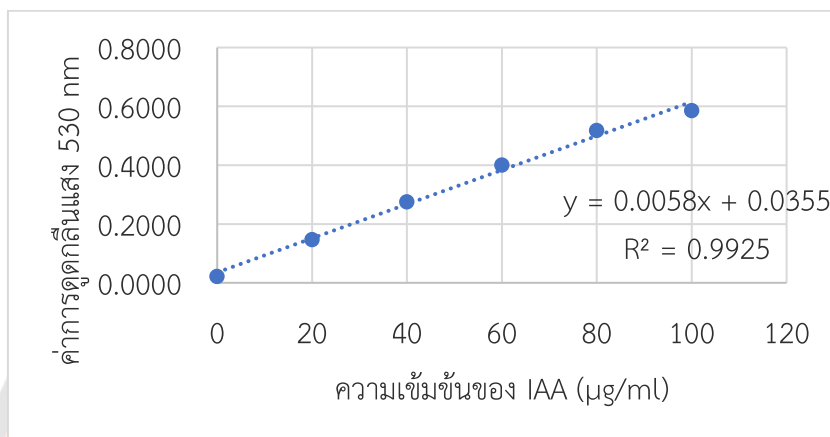
ตาราง 22 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน IAA

หลอดทดลอง	ความเข้มข้นสุดท้าย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	stock solution (มิลลิลิตร)	YM media (มิลลิลิตร)
1	0.000	0.000	5.000
2	0.020	0.100	4.900
3	0.040	0.200	4.800
4	0.060	0.300	4.700
5	0.080	0.400	4.600
6	0.100	0.500	4.500

ทำการ dilution stock IAA ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 0.000, 0.020, 0.040, 0.060, 0.080 และ 0.100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร YM โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

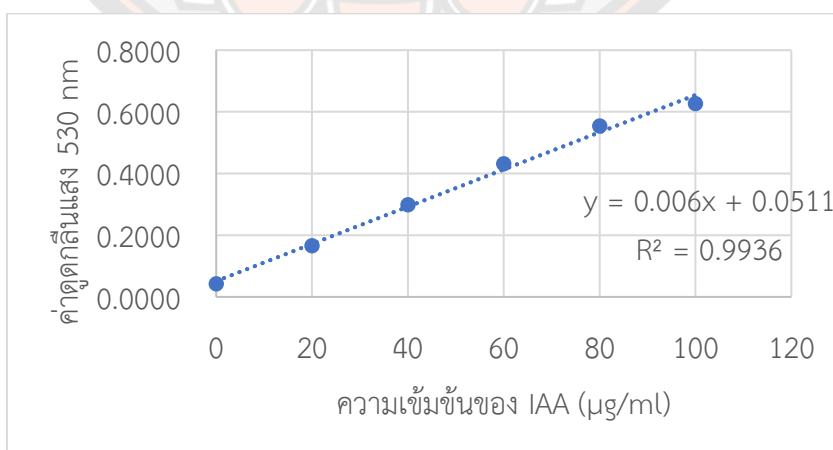
3. ปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ
4. เติม Salkowski's reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร
6. นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของ IAA ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

เมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานของ IAA ที่เลี้ยงในอาหาร YM พบว่า สมการเส้นตรง $y = 0.0058x + 0.0355$ เมื่อแกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร และแกน x คือ ความเข้มข้นของ IAA มาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนั้นเมื่อทราบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ สามารถแทนค่าลงในค่า y เพื่อคำนวณความเข้มข้นของ IAA ที่ได้ (ภาพ 19)



ภาพ 19 กราฟมาตรฐานของ IAA เลี้ยงในอาหาร YM ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานของ IAA เลี้ยงในอาหาร YM ที่มีการเติม L-tryptophan ที่ได้ พบว่า สมการเส้นตรง $y = 0.006x + 0.0511$ เมื่อแกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร และแกน x คือ ความเข้มข้นของ IAA มาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนั้นเมื่อทราบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ สามารถแทนค่าลงในค่า y เพื่อคำนวณความเข้มข้นของ IAA ที่ได้ (ภาพ 20)



ภาพ 20 กราฟมาตรฐานของ IAA เลี้ยงในอาหาร YM ที่มีการเติม L-tryptophan ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

2. วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานฟอสเฟต

1. เตรียม stock solution ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง KH_2PO_4 (ซึ่งผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง) จำนวน 0.0215 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 75 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย KH_2PO_4 ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นปิเปตสารละลาย KH_2PO_4 ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย KH_2PO_4 ที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต จาก stock solution ดังที่แสดงในตารางที่ 23

ตาราง 23 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน KH_2PO_4

Final concentration (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	Stock KH_2PO_4 5 ppm (มิลลิลิตร)	Distill water (มิลลิลิตร)	Ascorbic acid (มิลลิลิตร)
0.00	0.00	20.00	5.00
0.20	0.80	19.20	5.00
0.40	1.60	18.40	5.00
0.60	2.40	17.60	5.00
0.80	3.20	16.80	5.00
1.00	4.00	16.00	5.00

ทำการ dilution stock ฟอสเฟต ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 0.00, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการทดสอบ

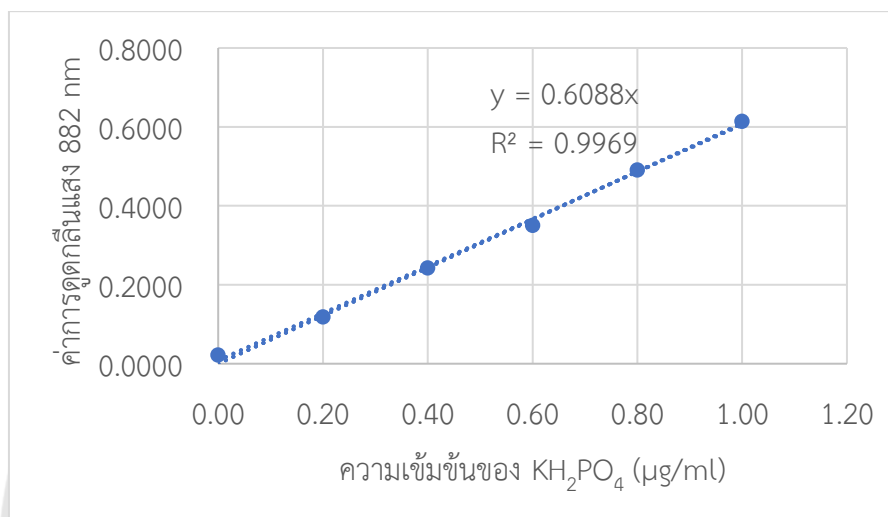
1. ปิเปตสารจาก Stock KH_2PO_4 ปริมาตร 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 23) ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมน้ำยา develop สี ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2. จากนั้นเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลายสีน้ำเงิน

3. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร

4. นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของฟอสเฟตในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานของ KH_2PO_4 ที่ได้ พบว่า สมการเส้นตรง $y = 0.6088x$ เมื่อแกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร และแกน x คือ ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 มาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนั้นเมื่อทราบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ สามารถแทนค่าลงในค่า y เพื่อคำนวณความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ได้ (ภาพ 21)



ภาพ 21 กราฟมาตรฐานของ KH_2PO_4 ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร

ภาคผนวก ง การทดสอบในระดับโรงเรียน

1. การเตรียมหัวเชื้อสำหรับทดสอบในระดับโรงเรียน

นำโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต DB016, DB021 และ DB041 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายแบคทีเรียในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยให้มีค่าความขุ่น เท่ากับ 1 (ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย เท่ากับ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) บรรจุลงในขวดย่น้ำตามปริมาณที่กำหนดในแต่ละกรรมวิธีเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การตรวจนับปริมาณของแบคทีเรีย (Colony Forming Unit; CFU)

นำหัวเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต DB016, DB021 และ DB041 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 มาตรวจนับปริมาณของแบคทีเรียด้วยวิธีการทำให้เจือจาง (Serial dilution) จากนั้นทำการเกลี่ย (Spread plate) สารละลายที่เจือจางเท่ากับ 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ลงบนอาหารแข็ง NA บนที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-96 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวน 30-300 โคโลนี และคำนวณเป็น CFU/ml

การคำนวณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในหน่วย CFU/g หรือ CFU/ml

$$\text{จากสูตร } \text{CFU/g หรือ CFU/ml} = \frac{\Sigma C}{(v_1 n_1 + 0.1 n_2) d}$$

เมื่อ ΣC = ผลรวมของโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดจากจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี

v_1 = ปริมาณของ inoculum ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

n_1 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนีในระดับความเข้มข้นแรก

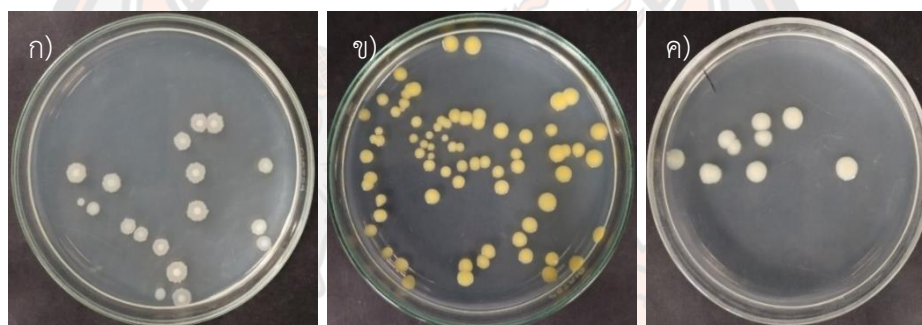
n_2 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นที่ 2

d = ระดับความเข้มข้นแรกที่สามารถนับเชื้อได้ในช่วง 30-300 โคโลนี

จากการตรวจนับปริมาณของแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียไอโซเลต DB016, DB021 และ DB041 มีปริมาณของแบคทีเรียเท่ากับ 1.76×10^8 , 2.17×10^8 และ 1.49×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตาราง 24, ภาพ 22)

ตาราง 24 การตรวจนับปริมาณของแบคทีเรีย

ไอโซเลต	ระดับความเจือจาง 10^{-5}			ค่าเฉลี่ย	ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร
	1	2	3		
DB016	164	208	156	176.00	1.76×10^8
DB021	262	145	246	217.67	2.17×10^8
DB041	117	181	148	148.67	1.49×10^8



ภาพ 22 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง NA
ก) DB016 ชั่วโมงที่ 48 ข) DB021 ชั่วโมงที่ 96 ค) DB041 ชั่วโมงที่ 48

3. การทดสอบ motility test medium

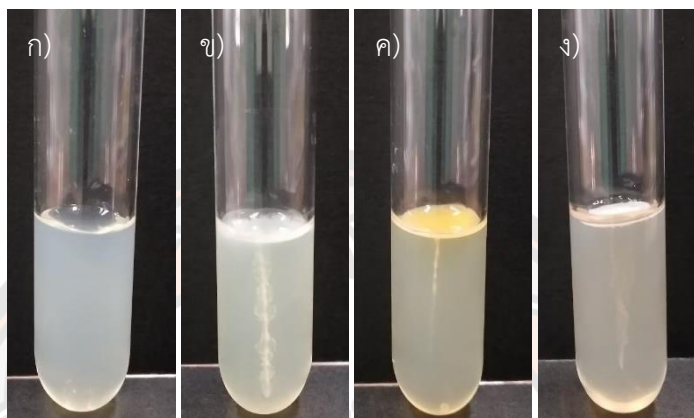
วิธีการทดสอบ

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแทงลงไปในการตรงๆ เพียงครั้งเดียว ประมาณ 2/3 ของส่วนสูงอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบ

การอ่านผล

ผลบวก คือ เห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอยเข็มแทงหรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนบริเวณรอยเข็มแทงแต่อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นกว่าเดิม และผลลบ คือ เห็นการเจริญของเชื้อโดยมีขอบเขตชัดเจนที่บริเวณรอยเข็มแทง

จากการทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียไอโซเลต DB016 และ ไอโซเลต DB041 แสดงผลเป็นบวกเนื่องจากเห็นการเจริญของเชื้อออกมากรวยเข็มแทง และ ไอโซเลต DB021 ให้ผลเป็นลบเนื่องจากเห็นการเจริญของเชื้อโดยมีขอบเขตชัดเจนที่บริเวณรอย เข็มแทง (ภาพ 23)



ภาพ 23 ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย
 ชุดควบคุม ข) แบคทีเรียไอโซเลต DB016
 ค) แบคทีเรียไอโซเลต DB021 ง) แบคทีเรียไอโซเลต DB041

4. การทดสอบการปฏิบัติของแบคทีเรีย

วิธีการทดสอบการปฏิบัติของแบคทีเรีย

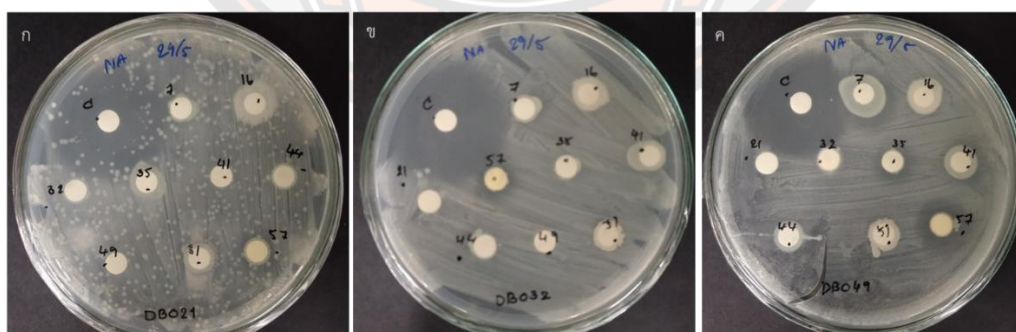
นำแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำแบคทีเรียมาทำการละลายใน 0.85% NaCl นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยให้แบคทีเรียมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.08-0.1 จากนั้นหยดสารละลายแบคทีเรียปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง NA จากนั้นเจาะรูใหม่ ทำการป้ายให้ทั่วอาหารทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หยดแบคทีเรียลงบนแผ่นดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วางลงบนอาหารอาหารแข็ง NA ที่มีการป้ายแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดบริเวณยับยั้งรอบๆ หลุม

จากการทดลองการปฏิบัติการของแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต ด้วยวิธี paper disc assay พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต DB035 ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลต DB049 และ DB057 ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลต DB021, DB032 และ DB049 (ตาราง 25, ภาพ 24)

ตาราง 25 ผลการทดสอบการปฏิบัติการของเชื้อแบคทีเรีย

ไอโซเลต	จุดควบคุม	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (มิลลิเมตร)							
		DB 007	DB 016	DB 021	DB 032	DB 035	DB 041	DB 044	DB 057
DB007	15	-	-	-	-	-	-	-	-
DB016	30	-	-	-	-	-	-	-	-
DB021	35	-	-	-	-	-	-	-	13
DB032	35	-	-	-	-	-	-	-	10
DB035	17	-	-	-	-	-	-	-	-
DB041	20	-	-	-	-	-	-	-	-
DB044	17	-	-	-	-	-	-	-	-
DB051	35	-	-	-	-	-	-	-	-
DB057	10	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: *จุดควบคุม = Chloramphenicol มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อดิสก์



ภาพ 24 การปฏิบัติการของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

- ก) การปฏิบัติการของเชื้อ DB057 ยับยั้งเชื้อ DB021 บนอาหารแข็ง NA
 ข) การปฏิบัติการของเชื้อ DB057 ยับยั้งเชื้อ DB032 บนอาหารแข็ง NA
 ค) การปฏิบัติการของเชื้อ DB057 และ DB035 ยับยั้งเชื้อ DB021 บนอาหารแข็ง NA

5. การเตรียมวัสดุปลูก

1. ชั่งวัสดุปลูกตามที่แสดงในตาราง 26

ตาราง 26 ส่วนผสมของวัสดุปลูก

วัสดุปลูก	น้ำหนัก	หน่วย
ดินจากบ้านไร่ไถอ่อนสตรอเบอร์รี่	500	กรัม
ขุยมะพร้าว	100	กรัม
ดินเพาะ	250	กรัม
พีทมอส	250	กรัม
รวม	1,100	กรัมต่อกระถาง

2. ทำการผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นบรรจุใส่ถุง โดยซ้อนถุง 2 ชั้น เพื่อป้องกันการฉีกขาด และทำการปิดปากถุง นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 2 รอบ



ดินจากไร่

ขุยมะพร้าว

ดินเพาะ

พีทมอส

ภาพ 25 วัสดุปลูก

6. ขั้นตอนการปลูกไหลสตรอว์เบอร์รี่

1. นำดินที่เตรียมไว้ใส่ลงในกระถางโดยผสมกับน้ำ จากนั้นเจาะหลุมตรงกลางกระถางสำหรับวางต้นไหลสตรอว์เบอร์รี่
2. ย้ายต้นไหลสตรอว์เบอร์รี่ลงในกระถาง กลบด้วยดินไม่ควรกดบริเวณโคนต้น จากนั้นรดน้ำปริมาณ 100 มิลลิลิตร
3. ทำการย้ายปลูก เป็นเวลา 14 วัน เพื่อเตรียมต้นไหลให้สมบูรณ์ก่อนการทำการทดลองในระดับโรงเรือน



ภาพ 26 ขั้นตอนการปลูกไหลสตรอว์เบอร์รี่

7. วิธีการเตรียมหัวเชื้อและปุ๋ยเคมี

เตรียมวัสดุและอุปกรณ์

1. การเตรียมปริมาณหัวเชื้อสำหรับรดในกระถาง 10^8 CFU/ml

เลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต DB016, DB021 และ DB041 ในอาหาร NB ปริมาตร 1,200 มิลลิลิตรต่อแบคทีเรีย 1 ไอโซเลต จากนั้นบรรจุลงในขวดยาปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 15 ขวด และปริมาตร 25 มิลลิลิตร จำนวน 15 ขวด โดยทำการเตรียมแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต (ภาพ 27)



ภาพ 27 แบคทีเรียที่ทำการบรรจุลงในขวดยา

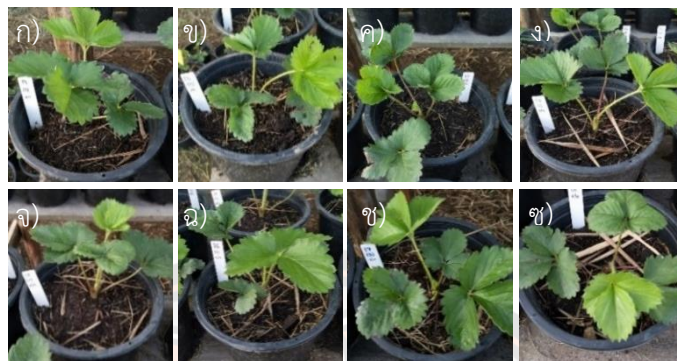
2. การเตรียมปุ๋ยสูตรเสมอ 15-15-15

ทำการชั่งปุ๋ยสูตรเสมอ 15-15-15 ใส่ลงในถุง ถุงละ 5 กรัม จำนวน 15 ถุง และ 2.5 กรัม จำนวน 15 ถุง จากนั้นปิดปากถุงให้สนิท (ภาพ 28)



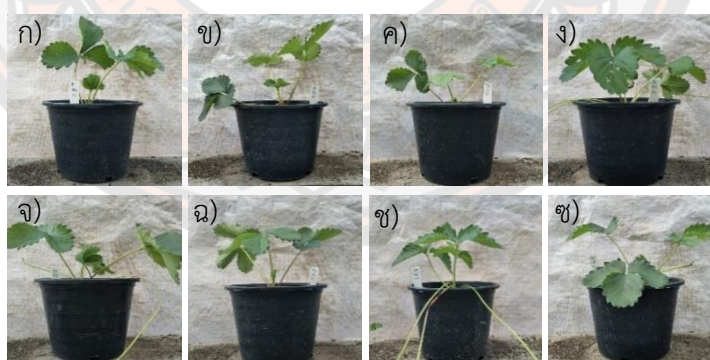
ภาพ 28 ปุ๋ยสูตรเสมอ 15-15-15

ภาคผนวก จ ภาพการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รี
ด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในระดับโรงเรียน



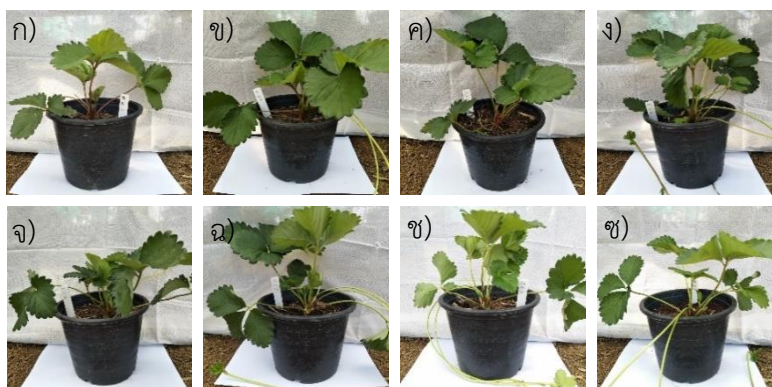
ภาพ 29 ต้นสตรอว์เบอร์รี หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 0

- ก) กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ ข) กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016
ค) กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021 ง) กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041
จ) กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ
ฉ) กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ
ช) กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ
ซ) กรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ



ภาพ 30 ต้นสตรอว์เบอร์รี หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 14

- ก) กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ ข) กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016
ค) กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021 ง) กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041
จ) กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ
ฉ) กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ
ช) กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ
ซ) กรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ



ภาพ 31 ต้นสตรอว์เบอร์รี หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 28

- ก) กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ ข) กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016
 ค) กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021 ง) กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041
 จ) กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ฉ) กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ช) กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ซ) กรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ



ภาพ 32 ต้นสตรอว์เบอร์รี หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 42

- ก) กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ ข) กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016
 ค) กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021 ง) กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041
 จ) กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ฉ) กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ช) กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ซ) กรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ



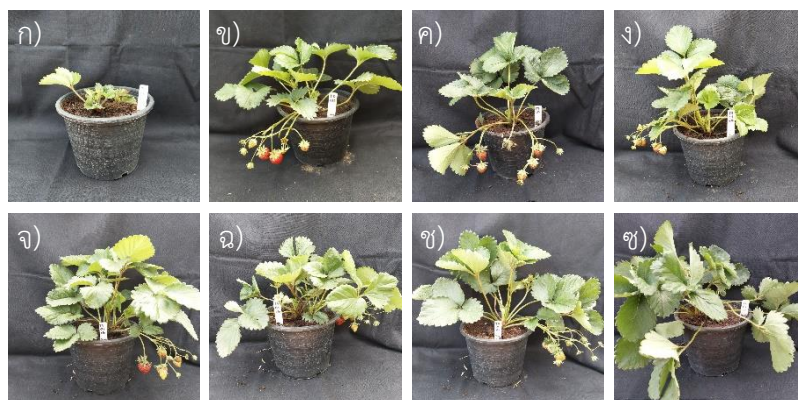
ภาพ 33 ต้นสตรอว์เบอร์รี หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 56

- ก) กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ ข) กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016
 ค) กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021 ง) กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041
 จ) กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ฉ) กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ช) กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ซ) กรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ



ภาพ 34 ต้นสตรอว์เบอร์รี หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 70

- ก) กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ ข) กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016
 ค) กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021 ง) กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041
 จ) กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ฉ) กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ช) กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ซ) กรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ



ภาพ 35 ต้นสตรอว์เบอร์รี หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 84

- ก) กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ ข) กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016
 ค) กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021 ง) กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041
 จ) กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ฉ) กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ช) กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ซ) กรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ



ภาพ 36 ต้นสตรอว์เบอร์รี หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 98

- ก) กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ ข) กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016
 ค) กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021 ง) กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041
 จ) กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับ DB016+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ฉ) กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับ DB021+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ช) กรรมวิธีที่ 7 วัสดุปลูกร่วมกับ DB041+ปุ๋ยสูตรเสมอ
 ซ) กรรมวิธีที่ 8 วัสดุปลูกร่วมกับปุ๋ยสูตรเสมอ

