



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียรีดิวส์คลอเรตเพื่อใช้ประโยชน์
ทางการเกษตร

**Study on bioactive compounds from chlorate reducing bacteria for
agricultural uses**

โดย

ศรียาญจนา คัด้ายเรือง และคณะ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2557

รหัสงานวิจัย มจ.1-56-005



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียรีดิวซ์คลอเรตเพื่อใช้ประโยชน์
ทางการเกษตร

Study on bioactive compounds from chlorate reducing bacteria for
agricultural uses

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2556

จำนวน 262,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวศรียาญจนา คล้ายเรือง

ผู้ร่วมโครงการ นายธูปน ชื่นบาล

นางปิยะนุช เนียมทรัพย์

นางสาวนลิน วงศ์ขัตติยะ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

30 /09/2557

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการ	26
ผลการทดลองและวิจารณ์	35
สรุปผล	64
เอกสารอ้างอิง	65
ภาคผนวก	69

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	การจำแนกเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างใบลำไยที่มีอาการของโรค
ตารางที่ 2	ผลการทดลองการยับยั้งเชื้อรา รหัส L4.1B
ตารางที่ 3	เชื้อแบคทีเรียคลอเรตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Meliola</i> L4.4B
ตารางที่ 4	ผลการทดลองการยับยั้งเชื้อรา รหัส L5.2B
ตารางที่ 5	ผลการทดลองการยับยั้งเชื้อรา รหัส L5.2A
ตารางที่ 6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไย
ตารางที่ 7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไย
ตารางที่ 8	ปริมาณ IAA ในอาหาร Nutrient broth (NB) และ Tryptic soy broth (TSB)
ตารางที่ 9	ผลของ pH ต่อการผลิต IAA ของเชื้อ <i>ไอโซเลต 10-2.1</i>
ตารางที่ 10	ผลของ pH ต่อการผลิต IAA ของเชื้อ <i>ไอโซเลต 6-3.1</i>
ตารางที่ 11	ผลของ pH ต่อการผลิต IAA ของเชื้อ <i>ไอโซเลต 9-4C.2</i>
ตารางที่ 12	ผลของ pH ต่อการผลิต IAA ของเชื้อ <i>ไอโซเลต 9-4D.1</i>
ตารางที่ 13	ผลของ pH ต่อการผลิต IAA ของเชื้อ <i>ไอโซเลต C9-24.2</i>
ตารางที่ 14	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ผลิต IAA
ตารางที่ 15	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน McFarland
ตารางที่ 16	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 เลี้ยงในอาหาร NB
ตารางที่ 17	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 เลี้ยงในอาหาร TSB
ตารางที่ 18	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่ไม่ได้เติม tryptophan
ตารางที่ 19	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่เติม tryptophan เข้มข้น 200 mg/ml
ตารางที่ 20	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่เติม tryptophan เข้มข้น 400 mg/ml
ตารางที่ 21	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่เติม tryptophan เข้มข้น 600 mg/ml
ตารางที่ 22	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่ pH 5
ตารางที่ 23	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่ pH 6
ตารางที่ 24	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่ pH 7
ตารางที่ 25	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่ pH 8
ตารางที่ 26	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่ pH 9
ตารางที่ 27	การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต IAA โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ปฏิบัติการรีดิวส์คลอเรต	9
ภาพที่ 2 โครงสร้างออกซินธรรมชาติ(Natural auxins)	16
ภาพที่ 3 โครงสร้างออกซินสังเคราะห์ (Synthetic auxins)	17
ภาพที่ 4 ชีวิตการสังเคราะห์ indole-3-acetic acid (IAA) ในพืช	18
ภาพที่ 5 ชีวิตสังเคราะห์ Indole-3-Acetic acid (IAA) ในแบคทีเรีย	21
ภาพที่ 6 ชีวิตที่เป็นอิสระต่อ tryptophan ทั้งในพืชและแบคทีเรีย	22
ภาพที่ 7 กลไกการทำงานร่วมกันระหว่างพืชกับแบคทีเรียที่ผลิต IAA และมีเอนไซม์ ACCdeaminase	25
ภาพที่ 8 ตัวอย่างชิ้นส่วนใบพืชที่มีอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อราที่ใช้ในการแยกตัวอย่างเชื้อ (ก) ใบที่มีจุดสีดำ (ข) ใบที่มีจุดสีส้ม	35
ภาพที่ 9 การยับยั้ง <i>Collectrichum</i> L5.2A และ <i>Phomopsis</i> L5.2B สาเหตุโรคใบจุดดำของเชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรต	39
ภาพที่ 10 แบคทีเรียสลายคลอเรตที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไย โดยใช้โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ Dual culture	40
ภาพที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลต K5-3C (ความยาว 320 คู่เบส) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>Pseudomonas mendocina</i> strain B6-1 100%	44
ภาพที่ 12 ผลของความเข้มข้น tryptophan ต่อการผลิต IAA ของเชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรต 5 ไอโซเลตคือ ก. 10-2.1, ข. 6-3.1, ค. 9-4C.2, ง. 9-4D.1 และ จ. C9-24.2 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตาม Multiple Range Test ($P < 0.05$)	48
ภาพที่ 13 ผลของออกซิเจนด้วยการเขย่า(shaking) ต่อการผลิต IAA ของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตคือ ก.เชื้อไอโซเลต 10-2.1, ข. เชื้อไอโซเลต 6-3.1, ค. เชื้อไอโซเลต 9-4C.2, ง. เชื้อไอโซเลต 9-4D.1 และ จ.เชื้อไอโซเลต C9-24.2	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 10-2.1 (ความยาว 561 คู่เบส) เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>Pseudomonas sp.</i> JC5 100%	56
ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 6-3.1 (ความยาว 531 คู่เบส) เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>Pseudomonas sp.</i> F15100%	57
ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 9-4C.2 (ความยาว 521 คู่เบส) เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>Pseudomonas sp.</i> I12B-00129 100%	58
ภาพที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 9-4D.1 (ความยาว 481 คู่เบส) เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>Micrococcus sp.</i> SubaUpMs28 100%	59
ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท C9-24.2 (ความยาว 411 คู่เบส) เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>Pseudomonas sp.</i> JC5100%	60
ภาพที่ 19 กราฟมาตรฐาน IAA เลี้ยงในอาหาร NB	75
ภาพที่ 20 กราฟมาตรฐาน IAA เลี้ยงในอาหาร TSB	76
ภาพที่ 21 กราฟมาตรฐาน IAA ที่ไม่ได้เติม tryptophan	77
ภาพที่ 22 กราฟมาตรฐาน IAA ที่เติม tryptophan เข้มข้น 200 mg/ml	78
ภาพที่ 23 กราฟมาตรฐาน IAA ที่เติม tryptophan เข้มข้น 400 mg/ml	79
ภาพที่ 24 กราฟมาตรฐาน IAA ที่เติม tryptophan เข้มข้น 600 mg/ml	80
ภาพที่ 25 กราฟมาตรฐาน IAA ที่ pH 5	81
ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐาน IAA ที่ pH 6	82
ภาพที่ 27 กราฟมาตรฐาน IAA ที่ pH 7	83
ภาพที่ 28 กราฟมาตรฐาน IAA ที่ pH 8	84
ภาพที่ 29 กราฟมาตรฐาน IAA ที่ pH 9	85

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียรีดิวส์คลอเรตเพื่อใช้ประโยชน์ทาง
การเกษตร

Study on bioactive compounds from chlorate reducing bacteria for agricultural
uses

ศรีกาญจนา คล้ายเรือง ฐปน ชื่นบาล ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และนลิน วงศ์ขัตติยะ

Srikanjana Klayraung, Tapana Cheunbarn, Piyanuch Niumsup, and Nalin Wongkattiya

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรตจำนวน 91 ไอโซเลตที่แยกได้จากดินสวนลำไยถูกนำมาศึกษา
การผลิตกรดอินโดลอะซิติก (Indol-3-acetic acid; IAA) พบว่ามี 45 ไอโซเลต สามารถผลิต IAA ได้
ในอาหาร Tryptic soy broth ที่เติม tryptophan ที่สถานะตั้งไว้ ในจำนวนนี้มี 5 ไอโซเลต ที่สามารถ
ผลิต IAA ได้ปริมาณสูง ($>10 \mu\text{g/mL}$) ซึ่งจากการจำแนกด้วยการหาลำดับเบสยีน 16S rRNA พบว่า
อยู่ในจีโนส *Pseudomonas* sp. และ *Micrococcus* sp. ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษา พบว่า ความเข้มข้น
ของ tryptophan และ pH มีผลต่อการผลิต IAA ของเชื้อแบคทีเรีย อย่างมีนัยสำคัญ โดย
Pseudomonas ผลิต IAA ได้สูงสุดที่ pH 7 ในขณะที่ *Micrococcus* sp. ผลิตได้สูงที่ pH9 และในการ
เพาะเลี้ยงที่มีการเขย่า ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิต IAA ได้มากกว่าสถานะตั้งไว้ถึง 100%

คำสำคัญ: แบคทีเรียสลายคลอเรต, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์, ออกซิน, การละลายฟอสเฟต

Abstract

A total of 91 isolates was investigated for indole-3-acetic acid (IAA) production in chlorate-degrading bacteria from longan plantation soils. The forty five bacterial isolates produced IAA in tryptic soy broth containing L-tryptophan at static condition. Among these, only 5 isolates producing high amount of IAA ($>10 \mu\text{g/mL}$ of IAA) were identified as *Pseudomonas* sp. and *Micrococcus* sp. using 16S rRNA base sequencing technique. Further investigation was revealed that concentration of tryptophan and pH influenced the IAA production significantly. In this study, maximum IAA production of *Pseudomonas* sp. was observed at pH7 ($13.6\text{--}31.4 \mu\text{g/mL}$), whereas *Micrococcus* sp. showed that highest IAA production ($17.5 \mu\text{g/mL}$) at pH9. Furthermore, in condition of shaking flask gave higher concentration of IAA than in static condition with 100 %.

Keywords: Chlorate reducing bacteria, bioactive compound, antagonistic activity, auxin, phosphate solubilizing

คำนำ

ลำไยเป็นที่สำคัญอย่างหนึ่งในภาคเหนือ โดยสามารถส่งออกเป็นสินค้าเกษตรในรูปลำไยสด ลำไยกระป๋อง ลำไยแช่แข็งและลำไย ทำรายได้จากการส่งออกปีละไม่ต่ำกว่า 5,000 ล้านบาท ปัญหาหนึ่งที่เกษตรกรผู้ปลูกลำไยมักเผชิญในอดีต คือการออกดอกไม่สม่ำเสมอของต้นลำไย เนื่องจากการออกดอกติดผลขึ้นอยู่กับความหนาวเย็น จึงได้มีการนำสารโพแทสเซียมคลอเรต สามารถกระตุ้นให้ลำไยออกดอกนอกฤดูได้ ถึงแม้ว่าจะมีรายงานว่าไม่มีอนุมูลคลอเรตตกค้างในผลลำไยสุก และมีความปลอดภัยในการบริโภคก็ตาม แต่ในขณะเดียวกันสารโพแทสเซียมคลอเรต สามารถที่จะใช้ในการเหนี่ยวนำให้เชื้อราให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับห้องปฏิบัติการ และมีรายงานการศึกษาผลของการเติมคลอเรตต่อลำไยในการทดลองระดับกระถางโดยคุณผลต่อ arbuscular mycorrhizal fungi การดูดซึมฟอสฟอรัส และชีวมวลของพืช พบว่าการเพิ่มปริมาณของคลอเรตมีผลในการลดจำนวนเชื้อรา mycorrhiza ดังกล่าว อีกทั้งยังลดอัตราการดูดซึมฟอสฟอรัส และชีวมวลด้วย (Li et al., 2008) ดังนั้นการใช้คลอเรตจึงอาจส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศของจุลินทรีย์ ซึ่งศรีกาญจนา และคณะ ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2554 ในเรื่อง “การสลายคลอเรตโดยแบคทีเรียริโดวส์คลอเรตที่แยกได้จากดินและกากตะกอนน้ำเสีย” เพื่อศึกษาหาผลกระทบของการใช้คลอเรตต่อนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในดิน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรของสาร ซึ่งแสดงถึงความสมบูรณ์ของดิน นอกจากนี้ยัง ทำการแยกและจำแนกเชื้อ chlorate reducing bacteria จากแปลงปลูกลำไย และกากตะกอนน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์ร่วมกับการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตในการกระตุ้นการออกดอกนอกฤดูของลำไย (อยู่ระหว่างดำเนินการวิจัย)

จากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น output สำคัญที่ได้ หลังจากดำเนินงานแล้วเสร็จมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ คือเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของ chlorate reducing bacteria จำนวนหนึ่งที่แยกได้ ซึ่งผู้วิจัยต้องการที่จะนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดในงานทางด้านการเกษตร โดยมองจากมุมมองปัญหาที่ว่าสิ่งที่เกษตรกรต้องการในการผลิตผลไม้คือ ต้องการได้ผลผลิตที่มีปริมาณมาก และได้ราคาสูง ซึ่งทั้งสองประเด็นนี้จะได้มาก็ต่อเมื่อเกษตรกรสามารถผลิตผลไม้ นอกฤดูได้แล้ว ผลิตโดยไม่ขึ้นกับดินฟ้าอากาศ ต้นไม้ต้องเจริญเติบโตได้ดี และไม่มีโรคพืชมาเบียดเบียน ซึ่งสำหรับลำไยแล้ว หลังจากทีเกษตรกรสามารถทำให้ลำไยออกดอกนอกฤดูได้แล้ว ปัญหาที่ยังคงมีอยู่คือมีรายงาน

การเกิดโรคบางอย่างมากขึ้นเช่น *Phytophthora* foliage blight และ fruit rot ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Phytophthora* และโรค Witches' broom ที่มีสาเหตุมาจาก *Phytoplasma* นอกจากนี้ยังมีเชื้อราก่อโรคอื่นๆ ที่พบทั้งในช่วงก่อนเก็บ และหลังเก็บเกี่ยวผลผลิตซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายได้เช่น *Colletotrichum* sp., *Pestalotiosis* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. และ *Aspergillus niger* (Coates et al., 1999) โดยการควบคุมปัญหาโรคเหล่านี้โดยส่วนใหญ่เกษตรกรจะใช้สารเคมีในการกำจัดซึ่งอาจส่งผลในทางลบต่อสุขภาพทั้งต่อผู้บริโภค และตัวเกษตรกรผู้ใช้ ดังนั้นการควบคุมโดยชีววิธีจึงได้รับความสนใจและมีผู้ศึกษากันเพิ่มขึ้น เช่น การใช้เชื้อราเอนโดไฟต์เพื่อควบคุมโรคใบจุดลำลาย (วันพร และพิภพ, 2552) แต่ยังมีรายงานการศึกษาการใช้แบคทีเรียเพื่อควบคุมโรคลำลายค่อนข้างน้อย หรือไม่มีเลย โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มของ chlorate reducing bacteria ซึ่งจากการวิจัยพบว่า chlorate reducing bacteria ส่วนหนึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชได้ (Cozoria, 2006) ซึ่งกลไกการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชส่วนหนึ่งมาจากการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย ในขณะเดียวกันเชื้อ *Pseudomonas* นี้ยังมีรายงานการผลิตฮอร์โมนพืชในกลุ่มของออกซิน (Kang et al., 2006) ซึ่ง ชรัสนันท์ (2548) ได้รายงานไว้ว่าฮอร์โมนพืชมีผลต่อการเจริญเติบโตของผลลำลาย ซึ่งทั้งสารปฏิชีวนะ และฮอร์โมนพืชนี้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางการเกษตรได้ นอกจากนี้เชื่อดังกล่าวยังมีข้อมูลว่าสามารถละลายฟอสเฟตอินทรีย์ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์สำหรับการเจริญเติบโตของพืช (Rodríguez and Fraga, 1999)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าเชื่อดังกล่าวมีศักยภาพทั้งในการควบคุมโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการเกษตรได้ จึงเป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อ chlorate reducing bacteria อื่นๆ ที่มีอยู่มีคุณสมบัติดังกล่าวหรือไม่ ดังนั้นโครงการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อเป็นการใช้ประโยชน์จากเชื้อ chlorate reducing bacteria ในทางการเกษตร เพื่อเป็นทางเลือกที่จะไม่ต้องใช้สารเคมี เป็นพื้นฐานในการนำไปสู่การพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมสำหรับการใช้งาน และเตรียมความพร้อมพร้อมสู่การทำการผลิตลำลายด้วยวิธีของเกษตรกรอินทรีย์ รวมถึงเป็นการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรจุลินทรีย์ที่มีอยู่ให้ได้ประโยชน์สูงสุด

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อ chlorate reducing bacteria ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้
- 2 เพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อ chlorate reducing bacteria ในการผลิตฮอร์โมนพืช
- 3 เพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อ chlorate reducing bacteria ในการละลายฟอสเฟต
- 4 เพื่อศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค การผลิตฮอร์โมนพืช และความสามารถในการละลายฟอสเฟต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อแบคทีเรียรีดิวซ์คลอเรต และทราบชนิดของแบคทีเรียรีดิวซ์คลอเรตในตัวอย่างดินสวนลำไย
2. ทราบถึงผลกระทบของคลอเรตต่อนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในดิน
3. นำความรู้ที่ได้ไปใช้วางแผนการใช้คลอเรตร่วมกับการใช้แบคทีเรียรีดิวซ์คลอเรตในการกระตุ้นการออกดอกนอกฤดูของลำไยได้อย่างมีประสิทธิภาพ
4. สามารถนำความรู้ที่ได้ใช้ลดความขัดแย้ง และสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภคที่ตระหนักถึงความสำคัญของสิ่งแวดล้อม

การตรวจเอกสาร

1. ข้อมูลพื้นฐานของลำไย และผลผลิตลำไย

ลำไย เป็นพืชที่อยู่ในตระกูล Sapindaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ได้แก่ *Euphoria longana* Camb. *Eu phoria longa* Strend. *Nephelium longana* Camb. และ *Dimocarpus longan* Lour. เป็นไม้ผลกิ่งเมืองร้อนมีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนตอนใต้ทางแถบอินเดียนได้ และประเทศไทยตอนบน ปัจจุบันมีการกระจายการปลูกไปสู่ทวีปออสเตรเลีย อเมริกาเหนือ และเอเชียใต้ (พาวันและคณะ, 2547)

ลำไยจัดเป็นไม้ผลเศรษฐกิจสำคัญในการสร้างสถานะเศรษฐกิจให้แก่เกษตรกร โดยเฉพาะเกษตรกรในจังหวัดภาคเหนือของประเทศไทย เช่น จังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน โดยมีรายได้จากการส่งออกไม่ต่ำกว่า 5,000 ล้านบาทต่อปี รัฐบาลจึงมีนโยบายในการส่งเสริม สนับสนุน การปลูกและผลิตลำไย โดยกำหนดให้ลำไยเป็นผลไม้ยอดเยี่ยม 1 ใน 4 ชนิดที่ต้องผลักดันให้เกษตรกรขยายการปลูกและการผลิตให้เพิ่มมากขึ้น (พงษ์ศักดิ์และคณะ, 2542)

ในปี พ.ศ.2554 ได้มีรายงานการขยายการเพาะปลูกลำไยในประเทศไทยไปทั้งสิ้น 27 จังหวัด ครอบคลุมพื้นที่ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง รวมเนื้อที่การเพาะปลูกทั้งสิ้น 966,589 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) ซึ่งโดยปกติในการออกของลำไยจะต้องอาศัยความหนาวเย็น ดังนั้นจึงมีการใช้วิธีการบังคับให้ลำไยออกดอกฤดูกันเป็นอย่างมาก จากรายงานการผลิตของ สุภาภรณ์ และคณะ (2553) ในพื้นที่ 3 จังหวัด คือ เชียงใหม่ ลำพูน และจันทบุรี มีการบังคับให้ออกดอกนอกฤดูถึง 60.9%

การผลิตลำไยนอกฤดูเพื่อเป็นการแก้ปัญหาการผลผลิตล้นตลาดและการขาดแคลนแรงงานในการเก็บเกี่ยวผลผลิตรวมทั้งสภาพอากาศที่แปรปรวนมีผลต่อการออกดอกติดผลของลำไย วิธีการที่เกษตรกรนำมาใช้ในการบังคับให้ลำไยออกดอกที่เกษตรกรใช้มากที่สุด คือ การใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต (พาวันและคณะ, 2547)

การใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตในการกระตุ้นให้ลำไยออกดอกเพื่อการผลิตลำไยจะใช้การพ่นทางใบ และการฉีดเข้าต้นลำไย ซึ่งการใช้ปริมาณที่ให้ผลจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารที่ใช้ นอกจากนี้ ยังขึ้นอยู่กับฤดูกาล รวมทั้งอายุของใบ แต่วิธีการที่ทำได้ง่ายคือการผสมน้ำราดบนดินบริเวณใต้ทรงพุ่ม หรือการหว่านสารนี้บริเวณใต้ทรงพุ่มแล้วรดน้ำตาม โดยปริมาณสาร

โพแทสเซียมคลอเรตที่จะให้กับต้นลำไยจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ของลำไย และขนาดทรงพุ่มของลำไย โดยความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอเรตที่ใช้อยู่ที่ 10-900 กรัมต่อดิน ซึ่งเป็นแนวทางเท่านั้น จะต้องมีการปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมกับพื้นที่เพาะปลูกด้วย (นพดลและคณะ, 2543; พาวันและคณะ, 2547; Manochai et al., 2005)

2. สารโพแทสเซียมคลอเรต

สารโพแทสเซียมคลอเรต (potassium chlorate; KClO_3) คือสารเคมีที่มีลักษณะเป็นของแข็ง สีขาว ละลายน้ำได้ เมื่ออยู่ในรูปผลึกของสารบริสุทธิ์จะไม่มีสี มีสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) ที่รุนแรง โดยสามารถให้ออกซิเจนในปริมาณที่มาก และรวดเร็วกว่าสารตัวอื่น สารนี้แตกตัวได้ง่ายเมื่อถูกแรงกระแทก แรงเสียดสี หรือถูกความร้อน ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในทาง อุตสาหกรรมกระดาษ และการฟอกย้อม (Germgard et al., 1981) การผลิตวัตถุระเบิด ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ รวมถึงในทางการเกษตรซึ่งนำมาใช้เป็นสารเร่งการออกดอกของต้นลำไย

3. ผลกระทบของสารประกอบคลอเรตต่อสิ่งมีชีวิต

เนื่องจากการใช้สาร โพแทสเซียมคลอเรตการอย่างแพร่หลายในพื้นที่เพาะปลูกลำไย ทำให้มีผู้วิจัยถึงผลกระทบของสารนี้ต่อสิ่งมีชีวิตอื่นไว้เช่น

มีการรายงานว่าปริมาณคลอเรตตกค้างในดินมากเกินไป สามารถทำลายระบบนิเวศของดิน และส่งผลต่อการเจริญของพืชได้ อย่างเช่น ข้าว (Borges et al., 2004)

กนกวรรณ (2446) รายงานถึงผลของโพแทสเซียมคลอเรตต่อเชื้อราอาบัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา ซึ่งเป็นเชื้อราที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ระบุว่า สารโพแทสเซียมคลอเรตมีผลต่อปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *Glomus pustulatum* และทำให้ความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยในรากพืชลดลง

ปริศนา (2547) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของสาร โพแทสเซียมคลอเรตที่มีต่อเชื้อรา *Fusarium* ในสวนลำไย พบว่า เชื้อราชนิดนี้ที่แยกได้จากสวนลำไยที่มีการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น

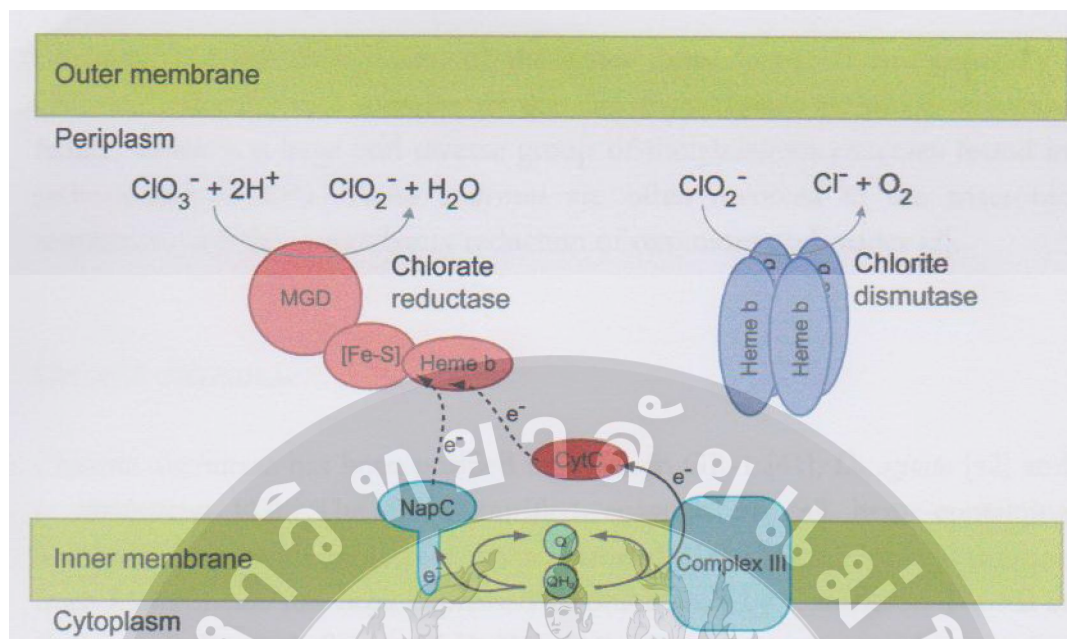
Li et al. (2008) ได้รายงานถึงปริมาณคลอเรตในดินที่สูง ได้แก่ 200-400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถยับยั้งการ colonize ของเชื้อรา arbuscular mycorrhiza อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการ

การดูดซึมฟอสฟอรัส และการเจริญเติบโตของพืชที่ทดสอบ 3 ชนิดคือ bermudagrass, bahiagrass และเมล็ดลำไยด้วย

นั่นคือคลอเรตที่ตกค้างในดินเมื่อส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่น หมายถึงส่งผลต่อคุณภาพดิน (soil quality) ด้วย

4. แบคทีเรียรีดิวซ์คลอเรต (Chlorate reducing bacteria)

แบคทีเรียรีดิวซ์คลอเรต (chlorate reducing bacteria; CRB) คือ แบคทีเรียที่สามารถใช้ chlorate (ClO_3^-) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ โดยแบคทีเรียจะสามารถรีดิวซ์ chlorate ไปเป็น chlorite โดยเอนไซม์ chlorate reductase ในขั้นแรก จากนั้นในขั้นที่ 2 chlorite จะแตกตัวเป็น chloride และ ออกซิเจน โดยมี chlorite dismutase เป็นตัวเร่ง (Oltmann et al., 1976 และ Rikken et al., 1996) โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นบริเวณ periplasm ดังแสดงในภาพที่ โดยทั่วไปแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ chlorate ได้จะอยู่ในกลุ่มของ facultative anaerobe (Logan, 1998) นอกจากนี้ denitrifying bacteria บางกลุ่มยังสามารถรีดิวซ์ chlorate ได้อีกด้วย (Oltmann et al., 1976) ตัวอย่างของแบคทีเรียที่มีการรายงานว่าสามารถรีดิวซ์คลอเรต ได้แก่ *Vibrio dechloraticans*, *Acinetobacter thermotoleranticus* (Ginkel et al., 1995) และ *Ideonella dechloratans* (Thorell et al., 2003) ซึ่งแยกได้จากกากตะกอนน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสีย นอกจากนี้ Steinberg et al. (2005) ได้ศึกษาความแตกต่างในการรีดิวซ์ chlorate ของ *Pseudomonas* sp. กับการรีดิวซ์ perchlorate ของ *Azospira* sp. พบว่ามีความแตกต่างกันของเอนไซม์ chlorate และ perchlorate reductase ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยารีดิวซ์คลอเรต (Oltmann et al., 1976 และ Rikken et al., 1996)

. โรคของลำไยที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา

4.1 โรคใบจุดของลำไย (Black spot of longan leaf)

เชื้อสาเหตุ : เกิดจากเชื้อรา *Collectotrichum* sp.

พบระบาดตามสวนลำไยทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วงที่มีฝนตกสภาพอากาศชื้น หากระบาดรุนแรงเป็นผลทำให้ใบสูญเสียพื้นที่การสังเคราะห์แสง สภาพต้นทรุดโทรมผลผลิตต่ำ เชื้อราที่แยกได้จากแผลจุดดำจากแหล่งต่างๆ สามารถตรวจพบเชื้อราหลายชนิด เช่น *Collectotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Helminthosporium* sp., *Phomopsis* sp. และ *Zygosporium* sp. แต่พบว่าเชื้อรา *Collectotrichum* sp. เป็นเชื้อราที่แยกได้มากที่สุดจากอาการใบจุดดำลำไยที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ และได้พิสูจน์ว่าเชื้อสาเหตุที่แท้จริงของโรคเกิดจากเชื้อรา *Collectotrichum* sp. ผลจากการกระตุ้นแผล (latent infection) ด้วยสารละลายของสารเคมีกำจัดวัชพืชพาราควอต เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มไว้ 3 วัน มีเส้นใยสีขาว และกลุ่มสปอร์สีส้มของเชื้อรา *Collectotrichum* sp.

สาเหตุของโรคใบจุด : อาการแผลจุดดำที่เกิดขึ้นบนใบจะปรากฏเฉพาะชุดของใบแก่เท่านั้น ในขณะที่ใบอ่อนที่เพิ่งแตกออกใหม่จะไม่ปรากฏอาการของใบจุดเลย แต่อาจจะพบร่องรอย

จุดเข้มนในเนื้อใบเมื่อส่องใบกับแสงแดด เมื่อใบแก่เกิดอาการแผลจุดดำแล้วก็มีโอกาสที่จะถูกเชื้อราชนิดอื่นเข้าทำลายซ้ำเติม จะเห็นได้จากลักษณะแผลบนใบของลำไยแต่ละส่วนมีขนาดไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับจำนวน และชนิดของเชื้อราที่เข้าทำลาย

อาการที่ปรากฏบนใบแก่เริ่มแรกจะเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อน ต่อมาแผลจะเริ่มแห้งและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือดำและบางครั้งถ้าสภาพอากาศมีความชื้นสัมพัทธ์สูงๆ อาจพบเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา นอกจากนี้ได้ใบบริเวณที่เป็นรอยแผลจุดดำนี้มักจะพบเส้นใยเป็นขุยสีขาวเจริญอยู่ จากการตรวจสอบพบว่าเป็นเชื้อราอีกชนิดหนึ่งคือเชื้อ *Zygosporium* sp. ที่เข้าทำลายในระยะหลังจากที่เกิดอาการจุดดำแล้ว ซึ่งเชื้อนี้เจริญอยู่บริเวณแผลจุดดำในส่วนใต้ใบ สปอร์ของเชื้อราสามารถแพร่กระจายไปตามลม และละอองของน้ำฝน ในสวนที่พบว่าโรคนี้ระบาดรุนแรงจะทำให้สภาพต้นทรุดโทรม และให้ผลผลิตต่ำเนื่องจากใบสูญเสียพื้นที่ในการสังเคราะห์แสง (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

4.2 โรคยอดไหม้ ใบไหม้ของลำไย (longan apical, leaf blight)

เชื้อสาเหตุ : เกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Mycelia sterilia* ซึ่งจะระบาดรุนแรงในสภาพที่มีอากาศเริ่มหนาวเย็น มีหมอกลงจัดในตอนเช้า

จากการสำรวจพื้นที่แหล่งปลูกลำไยในเขตอำเภอลี้ จังหวัดลำพูน พบลำไยในพื้นที่แสดงอาการยอดไหม้ทั่วทรงพุ่มของต้นโดยเฉพาะในช่วงเดือนพฤศจิกายนเป็นต้นไป ซึ่งเข้าสู่ฤดูหนาว มีหมอกลงจัดจะเป็นโรคนี้มีการระบาด สำหรับต้นที่มีอาการรุนแรง ใบจะไหม้แห้งเป็นสีน้ำตาลและหลุดร่วงจากข้อได้ง่าย สามารถมองเห็นอาการยอดไหม้รอบทรงพุ่มของต้นจากระยะไกลได้ชัดเจน ถ้าหากสภาพอากาศมีความชื้นและเย็น จะพบเส้นใยสีขาวของเชื้อราเจริญตามกิ่งและก้านใบ (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

4.3 โรคจุดสนิม โรคจุดสาหร่าย (Algal leaf spot)

เชื้อสาเหตุ : เกิดจากเชื้อรา *Cephaleuros virescens*

พบระบาดตามสวนลำไยทั่วไป โดยเฉพาะบริเวณทรงพุ่มที่มีร่มเงา และความชื้นสูง โดยทั่วไปแล้วไม่ทำความเสียหายให้กับลำไยเท่าใดนัก ถ้ามีการระบาดรุนแรงจะทำให้ลำไยสูญเสียพื้นที่ใบในการสังเคราะห์แสง ซึ่งจะมีผลต่อคุณภาพและผลผลิตของลำไย

อาการใบจุดสนิมเป็นอาการที่พบบริเวณหน้าใบลำไย มีอาการเป็นจุดสีน้ำตาลแดงคล้าย สนิมเหล็ก อาการจะเกิดบริเวณใบเป็นจุดค่อนข้างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 เซนติเมตร โดยอาการเริ่มจากลักษณะเป็นจุดสีเขียวคล้ายขุยกำมะหยี่ และจะเปลี่ยนเป็นสีแดงคล้ายสนิมเหล็ก บางชนิดพบว่ามีสีเหลืองหรือ สีส้ม ลักษณะของสาหร่ายที่พบบนใบ สามารถแบ่งการเจริญได้ 2 แบบ คือ

1)เจริญเป็นกอหรือกระจุกของโคโลนีสีส้มอยู่ที่หลังใบ (ผิวใบด้านบน) แพลมีขนาด 2-4 มิลลิเมตร

2)เจริญด้านท้องใบ (ใต้ใบ) โดยมีแผลลักษณะเนื้อเยื่อตายเป็นสีน้ำตาลดำ (necrosis) บริเวณโดยรอบแผลมีลักษณะฉ่ำน้ำ แผลที่พบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 5 มิลลิเมตรขึ้นไป บางแผลอาจกว้างถึง 1 เซนติเมตร

นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถเกิดที่กิ่งได้อีกด้วย โดยทั่วไปโรคนี้นักทำให้บริเวณใบที่เกิดจุด สาหร่าย เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ถ้าเป็นรุนแรงมากๆอาจทำให้ใบแห้งและร่วง เป็นผลให้ต้น ลำไยทรุดโทรม การแพร่ระบาดของโรคนี้อาจเกิดได้ทุกฤดู โดยเฉพาะในสภาพอากาศชื้นและค่อนข้าง เย็นมักจะพบว่ามีการระบาดรุนแรง ทำให้ใบสูญเสียพื้นที่ในการสังเคราะห์แสง เนื้อเยื่อของพืชถูก ทำลายเป็นผลให้ใบแห้งและหลุดร่วงแต่พบว่าในสภาพอากาศที่แห้งแล้งบางครั้งโคโลนีของ สาหร่ายนี้จะฝ่อและยุบตัวไปเอง (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

4.4 โรคราน้ำฝน โรคกิ่งอ่อนและใบไหม้ โรคผลเน่า

เชื้อสาเหตุ : เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora mirabilis* Galido and Hohl

ลักษณะอาการ : กิ่งอ่อนหรือยอดอ่อน มีอาการไหม้หรือเน่าจากการเข้าทำลายของราสาเหตุ ของโรค เมื่อกิ่งอ่อนถูกทำลายจึงทำให้ใบอ่อนร่วง แล้วเกิดอาการช่อดอกไหม้ และผลเน่าตามมาใน ภายหลัง กิ่งอ่อนและใบอ่อนที่เป็นโรคจะมีสีน้ำตาลคล้ำ ในช่วงที่มีอากาศเย็น ความชื้นสูงจะพบ ราสีชมพูขึ้นที่กิ่งอ่อน เส้นกลางใบอ่อนและผิวเปลือกผลที่เป็นโรค

การแพร่ระบาด : ภายหลังการตัดแต่งกิ่ง ต้นลำไยจะแตกใบอ่อนและยอดอ่อนทั่วทั้งทรง พุ่ม หากช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่ยังมีฝนตกชุก จะเกิดการแพร่กระจายของราสีชมพูขึ้นบนกิ่ง อ่อน เส้นกลางใบ และผิวเปลือกผล ราสาเหตุสร้างสปอร์แรงเจียม (sporangium) เป็นจำนวนมาก ซึ่งจะปลิวไปตามลม หรือติดไปกับน้ำฝนและเข้าทำลายลำไยต้นใกล้เคียง ภายในสปอร์แรงเจียมนี้

สามารถสร้างสปอร์ที่มีหาง (zoospore) ซึ่งว่ายน้ำได้ เมื่อสปอร์ถูกปล่อยออกมาและเข้าทำลายผลลำไยทำให้เกิดอาการเน่าเสียหายอย่างรุนแรง การระบาดของโรคเกิดมากในช่วงเวลาที่มีอากาศเย็น ความชื้นสูง สำหรับโรคผลเน่าเนิ่น เกิดกับผลลำไยที่มีอายุก่อนเก็บเกี่ยวประมาณ 1 เดือน หากโรคเกิดรุนแรงผลจะเน่าและร่วงทำให้ผลผลิตเสียหาย (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

4.5 โรครากเน่าโคนเน่าลำไย

เชื้อสาเหตุ : เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler

ลักษณะอาการ : อาการปรากฏทางใบ ใบลำไยมีสีเหลืองซีด เมื่อขูดดูบริเวณรากต่อโคนต้น พบอาการเน่าบริเวณรอยต่อระหว่างรากและลำต้นส่วนที่อยู่ใต้ระดับผิวดินมีสีน้ำตาล รากไม่สามารถดูดน้ำและอาหารได้ ทำให้ลำไยยืนต้นตาย

การแพร่ระบาด : ราเข้าทำลายทางราก ลูกกลามสู่โคนต้น ในสภาพดินที่มีการระบายน้ำไม่ดี มีน้ำขัง ดินมีความชื้นและแฉะอยู่ตลอดเวลา ในสภาพที่มีฝนตกชุกและอากาศมีความชื้นสูง เป็นสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับการเจริญของราสาเหตุโรค เชื้อจะสร้างเส้นใยสีขาว พร้อมทั้งสร้างสปอร์แรงเจ็มภายในสร้างสปอร์จำนวนมาก สปอร์จะติดไปกับหยดน้ำฝนที่กระเซ็น หรือไหลตามน้ำฝน หรือแพร่ระบาดทางลม เชื้ออาจติดไปกับดิน น้ำ และซากพืชส่วนที่เป็นโรค การใช้กิ่งตอนลำไยจากแหล่งที่มีการระบาดของโรค เป็นการนำเชื้อสาเหตุซึ่งอยู่ในดินติดมาด้วย การใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตเพื่อช่วยบังคับให้ต้นลำไยออกดอกติดผลนอกฤดู อาจทำให้เกิดโรครากเน่าระบาดมากขึ้น (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

4.6 โรคราดำของลำไย (Sooty mold of longan)

เชื้อสาเหตุ : เกิดจากเชื้อรา *Meliola euphoria* ; *Capnodium ramosum*

เชื้อราแพร่กระจายอยู่ในอากาศ ปลิวมาตกลงบนส่วนของพืชที่มีน้ำหวานที่แมลงปากดูดจำพวก เพลี้ยแป้ง เพลี้ยหอย เพลี้ยจักจั่น และเพลี้ยอ่อน ขับถ่ายออกมา ทำให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราชนิดนี้ เชื้อราเป็นคราบสีดำขึ้นปกคลุมซึ่งเกิดขึ้นได้ทั้งบริเวณใบ กิ่ง และช่อดอก รวมทั้งผิวของผลเชื้อราไม่ได้ทำลายพืชโดยตรง แต่ถ้าปรากฏบนใบจะไปลดอัตราการสังเคราะห์แสง หากเกิดที่ช่อดอกจะเคลือบส่วนเกสรทั้งหมด ไม่สามารถผสมเกสรได้ และดอกหลุดร่วง เมื่อติดผลทำให้ผลมีสีดำไม่สวยงามราคาจำหน่ายตก

การระบาดของเชื้อรานี้ เกิดจากการทำลายของแมลงปากดูด ที่ดูดกินส่วนยอดอ่อนของ ลำไยแล้วถ่ายน้ำหวานออกมาปกคลุมส่วนต่างๆของลำไย จากนั้นก็จะมีเชื้อราเจริญขึ้นบนยอด น้ำหวานเหล่านี้ รวมทั้งสามารถแพร่กระจายไปตามลมบนหลังใบซึ่งได้รับแสงแดดโดยตรงเชื้อจะ เจริญได้ไม่ดีจึงทำให้เห็นเป็นคราบดำคล้ายเขม่า หรือเป็นจุดดำเล็กๆสามารถใช้มือถูแล้วหลุดออก ได้ง่าย ส่วนใต้ท้องใบเชื้อจะเจริญฟู เห็นเป็นวงกลมกระจาย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงเชื้อรา บางแห่งพบว่าเกิน 1 เซนติเมตร เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่ เฉพาะบริเวณผิวแต่ไม่ลุกลามลึกเข้าไปทำลายเซลล์พืช บางครั้งจะพบแมลงปากดูดขนาดเล็กเป็นจุด ขาวๆปะปนอยู่กับเส้นใยสีดำของเชื้อราที่เจริญอยู่ตามส่วนต่างๆ เช่น ใบและผล (จริยา และคณะ, 2545)

5. วิธีการควบคุมโรค

5.1 การควบคุมโรคใบจุดของลำไย (Black spot of longan leaf)

เชื้อสาเหตุ : เกิดจากเชื้อรา *Collectotrichum* sp.

แนวทางในการป้องกันกำจัด :

1)ตัดแต่งกิ่งและทรงพุ่มให้โปร่งหลังเก็บผลและเก็บใบที่เป็นโรคไปเผาทำลายเพื่อไม่ให้ เป็นแหล่งสะสมของเชื้อสำหรับฤดูกาลต่อไป

2)มีสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการแพร่ระบาดของโรคนี้ เช่น เบนโนไมล คาร์เบนดาซิม แคปแทน แมนโคเซบ คอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ และเมตาแลกซิล โดย สามารถเลือกได้มากกว่า 1 ชนิดฉีดพ่นสลับกันทุก 2 สัปดาห์ในช่วงฤดูฝน ควรหลีกเลี่ยงการฉีดพ่น สารในระยะที่ลำไยให้ผลผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารคอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ เพราะจากการ ทดสอบนำผลลำไยที่แช่สารคอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์แล้วนำไปปรนด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะมีผล ทำให้ลำไยมีเปลือกเปลี่ยนเป็นสีดำคล้ำ เนื่องจากผลของสารเคมีประเภทสารประกอบของทองแดง หรือคอปเปอร์ตกค้างที่เปลือกลำไยจะทำปฏิกิริยากับซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทำให้เกิดเป็นคอปเปอร์ ซัลไฟด์ เป็นผลให้เกิดสีดำขึ้นบริเวณเปลือกลำไย

5.2 การควบคุมโรคจุดสนิม โรคจุดสาหร่าย (Algal leaf spot)

เชื้อสาเหตุ : เกิดจากเชื้อรา *Cephaleuros virescens*

แนวทางในการป้องกันกำจัด :

- 1) ฉีดพ่นด้วยสารเคมี คอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ในอัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
- 2) กรณีที่มีโรคระบาด หรือขึ้นปกคลุมผิวใบหนาแน่น ให้ฉีดพ่นด้วยไตรเฟนทินอะซีเตต อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นให้ทั่วทุก 25 วัน หรือ คาร์เบนดาซิม (เดอโรซาล) ผสมแมนโคเซบ (ลีลาเอ็ม) อัตราที่แนะนำข้างฉลาก อย่างใดอย่างหนึ่ง

5.3 การควบคุมโรคราน้ำฝน โรคกิ่งอ่อนและใบไหม้ โรคผลเน่า

เชื้อสาเหตุ : เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora mirabilis* Galido and Hohl

แนวทางในการป้องกันกำจัด : โดยการควบคุมโรคด้วยวิธีผสมผสาน มีการจัดการด้านเขตกรรม ในรอบ 1 ปี หลังเก็บผลผลิต ตัดแต่งกิ่งลำไยให้โปร่ง ไม่ให้เป็นแหล่งสะสมเชื้อ และตัดแต่งช่อดอก ตัดแต่งช่อผล ไม่ให้มีช่อดอก ช่อผล มากเกินไป หรือช่อที่ไม่สมบูรณ์ แล้วพ่นด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืช สารเมทาแลกซิล 25เปอร์เซ็นต์ WP อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ทั่วทรงพุ่มของต้นลำไย ทุกครั้งภายหลังการตัดแต่งกิ่ง เก็บทำลายใบอ่อน กิ่ง หรือผลที่เป็นโรค ด้วยการฝังหรือเผา

5.4 การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าลำไย

เชื้อสาเหตุ : เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler

แนวทางในการป้องกันกำจัด : ต้นลำไยที่เริ่มเป็นโรค ให้ใช้สารเมทาแลกซิล 25เปอร์เซ็นต์ WP ละลายน้ำราดดินบริเวณโคนต้น อาจช่วยให้รอดพ้นจากการตายได้ หากต้นใดเป็นโรคแล้วถอนทำลาย แล้วขุดดินบริเวณหลุมปลูกออก ตากแดดหลายๆครั้ง ระวังอย่าให้น้ำท่วมขังบริเวณโคนต้น โดยเฉพาะช่วงฤดูฝน (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

5.5 การควบคุมโรคคราดำของลำไย (Sooty mold of longan)

เชื้อสาเหตุ : เกิดจากเชื้อรา *Meliola euphoria* ; *Capnodium ramosum*

แนวทางในการป้องกันกำจัด :

- 1) ใช้สารเคมีฆ่าแมลงฉีดพ่นกำจัดพวกแมลงปากดูด ได้แก่ เพอร์เมทริน ไซเพอร์เมทริน ไซฟลูทริน เดลทาเมทริน และคาร์บาริล เป็นต้น

2) โดยปกติทราบหรือแผ่นรากบางชนิดที่ปกคลุมส่วนพืชอาจจะหลุดร่วงไปเอง เมื่อเชื้อราใช้อาหารและความชื้นในบริเวณนั้นจนหมดก็จะค่อยๆแห้งและหลุดร่วง จึงไม่มีความจำเป็นต้องใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ยกเว้นในกรณีที่มีการระบาดของรุนแรงอาจใช้สารคอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ แมนโคเซบ คาร์เบนดาซิม นิคพ่นซึ่งสามารถใช้ควบคู่กับสารเคมีฆ่าแมลงได้

3) ส่วนที่มีการตัดแต่ง ให้ปุยทั้งทางรากและทางใบจนพืชเจริญดี และหากมีการใช้สารเคมีกำจัดแมลงอย่างสม่ำเสมอแล้ว จะพบเชื้อรานี้ระบายน้อยหรือไม่พบเลย (จริยา และคณะ, 2545)

5.6 การควบคุมโรคยอดไหม้ ใบไหม้ของลำไย (longan apical, leaf blight)

เชื้อสาเหตุ : เกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Mycelia sterilia*

แนวทางในการป้องกันกำจัด : พ่นสารกำจัดเชื้อราเพื่อยับยั้งการแพร่ระบาดของโรคโดยใช้เมตาแลกซิล (metalaxy1) 25เปอร์เซ็นต์WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นให้ทั่วทั้งทรงพุ่ม (พาวิน, 2543)

6. ออกซิน (Auxin)

ออกซิน เป็นกลุ่มของฮอร์โมนพืชที่กระตุ้นการเจริญเติบโต ทำให้มีการแบ่งเซลล์และยืดตัวของเซลล์ การขนส่งออกซินภายในพืชเป็นการขนส่งอย่างมีทิศทาง ออกซินซึ่งในปัจจุบันพบในพืชชั้นสูงทั่วไป และมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช สังเคราะห์ได้จากส่วนเนื้อเยื่อเจริญของลำต้น ปลายราก ใบอ่อน ดอกและผล และพบมากที่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญ โคลีออปไทด์ (Coleoptile) และคัพภะ (embryo) รวมทั้งใบที่กำลังเจริญด้วย (Arteca, 1996)

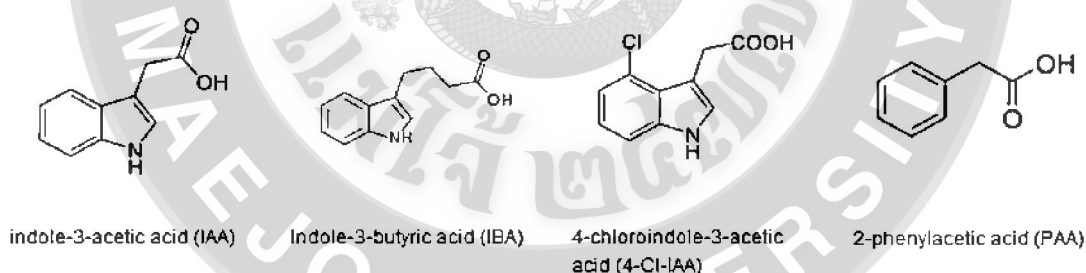
สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulating chemicals : PGRC) ที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิน มีอยู่หลายชนิดและเป็นที่รู้จักกันดีสำหรับเกษตรกรในประเทศไทย สารออกซินชนิดแรกที่ค้นพบคือ indole-3-acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเอง โดยมีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต มีผลกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ และยังมีผลกระตุ้นการเกิดราก รวมถึงมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตในส่วนต่าง ๆ ของพืชซึ่ง

สามารถพิสูจน์ได้หลายวิธีกับพืชทั้งต้น (intact plant) รวมทั้งวิธีที่ตัดอวัยวะเฉพาะส่วนมาทดสอบ (excised part) (Ahmad et.al., 2006)

เนื่องจากความสามารถในการควบคุมกระบวนการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าวข้างต้น จึงทำให้มีการสังเคราะห์สารต่างๆ ที่มีคุณสมบัติคล้ายออกซินเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร สารสังเคราะห์เหล่านี้มีอยู่หลายชนิด แต่ที่นิยมใช้กันทั่วไปมีอยู่เพียงไม่กี่ชนิด ได้แก่ NAA (1-naphthylacetic acid), IBA 4-(indol-3-butyric acid), 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxy- acetic acid) และ 4-CPA (4-chlorophenoxyacetic acid) (Arteca, 1996)

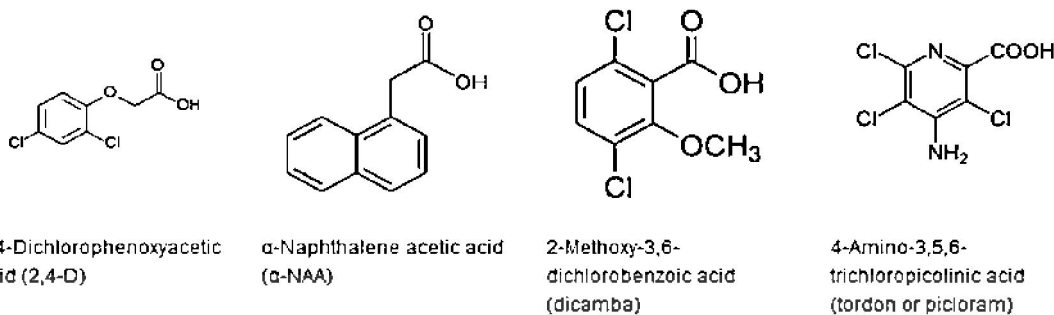
6.1 ประเภทของออกซิน

6.1.1 ออกซินธรรมชาติ (Natural auxins) คือ ออกซินที่พืชและจุลินทรีย์สามารถสร้างขึ้นได้โดยอาศัยสารตั้งต้น (precursor) คือ ทริปโตเฟน (tryptophan) เช่น Indole-3-acetic acid (IAA), Indole-3-butyric acid (IBA), 4-chloroindole-3-acetic acid (4-Cl-IAA) และ 2-phenylacetic acid (PAA) ซึ่งโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างออกซินธรรมชาติ (Natural auxins)

6.1.2 ออกซินสังเคราะห์ (Synthetic auxins) เป็นสารประกอบที่ออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกับ IAA แต่มีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างจากสังเคราะห์ขึ้นมา เช่น 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D), α -Naphthalene acetic acid (α -NAA), 2-Methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid และ 4-Amino-3,5,6-trichloropicolonic acid (TORDON หรือ PICORAM) ซึ่งโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างออกซินสังเคราะห์ (Synthetic auxins)

6.2 ชีวสังเคราะห์ของออกซิน (Davies, 1995; Salisbury and Ross, 1992)

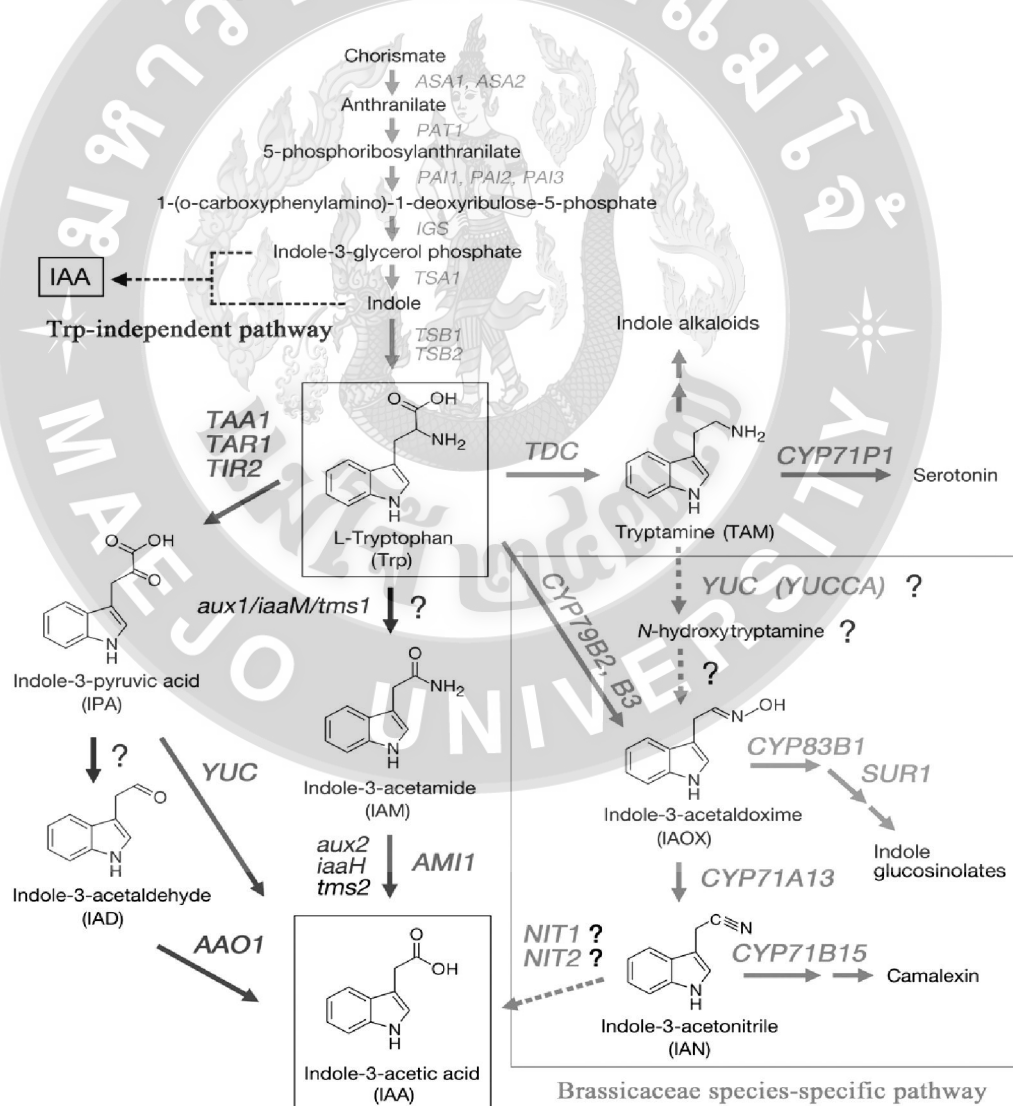
ออกซินมีลักษณะทางเคมีเป็นสาร indole-3-acetic acid หรือเรียกย่อๆ ว่า IAA ซึ่งในปัจจุบันเชื่อว่าเป็นออกซินส่วนใหญ่ที่พบในพืชและในสภาพธรรมชาติ อยู่ในรูป indole ทั้งสิ้น โดยที่ IAA เป็นสารที่สำคัญที่สุด นอกจากนั้นยังพบในรูปของ indole-3-acetaldehyde (IAAld), indole-3-pyruvic acid (IPyA) และ indole-3-acetonitrile (IAN) ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถเปลี่ยนแปลงเป็น IAA ได้

การสังเคราะห์ออกซินนั้น มีกรดอะมิโน tryptophan เป็นสารตั้งต้น (Precursor) ซึ่ง tryptophan เป็นกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างของ indole อยู่โดยในการสังเคราะห์ IAA นั้นจะมี IAAld และ IPyA เป็นสารที่พบในระหว่างการสังเคราะห์ ในพืชบางชนิด เช่น ข้าวโอ๊ต ยาสูบ มะเขือเทศ ทานตะวัน และข้าวบาร์เลย์ พบว่า tryptophan สามารถเปลี่ยนเป็น tryptamine ได้ในพืชตระกูลกะหล่ำ tryptamine จากนั้นเปลี่ยนไปเป็น indole acetaldoxime แล้วเปลี่ยนไปเป็น IAN แล้วจึงเปลี่ยนเป็น IAA

การศึกษาเรื่องการสังเคราะห์ออกซินมักศึกษาจากเนื้อเยื่อปลายรากหรือปลายยอด และพบว่า IAA นี้สังเคราะห์ได้ทั้งในส่วนของไซโตซอล (cytosol) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ในการศึกษาในปัจจุบันพบว่า phenylacetic acid หรือ PAA มีคุณสมบัติของออกซินด้วย และสามารถสังเคราะห์ได้จาก L-phenylalanine โดยพบในคลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรียของทานตะวัน

6.2.1 ชีวิตสังเคราะห์ของ Indole-3-Acetic Acid (IAA) ในพืช

วิธีการสังเคราะห์ IAA เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปแล้วว่า tryptophan เป็นสารตั้งต้น (precursor) สำหรับการสังเคราะห์ IAA ดังแสดงในภาพที่ 4 ซึ่งเกิดจากการรวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ tryptophan สามารถเปลี่ยนรูปไปเป็น IAA ในรา และพบเอนไซม์ชนิดหนึ่งในระบบที่สามารถเปลี่ยนรูป tryptophan ไปเป็น IAA ในใบผักโขม ต่อมานักวิจัยจำนวนมากได้แสดงให้เห็นว่า tryptophan เป็นสารตั้งต้นของ IAA ในพืชชั้นสูงด้วย อย่างไรก็ตามได้เกิดความสับสนขึ้นเมื่อมีนักวิจัยบางคนเสนอว่า ขั้นตอนของปฏิกิริยาเคมีนี้อาจไม่ถูกต้อง เนื่องจากมีการ ปนเปื้อนของแบคทีเรียสร้าง IAA ขึ้น (Lippert et al., 1966)



ภาพที่ 4 ชีวิตวิธีการสังเคราะห์ indole-3-acetic acid (IAA) ในพืช (Mano and Nemoto, 2012)

ขั้นตอนที่ 1 จะเป็นการเปลี่ยนรูป tryptophan ไปเป็น indole-3-pyruvic acid โดยเอนไซม์ tryptophan transaminase จากนั้นจะเกิดกระบวนการ decarboxylation โดยเอนไซม์ indolepyruvate decarboxylase ไปเป็น indole-3-acetaldehyde (IAAld) ซึ่งต่อมาจะเปลี่ยนรูปไปเป็น IAA โดยเอนไซม์ indoleacetaldehyde dehydrogenase (ภาพที่ 4)

ขั้นตอนที่ 2 ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ decarboxylation ของ tryptophan ไปเป็น tryptamine โดยเอนไซม์ tryptophan decarboxylase จากนั้นเปลี่ยนรูปไปเป็น IAAld โดยเอนไซม์ amine oxidase และในที่สุดเปลี่ยนไปเป็น IAA โดยเอนไซม์ IAAld dehydrogenase (ภาพที่ 4)

6.2.2 ชีวิตสังเคราะห์ของ Indole-3-Acetic Acid (IAA) ในแบคทีเรีย

Spaepen และ Vanderleyden (2011) ได้สรุปไว้ว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียที่แยกได้จากรากพืชสามารถสังเคราะห์ IAA ได้ สำหรับสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ IAA คือ tryptophan ดังนั้นการเพิ่ม tryptophan ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงส่งผลทำให้เชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิต IAA ได้สูงขึ้น

ในการสังเคราะห์ tryptophan นั้นสารประกอบตั้งต้นคือ chorismate โดยถูกควบคุมโดย trp genes สังเคราะห์จาก phosphoenolpyruvate และ erythrose 4-phosphate ในชีววิถี Shikimate ซึ่งเป็นชีววิถีทั่วไปในชีวสังเคราะห์ของ aromatic amino acid และ สารทุติยภูมิอีกหลายตัว และขั้นตอนสุดท้ายคือได้ tryptophan เป็นสารตั้งต้นในวิธีการสังเคราะห์ IAA ต่อไป ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ดังภาพที่ 5

วิถี Indole-3-Acetamide (IAM) วิถี IAM ประกอบด้วยสองขั้นตอน ขั้นตอนแรก เอนไซม์ tryptophan monooxygenase (สังเคราะห์จากยีน *iaaM*) เปลี่ยน tryptophan ไปเป็น IAM และขั้นตอนต่อมา IAM จะถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็น IAA และ ammonia (NH_3) ด้วยเอนไซม์ IAM Hydrolase (สังเคราะห์จากยีน *iaaH*) ซึ่งจากยีนที่สร้างเอนไซม์ทั้งสองนั้นเป็นลักษณะของยีนที่อยู่ในแบคทีเรียก่อโรคในพืช เช่น *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans* และในแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน(nitrogen fixing bacteria) เช่น *Rhizobium* และ *Bradyrhizobium* sp. เป็นต้น

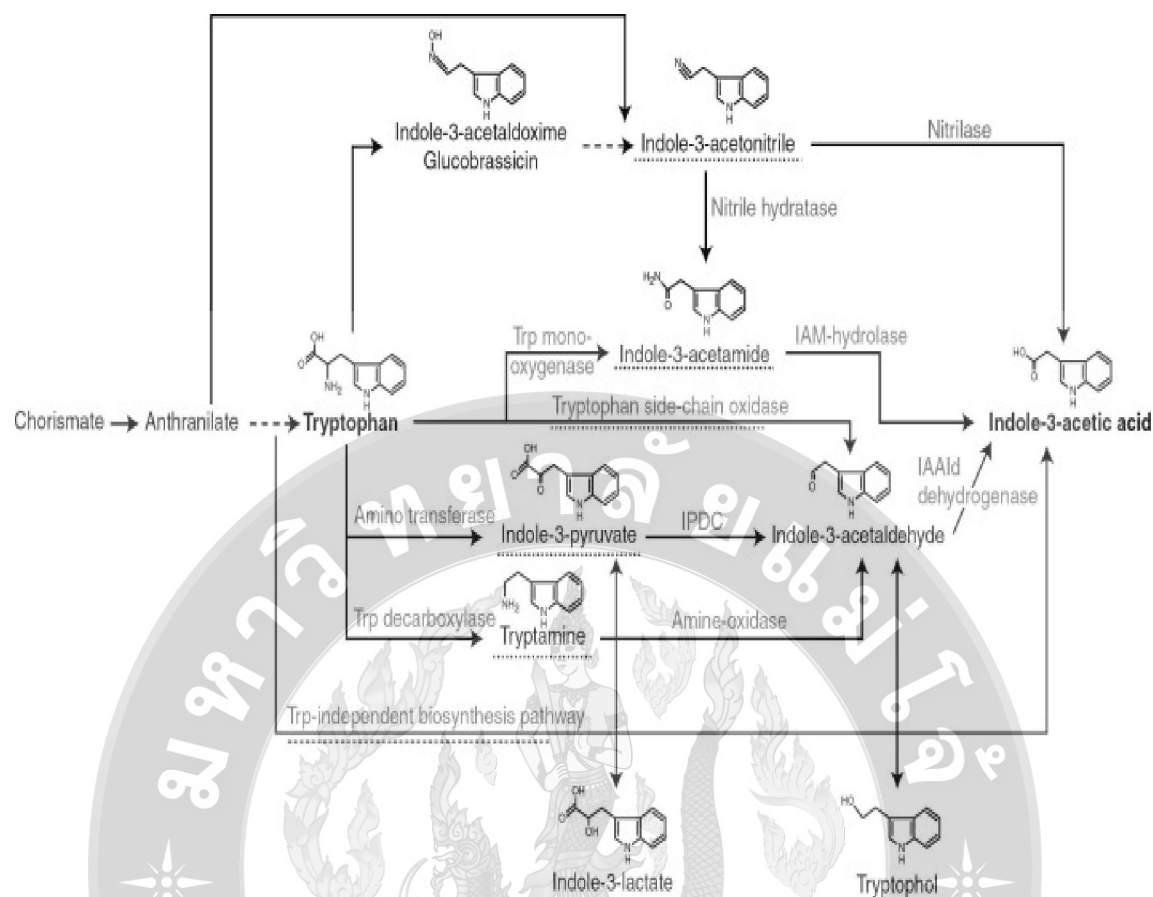
วิถี Indole-3 pyruvate (IPA) วิธีการสังเคราะห์ IPA ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรก tryptophan จะถูกเปลี่ยนไปเป็น IPA ด้วย เอนไซม์ aminotransferase ขั้นตอนที่ 2 ปฏิกริยาการปลดปล่อยหมู่คาร์บอกซิลของ IPA โดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาคือ indole-3-pyruvate decarboxylase (สังเคราะห์จากยีน *ipdC*) ไปเป็น indole-3-acetaldehyde (IAAld) และขั้นตอนสุดท้าย IAAld เปลี่ยนไปเป็น IAA ด้วยเอนไซม์ IAAld dehydrogenase

IPA ส่วนใหญ่เป็นวิธีการสังเคราะห์ออกซินในพืชแต่วิถี IPA แต่ก็ยังพบในแบคทีเรียหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มของแบคทีเรียก่อโรคในพืช เช่น *P. agglomerans* กลุ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อพืช เช่น *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobiums*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* และ *Rhizobium* และยังพบในกลุ่มของ Cyanobacteria เป็นต้น

วิถี tryptamine (TAM) ซึ่ง tryptophan จะเปลี่ยนเป็น tryptamine ด้วยเอนไซม์ tryptophan decarboxylase และ tryptamine เปลี่ยนเป็น IAAld ด้วยเอนไซม์ amino-oxidase พบ *Bacillus cereus* และ *Azospirillum*

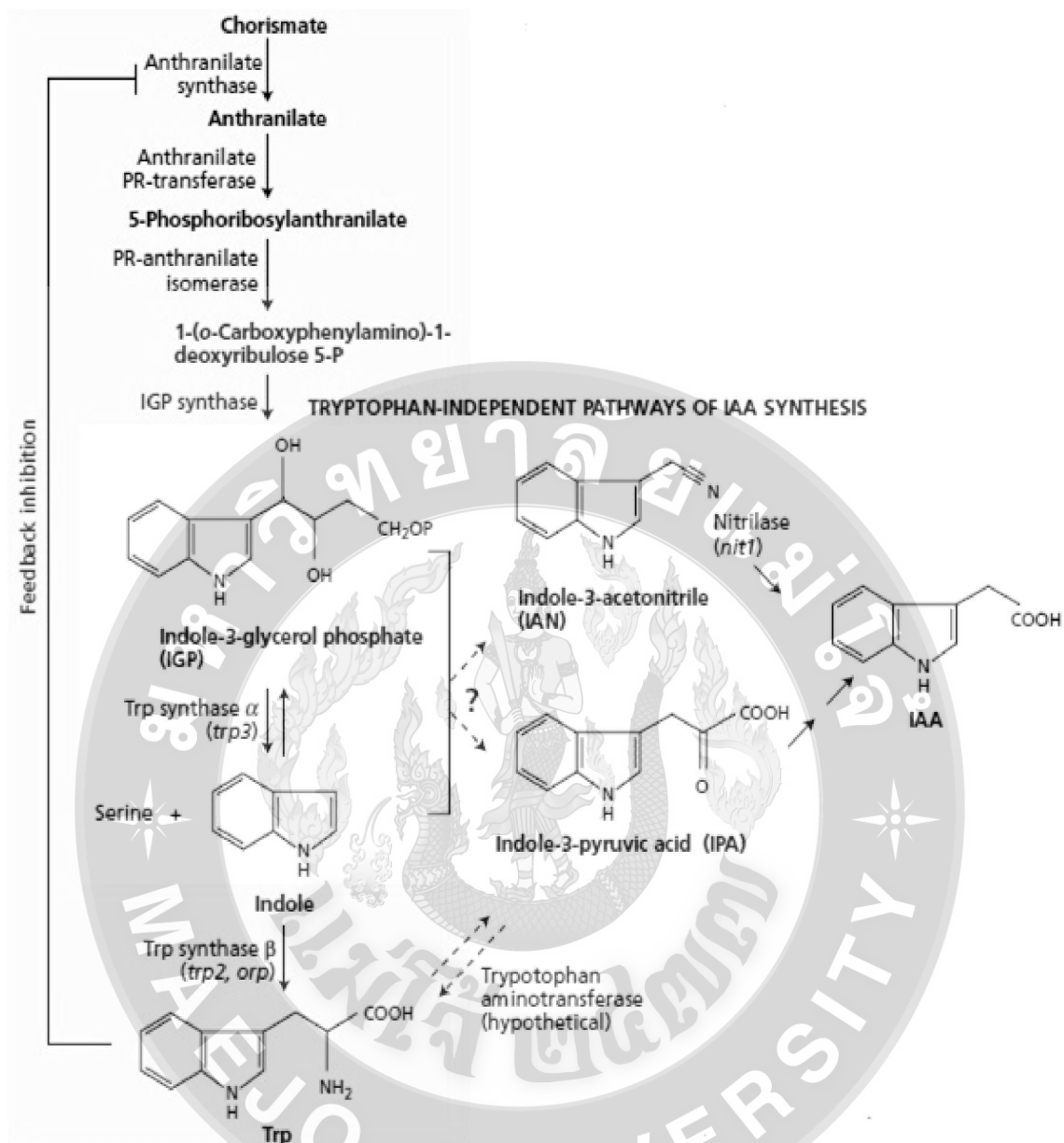
วิถี indol-3-acetonitrile (IAN) โดย IAN จะเปลี่ยนไปเป็น IAA โดยตรงด้วยเอนไซม์ nitrilase พบใน *A. tumefaciens* และ ทางอ้อมโดย IAN เปลี่ยนไปเป็น IAM ด้วยเอนไซม์ nitrile hydratase พบใน *Agrobacterium* และ *Rhizobium* spp.

วิถี tryptophan side-chain oxidase (TSO) ในวิถีนี้ tryptophan จะถูกเปลี่ยนเป็น IAAld ด้วยเอนไซม์ tryptophan side-chain oxidase แล้ว IAAld เปลี่ยนเป็น IAA ด้วยเอนไซม์ IAAld dehydrogenase ซึ่งจะพบแต่ใน *Pseudomonas fluorescens* CHA0



ภาพที่ 5 ชีวิตสังเคราะห์ Indole-3-Acetic acid (IAA) ในแบคทีเรีย (Spaepen and Vaanderleyden, 2010)

วิธีที่เป็นอิสระต่อ **tryptophan (Tryptophan-independent pathway)** การสังเคราะห์ IAA วิธีนี้จะพบในพืชที่เกิดการกลายพันธุ์โดยจะไม่ใช่ tryptophan เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ IAA แต่การสังเคราะห์ IAA เกิดจาก indole-3-glycerol phosphate หรือ indole แต่ในแบคทีเรียมีรายงานการพบใน *Azospirillum brasilense* แต่ไม่มีหลักฐานทางพันธุกรรมหรือชีวเคมี ที่ให้การสนับสนุน วิธีนี้ชัดเจนดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ชีวิตที่เป็นอิสระต่อ tryptophan ทั้งในพืชและแบคทีเรีย (Bartel, 1997)

6.3 การสลายตัวของ IAA

ปริมาณของ IAA ในพืชนั้นไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับอัตราการสังเคราะห์เท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการสลายตัว ซึ่งการสลายตัวของ IAA นั้น สามารถเกิดขึ้นได้หลายวิธี

6.3.1 โฟโตออกซิเดชัน (Photo-oxidation) IAA ที่อยู่ในสภาพสารละลายจะสลายตัวได้เมื่อได้รับแสง การเกิด photo-oxidation ของ IAA จะถูกเร่งโดยการปรากฏของรังสีวัตตามธรรมชาติ หรือที่สังเคราะห์ได้ จึงอาจจะเป็นไปได้ว่าการที่รังสีวัตของพืชดูดซับพลังงานจากแสงแล้วทำให้เกิดการออกซิไดซ์ IAA ซึ่งรังสีวัตที่เกี่ยวข้อง คือ ไรโบฟลาวินและไวโอลาแซนธิน (Riboflavin และ Violaxanthin) สารที่เกิดขึ้นเมื่อ IAA สลายตัวโดยแสงคือ 3-methylene-2-oxindole และ Indoleacetaldehyd

6.3.2 การออกซิไดซ์ IAA โดยเอนไซม์ (Enzymic Oxidation of IAA) พืชหลายชนิดมีเอนไซม์เรียกว่า IAA-oxidase ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการสลาย IAA ได้คาร์บอนไดออกไซด์ และเป็นปฏิกิริยาที่ใช้ออกซิเจน IAA-oxidase มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ประเภทเพอร์ออกซิเดส (peroxidase) และเป็นเอนไซม์ที่ต้องการแมงกานีสเป็นโคแฟกเตอร์ กระบวนการออกซิไดซ์ โดย IAA-oxidase ยังไม่เป็นที่เข้าใจกันมากนัก จากการทดลอง In vitro พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ 3-methylene-2-oxindole และถูกเมตาโบไลซ์ต่อไป เป็น 3-methyl-2-oxindole

มีการทดลองหลายครั้งที่ยืนยันว่า IAA-oxidase จะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุของพืชเพิ่มมากขึ้น นอกจากนั้นยังมีความสัมพันธ์แบบผกผันระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณของ IAA-oxidase ในเนื้อเยื่อของรากจะมี IAA ในปริมาณต่ำ แต่มี IAA-oxidase เป็นจำนวนมาก

6.3.3 รวมกับสารชนิดอื่นในไซโตพลาสต์ หรือ เปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ชนิดอื่น

6.4 การวัดปริมาณออกซิน

6.4.1 Bioassay คือ การวัดปริมาณออกซินโดยใช้ชิ้นส่วนของพืช เช่น โคลิออปไทล์ของข้าวโอ๊ตหรือพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอื่นๆ แล้ววัดความโค้งงอของยอดโดยการวางออกซินที่ต้องการวัดปริมาณลงบนส่วนของโคลิออปไทล์ซึ่งตัดยอดออกแล้ว มุมที่โค้งจะบอกปริมาณของออกซินได้ โดยเปรียบเทียบจากเส้นมาตรฐาน (Standard Curve)

6.4.6 การวัดจากคุณสมบัติทางฟิสิกส์ คือ การวัดปริมาณของออกซินโดยใช้การดูดกลืนแสงของ IAA ซึ่งเมื่อมีความเข้มข้นต่างกันจะดูดกลืนแสงได้ต่างกัน โดยใช้ความยาวคลื่นแสงที่

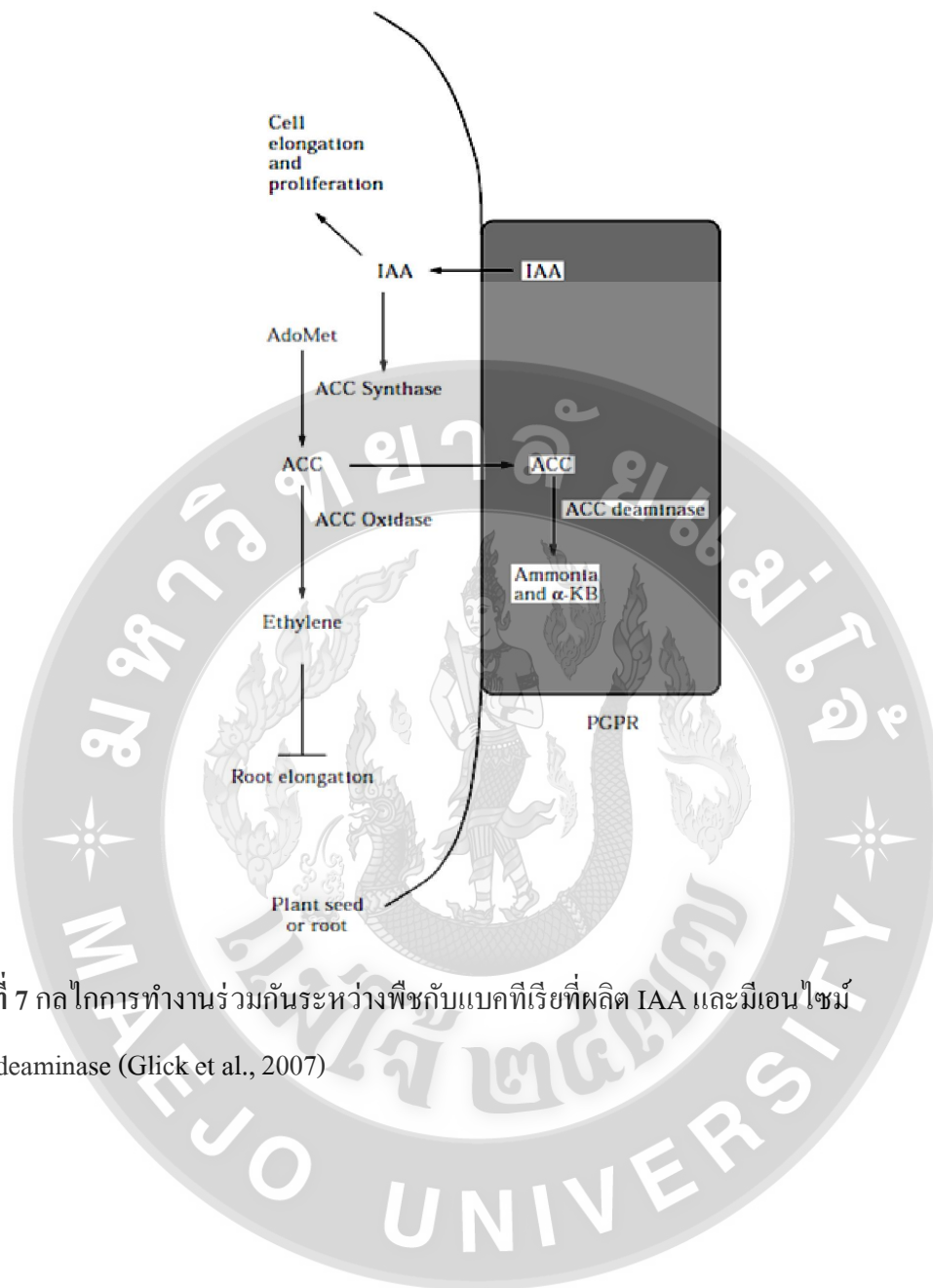
280 nm หรือสกัดจนเป็นสารบริสุทธิ์แล้วจึงใช้เครื่อง Gas Chromatograph ร่วมกับ Mass Spectrometry ในการจำแนกและหาปริมาณ

6.4.7 การวัดโดยวิธีเคมี โดยให้ออกซินทำปฏิกิริยากับ Salkowski's Reagent (acidified ferric chloride) หรือใช้ Ehrlich's Reagent ซึ่งจะเกิดสีขึ้นมา จากนั้นวัดความเข้มของสีแล้วเปรียบเทียบกับเส้นมาตรฐาน

6.4 บทบาทด้านการผลิตฮอร์โมนพืชของแบคทีเรีย

แบคทีเรียกลุ่มสนับสนุนการเจริญของพืชที่อาศัยบริเวณรากพืช อาศัยอย่างอิสระอาศัยทั้งในพืชและบนพืชมีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชได้ (Tsavkelova et al., 2006) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีปริมาณสูงถึงร้อยละ 80 ของแบคทีเรียทั้งหมดในดิน โดยฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญและการพัฒนาการของพืชแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ ออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโทไคนิน เอทิลีน และกรดแอบไซซิก (Hayat et al., 2010) Indole-3-Acetic Acid (IAA) เป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซินมีบทบาทต่อการยืดยาวและการแบ่งเซลล์รวมทั้งช่วยกระตุ้นการเจริญและการพัฒนาการเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองของพืช การกระตุ้นการสร้าง IAA จากแบคทีเรีย ด้วยเอนไซม์ ACC deaminase จากพืช ดังภาพที่ 7

จากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตออกซินได้ เช่นแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* และ *Xanthomonas* เป็นต้น (Tsavkelova et al., 2006; Ahmad et al., 2008) ไซยาโนแบคทีเรียในสกุล *Nostoc*, *Calothrix*, *Anabaena* เป็นต้น นอกจากแบคทีเรียแล้ว ยูคาริโอตทั้งยีสต์และราหลายสกุล เช่น *Saccharomyces*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Aspergillus* และ *Trichoderma* เป็นต้น ก็มีความสามารถในการผลิต IAA เช่นกัน (Tsavkelova et al., 2006)



ภาพที่ 7 กลไกการทำงานร่วมกันระหว่างพืชกับแบคทีเรียที่ผลิต IAA และมีเอนไซม์ ACCdeaminase (Glick et al., 2007)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์

- 1.1 ตู้ปลอดเชื้อชนิด Biohazard (Microflow, USA)
- 1.2 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Binder, Germany)
- 1.3 ตู้อบลมร้อน (Binder, Germany)
- 1.4 เครื่องฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Astell, England)
- 1.5 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, Switzerland)
- 1.6 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, Switzerland)
- 1.7 กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Olympus, Japan)
- 1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง Spectrafuge™ 7M Microcentrifuge (Labnet Hermle, USA)
- 1.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง GENESYS™ 20 (Thermo Scientific, USA)
- 1.10 PCR Mastercycler Personal (Eppendorf, Canada)
- 1.11 Electrophoresis (Labnet, USA)
- 1.12 Transluminator (Bio-rad, USA)
- 1.13 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, Taiwan)
- 1.14 ชุดทำ PCR Product ให้บริสุทธิ์สำเร็จรูป GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan)
- 1.15 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่
 - งานอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - หลอดทดลอง
 - ปีกเกอร์
 - ปีเปต
 - กระบอกตวง
 - ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
 - กระดาษกรอง เบอร์ 1, 42
 - เครื่องวัดพีเอช
 - ห่วงถ่ายเชื้อ
 - เข็มเขี่ยเชื้อ

- ปากคีบ
- สไลด์
- Microcentrifuge tube
- PCR reaction tube
- Micropipette

2. สารเคมี

สารเคมี	บริษัท
2.1 Glacial acetic acid	Merck, Germany
2.2 Ammonium dihydrogen phosphate	J.T. baker, USA
2.3 Ammonium sulfate	Merck, Germany
2.4 Boric acid	Merck, Germany
2.5 Carboxymethyl cellulose (CMC)	Union Science, Thailand
2.6 Calcium chloride	Merck, Germany
2.7 Citric acid	BDH, England
2.8 Cobalt chloride	UNIVAR, Australia
2.9 Copper sulfate	J.T. baker, USA
2.10 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	J.T. baker, USA
2.11 Ferric ammonium sulphate	UNIVAR, Australia
2.12 Ferrous sulphate	J.T. baker, USA
2.13 Folin-Ciocalteu reagent	Merck, Germany
2.14 Glucose monohydrate	Merck, Germany
2.15 Hydrochloric acid	UNIVAR, Australia
2.16 Indigo carmine	Sigma, USA
2.17 Magnesium sulphate	UNIVAR, Australia
2.18 Maleic acid	QRec, New Zealand
2.19 Manganese chloride	UNIVAR, Australia
2.20 Methanol	LAB-SCAN
2.21 p-nitrophenyl	Fluka, Japan
2.22 p-nitrophenyl phosphate di sodium salt	Sigma, Austria

2.23	Phenol	Fisher Scientific, UK
2.24	Potassium chlorate	Merck, Germany
2.25	Potassium chloride	EMSURE, Germany
2.26	Potassium cyanide	J.T. baker, USA
2.27	Potassium ferrocyanide	Fisher Scientific, UK
2.28	di-potassium hydrogen phosphate	BDH, England
2.29	Potassium sodium tartrate	CARLO ERBA REAGENTI
2.30	Sodium acetate	Merck, Germany
2.31	Sodium carbonate	Fisher Chemicals, UK
2.32	Sodium dihydrogen phosphate	Merck, Germany
2.33	Sodium dodecyl sulphate	Fisher Chemicals, UK
2.34	Disodium hydrogen phosphate	Fisher Chemicals, UK
2.35	Sodium hydroxide	LABSCAN
2.36	Sodium hypochlorite	Union Science, Thailand
2.37	Disodium molybdate	J.T. baker, USA
2.38	Sodium nitroprusside	Merck, Germany
2.39	Sulfuric acid	LABSCAN
2.40	Trichloroacetic acid	Merck, Germany
2.41	Triphenyl formazan	Sigma, Japan
2.42	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride	Merck, Germany
2.43	Tris (hydroxyl methyl) amino methane	Vivantis, USA
2.44	Tyrosine	Fluka Biochemike, Switzerland
2.45	Urea	CODER CARLOERBA
2.46	Zinc sulphate	J.T. baker, USA
2.47	สารเคมีที่ใช้ในการย้อมแกรม	(Bio-Medical Laboratory, ประเทศไทย)
2.48	สารละลาย/สารเคมี ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ	(Geneaid, Taiwan)
2.49	สารเคมี สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	
	- PCR Master Mix	(Fermentas, USA)
	- 16S rDNA primer คือ 27F และ 1522R	(Operon, Germany)
2.50	สารเคมีที่ใช้ในการทำ electrophoresis	

- Loading dye (Fermentas, USA)
 - GeneRuler TM100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, USA)
 - สารละลาย Gel star (Lonza, Switzerland)
 - Agarose gel Vivantis, USA
- 2.51 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR purification (BC Bioscience, Taiwan)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (ภาคผนวก ข)

- 3.1. mineral salts medium (Ginkel et al., 1995)
- 3.2 nutrient broth (Criterion, Hardy Diagnostic, USA)
- 3.3 nutrient agar (Criterion, Hardy Diagnostic, USA)
- 3.4 Starch casein agar
- 3.5 Streptomycin rose Bengal agar

4. วิธีการทดลอง

4.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างดินจากสวนลำไย

เก็บตัวอย่างดินจากสวนลำไยในพื้นที่ จ.เชียงใหม่ โดยเป็นสวนที่มีการใช้สารคลอเรตเพื่อเร่งการออกดอกนอกฤดูกาลของลำไย

4.2 คัดแยก chlorate reducing bacteria จากดินในสวนลำไย

นำตัวอย่างดินมาผ่านขั้นตอน enrichment โดยการดัดแปลงวิธีของ Ginkel et al. (1995) และแยกเชื้อโดยการทำ serial dilution ใน agar tube และบน agar plate (Bruce et al., 1999) นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญขึ้นมาไปทำให้บริสุทธิ์ และเก็บไว้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.3 การทดสอบการสลายคลอเรต โดยแบคทีเรียรีดิวส์ในระดับหลอดทดลอง

4.3.1 นำเชื้อแบคทีเรียรีดิวส์ที่บริสุทธิ์ที่แยกได้จากดิน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอเรต 200 มิลลิกรัม/ลิตร และมีค่าพีเอชของอาหารที่แตกต่างกันคือ 5, 7 และ 8 นาน 24 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์ปริมาณคลอเรต

4.3.2 นำเชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ที่แยกได้จากดิน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอไรด์ 200 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลกลูโคส 200 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 7 นาน 24 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์ปริมาณคลอไรด์

4.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่บริสุทธิ์คลอไรด์

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการสลายคลอไรด์ มาจำแนกชนิดโดยใช้คุณสมบัติทางสรีรวิทยา และการใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา

4.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ได้มาทำการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา รูปร่าง และการติดสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Compound microscope) กำลังขยายของภาพ 1000 เท่า

4.4.2 การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย โดยการหาลำดับเบส 16S rRNA

1) การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อบริสุทธิ์เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NB แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหาร NB โดยการนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เซลล์แบคทีเรียจะตกตะกอนอยู่ที่ก้น Microcentrifuge tube ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) (Geneaid, Taiwan)

2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่อง PCR Mastercycler Personal โดยใช้ primer คือ 27F (5'AGAGTTTGATCMTGG CTCAG-3') และ 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCRCCGCA -3') จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis โดยนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง Dark reader ทำให้สังเกตเห็นแถบของดีเอ็นเอปรากฏขึ้น จากนั้นนำ PCR product ของชิ้นส่วน 16S rDNA ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ดีเอ็นเอบรรจุอยู่ใน Microcentrifuge tube และนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3) การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย โดยการหาลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rRNA

นำ PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ววิเคราะห์หาลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rRNA โดยในการวิจัยครั้งนี้ได้จัดส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท First BASE Laboratories ณ ประเทศมาเลเซีย แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

4.5 ทดสอบความสามารถการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของเชื้อ chlorate reducing bacteria ต่อของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคลำไย

4.5.1 การแยกเชื้อสาเหตุโรคและบ่งชนิด

เก็บตัวอย่างลำไยที่เป็นโรคจากแหล่งปลูกในพื้นที่อำเภอสันทราย ด้วยวิธีการเลี้ยวเนื้อเยื่อที่เป็นโรคโดยตัดเนื้อเยื่อบริเวณคาบเกี่ยวเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อเป็นโรคให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 3x3 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบนำไปวางบนผิวหน้า Potato Dextrose Agar (PDA) plate ที่ผสมยาปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนมีเส้นใยของเชื้อราปรากฏบนจานอาหาร แล้วใช้เข็มเขี่ยตัดอาหารวุ้นบริเวณปลายเส้นใยไปเลี้ยงบน PDA plate ใหม่ที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อราออกเส้นใยใหม่อีกครั้งจนได้เชื้อบริสุทธิ์ตามวิธี Hyphal tip isolation เก็บบริเวณปลายสุดของเส้นใยมาเก็บเป็น stock culture บน PDA slant

4.5.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่แยกมาจากบริเวณผิวใบลำไยและผลลำไย ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไย โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ Dual culture (Mostapha, 2004)

เพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA แล้วเจาะด้วย cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำมาวางบนจานอาหาร PDA แล้วนำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาจัดเป็นเส้นขนานกับเชื้อราด้านตรงข้าม บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 วัน วัดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อรา เทียบกับเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารที่ไม่ปลูกเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (control) จากนั้นนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยตามกรรมวิธีของ Mostapha (2004)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้ง} = \frac{(\text{Control growth} - \text{Fungal growth})}{\text{Fungal growth}} \times 100$$

4.6 ทดสอบความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืชโดยเฉพาะออกซินของ chlorate reducing bacteria

4.6.1 การทดสอบการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) จากแบคทีเรียสายคลอเรต

- 1) นำเชื้อแบคทีเรียสายคลอเรตทั้ง 91 ไอโซเลต คัดแยกจากดินสวนลำไยที่ได้ มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Tryptone Soy Broth (TSB)
- 2) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสองสัปดาห์เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
- 3) จากนั้นนำมา Streak ลงบนอาหาร Tryptone Soy Agar (TSA) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสองสัปดาห์เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
- 4) นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง TSA นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสองสัปดาห์เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
- 5) นำเชื้อแบคทีเรียสายคลอเรตที่อยู่ในอาหารแข็ง TSA มาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth (NB) และ Tryptone soy broth (TSB) ที่เติม tryptophan 200 mg/ml บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสองสัปดาห์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 6) นำไปวิเคราะห์ปริมาณ IAA ตามวิธีมาตรฐาน (Ahmad et al, 2008) ในภาคผนวก ข

4.6.2 การทดสอบผลของความเข้มข้น tryptophan ต่อการผลิต IAA

- 1) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต IAA ได้สูง 30% แรกและนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 24-72 ชั่วโมง
- 2) ปรับปริมาณเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น เท่ากับ McFarland No. 0.5 (ภาคผนวก ค) (1.5×10^8 cell/ml) โดยใช้ 0.85% NaCl
- 3) ถ่ายเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 0.2 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีปริมาณ tryptophan ความเข้มข้น 0, 200, 400 และ 600 mg/ml

4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

5) นำไปวิเคราะห์ปริมาณ IAA ในภาคผนวก ง

4.6.3 ผลของ pH ต่อการผลิต IAA

1) เตรียมเชื้อแบคทีเรียเช่นเดียวกับที่ทดสอบผลของความเข้มข้นของ tryptophan ต่อการผลิต IAA ของเชื้อแบคทีเรีย

2) ถ่ายเชื้อปริมาตร 0.2 ml ใส่ลงในอาหาร TSB ที่มีปริมาณ tryptophan 200 mg/ml ที่มี pH ต่างๆ คือ 5, 6, 7, 8 และ 9 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

3) วิเคราะห์ปริมาณ IAA ในภาคผนวก ง

4.6.4 ผลของการให้อากาศต่อการเข้าต่อการผลิต IAA

1) เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการในข้อ 3

2) ถ่ายสารละลายเชื้อแบคทีเรีย 4 ml ลงในอาหาร TSB ซึ่งเติม tryptophan เท่ากับ 200 mg/ml ปริมาตร 100 ml เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 5 และ 7 วัน

3) วิเคราะห์ปริมาณ IAA ในภาคผนวก ง

4.7 ทดสอบความสามารถของเชื้อ chlorate reducing bacteria ในการละลายฟอสเฟต

4.7.1 ทดสอบความสามารถของเชื้อ chlorate reducing bacteria ในการละลายฟอสเฟต เบื้องต้นบนอาหารแข็ง Pikovskaya (PVK) medium และ National Botanical Research Institute's (NBRI) phosphate growth medium โดยวิธีการ point inoculation (Nautiyal, 1999)

4.7.2 จากนั้นนำมาทดสอบโดยละเอียดในเชิงปริมาณในอาหารเหลวตามวิธีการของ Pandey et al. (2006) โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อ chlorate reducing bacteria ในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน นาน 15 วัน โดยนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต (พัชร, 2550)

4.8 การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ การผลิตฮอร์โมนพืช และความสามารถในการละลายฟอสเฟตของเชื้อ chlorate reducing bacteria

4.9 ปัจจัยในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้

ตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ chitinase โดยนำเชื้อ chlorate reducing bacteria ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ มาตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ chitinase บนอาหารแข็งโดยวิธีของ Cherni et al. (1995)



ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการคัดแยกเชื้อราก่อโรคในลำไย จากตัวอย่างลำไย

ผลการแยกเชื้อราสาเหตุโรคของลำไย ตามวิธี Hyphal tip isolation ลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ในพื้นที่อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ ที่แสดงอาการโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา 2 ลักษณะคือจุดสีดำ และจุดสีส้มที่ใบ (ภาพที่ 1) ได้เชื้อราจำนวนทั้งสิ้นจำนวน 10 ไอโซเลต โดยให้เชื้อรารหัส L4.4B, L5.3B, L5.2A และรหัส L4.1B และตัวแทนของเชื้อราทั้งหมด จากลักษณะโคโลนีที่เหมือนกันโดยแบ่งออกเป็น 4 ลักษณะ คือ 1) โคโลนีสีเทา เส้นใยไม่ฟูและกระจาย ขอบโคโลนีเรียบ ให้เชื้อรารหัส L4.1B เป็นตัวแทนของเชื้อรา 2) โคโลนีสีเทา เส้นใยฟูและกระจาย สปอร์สีดำ ให้เชื้อรารหัส L4.4B เป็นตัวแทนของเชื้อรา 3) โคโลนีสีขาว เส้นใยมีลักษณะฟูและกระจาย ให้เชื้อรารหัส L5.2A เป็นตัวแทนของเชื้อราในลักษณะนี้ 4) โคโลนีสีขาว เส้นใยไม่ขึ้นฟู และกระจาย ให้เชื้อรารหัส L5.2B เป็นตัวแทนของเชื้อรา 3) และ 4) ดังแสดงในตารางที่ 4 จากการจำแนกชนิดโดยอาศัยหลักการของ Alexopoulos และคณะ (1996) และ วรวรรณและวิหชา (มปป.) พบว่า L4.1B เป็นเชื้อราที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเส้นใยไปเป็น asexual spores เรียกว่าเป็น mycelia sterilia ในขณะที่ L4.4B, L5.2A และ L5.2B เป็นเชื้อราในجنس *Meliola*, *Collectrichum* และ *Phomopsis* ตามลำดับ



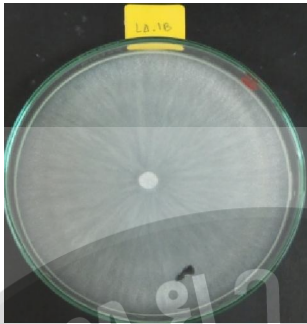
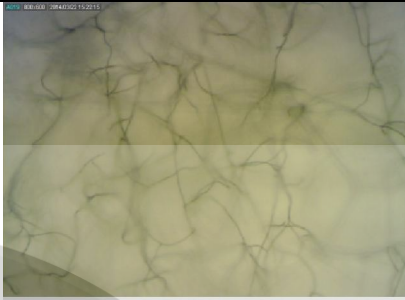
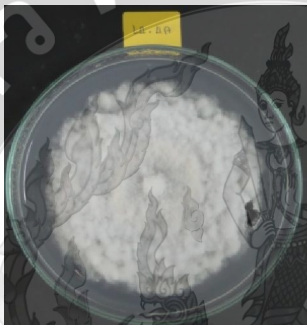
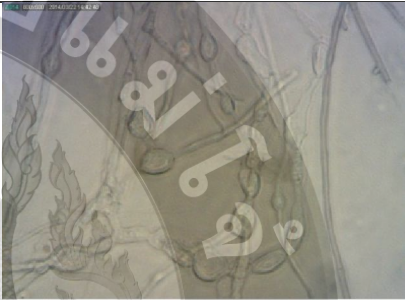
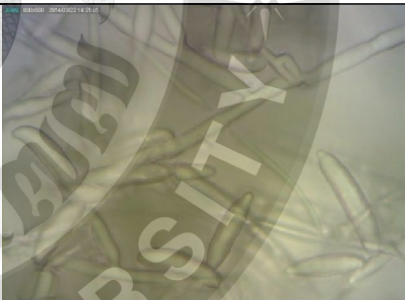
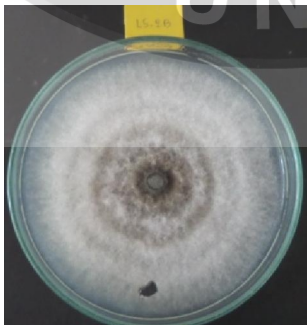
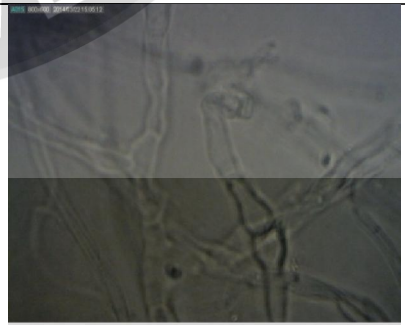
ก.



ข.

ภาพที่ 8 ตัวอย่างชิ้นส่วนใบพืชที่มีอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อราที่ใช้ในการแยกตัวอย่างเชื้อบ (ก) ใบที่มีจุดสีดำ (ข) ใบที่มีจุดสีส้ม

ตารางที่ 1 การจำแนกเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างใบลำไยที่มีอาการของโรค

ตัวอย่างเชื้อรา	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
L4.1B		 (400x)
L4.4B		 (400x)
L5.2A		 (400x)
L5.2B		 (400x)

2. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไย โดยใช้แบคทีเรียสายคลอเรตโดยใช้วิธีการ Dual culture

เมื่อนำแบคทีเรียสลายคลอเรตจำนวน 91 ไอโซเลต มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) หลังจากเลี้ยงเชื้อร่วมกันเป็นเวลา 3 – 5 วัน พบว่าแบคทีเรียสลายคลอเรต สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรากล่อโรคลำไยได้จำนวน 11 ไอโซเลต และพบบริเวณใส (clear zone) ระหว่างโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรต และเชื้อรากล่อโรคลำไย (ภาพที่ 2) โดยจะให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อแตกต่างกันไป โดยเชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา mycelia sterilia L4.1B มีเพียง 1 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต 1-2D โดยสามารถยับยั้งการเจริญได้ 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองควบคุม

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Meliola* L4.4B มีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งได้ 2 ไอโซเลตคือ K7-1A.1.3 และ 7.2.1 โดยยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 28.3 และ 30.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดลองการยับยั้งเชื้อรา รหัส L4.1B

รหัสเชื้อแบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ค่าการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เชื้อรา รหัส L4.1B
control	53.72		
1-2D	40.29	10.12	25.00

ตารางที่ 3 เชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Meliola* L4.4B

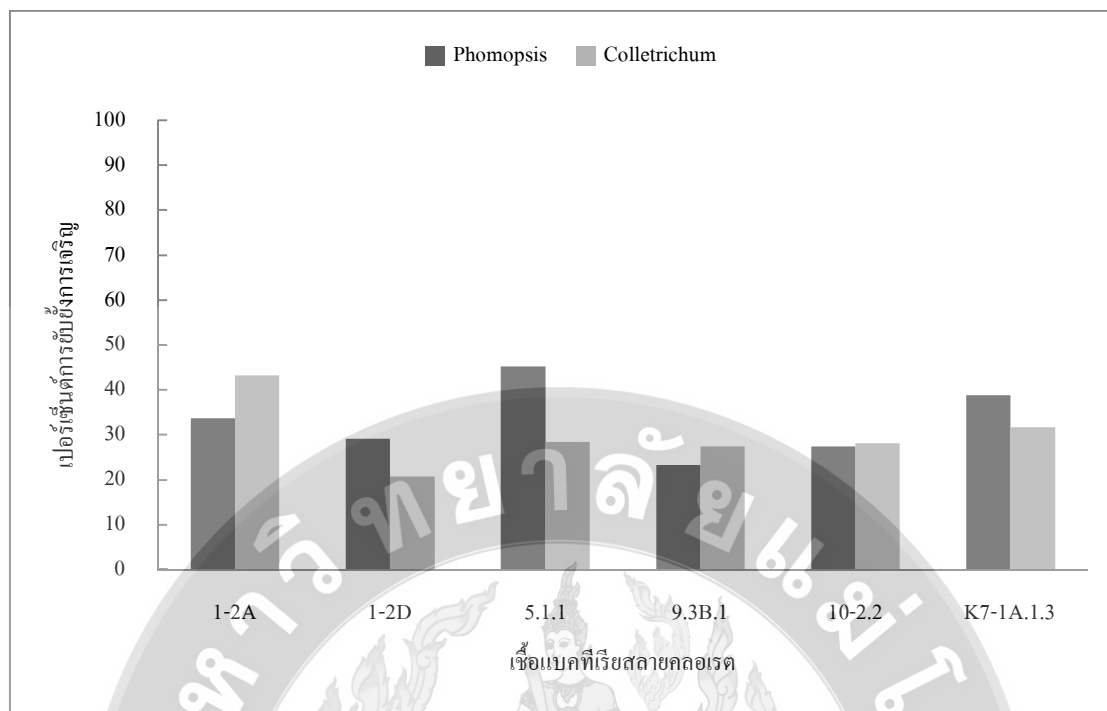
รหัสเชื้อแบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ค่าการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เชื้อ
control	66.77		

K7-1A.1.3	47.89	3.33	28.27
7.2.1*	46.37	7.92	30.55

ตารางที่ 4 ผลการทดลองการยับยั้งเชื้อรา รหัส L5.2B

เชื้อแบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ค่าการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เชื้อ
control	51.72		
10-2.2	37.52	5.67	27.45
9.3B.1	39.66	6.65	23.32
1-2D	36.62	11.93	29.19
9-5E	35.52	5.77	31.31
3-1A.1	35.81	4.30	30.76
9-3-2	30.81	7.37	40.43
9-2.1	36.22	3.46	29.97
7.2.1*	30.20	8.29	41.60
1-2A	34.33	6.78	33.61
5.1.1	28.34	5.74	45.20
C2-3.1	29.40	4.18	43.15
1-1E.2.1	31.40	5.97	39.29
K73.1.1	31.64	4.19	38.82

สำหรับการทดสอบกับเชื้อรา *Collectrichum* L5.2A และ *Phomopsis* L5.2B ซึ่งเชื้อราในทั้ง 2 จินัสนี้เป็นสาเหตุของโรคใบจุดดำ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรตจำนวน 17 ชนิดที่แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าว ได้ในช่วง 20.7-49.4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ และ) โดยมีเชื้อแบคทีเรียเพียง 6 ไอโซเลตที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ 1-2A, 1-2D, 5.1.5, 9.3B.1, 10-2.2 และ K7-1A.1.3 (ภาพที่)



ภาพที่ 9 การยับยั้ง *Collectrichum* L5.2A และ *Phomopsis* L5.2B สาเหตุโรคใบจุดดำของข้าว
แบคทีเรียสลายคลอเรต

ตารางที่ 5 ผลการทดลองการยับยั้งเชื้อรา รหัส L5.2A

รหัสเชื้อแบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ค่าการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เชื้อรา รหัส L5.2A
control	54.20		
3-2D.1.2	38.54	6.49	28.89
9-5.1	32.91	7.67	39.27
9-3B.1	39.35	48.05	27.40
1-2D	42.97	3.37	20.72

10-2.2	38.99	4.32	28.06
5.1.1	38.84	2.31	28.34
C7-1B.2	27.42	9.14	49.40
1-2A	30.77	5.02	43.22
K7-1A.1.3	37.04	6.21	31.66



ภาพที่ 10 แบคทีเรียสลายคลอเรตที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไย โดยใช้โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ Dual culture

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียสลายคลอเรตที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไย

3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

จากการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรต โดยการศึกษาลักษณะพื้นฐานทางสรีรวิทยา พบว่าทั้ง 11 ไอโซเลตนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ดังแสดงในตารางที่

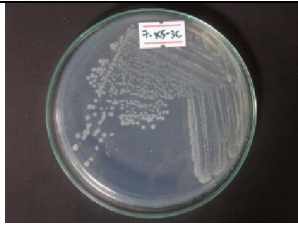
3.2 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรตด้วยเทคนิคทางอนุวิทยาด้วยวิธีการหาลำดับเบสของ 16S rRNA

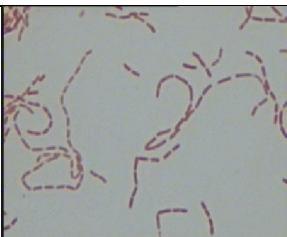
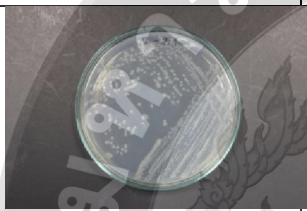
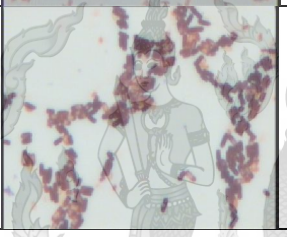
เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่นำมาทดสอบทั้ง 11 ไอโซเลต ไปจำแนกโดยเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยชุดสำเร็จรูป GEL/PCR DNA Fragments

Extraction Kit และนำมาทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction โดยใช้ Universal Primer 27F และ 1522R เป็น primer เมื่อนำมา run gel – electrophoresis พบว่า เชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรต ผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1500 คู่เบส จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปหาลำดับเบสที่ บริษัท First BASE Laboratories ณ ประเทศมาเลเซีย

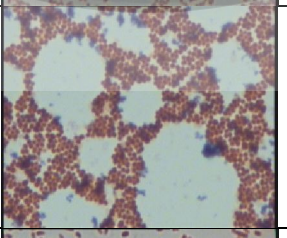
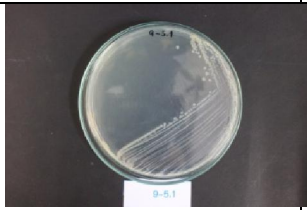
หลังจากการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรตโดยนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ดังแสดงตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับเบสในภาพที่ 3 พบว่า เชื้อรหัส 9-5E, 7.2.1, 9-5.1, K7-1A.1.3 และเชื้อรหัส 10-2.2 มีความเหมือนกับ *Bacillus amyloliquefaciens* strain EGY-SCJ1 ที่มี GenBank Accession no. คือ KF576648.1 เท่ากับ 100% ในขณะที่เชื้อรหัส K5-3C มีความเหมือนกับ *Pseudomonas mendocina* strain B6-1 ที่มี GenBank Accession no. คือ EU100399.1 เท่ากับ 100% เชื้อรหัส 1-2D มีความเหมือนกับ *Bacillus subtilis* strain 2B ที่มี GenBank Accession no. คือ KF112078.1 เท่ากับ 100% เชื้อรหัส 10-5.1 มีความเหมือนกับ *Pseudomonas* sp. AKM-L5 ที่มี GenBank Accession no. คือ KF649130.1 เท่ากับ 100% เชื้อรหัส 9-2.1 มีความเหมือนกับ *Alcaligenaceae bacterium* KAs3-R3 ที่มี GenBank Accession no. คือ JX110531.1 เท่ากับ 100% เชื้อรหัส 1-2A มีความเหมือนกับ *Staphylococcus epidermidis* strain G0242 ที่มี GenBank Accession no. คือ KF575163.1 เท่ากับ 100% และสุดท้ายเชื้อรหัส 5.1.1 มีความเหมือนกับ *Pseudomonas putida* strain L39 ที่มี GenBank Accession no. คือ KF42930.1 เท่ากับ 100% (ตารางที่ 11) ซึ่งเชื้อทั้ง 11 ไอโซเลตนี้แยกได้จากดินและกากตะกอนน้ำเสีย

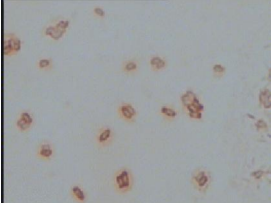
ตารางที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไย

ไอโซเลต	โคโลนีแบคทีเรีย	เซลล์แบคทีเรีย	แกรม/รูปร่าง	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย
K5-3C			ลบ/ rods	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain B6-1

1-2D			บวก/ ท่อน	<i>Bacillus subtilis</i> strain 2B
10-5.1			ลบ/ rods	<i>Pseudomonas</i> sp. AKM-L5
9-5E			บวก/ ท่อน	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain EGY-SCJ1
7.2.1			บวก/ ท่อน	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain EGY-SCJ1

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ไอโซ เลต	โคโลนีแบคทีเรีย	เซลล์แบคทีเรีย	แกรม/ รูปร่าง	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย
9-2.1			ลบ/ rods	<i>Pseudomonas putida</i> strain L39
1-2A			บวก/ กลม	<i>Staphylococcus</i>
9-5.1			บวก/ ท่อน	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain EGY-SCJ1

K7-1A.1.3			บวก/ ท่อน	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain EGY-SCJ1
5.1.1			ลบ/ rods	<i>Pseudomonas putida</i> strain L39
10-2.2			บวก/ ท่อน	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain EGY-SCJ1

Pseudomonas mendocina strain B6-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|EF208965.1|](#) Length: 1400 Number of Matches: 1

Range 1: 182 to 502 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
593 bits(321)	2e-166	321/321(100%)	0/321(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTCACCAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGA	60		
Sbjct 182	GGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTCACCAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGA	241		
Query 61	GGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG	120		
Sbjct 242	GGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG	301		
Query 121	GGAAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTAAGAAGGTCT	180		
Sbjct 302	GGAAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTAAGAAGGTCT	361		
Query 181	TCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGCTAGTTAATACTGGTTGTTTT	240		
Sbjct 362	TCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGCTAGTTAATACTGGTTGTTTT	421		
Query 241	GACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAG	300		
Sbjct 422	GACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAG	481		
Query 301	GGTGCAAGCGTTAATCGGAAT	321		
Sbjct 482	GGTGCAAGCGTTAATCGGAAT	502		

ภาพที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท K5-3C (ความยาว 320 คู่เบส) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pseudomonas mendocina* strain B6-1 100%

ตารางที่ 7 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรตด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา โดยการเทียบ
กับ National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

No.	Isolate	Length (bp)	Nearest relative	Malty (%)
1	K5-3C	320	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain B6-1	100
2	1-2D	350	<i>Bacillus subtilis</i> strain 2B	100
3	10-5.1	360	<i>Pseudomonas</i> sp. AKM-L5	100
4	9-5E	250	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain EGY-SCJ1	100
5	7.2.1	320	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain B6-1	100
6	9-2.1	280	<i>Bacillus subtilis</i> strain 2B	100
7	1-2A	340	<i>Pseudomonas</i> sp. AKM-L5	100
8	9-5.1	280	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain EGY-SCJ1	100
9	K7-1A.1.3	310	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain EGY-SCJ1	100
10	5.1.1	261	<i>Pseudomonas putida</i> strain L39	100
11	10-2.2	330	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain EGY-SCJ1	100

4. การทดสอบการผลิต Idole-3-acetic acid (IAA) จากแบคทีเรียสลายคลอเรต

จากการนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสลายคลอเลตจำนวน 91 ไอโซเลต (ศรีกาญจนา, 2555) ซึ่งทั้งหมดนี้แยกได้จากดินสวนลำไยมาทดสอบความสามารถในการผลิต IAA โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) จนพบการเจริญของเชื้อ ก่อนนำไปเลี้ยงใน Nutrient broth (NB) และ TSB ซึ่งเติม L-tryptophan ความเข้มข้น 200 mg/ml โดยใช้ปริมาณของ เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 ml พบว่าในอาหาร NB มีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA ทั้งหมด 47 ไอโซเลต โดยปริมาณที่ผลิตได้เท่ากับ 1.2 - 45.8 µg/ml สำหรับในอาหาร TSB นั้นมีเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 63 ไอโซเลตที่พบการผลิต IAA โดยผลิตได้ในความเข้มข้น 1.1-57.6 µg/ml

เมื่อนำผลการทดลองใน 2 อาหารดังกล่าวข้างต้น คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้สูงจำนวน 5 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต IAA ได้สูงในอาหาร NB ทั้งนี้สืบเนื่องมาจาก NB ที่ใช้ในครั้งนี้เป็นอาหารสำเร็จรูปที่มีการเติม (LAB M Limited, UK) yeast extract จึงมีความสมบูรณ์มากกว่า NB ปกติ ที่มีส่วนประกอบเพียง beef extract และ peptone รวมทั้ง TSB ด้วย

ตารางที่ 8 ปริมาณ IAA ในอาหาร Nutrient broth (NB) และ Tryptic soy broth (TSB)

ไอโซเลต	IAA(µg/ml)	
	NB	TSB
10-2.1	32.2ab	32.4d
6-3.1	35.7abc	28.3c
9-4C.2	37.5ab	14.1b
9-4D.1	43.6c	11.4a
C9-24.2	45.8d	57.6e

5. ผลของความเข้มข้น tryptophan ต่อการผลิต IAA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก

หลังจากคัดเลือกเชื้อได้ 5 ไอโซเลตแล้ว นำมาทดสอบการผลิต IAA ในอาหาร TSB เนื่องจาก NB เติม yeast extract มีราคาสูงกว่า นอกจากนี้ยังมีการปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้น และ

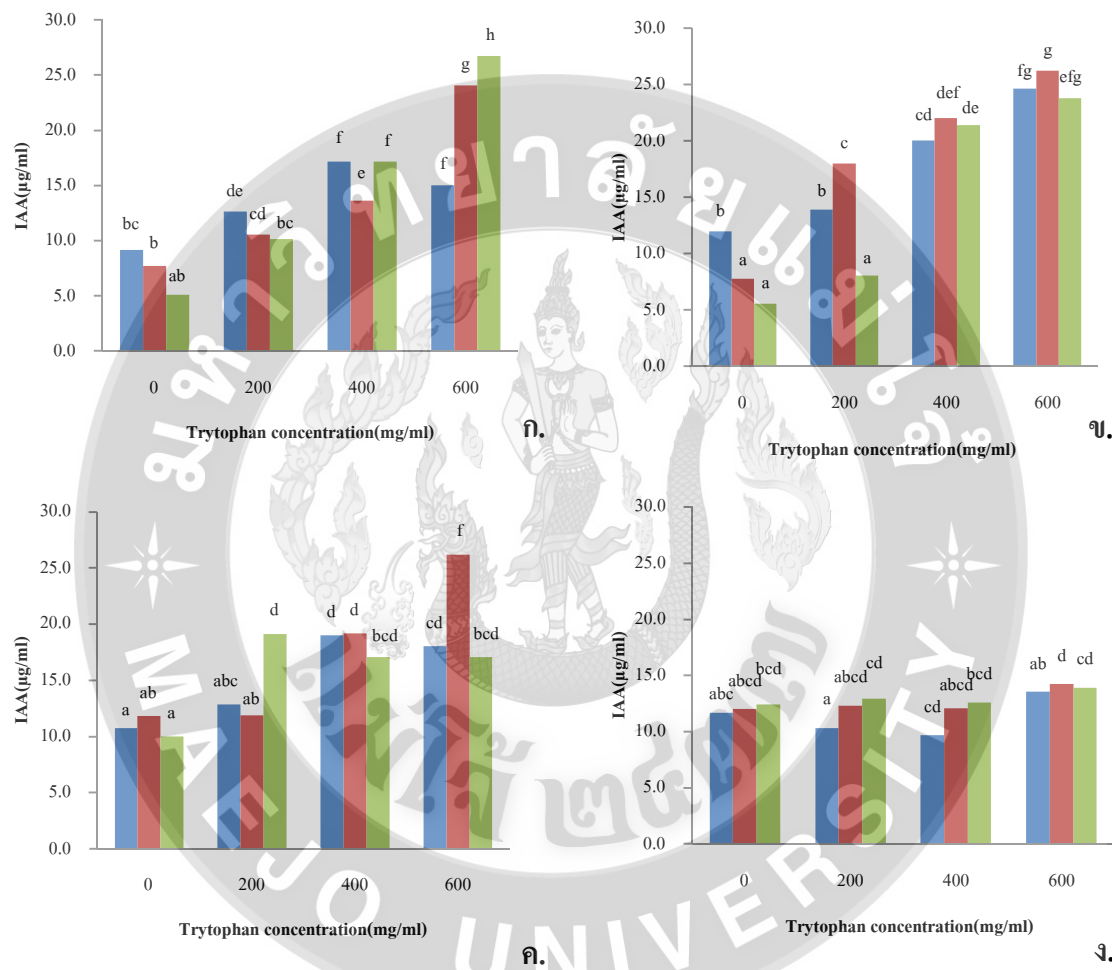
ระยะเวลาเพาะเลี้ยงให้เท่ากัน คือ เตรียมเชื้อเริ่มต้นให้มีความเข้มข้นมาตรฐาน McFarland No. 0.5 และใช้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 0.2 ml

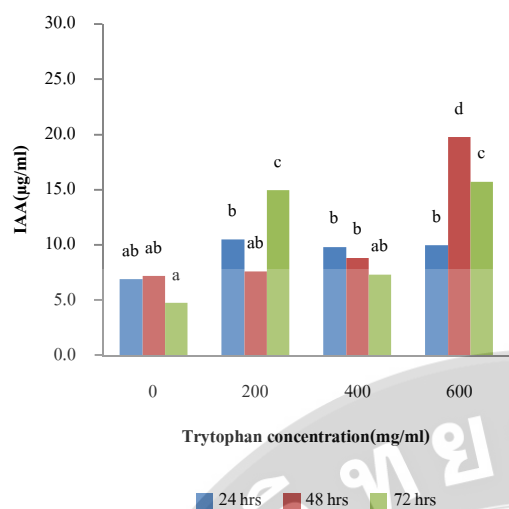
ในการทดลองที่ทดสอบความเข้มข้นของ tryptophan โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 200, 400 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่เขย่าพบว่า ผลการทดลองดังรูปที่ 1 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ tryptophan เชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต ผลิต IAA ได้มากขึ้นด้วย คือ ส่วนใหญ่ในอาหาร TSB ที่เติม tryptophan 600 mg/ml จะได้ปริมาณ IAA สูงกว่าในอาหารที่เติม tryptophan 200 และ 400 mg/ml โดยไอโซเลต 10-2.1 ผลิตได้สูงสุดที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง และแตกต่างจาก 24 และ 48 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ 6-3.1 ในอาหาร TSB ที่เติม tryptophan 600 mg/ml ผลิตได้สูงสุดเช่นกัน โดยระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง อย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนเชื้อ 9-4C.2, 9-4D.1 และ C9-24.2 สามารถผลิต IAA ได้ในอาหาร TSB ที่เติม tryptophan 600 mg/ml เช่นกัน ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังภาพที่ 8

6. ผลของ pH ต่อการผลิต IAA

ในการทดสอบผลของ pH ในช่วง 5-9 ต่อการผลิต IAA ในอาหาร TSB ที่เติม tryptophan 200 mg/ml พบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 3 ไอโซเลตคือ 10-2.1, 6-3.1 และ C9-24.2 ผลิต IAA ได้สูงที่ pH 7 ในขณะที่ 9-4C.2 ผลิตได้สูงที่ pH 8 และ 9-4D.1 ผลิตได้สูงที่ pH 9 แสดงดังตารางที่ 9-13

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรตส่วนใหญ่สามารถผลิต IAA ได้สูงในช่วงที่มี pH 7-9 ซึ่งเป็นช่วง pH ที่เชื้อมีการเจริญดี ดังนั้นจึงส่งผลทำให้สามารถผลิต IAA ได้สูงตามมา แต่ในช่วงที่มี pH เป็นกรดซึ่งเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้จึงทำให้ไม่มีการผลิต IAA หรือ ผลิต IAA ได้น้อย





ภาพที่ 12 ผลของความเข้มข้น tryptophan ต่อการผลิต IAA ของเชื้อแบคทีเรียสายคลอเลต 5 ไอโซเลตคือ ก. 10-2.1, ข. 6-3.1, ค. 9-4C.2, ง. 9-4D.1 และ จ. C9-24.2 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตาม Multiple Range Test ($P < 0.05$)

ตารางที่ 9 ผลของ pH ต่อการผลิต IAA ของเชื้อไอโซเลต 10-2.1

pH	ปริมาณ IAA (µg/ml) ที่ช่วงเวลาต่างๆ		
	24	48	72
5	5.6ab	4.5a	10.7cd
6	9.2c	8.5bc	12.6def
7	9.8cd	16.5ghi	17.9i
8	13.1def	15.7fghi	14.2efg
9	11.2cde	14.5efgh	17.7hi

ตารางที่ 10 ผลของ pH ต่อการผลิต IAA ของเชื้อไอโซเลต 6-3.1

pH	ปริมาณ IAA (µg/ml) ที่ช่วงเวลาต่างๆ		
	24	48	72
5	0.0a	3.7b	0.0a
6	11.2c	9.6c	25.0g
7	17.3def	17.5ef	31.5h
8	15.1de	8.3c	27.1g
9	14.9de	14.6d	18.1f

ตารางที่ 11 ผลของ pH ต่อการผลิต IAA ของเชื้อไอโซเลต 9-4C.2

pH	ปริมาณ IAA ($\mu\text{g/ml}$) ที่ช่วงเวลาต่างๆ		
	24	48	72
5	7.3ab	5.7a	9.5cd
6	6.9ab	10.7d	10.2d
7	10.2d	11.3d	10.0cd
8	11.2d	18.1f	15.8e
9	8.1bc	10.4d	13.9e

ตารางที่ 12 ผลของ pH ต่อการผลิต IAA ของเชื้อไอโซเลต 9-4D.1

pH	ปริมาณ IAA ($\mu\text{g/ml}$) ที่ช่วงเวลาต่างๆ		
	24	48	72
5	2.5b	0.5a	3.4bc
6	4.4cd	6.2ef	6.1ef
7	7.5fg	12.9j	8.9gh
8	5.5de	9.0h	12.7j
9	8.8gh	10.6i	17.5k

ตารางที่ 13 ผลของ pH ต่อการผลิต IAA ของเชื้อไอโซเลต C9-24.2

pH	ปริมาณ IAA ($\mu\text{g/ml}$) ที่ช่วงเวลาต่างๆ		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
5	9.0bcde	7.0abc	6.1a
6	6.7ab	11.5fgh	10.9efg
7	7.7abcd	14.7i	13.6hi
8	8.2abcd	14.4i	13.4hi
9	9.8defg	11.7gh	9.2cdef

7. ผลของออกซิเจนด้วยการเขย่าต่อการผลิต IAA

การศึกษาผลของออกซิเจนด้วยการเขย่าโดยเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตในอาหาร TSB ที่มี tryptophan เข้มข้น 200 mg/ml เป็นระยะเวลา 1-7 วัน และ ศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่มีการเพิ่มออกซิเจนโดยการเขย่า กับระยะการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ในการผลิต IAA ซึ่งจากการศึกษาพบว่า

เชื้อไอโซเลต 10-2.1 สามารถผลิต IAA ได้สูงในช่วงระยะการเจริญที่คงที่ (stationary phase) โดยในวันที่ 5 เชื้อไอโซเลต 10-2.1 สามารถผลิต IAA ได้เท่ากับ 51.8 $\mu\text{g/ml}$ และ ในวันที่ 7 สามารถผลิต IAA ได้สูงถึง 94.7 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งในช่วงที่มีการผลิต IAA ของเชื้อแบคทีเรียในวันที่ 7 นั้นพบว่าการเจริญของเชื้อลดลงเมื่อพิจารณาจากค่าความขุ่น ดังแสดงในภาพที่ 9 ก.

เชื้อไอโซเลต 6-3.1 สามารถผลิต IAA เฉลี่ยไม่แตกต่างกันมากนักในวันที่ 1-3 คือ 28.1-44.4 $\mu\text{g/ml}$ แล้วในวันที่ 5 พบว่าสามารถผลิต IAA ได้เท่ากับ 119.9 $\mu\text{g/ml}$ และในวันที่ 7 สามารถผลิต IAA ได้สูงถึง 144.4 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งช่วงที่เชื้อไอโซเลต 6-3.1 ผลิต IAA ได้สูงนั้นคือวันที่ 5-7 พบว่าเชื้ออยู่ในระยะการเจริญลดลงเช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 9 ข.

เชื้อไอโซเลต 9-4C.2 ให้ปริมาณ IAA ไม่แตกต่างกันในวันที่ 1 และ 2 คือ 15.9 และ 16.6 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และในวันที่ 3 พบว่าสามารถผลิต IAA ได้เท่ากับ 43.7 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งพบว่าเชื้อเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ และในวัน 5 และ 7 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิต IAA ได้สูงถึง 103.8 และ 113.0 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยที่ไม่ต่างกัน ในช่วงที่เชื้อมีการผลิต IAA ในปริมาณที่สูงนั้นอยู่ในระยะการเจริญของเชื้อที่คงที่ เช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 9 ค.

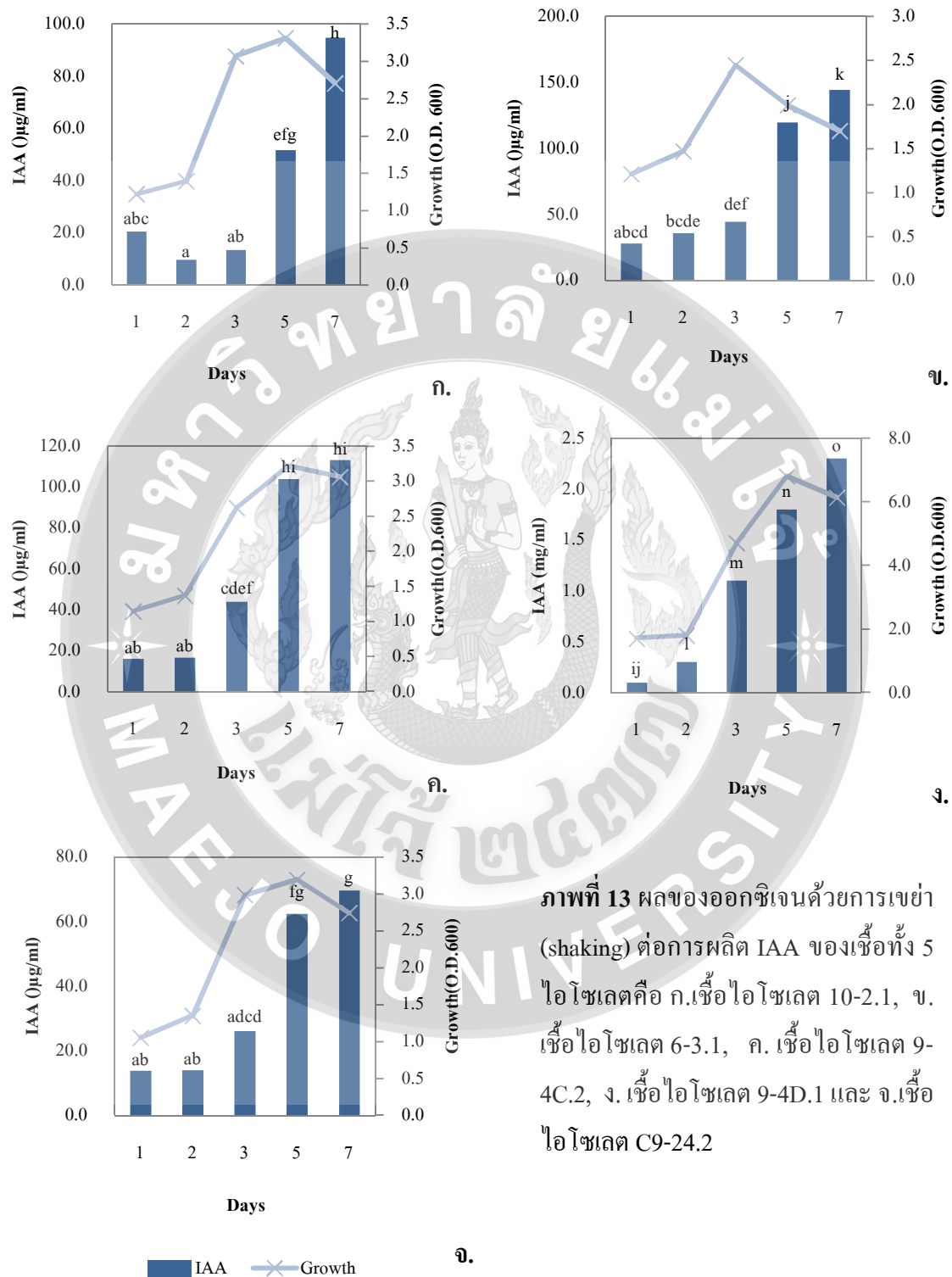
เชื้อไอโซเลต 9-4D.1 พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียสายคลอเรตที่สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตอื่นๆทั้งหมดในงานวิจัย และจากการศึกษาของงานวิจัยหลายเรื่องที่ผ่านมา ดังนั้นเชื้อไอโซเลต 9-4D.1 จึงเป็นเชื้อที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงกระบวนการผลิตวิธีการผลิต IAA หรือแม้กระทั่งสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเพื่อให้ได้ปริมาณ IAA สูงสุด เพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตรต่อไป โดยในการทดลองนี้พบว่าเชื้อไอโซเลต 9-4D.1 สามารถผลิต IAA ได้สูงถึง 0.1 mg/ml ภายในระยะเวลา 1 วัน และมีแนวโน้มที่จะผลิต IAA สูงขึ้น

เรื่อยๆ ซึ่งพบว่าสามารถผลิต IAA ได้สูงถึง 2.3 mg/ml ภายในระยะเวลา 7 วัน เมื่อดูการเจริญพบว่า เชื้อสามารถผลิต IAA ได้สูงในช่วงการเจริญเริ่มลดลงดังแสดงในภาพที่ 9 ง.

เชื้อไอโซเลต C9-24.2 สามารถผลิต IAA ได้สูงเท่ากับ 62.4 $\mu\text{g/ml}$ ในวันที่ 5 คือระยะ stationary ของการเจริญ และสามารถผลิต IAA ได้สูงสุดเท่ากับ 69.7 $\mu\text{g/ml}$ ในวันที่ 7 ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันมากเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยด้วยวิธีการทางสถิติ Multiple Range Test ดังแสดงในภาพที่ 9 จ. ซึ่งจากผลการทดลองทุกไอโซเลตแสดงให้เห็นว่าเชื้อส่วนใหญ่จะผลิตออกซินในระยะที่ไม่มีการเจริญ นั้นแสดงให้เห็นว่า IAA ไม่ใช่สารสำคัญต่อการเจริญของเชื้อ ดังนั้นการเพิ่มออกซิเจนโดยการเขย่าซึ่งจะช่วยให้เชื้อมีการเจริญมากกว่าที่ตั้งทิ้งไว้ทุกไอโซเลตให้ปริมาณ IAA มากกว่าอย่างเห็นได้ชัดเจน

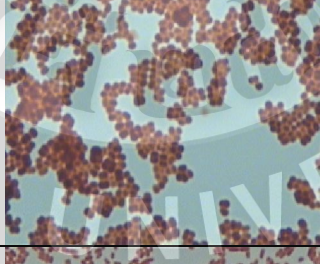
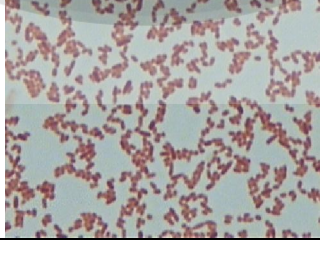
8. ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายคลอเลตที่ผลิต IAA

จากการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสายผลิต IAA โดยการศึกษาลักษณะพื้นฐานทางสรีรวิทยา พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน 4 ไอโซเลต และแกรมบวก รูปกลม 1 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 7 และเมื่อจำแนกชนิดโดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA เทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) พบว่า เชื้อไอโซเลต 10-2.1 และ C9-24.3 มีความคล้ายกับ *Pseudomonas sp.* JC5 ที่มี GenBank Accession No.คือ KF263569.1 100% ดังภาพที่ 10 และ 14 , เชื้อไอโซเลต 6-3.1 มีความคล้ายกับ *Pseudomonas sp.* F15 ที่มี GenBank Accession No.คือ KF573430.1 100% ดังภาพที่ 11, เชื้อไอโซเลต 9-4C.1 มีความคล้ายกับ *Pseudomonas sp.* I12B-00129 ที่มี GenBank Accession No.คือ KC589282.1 100% ดังภาพที่ 12 และเชื้อไอโซเลต 9-4D.1 มีความคล้ายกับ *Micrococcus sp.* SubaUpMs28 ที่มี GenBank Accession No.คือ KF574795.1 100% ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ผลของออกซิเจนด้วยการเขย่า (shaking) ต่อการผลิต IAA ของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตคือ ก.เชื้อไอโซเลต 10-2.1, ข. เชื้อไอโซเลต 6-3.1, ค. เชื้อไอโซเลต 9-4C.2, ง. เชื้อไอโซเลต 9-4D.1 และ จ.เชื้อไอโซเลต C9-24.2

ตารางที่ 14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ผลิต IAA

ไอโซเลต	โคโลนีแบคทีเรีย	เซลล์แบคทีเรีย (กำลังขยาย 1000 เท่า)	แกรม/รูปร่าง	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย
10-2.1			ลบ/ rods	<i>Pseudomonas</i> sp. JC5
6-3.1			ลบ/ rods	<i>Pseudomonas</i> sp. F15
9-4C.1			ลบ/ rods	<i>Pseudomonas</i> sp. I12B- 00129
9-4D.1			บวก/ cocci	<i>Micrococcus</i> sp. SubaUpMs28
C9-24.2			ลบ/ rods	<i>Pseudomonas</i> sp. JC5

Pseudomonas sp. JC5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KF263569.1](#) Length: 1422 Number of Matches: 1

Range 1: 149 to 709 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1037 bits(561)	0.0	561/561(100%)	0/561(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGG	60		
Sbjct 149	GGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGG	208		
Query 61	TAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA	120		
Sbjct 209	TAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA	268		
Query 121	ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCG	180		
Sbjct 269	ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCG	328		
Query 181	AAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAAGCACITTA	240		
Sbjct 329	AAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAAGCACITTA	388		
Query 241	AGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTGGCGTTACCGACAGAATAAG	300		
Sbjct 389	AGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTGGCGTTACCGACAGAATAAG	448		
Query 301	CACCGGCTAATCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	360		
Sbjct 449	CACCGGCTAATCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	508		
Query 361	TTACTGGGCGTAAAGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	420		
Sbjct 509	TTACTGGGCGTAAAGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	568		
Query 421	AACCTGGGAATGCAATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTC	480		
Sbjct 569	AACCTGGGAATGCAATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTC	628		
Query 481	CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACT	540		
Sbjct 629	CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACT	688		
Query 541	GGACTGATACTGACACTGAGG	561		
Sbjct 689	GGACTGATACTGACACTGAGG	709		

ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลข 10-2.1(ความยาว 561 คู่เบส) เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pseudomonas* sp. JC5 100%

Pseudomonas sp. F15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KF573430.1|](#) Length: 1459 Number of Matches: 1

Range 1: 98 to 628 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
981 bits(531)	0.0	531/531(100%)	0/531(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGG	60		
Sbjct 98	CTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGG	157		
Query 61	GAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAG	120		
Sbjct 158	GAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAG	217		
Query 121	TTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGT	180		
Sbjct 218	TTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGT	277		
Query 181	CACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA	240		
Sbjct 278	CACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA	337		
Query 241	CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAA	300		
Sbjct 338	CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAA	397		
Query 301	AGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTGTTTGACGTTACCGA	360		
Sbjct 398	AGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTGTTTGACGTTACCGA	457		
Query 361	CAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGT	420		
Sbjct 458	CAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGT	517		
Query 421	TAAICGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGC	480		
Sbjct 518	TAAICGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGC	577		
Query 481	CCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACGGT	531		
Sbjct 578	CCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACGGT	628		

ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 6-3.1 (ความยาว 531 คู่เบส) เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pseudomonas sp.* F15100%

Pseudomonas sp. I12B-00129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KC589282.1|](#) Length: 619 Number of Matches: 1Range 1: 42 to 562 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
963 bits(521)	0.0	521/521(100%)	0/521(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCA	60		
Sbjct 42	AGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCA	101		
Query 61	GGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGG	120		
Sbjct 102	GGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGG	161		
Query 121	TAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA	180		
Sbjct 162	TAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA	221		
Query 181	ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCG	240		
Sbjct 222	ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCG	281		
Query 241	AAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACITTA	300		
Sbjct 282	AAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACITTA	341		
Query 301	AGTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTGGCGTTACCGACAGAATAAG	360		
Sbjct 342	AGTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTGGCGTTACCGACAGAATAAG	401		
Query 361	CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	420		
Sbjct 402	CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	461		
Query 421	TTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	480		
Sbjct 462	TTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	521		
Query 481	AACCTGGGAACCTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACGG	521		
Sbjct 522	AACCTGGGAACCTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACGG	562		

ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 9-4C.2 (ความยาว 521 คู่เบส) เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pseudomonas sp.* I12B-00129 100%

Micrococcus sp. SubaUpMs28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KF574795.1](#) Length: 1016 Number of Matches: 1Range 1: 43 to 523 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
889 bits(481)	0.0	481/481(100%)	0/481(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGCCTACCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTA	60		
Sbjct 43	GAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGCCTACCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTA	102		
Query 61	TCGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC	120		
Sbjct 103	TCGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC	162		
Query 121	GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG	180		
Sbjct 163	GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG	222		
Query 181	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGA	240		
Sbjct 223	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGA	282		
Query 241	CGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAA	300		
Sbjct 283	CGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAA	342		
Query 301	AGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	360		
Sbjct 343	AGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	402		
Query 361	TAGGGTGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGG	420		
Sbjct 403	TAGGGTGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGG	462		
Query 421	TCTGTCGTGAAAGTCCGGGGCTTAACCCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGT	480		
Sbjct 463	TCTGTCGTGAAAGTCCGGGGCTTAACCCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGT	522		
Query 481	G	481		
Sbjct 523	G	523		

ภาพที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 9-4D.1 (ความยาว 481 คู่เบส) เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Micrococcus sp.*

SubaUpMs28 100%

Pseudomonas sp. JC5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KF263569.1](#) Length: 1422 Number of Matches: 1

Range 1: 98 to 508 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
760 bits(411)	0.0	411/411(100%)	0/411(0%)	Plus/Plus
Query 1	CAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTT	60		
Sbjct 98	CAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTT	157		
Query 61	CGGGCCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTC	120		
Sbjct 158	CGGGCCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTC	217		
Query 121	ACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACA	180		
Sbjct 218	ACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACA	277		
Query 181	CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA	240		
Sbjct 278	CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA	337		
Query 241	TCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAG	300		
Sbjct 338	TCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAG	397		
Query 301	GAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGTCTGTTTGGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTA	360		
Sbjct 398	GAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGTCTGTTTGGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTA	457		
Query 361	ACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	411		
Sbjct 458	ACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA	508		

ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท C9-24.2 (ความยาว 411 คู่เบส) เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pseudomonas sp.* JC5100%

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรตให้ความเข้มข้นของ IAA ในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) และ Nutrient broth (NB) ที่แตกต่างกันอาจจะสืบเนื่องมาจากแหล่งของคาร์บอนที่แตกต่างกันเช่นในอาหาร NB มี Beef Extract ส่วน TSB มี dextrose เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งปริมาณสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่เติมลงไปในการแต่ละสูตรที่ไม่เท่ากันก็อาจจะส่งผลต่อการเจริญ โดยมีรายงานของ Ahmad และคณะ(2008) และ Oberhansli และคณะ (1991) พบว่าเชื้อ *Pseudomonas sp.* สามารถสังเคราะห์ IAA ได้ และ Sahasrabudhe (2011) ยังพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ชอบและสามารถผลิต IAA ได้สูงสุดคือ ใน mannitol และ พบว่าเชื้อ *Rhizobium loti* สามารถผลิต IAA สูงสุดใน lactose และในระยะเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า *Rhizobium leguminosarum* สามารถผลิต IAA สูงสุดใน glucose ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแหล่งคาร์บอนและระยะเวลามีผลต่อการผลิต IAA

การศึกษาผลของความเข้มข้นของ tryptophan พบว่า การผลิต IAA ของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต 10-2.1 สามารถผลิต IAA ได้สูงสุด และ พบว่ามีเชื้อ 1 ไอโซเลตที่ความเข้มข้นของ tryptophan ไม่มีผลต่อการผลิต IAA ส่วนเชื้ออีก 4 ไอโซเลตนั้นสามารถผลิต IAA ได้สูงสุดในอาหารที่มี tryptophan เท่ากับ 600 mg/ml ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gravel และ คณะ(2007) รายงานว่าเชื้อ *Pseudomonas putida* B สามารถผลิต IAA และสารประกอบ ได้ถึง 3.3 µg/ml โดยใช้ tryptophan เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ และ ยังพบอีกว่าถ้าให้ tryptamine เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ IAA เชื้อ *Pseudomonas putida* B ก็จะสามารถผลิต IAA ได้สูงถึง 23.40 µg/ml ยังมีรายงาน การเพิ่ม tryptophan ลงไปในอาหาร 0.2-1.6 g/L จะส่งผลให้เชื้อ *Azotobacter diazotrophicus* L1 สามารถผลิต IAA สูงสุดในอาหารที่มี tryptophan 1.2 g/L (Nitaการศึกษาผลของความเข้มข้นของ tryptophan พบว่า การผลิต IAA ของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตพบว่าไอโซเลต 10-2.1 สามารถผลิต IAA ได้สูงสุด และ พบว่ามีเชื้อ 1 ไอโซเลตที่ความเข้มข้นของ tryptophan ไม่มีผลต่อการผลิต IAA ส่วนเชื้ออีก 4 ไอโซเลตนั้นสามารถผลิต IAA ได้สูงสุดในอาหารที่มี tryptophan เท่ากับ 600 mg/ml ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gravel และ คณะ(2007) รายงานว่าเชื้อ *Pseudomonas putida* B สามารถผลิต IAA และสารประกอบ ได้ถึง 3.3 µg/ml โดยใช้ tryptophan เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ และ ยังพบอีกว่าถ้าให้ tryptamine เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ IAA เชื้อ *Pseudomonas putida* B ก็จะสามารถผลิต IAA ได้สูงถึง 23.40 µg/ml ยังมีรายงาน การเพิ่ม tryptophan ลงไปในอาหาร 0.2-1.6 g/L จะส่งผลให้เชื้อ *Azotobacter diazotrophicus* L1 สามารถผลิต IAA สูงสุดในอาหารที่มี tryptophan 1.2 g/L (Nita et al., 2011) ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตสามารถผลิต IAA ได้สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นดังที่กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นจากการศึกษาในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่าความเข้มข้นของ tryptophan มีผลต่อการผลิต IAA ซึ่งเป็นไปตามงานวิจัยของ Spaepen และคณะ(2011) ได้อธิบายถึงวิธีการสังเคราะห์ IAA ว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากรากพืชกว่า 80% สามารถผลิต IAA ได้ และยังบอกอีกว่าการสังเคราะห์ IAA ใช้ tryptophan เป็นสารตั้งต้น การเพิ่ม tryptophan ลงไปในอาหารทำให้สามารถผลิต IAA ได้สูงขึ้น และยังสอดคล้องกับผลการทดลองของ พิมพ์ธิดาและคณะ (2550) ที่ศึกษาการสังเคราะห์ IAA ของแบคทีเรียผลิตฮอร์โมน IAAแต่ละไอโซเลต โดยพบว่ามีความสามารถสังเคราะห์ออกซินในปริมาณที่แตกต่างกัน

การศึกษาผลของ pH ต่อการผลิต IAA นั้นพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Oberhansli และคณะ (1991) รายงานว่าเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ CHA0 สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดที่ pH 6 ส่วนสายพันธุ์ CHA750 สามารถผลิต IAA สูงสุดที่ pH 7 และเชื้อ *A. diazotrophicus* สามารถผลิต IAA สูงสุดที่ pH 6 และ *Pantoea agglomerans* สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดที่ pH 7 นอกจากนี้การลดลงของปริมาณ IAA ในช่วงวันหลังๆ อาจมีสาเหตุมาจากการนำไปใช้ในการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ และการลดลงของแหล่งคาร์บอนที่เป็นวัตถุดิบในการสร้าง IAA ที่นำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ (Ositadinma et al., 2005)

นอกจากนั้นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนด้วยการเขย่ายังมีผลต่อการผลิต IAA ของเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลต และผลิต IAA ได้สูงในระยะ stationary ของการเจริญ และสามารถผลิต IAA ได้มากกว่าผลการทดลองที่ไม่ได้เขย่าทุกไอโซเลต ดังนั้นออกซิเจนมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ถ้าเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตดี ก็จะสามารถผลิต IAA ได้สูงตามมาซึ่งมีรายงานยังพบอีกว่าเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* CHA0 มีการใช้เอนไซม์ Tryp transaminase สูงสุดในระยะ Stationary นั้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อ เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* CHA0 สามารถผลิต IAA สูงสุดในระยะ Stationary นั้นเอง (Nita et.al 2011) ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Khamna et al.(2010) รายงานว่าเชื้อ *Streptomyces* CMUH009 ที่แยกได้จากรากของตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดในระยะ ของการเจริญช่วง Stationary (143.97 µg/ml) และยังมีรายงานพบว่าเชื้อ *Micrococcus* sp.MU1 สามารถผลิต IAA ได้สูงในระยะ stationary เช่นกัน อีกทั้งช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชและสามารถนำแบคทีเรียนี้ไปประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมประสิทธิภาพของการนำพืชมาใช้ในการบำบัดดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก (เมษินิและคณะ, 2011) Dastager และคณะ (2010) ยังพบว่าเชื้อ *Micrococcus* sp.N11-0909 ยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยการสลายฟอสเฟต การผลิตออกซิน และยังผลิต IAA ถึง 109 mg/ml

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียสายคลอเรตที่ผลิต IAA มาจำแนกด้วยวิธีทางอนุวิธานชีววิทยาพบว่าจัดอยู่ในสายพันธุ์ *Micrococcus* sp. และ *Pseudomonas* sp. โดยเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่า ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Micrococcus* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก(gram positive bacteria) มีรูปร่างกลม (cocci) เคลื่อนที่ไม่ได้ โคโลนีสีเหลือง บ้างครั้งก็พบในสีส้ม เชลล์จะมีการจัดเรียงตัวกันเป็นคู่ และ เดี่ยว สามารถพบได้ สิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ ฝุ่น และดิน เป็นต้น (Dastager

et.al, 2010) โดยการผลิต IAA ของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ เมษิณี และคณะ (2554) ได้เคยรายงานไว้ว่า เชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus* sp.. MU1 ที่มีความสามารถในการต้านโลหะหนัก ผลิต IAA ได้สูงสุด 161 mg/l ที่ระยะการเจริญ 84 ชั่วโมง ซึ่งจากการวิจัยในครั้งนี้เชื้อ *Micrococcus* sp. 9-4D.1 ที่สลายคลอเรตสามารถผลิต IAA ได้สูงสุด 100 mg/l ที่ช่วงการเจริญ stationary phase เช่นเดียวกัน

สำหรับ *Pseudomonas* sp. คือเป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบ ([gram negative bacteria](#)) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ ([non-spore forming bacteria](#)) พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ดิน และน้ำ ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* มีรายงานการวิจัยความสามารถการส่งเสริมการเจริญของพืช รวมถึงผลิต IAA ด้วย โดยที่แยกได้จากดินและสามารถผลิต IAA ได้ เช่น *Pseudomonas fluorescens* (Upadhyay and Srivastava, 2010; Reetha et al., 2014) และ *Pseudomonas putida* (Bharucha et al., 2013) โดย pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิต IAA ของ *Pseudomonas* ที่มีรายงานคือ pH 7 –pH7.5 (Balaji et al., 2012; Bharucha et al., 2013) เช่นเดียวกับ *Pseudomonas* ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไยจากแบคทีเรียสายคลอเรต สามารถสรุปได้ว่า

1. การคัดแยกเชื้อราก่อโรคในลำไย พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อราสาเหตุของโรคในลำไยได้ 4 ชนิด คือ เชื้อ *Meliola* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคราดำในลำไย เชื้อ *Mycelia sterilia* เชื้อราสาเหตุของโรคใบไหม้ในลำไย เชื้อ *Collectrichum* sp. สาเหตุของโรคใบจุดดำในลำไย และ เชื้อ *Phomopsis* สาเหตุของโรคใบจุดดำในลำไย

2. เชื้อแบคทีเรียสายคลอเรตที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไย มีจำนวนทั้งสิ้น 17 ไอโซเลต จากแบคทีเรียสายคลอเรต 91 ไอโซเลต

3. เมื่อจำแนกเชื้อแบคทีเรียสายคลอเรต ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไย ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพบว่า เชื้อแบคทีเรียสายคลอเรตได้ส่วนใหญ่อยู่ในจีนัส *Bacillus* sp. จากการศึกษาการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) จากแบคทีเรียสายคลอเรต และ ผลของสภาวะบางประการต่อการผลิต IAA สามารถสรุปได้ว่า

1. การทดสอบการผลิต IAA จากแบคทีเรียสายคลอเรต 91 ไอโซเลต พบว่าในอาหาร NB สามารถผลิต IAA เท่ากับ 1.2-45.8 $\mu\text{g/ml}$ (47 ไอโซเลต) และในอาหาร TSB ผลิตเท่ากับ 1.1-57.6 $\mu\text{g/ml}$ (62 ไอโซเลต)

2. เชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบสามารถผลิต IAA ได้สูงสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของ tryptophan เท่ากับ 600 mg/ml และ เชื้อแบคทีเรียจะผลิต IAA ได้ดีที่ pH 7 -9 อีกทั้งยังพบว่า การให้อากาศในการเพาะเลี้ยงสามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียผลิต IAA ได้เป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาพตั้งนิ่ง

3. เมื่อจำแนกแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพบว่า เชื้อแบคทีเรียสายคลอเรตที่ผลิต IAA ได้สูงอยู่ในจีนัส *Pseudomonas* sp. และ *Micrococcus* sp.

เอกสารอ้างอิง

- พิมพ์ธิดา เรืองไพศาล, จวีวรรณ เหลืองวุฒิวิโรจน์ และดารารัตน์ โฮตาก้า. 2550. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างฮอร์โมนเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช. กรมพัฒนาที่ดิน. หน้า 33.
- เมษิณี ชื่นประเสริฐ, เบญจภรณ์ ประภักดิ์ม, จารุวรรณ วงศ์ทะเนตร และวราวรรณ เอี่ยมพึงพร. 2554. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียรอบรากพืชที่สร้างอินโดลอะซิดิกแอซิดจากพื้นที่ปนเปื้อนโลหะหนัก. การประชุมวิชาการครั้งที่ 8 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม, 8-9 ธันวาคม 2554. 737-744.
- นลิน วงศ์ขัตติยะ และศรีกาญจนา คล้ายเรือง. 2555. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. หน้า 92.
- ศรีกาญจนา คล้ายเรือง, ฐปน ชื่นบาล, ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และนลิน วงศ์ขัตติยะ. 2555. การสลายคลอเรตโดยแบคทีเรียริวิคัลคลอเรตที่แยกได้จากดินและกากตะกอนน้ำเสีย. รายงานการวิจัยมหาวิทยาลัยแม่โจ้. 56น.
- Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M. S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research. 163: 173-181.
- Ahmad, A., Hayat, S., Mobin, M., Hussain, A. and Fariduddin, Q. 2006. Photosynthetic rate, growth and yield of mustard plants sprayed with 28-homobrassinolide. Photosynthetic. 38: 469-471.
- Arteca, R.N. 1996. Plant Growth Substances: Principles and Applications. New York: Chapman & Hall. 332 p.
- Bartel, B. 1997. Auxin biosynthesis. Plant Biology. 48 : 51-66.
- Balaji, N., Lavanya, S.S., Muthamizhselvi, S., Tamilarasan, K. 2012. Optamization of fermentation condition for indole acetic acid production by *Pseudomonas* species. International of Advanced Biotechnology and Research. 3 : 797-803.
- Bharucha, U., Patei, K. 2013. Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effects as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). Agricultural Research. 2 : 215-221.

- Bruce, R.A., Achenbach, L.A., Coates, J.D. 1999. Reduction of (per)chlorate by novel organism isolate from paper mill waste. *Environmental Microbiology*. 44: 319-329.
- Chen, L., Luo, S., Xiao, X., Guo, H., Chen, J., Wan, Y., Li, B., Xu, T., Xi, Q., Rao, C., Liu, C. and Zeng, G. 2010. "Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils." *Applied Soil Ecology*. 46: 383-389.
- Davies, P.J. 1995. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer. 833 p.
- Dastager, S.G., Deepa, C.K. and Pandey, A. 2010. Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp. NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 987-992.
- Ginkel, C.G., Plugge, C.M., Stroo, C.A. 1995. Reduction of chlorate with various energy substrates and inocula under anaerobic. *Chemosphere*. 31: 4057-4066.
- Glick, B.R., Penrose, D.M. and Li, J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology* 190: 63-68.
- Gravel, V., Antoun, H. and Tweddell, R.J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry* 39: 1968-1977.
- Golubev, S.N., Muratova, A. Y., Wittenmayer, L., Bondarenkova, A. D., Hirche, F., Matora, L.Y., Merbach, W. and Turkovskaya, O.V. 2011. "Rhizosphere indole-3-acetic acid as a mediator in the *Sorghum bicolor*-phenanthrene-*Sinorhizobium meliloti* interactions." *Plant Physiology and Biochemistry*. 49: 600-608.
- Khamna, S., Yokota, A., Peterdy, J.F., Lumyong, S. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *EurAsian Journal of BioScience*. 4 : 23-32.
- Lippert, L. F., Smith, P. G. and Bergh, B. O. 1966. Cytogenetics of the vegetable crops. Garden pepper, *Capsicum* sp. *Botanical Review*. 32(1): 24-55.

- Mano, Y. and Nemoto, K. 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*: 2853-2872.
- Nita, B.P., Gajbhiye, M., Ahiwale, S.S., Gunjal, A.B. and Kapadnis, B.P. 2011. Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azotobacter diazotrophicus* L1 isolate from sugarcane. *International Journal of Environmental Sciences*. 2: 295-301.
- Oltmann, L.F., Reifnders, W.N., Stouthamar, A.H. 1976. The correlation between the protein composition of cytoplasmic membranes and the formation of nitrate reductase A, chlorate reductase C and tetrathionate reductase in *Proteus mirabilis* wild type and some chlorate resistant mutants. *Archives of Microbiol.* 111: 25-35.
- Ositadinma, O., Impe, J.V., Prinsen, E. and Vanderleyden, J. 2005. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiology Letters*. 246: 125-132.
- Oberhansli, T., Defago, G., and Haas, D. 1991. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *Journal of General Microbiology*. 137: 2273-2279.
- Reetha, S., Bhuvaneswari, G., Thamizhiniyan, P., Mycin, T.R. 2014. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa* L.) *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3 : 568-574.
- Sahasrabudhe, M.M. 2011. Screening of rhizobia for indole acetic acid production. *Scholars Research* 2: 460-468.
- Salisbury, F. B., and Ross, C. W. 1992. *Plant Physiology*. Belmont, CA: Wadsworth. 357-407, 531-548.
- Spaepen, S. and Vanderleyden, J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: 1-4.
- Steinberg, L.M., Trimble, J.J., Logan, B.E. 2005. Enzymes responsible for chlorate reduction by *Pseudomonas* sp. are different from those used for perchlorate reduction by *Azospira* sp. *Federation of European Microbiological Societies*. 247. 153-159.
- Stijin Spaepen and Jos Vanderleyden. 2011. Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: 1-4.

- Tsavkelova, E.A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T.A. and Netrusov, A. I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42: 117-126.
- Thorell, H.D., Stenklo, K., Karlsson, J., Nilsson, T. 2003. A gene cluster for chlorate metabolism in *Ideonella dechloratans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 5585-5592.
- Upadhyay, A. Srivastava. 2010. Evaluation of multiple plant growth promoting traits of an isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd. *Indian Journal of Experimental Biology*. 48 : 601-609.





ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Mineral medium for enrichment chlorate reducing bacteria (Ginkel et al., 1995)

KClO ₃	1	กรัม/ลิตร
K ₂ HPO ₄	1.55	กรัม/ลิตร
NaH ₂ PO ₄	0.85	กรัม/ลิตร
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5	กรัม/ลิตร
MgSO ₄	0.1	กรัม/ลิตร
EDTA	10	มิลลิกรัม/ลิตร
ZnSO ₄	2	มิลลิกรัม/ลิตร
CaCl ₂	1	มิลลิกรัม/ลิตร
FeSO ₄	5	มิลลิกรัม/ลิตร
Na ₂ MoO ₄	0.2	มิลลิกรัม/ลิตร
CuSO ₄	0.2	มิลลิกรัม/ลิตร
CoCl ₂	0.4	มิลลิกรัม/ลิตร
MnCl ₂	1	มิลลิกรัม/ลิตร

Starch Casein Agar

Soluble starch	10	กรัม/ลิตร
K ₂ HPO ₄	2	กรัม/ลิตร
KNO ₃	2	กรัม/ลิตร
NaCl	2	กรัม/ลิตร
Casein	0.4	กรัม/ลิตร
MgSO ₄	0.5	กรัม/ลิตร
CaCO ₃	0.1	กรัม/ลิตร
FeSO ₄	0.01	กรัม/ลิตร
Agar	15	กรัม/ลิตร

Streptomycin Rose Bengal Agar

Glucose	10	กรัม/ลิตร
Peptone	5	กรัม/ลิตร
KH_2PO_4	1	กรัม/ลิตร
MgSO_4	0.5	กรัม/ลิตร
Rose Bengal	30	มิลลิกรัม/ลิตร
Streptomycin	30	มิลลิกรัม/ลิตร
Agar	20	กรัม/ลิตร



ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Salkowski reagent

7.9 M H_2SO_4	1	L
-------------------------------	---	---

Iron (III) chloride (FeCl_3)	12	g
---	----	---



ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ตารางที่ 15 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน McFarland (นลิน และศรีกาญจนา, 2555)

McFarland number	1%Barium chloride (มิลลิลิตร)	1%Sulfuric acid (มิลลิลิตร)	ปริมาณเซลล์โดย เฉลี่ย ($\times 10^8$)
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

ภาคผนวก ง

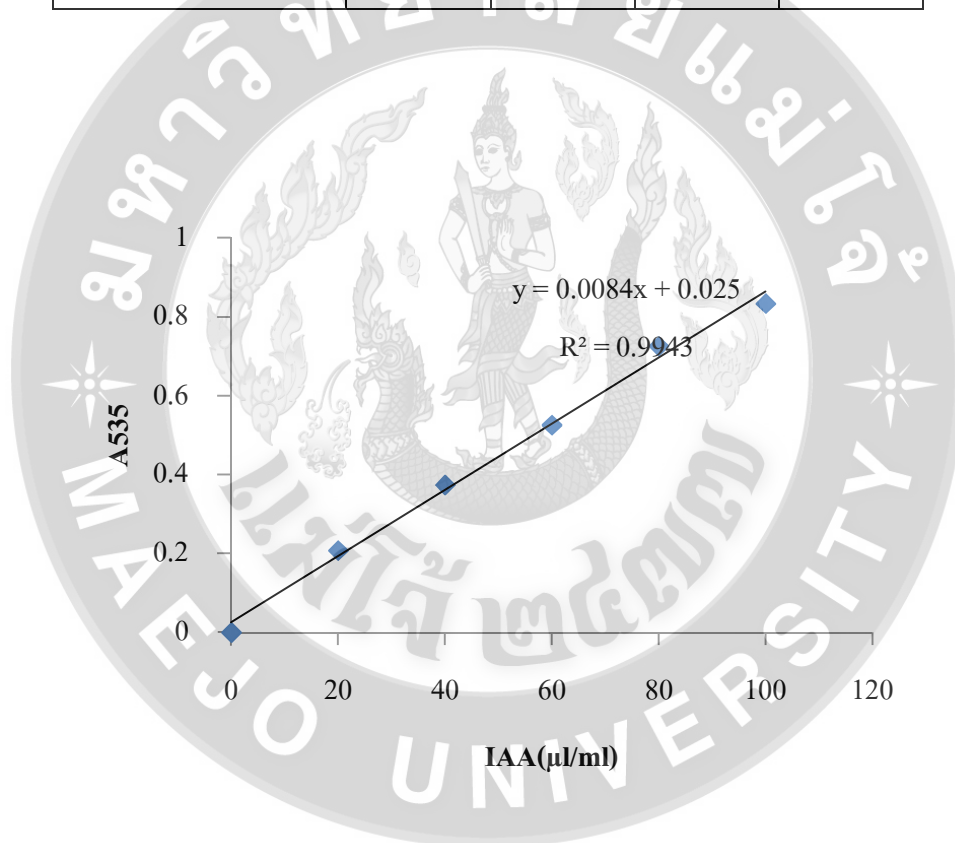
วิธีวิเคราะห์ปริมาณ Indole-3-acetic acid (IAA)

1. วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐาน IAA (Ahmad, 2008)

1. ชั่ง IAA 10 mg
2. เติม Ethanol 500 μ l เพื่อละลาย IAA
3. แล้วใช้ dH₂O ปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml จะได้ stock สารละลาย IAA ที่มีความเข้มข้น 1000 μ g/ml
4. ทำการ dilution stock IAA ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 μ g/ml ทั้งในอาหาร TSB และ NB โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 5 ml
5. ดูดสารละลายที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ มา 500 μ l ทำ 3 ซ้ำ
6. เติม Salkowski reagent 500 μ l ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 nm
4. นำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของ IAA ในหน่วย μ g/ml กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 nm
2. กราฟมาตรฐาน IAA ในอาหาร Nutrient broth (NB) และ Tryptic soy broth (TSB)

ตารางที่ 16 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 เลี้ยงในอาหาร NB

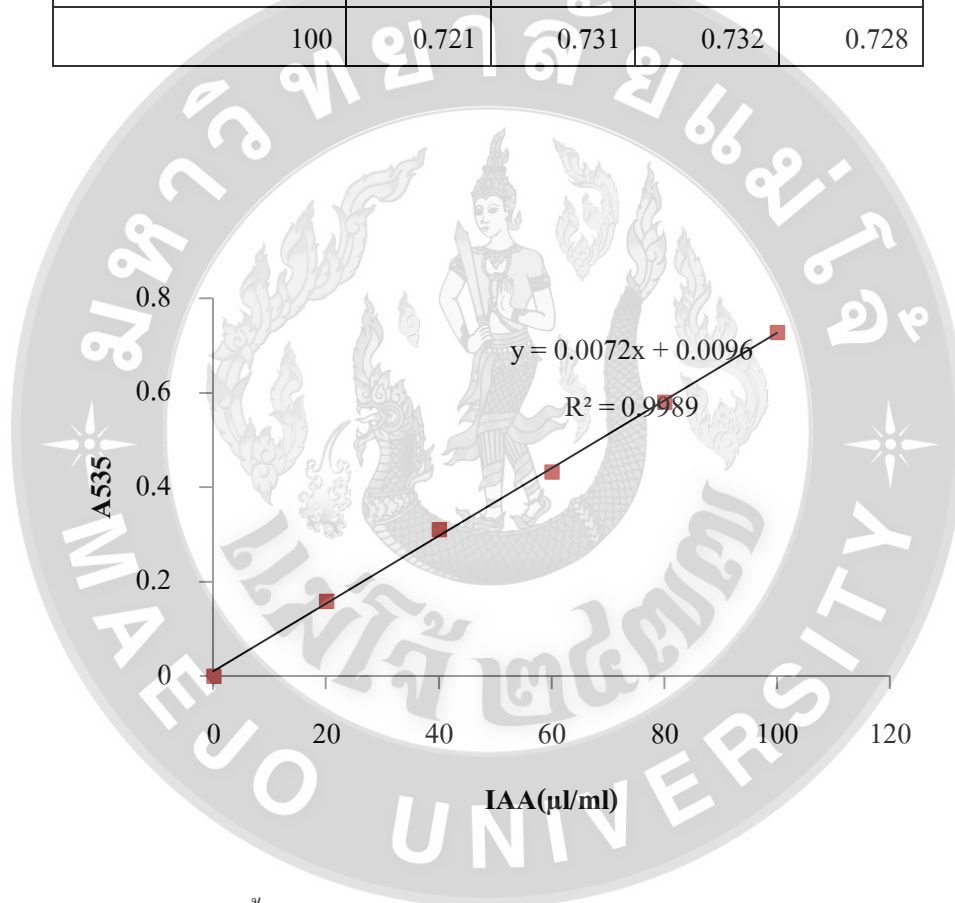
IAA concentration($\mu\text{g/ml}$)	A535			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
0	0	0	0	0
20	0.208	0.207	0.209	0.208
40	0.372	0.374	0.376	0.374
60	0.527	0.528	0.524	0.526
80	0.726	0.731	0.722	0.726
100	0.832	0.843	0.829	0.835



ภาพที่ 19 กราฟมาตรฐาน IAA เลี้ยงในอาหาร NB

ตารางที่ 17 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 เลี้ยงในอาหาร TSB

IAA concentration($\mu\text{g/ml}$)	A535			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
0	0	0	0	0
20	0.155	0.159	0.165	0.160
40	0.306	0.314	0.313	0.311
60	0.411	0.446	0.442	0.433
80	0.578	0.582	0.580	0.580
100	0.721	0.731	0.732	0.728

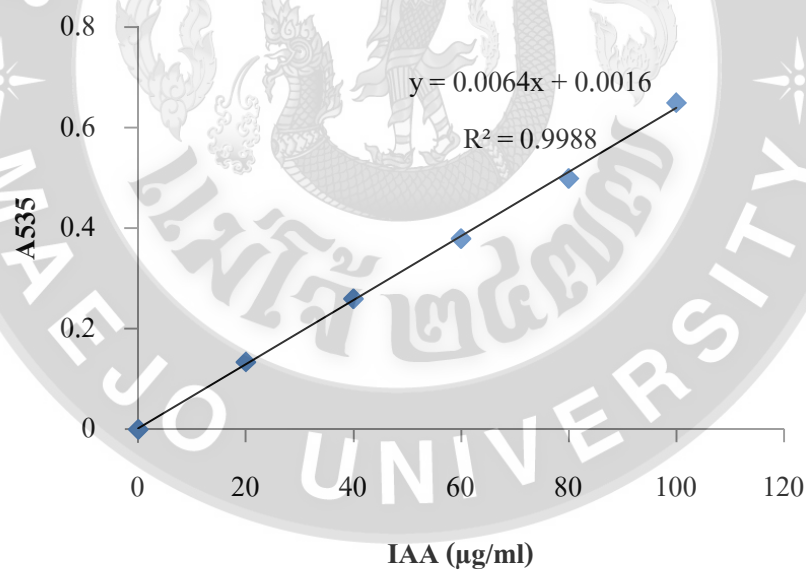


ภาพที่ 20 กราฟมาตรฐาน IAA เลี้ยงในอาหาร TSB

3. กราฟมาตรฐาน IAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 18 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่ไม่ได้เติม tryptophan

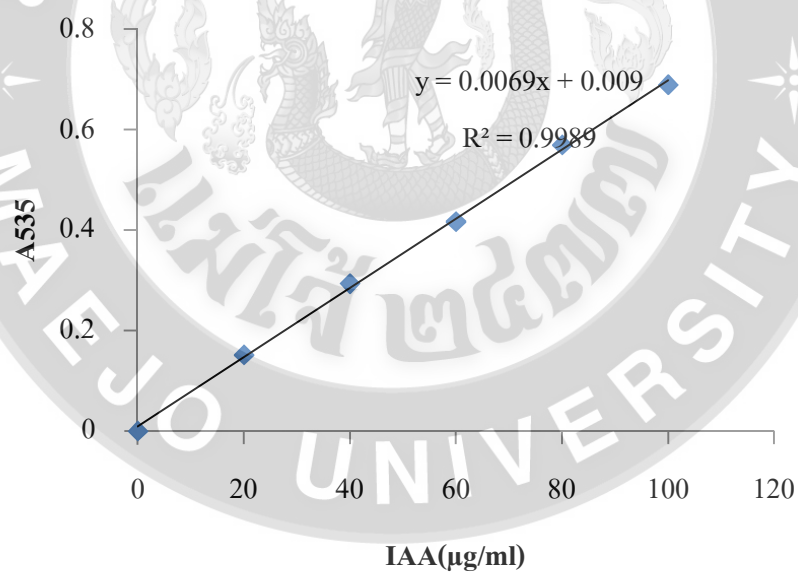
IAA concentration($\mu\text{g/ml}$)	A535			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
0	0	0	0	0
20	0.133	0.135	0.135	0.134
40	0.255	0.262	0.263	0.260
60	0.372	0.383	0.384	0.380
80	0.496	0.502	0.501	0.500
100	0.644	0.650	0.657	0.650



ภาพที่ 21 กราฟมาตรฐาน IAA ที่ไม่ได้เติม tryptophan

ตารางที่ 19 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่เติม tryptophan เข้มข้น 200 mg/ml

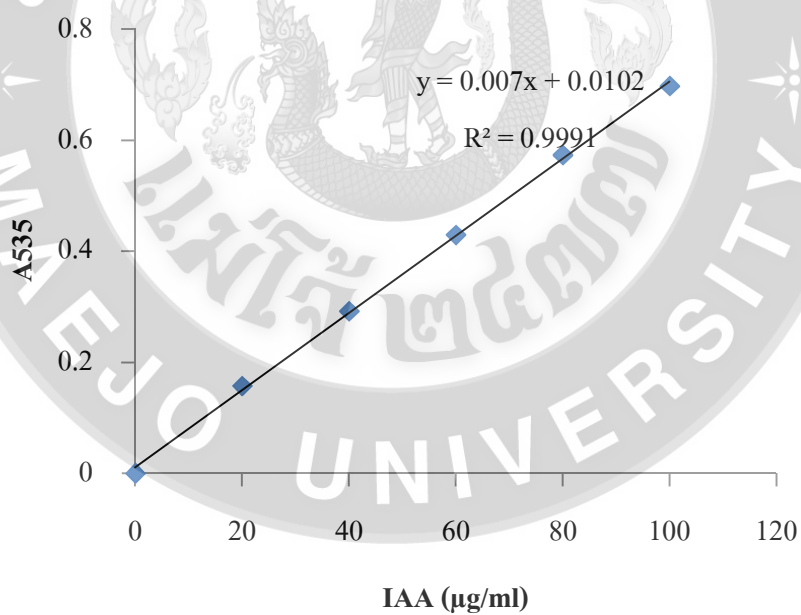
IAA concentration($\mu\text{g/ml}$)	A535			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
0	0	0	0	0
20	0.148	0.152	0.155	0.152
40	0.291	0.294	0.296	0.294
60	0.411	0.422	0.418	0.417
80	0.555	0.570	0.584	0.570
100	0.694	0.679	0.695	0.689



ภาพที่ 22 กราฟมาตรฐาน IAA ที่เติม tryptophan เข้มข้น 200 mg/ml

ตารางที่ 20 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่เติม tryptophan เข้มข้น 400 mg/ml

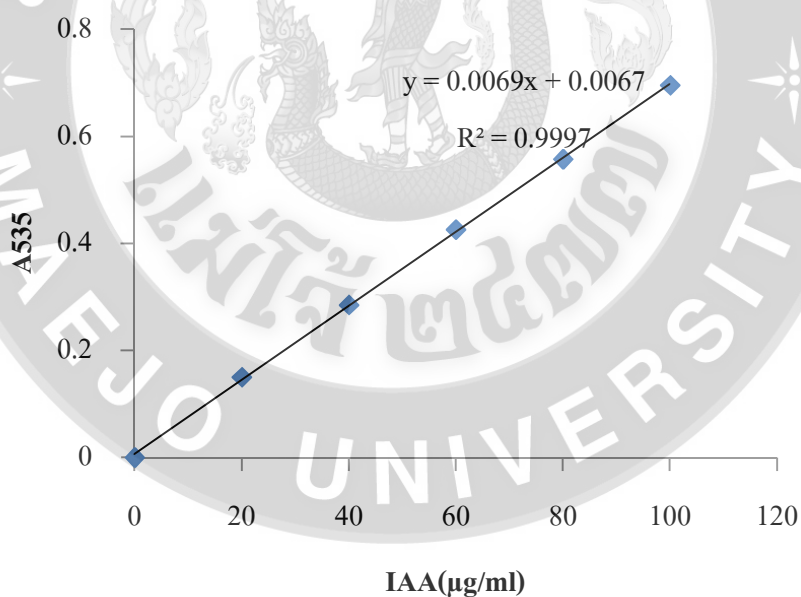
IAA concentration($\mu\text{g/ml}$)	A535			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
0	0	0	0	0
20	0.160	0.160	0.152	0.157
40	0.286	0.292	0.298	0.292
60	0.423	0.425	0.440	0.429
80	0.569	0.581	0.570	0.573
100	0.703	0.699	0.691	0.698



ภาพที่ 23 กราฟมาตรฐาน IAA ที่เติม tryptophan เข้มข้น 400 mg/ml

ตารางที่ 21 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่เติม tryptophan เข้มข้น 600 mg/ml

IAA concentration($\mu\text{g/ml}$)	A535			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
0	0	0	0	0
20	0.150	0.150	0.151	0.150
40	0.279	0.290	0.286	0.285
60	0.423	0.423	0.431	0.426
80	0.554	0.555	0.563	0.557
100	0.688	0.695	0.703	0.695

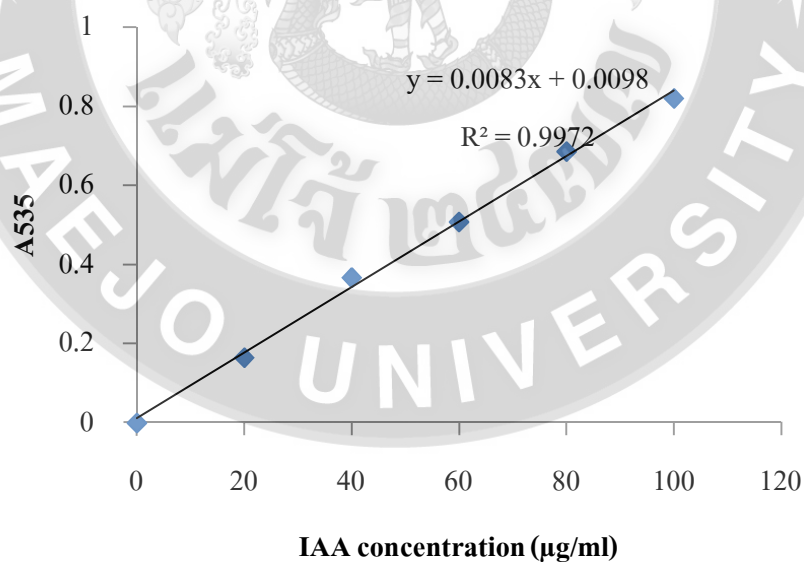


ภาพที่ 24 กราฟมาตรฐาน IAA ที่เติม tryptophan เข้มข้น 600 mg/ml

4.กราฟมาตรฐาน IAA ที่ pH ต่างๆ

ตารางที่ 22 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่ pH 5

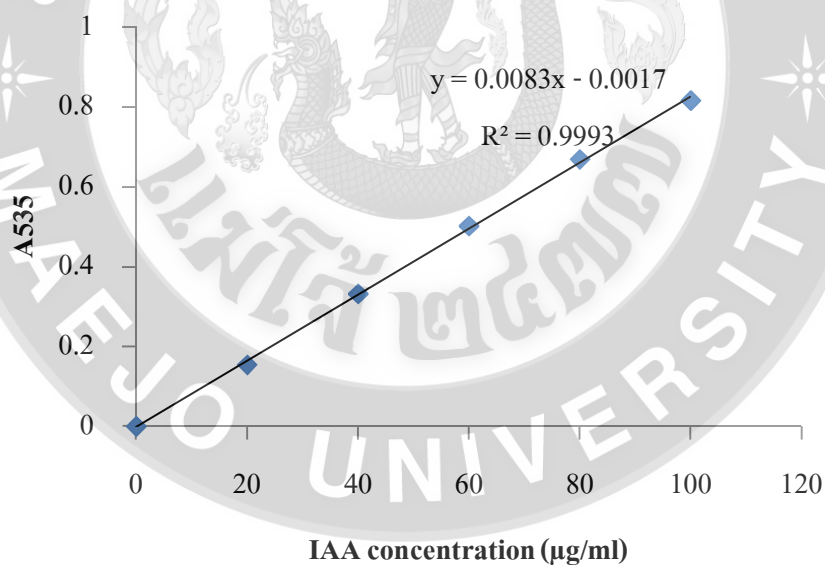
IAA concentration($\mu\text{g/ml}$)	A535			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
0	0	0	0	0
20	0.163	0.166	0.167	0.165
40	0.36	0.372	0.371	0.368
60	0.494	0.521	0.511	0.509
80	0.685	0.676	0.699	0.687
100	0.818	0.827	0.82	0.822



ภาพที่ 25 กราฟมาตรฐาน IAA ที่ pH 5

ตารางที่ 23 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่ pH 6

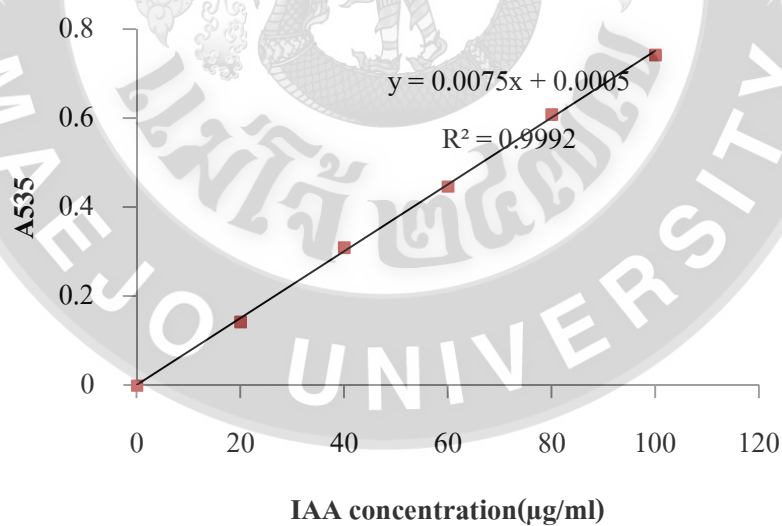
IAA concentration($\mu\text{g/ml}$)	A535			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
0	0	0	0	0
20	0.154	0.152	0.157	0.154
40	0.325	0.336	0.335	0.332
60	0.5	0.499	0.507	0.502
80	0.654	0.678	0.675	0.669
100	0.814	0.823	0.812	0.816



ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐาน IAA ที่ pH 6

ตารางที่ 24 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่ pH 7

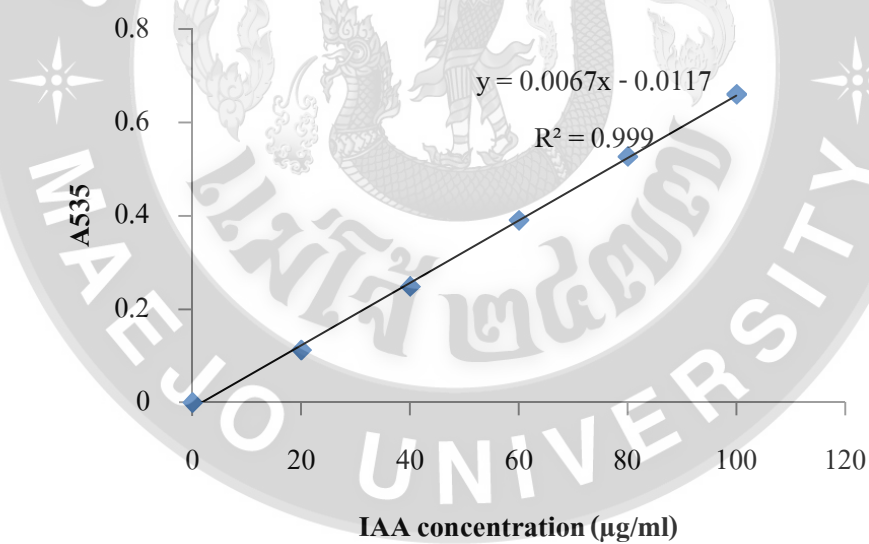
IAA concentration($\mu\text{g/ml}$)	A535			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
0	0	0	0	0
20	0.138	0.15	0.141	0.143
40	0.31	0.313	0.309	0.311
60	0.455	0.449	0.439	0.448
80	0.614	0.613	0.603	0.610
100	0.727	0.752	0.75	0.743



ภาพที่ 27 กราฟมาตรฐาน IAA ที่ pH 7

ตารางที่ 25 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่ pH 8

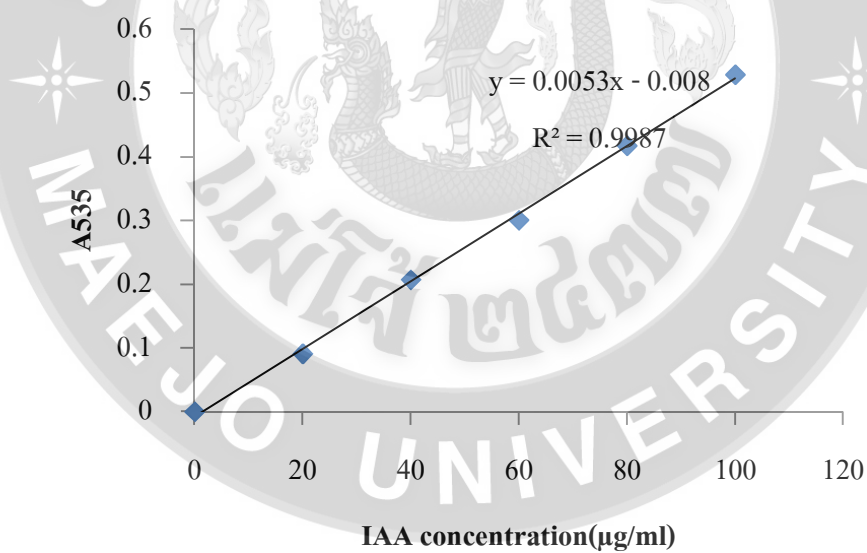
IAA concentration($\mu\text{g/ml}$)	A535			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
0	0	0	0	0
20	0.118	0.111	0.108	0.112
40	0.256	0.252	0.238	0.249
60	0.395	0.395	0.382	0.391
80	0.545	0.521	0.516	0.527
100	0.656	0.668	0.658	0.661



ภาพที่ 28 กราฟมาตรฐาน IAA ที่ pH 8

ตารางที่ 26 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 ที่ pH 9

IAA concentration($\mu\text{g/ml}$)	A535			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
0	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.095	0.088	0.09	0.091
40	0.214	0.202	0.205	0.207
60	0.312	0.306	0.283	0.300
80	0.392	0.411	0.448	0.417
100	0.53	0.525	0.531	0.529



ภาพที่ 29 กราฟมาตรฐาน IAA ที่ pH 9

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ปริมาณ IAA

1. ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณ IAA เทียบกับกราฟมาตรฐาน

1. นำเชื้อที่บ่มมา vortex
2. ดูดเชื้อมาใส่ในหลอด centrifuge ประมาณ 2.6 ml
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
4. ดูดส่วนใส (supernatant) ทั้งหมดลงในหลอด centrifuge ใหม่
5. นำส่วนใสมาทดสอบปฏิกิริยา 0.5 ml ทำ 3 ซ้ำ
6. เติม Salkowski reagent 0.5 ml ทำปฏิกิริยากับส่วนใส
7. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
8. นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A535 nm
9. เทียบกับกราฟมาตรฐาน
10. และคำนวณหาปริมาณ IAA $\mu\text{g/ml}$

2. การคำนวณหาปริมาณ IAA

$$\text{ปริมาณ IAA } (\mu\text{g/ml}) = A535 / \text{slope}$$

ภาคผนวก จ

ขั้นตอนการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ตามวิธีการของผู้ผลิต Geneai ประเทศ Taiwan

ขั้นตอนการทำ PCR

1. วิธีการสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic DNA Mini Kit

เติม culture broth ลงใน eppendorf

นำไป centrifuge 5 นาที 10000 rpm เท supernatant ที่

เติม 200 μ l ของ 10 mg lysozyme/ml TEN buffer + RNAase 2 μ l/ml

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที (กลับหลอดไปมาทุก 3 นาที)

เติม GB buffer 200 μ l (ทำให้เซลล์แตก) แล้ว Vortex

นำไปบ่มที่ 70 °C นาน 10 นาที (จนกว่าตะกอนละลายใส กลับหลอดทุก 3 นาที)

เติม ethanol (ABS) 200 μ l แล้ว Vortex 3-10 วินาที

เติมทั้งหมดลงใน GD column

นำไป centrifuge 5 นาที 10000 rpm เทของเหลวในหลอดทิ้ง

เติม w1 buffer 400 μ l

นำไป centrifuge 5 นาที 10000 rpm เทของเหลวในหลอดทิ้ง

เติม wash buffer 600 μ l

นำไป centrifuge 5 นาที 10000 rpm เทของเหลวในหลอดทิ้ง

1.1)เติม wash buffer 600 μ l

1.2)นำไป centrifuge 5 นาที 10000 rpm เทของเหลวในหลอดทิ้ง

1.3)ย้าย GB column ลงหลอด eppendorf ใหม่

1.4)เติม elution ที่บ่มทิ้งไว้ที่ 70 °C เป็น 50 μ l

1.5) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

1.6) นำไป centrifuge 5 นาที 10000 rpm ที่ GB column

1.7) เก็บส่วนของ DNA ที่อยู่ใน eppendorf ไว้ที่ -20°C

2. การทำ PCR

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)	คูณจำนวนตัวอย่าง +1
PCR MasterMix	25	$25 \times 6 = 150$
Primer I	4	$4 \times 6 = 24$
Primer II	4	$4 \times 6 = 24$
dH ₂ O	12	$12 \times 6 = 72$
DNA	5	-
Total	50	-

Universal Primer ที่ใช้ คือ 27F และ 1522R (สำหรับเชื้อแบคทีเรีย)

การนำ primer มาใช้ในการทำ PCR จะใช้ primer ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 pmol/μl

เมื่อใส่ส่วนผสมลงใน eppendorf ครบแล้ว ก็นำไปใส่เครื่อง PCR ซึ่งโปรแกรม PCR reaction จะรันตามระบบของตัวเครื่อง คือ

- | | | | |
|-------------------------|------------------|--------------------|------------------|
| 1. Initial Denaturation | 95 °C นาน 5 นาที | 4. Extension | 72 °C นาน 1 นาที |
| 2. Denaturation | 95 °C นาน 1 นาที | 5. Final Extension | 72 °C นาน 1 นาที |
| 3. Annealing | 55 °C นาน 1 นาที | 6. Set Hold | 20 °C |

3. การทำ PCR Product ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit

3.1) นำ PCR product ที่ได้ใส่ลงไปใน eppendorf ทั้งหมด

3.2) เติมน้ำ 500 μl DF buffer แล้ว Vortex

- 3.3) บ่มที่ 55 °C นาน 10-15 นาที กลับหลอดไปมาทุก 2-3 นาที
- 3.4) เอา FD column ใส่ลงใน collection tube
- 3.5) นำตัวอย่างใส่ลงใน DF column
- 3.6) นำไป centrifuge 30 นาที 10000 rpm เทของเหลวทิ้ง
- 3.7) เติม 500 µl wash buffer
- 3.8) นำไป centrifuge 30 นาที 13000 rpm เทของเหลวทิ้ง
- 3.9) นำไป centrifuge 2 นาที 10000 rpm
- 3.10) เติม elution buffer 30 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- 3.11) นำไป centrifuge 2 นาที เติม speed
- 3.12) เก็บ purified DNA ที่ได้ไปทำการ run gel และส่ง sequence

4. ตรวจสอบ PCR Product ด้วยวิธีการ run gel-electrophoresis

- 4.1) นำ 1.5% agarose gel 30 ml ไปหลอมด้วยไมโครเวฟ
- 4.2) ตั้งทิ้งไว้ให้เจลมีอุณหภูมิประมาณ 50 °C
- 4.3) ใส่ gel star 1 µl/10 ml
- 4.4) เทเจลลงในแม่พิมพ์และเสียบหัวลงไป เพื่อให้เกิดช่องสำหรับหยอดตัวอย่าง
- 4.5) รอให้เจลแข็งและต้องนำเจลไปบ่มไว้ที่มีด
- 4.6) เมื่อเจลแข็งตัวค่อยๆดึงหัวออกแล้วนำแผ่นเจลไปวางไว้ในเครื่อง electrophoresis
- 4.7) เติม TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจล นำ marker และตัวอย่างมาหยอดลงในแต่ละช่องดังนี้
 - Marker : marker 1 µl + TAE buffer 4 µl + loading dye 2 µl
 - Sample : DNA ตัวอย่าง 2 µl + loading dye 2 µl
- 4.8) ปิดฝาเครื่อง electrophoresis โดยตั้งค่าไว้ที่ 100 v เคลื่อนที่จาก - → +
- 4.9) ทิ้งไว้ประมาณ 30-45 นาที จากนั้นปิดเครื่อง electrophoresis
- 4.10) นำแผ่นเจลไปวางไว้บนเครื่องตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

ภาคผนวก จ

ผลการทดลองการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต IAA

ตารางที่ 27 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต IAA โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย

ลำดับ	ไอโซเลต	A535			IAA ($\mu\text{g/ml}$)		
		TSB	NB	เฉลี่ย	TSB	NB	เฉลี่ย
1	9-4D.1	0.425	0.340	0.382	57.648	37.460	47.554
2	10-2.1	0.243	0.242	0.242	32.440	25.794	29.117
3	6-3.1	0.214	0.267	0.240	28.319	28.770	28.545
4	C9-24.2	0.092	0.324	0.208	11.398	35.575	23.487
5	9-4C.2	0.111	0.280	0.195	14.060	30.298	22.179
6	8-2.1	0.187	0.132	0.160	24.685	12.738	18.712
7	9-5E	0.104	0.212	0.158	13.111	22.302	17.706
8	9-3B.2	0.108	0.197	0.153	13.690	20.516	17.103
9	C2-3	0.127	0.152	0.139	16.236	15.119	15.678
10	5.3.2	0.123	0.124	0.124	15.750	11.786	13.768
11	9-3.2	0.126	0.116	0.121	16.120	10.873	13.497
12	9-4A.2	0.104	0.133	0.119	13.157	12.857	13.007
13	2-2.1	0.082	0.118	0.100	9.986	11.091	10.539
14	1-2C.1.1	0.107	0.093	0.100	13.458	8.115	10.787
15	9-5.1	0.079	0.115	0.097	9.639	10.694	10.167
16	9-3D.1	0.087	0.098	0.093	10.773	8.710	9.742
17	9-4D	0.157	0.028	0.093	20.495	0.357	10.426
18	3-1A.1*	0.091	0.091	0.091	11.282	7.817	9.550
19	9-4E	0.112	0.058	0.085	14.269	3.889	9.079
20	9-4B.2	0.068	0.102	0.085	8.088	9.167	8.627
21	3-3	0.058	0.104	0.081	6.676	9.425	8.050
22	10-3.1	0.065	0.095	0.080	7.625	8.313	7.969
23	CA.2B	0.084	0.047	0.065	10.264	2.560	6.412
24	11-2.1.1	0.046	0.081	0.063	5.009	6.627	5.818

ตาราง 27 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลต	A535			IAA (µg/ml)		
		TSB	NB	เฉลี่ย	TSB	NB	เฉลี่ย
25	C7-3B.1	0.080	0.044	0.062	9.755	2.282	6.018
26	3-2D.1.1	0.090	0.029	0.059	11.097	0.496	5.797
27	2.4.1	0.044	0.072	0.058	4.801	5.536	5.168
28	1-1B.2	0.083	0.029	0.056	10.194	0.476	5.335
29	1-3A	0.076	0.035	0.055	9.222	1.131	5.177
30	4-1.1	0.050	0.047	0.048	5.611	2.579	4.095
31	C7-1B.2	0.035	0.059	0.047	3.574	4.067	3.821
32	1-3E	0.049	0.045	0.047	5.495	2.381	3.938
33	9-2.1	0.062	0.028	0.045	7.278	0.377	3.827
34	C1-2A	0.050	0.036	0.043	5.542	1.329	3.436
35	10-2.2	0.073	0.005	0.039	8.736	0.000	4.368
36	10-1.1	0.032	0.040	0.036	3.157	1.726	2.442
37	9-4.1	0.047	0.023	0.035	5.125	0.000	2.563
38	7-3.1	0.024	0.043	0.033	1.977	2.103	2.040
39	1-2B.1	0.047	0.020	0.033	5.125	0.000	2.563
40	1-2B.2	0.023	0.043	0.033	1.838	2.143	0.000
41	5.3.1	0.050	0.013	0.032	5.565	0.000	0.000
42	3-3B.1	0.025	0.038	0.031	2.116	1.528	0.000
43	4-1.2	0.055	0.007	0.031	6.282	0.000	0.000
44	1-2D	0.050	0.009	0.029	5.611	0.000	0.000
45	1-1B.1.2	0.039	0.015	0.027	4.083	0.000	0.000
46	7-2.1	0.003	0.049	0.026	0.000	2.817	0.000
47	3-3D.2	0.047	0.004	0.025	5.171	0.000	0.000
48	K5-3C	0.018	0.030	0.024	1.144	0.575	0.000
49	9-3B.1	0.034	0.013	0.023	3.343	0.000	0.000
50	5.3.1	0.034	0.012	0.023	3.389	0.000	0.000

ตาราง 27 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลต	A535			IAA ($\mu\text{g/ml}$)		
		TSB	NB	เฉลี่ย	TSB	NB	เฉลี่ย
51	1-1E.2.1	0.040	0.006	0.023	4.176	0.000	0.000
52	1-1B.1.2*	0.029	0.017	0.023	2.694	0.000	0.000
53	3-3A.1	0.023	0.019	0.021	1.815	0.000	0.000
54	3-3C.1	0.034	0.007	0.020	3.366	0.000	0.000
55	9-4C.3	0.007	0.031	0.019	0.000	0.734	0.000
56	9-4B.1	0.024	0.014	0.019	1.977	0.000	0.000
57	1-1E.2.2	0.028	0.007	0.017	2.532	0.000	0.000
58	1-1D	0.014	0.018	0.016	0.634	0.000	0.000
59	7.4.1	0.007	0.025	0.016	0.000	0.000	0.000
60	3-3B.2	-0.001	0.032	0.015	0.000	0.774	0.000
61	K7-1A.1.3	0.021	0.010	0.015	1.514	0.000	0.000
62	9-3A-2.2	0.001	0.029	0.015	0.000	0.516	0.000
63	3.1.1	0.029	0.001	0.015	2.718	0.000	0.000
64	1-3B	0.026	0.002	0.014	2.255	0.000	0.000
65	5-2.1	0.023	0.005	0.014	1.815	0.000	0.000
66	1-2A	0.015	0.012	0.014	0.773	0.000	0.000
67	9-3E	0.014	0.009	0.011	0.542	0.000	0.000
68	11-2.2	0.013	0.008	0.010	0.449	0.000	0.000
69	7.2.1	0.019	-0.002	0.009	1.282	0.000	0.000
70	K7-14-1.2	0.021	-0.004	0.009	1.583	0.000	0.000
71	K7-1F	0.016	0.001	0.008	0.819	0.000	0.000
72	3-2D.2	0.014	0.002	0.008	0.611	0.000	0.000
73	3-2D.1.2	0.017	-0.003	0.007	1.074	0.000	0.000
74	1-3B	0.002	0.013	0.007	0.000	0.000	0.000
75	3.2C	0.006	0.009	0.007	0.000	0.000	0.000
76	8-1.1	0.018	-0.004	0.007	1.167	0.000	0.583

ตาราง 27 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลต	A535			IAA ($\mu\text{g/ml}$)		
		TSB	NB	เฉลี่ย	TSB	NB	เฉลี่ย
77	3-3A.3	0.009	0.003	0.006	0.000	0.000	0.000
78	K7-1.1	0.004	0.007	0.006	0.000	0.000	0.000
79	3-1A.2.2	0.003	0.007	0.005	0.000	0.000	0.000
80	K7-3.1.1	0.000	0.008	0.004	0.000	0.000	0.000
81	3-2B.1	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000
82	3-3A.2	0.007	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000
83	1-3D.2	0.005	0.002	0.003	0.000	0.000	0.000
84	1-1B.1.1	0.005	-0.002	0.002	0.000	0.000	0.000
85	9-3A-2.1	0.009	-0.007	-0.001	0.000	0.000	0.000
86	3-2D.1.2*	-0.014	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000
87	K7-3.1.2	-0.012	0.006	-0.003	0.000	0.000	0.000
88	3-3D.1	-0.001	-0.007	-0.004	0.000	0.000	0.000
89	1-1E.1	-0.015	0.005	-0.005	0.000	0.000	0.000
90	3-1A.1	-0.013	0.001	-0.006	0.000	0.000	0.000
91	9-4C.1	-0.015	-0.004	-0.009	0.000	0.000	0.000