

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดของเชื้อ *Streptomyces*

และการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105

Optimum Conditions for Indole-3-Acetic Acid Production by *Streptomyces* and its Stimulation on Seed Germination of Rice cv. KDML105

ชนิษฐา สมตระกูล^{1*}, ณัฐมล ศรีภาษา¹, สударัตน์ ลาตเสนา¹, อภิเดช แสงดี¹ และวราภรณ์ ฉุยฉาย²

Khanitta Somtrakoon^{1*}, Nattamon Sripasa¹, Sudarat Ladsena¹, Aphidech Sangdee¹

and Waraporn Chouychai²

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม กันทรวิชัย มหาสารคาม 44150

²สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ นครสวรรค์ 60000

¹Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai, Mahasarakham, Thailand 44150

²Biology Program, Faculty of Science and Technology, Nakhonsawan Rajabhat University, Nakhonsawan, Thailand 60000

*Corresponding author: khanitta.s@msu.ac.th

Abstract

This study was to investigate the effects of temperature, pH and NaCl on indole-3-acetic acid produced by 4 bacterial species isolated from vermicompost, that were *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 and *Streptomyces* sp. SEF37. Effect of the culture filtrate from four strains of *Streptomyces* on germination stimulated and seedling growth of rice cultivar KDML105 were also determined. The results showed that the optimum of indole-3-acetic acid produced by four strains of *Streptomyces* were observed at 27-30°C (18.8-20.7 mg/l) and pH 7-9. *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 could produce indole-3-acetic acid in the presence of 2.55% NaCl. However, using suspension of these bacterial isolates could not stimulate seed germination and seedling growth of rice cultivar KDML105. The culture filtrate of *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 and *Streptomyces* sp. SEF37 trended to stimulate germination of seed while culture filtrate of *Streptomyces* sp. The SEF4 and *Streptomyces* sp. SEF11 trended to increase shoot length but culture filtrate of all strains decreased the root length. Thus, these *Streptomyces* strains could produce indole-3-acetic acid under alkaline conditions and salt stress conditions which could be applied to use with rice cultivation in the North eastern of Thailand in the future.

Keywords: indole-3-acetic acid, rice KDML105, *Streptomyces*

บทคัดย่อ

การศึกษาจัดทำขึ้นเพื่อทดสอบผลของอุณหภูมิ pH และโซเดียมคลอไรด์ ต่อการผลิตรกรดอินโดล-3-แอซิดิก โดยแบคทีเรีย 4 ชนิดที่คัดแยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือน ได้แก่ *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 และ *Streptomyces* sp. SEF37 รวมทั้งศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียและสารแขวนลอยของแบคทีเรียทั้งสองชนิด ต่อการกระตุ้นการงอกและการเจริญเติบโตในระยะต้นกล้าของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ผลิตรกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ดีที่อุณหภูมิ 27-30°C. (18.8-20.7 มก./ลิตร) และ pH ระหว่าง 7-9 โดย *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11 และ *Streptomyces* sp. SEF28 สามารถผลิตรกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ดีในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2.55 อย่างไรก็ตามการใช้สารแขวนลอยของแบคทีเรียไม่มีผลต่อการกระตุ้นการงอกและการเจริญเติบโตในระยะต้นกล้าของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ส่วนการใช้ น้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 และ *Streptomyces* sp. SEF37 มีแนวโน้มช่วยกระตุ้นให้เมล็ดข้าวงอกเร็วขึ้น ในขณะที่น้ำเลี้ยงของ *Streptomyces* sp. SEF4 และ *Streptomyces* sp. SEF11 มีแนวโน้มเพิ่มความยาวของยอด แต่น้ำเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดทำให้ความยาวรากของต้นกล้าข้าวลดลง อย่างไรก็ตามการที่แบคทีเรียเหล่านี้ผลิตรกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ในสภาวะที่มีเกลือและเป็นต่างจึงมีโอกาสเป็นไปได้ในการใช้แบคทีเรีย *Streptomyces* ร่วมกับการปลูกข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในอนาคต

คำสำคัญ: กรดอินโดล-3-แอซิดิก ข้าวขาวดอกมะลิ 105 สเตรปโตมัยซิส

คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและอีกหลายประเทศทั่วโลก เนื่องจากประชากรที่อาศัยอยู่ในประเทศที่ตั้งอยู่ในแถบทวีปเอเชีย อเมริกา และบางประเทศในยุโรปนิยมบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก (Kukusamude and Kongsri, 2018) ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีการผลิตและการส่งออกข้าวมากเป็นอันดับต้นของโลก จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรรายงานว่าพื้นที่เพาะปลูกข้าวของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2559 คิดเป็นร้อยละ 21.3 ของพื้นที่ของประเทศทั้งหมด (Office of The National Economic and Social Development Board, 2017) โดยปัจจัยสำคัญประการหนึ่งซึ่งส่งผลต่อผลผลิตข้าวอยู่ในขั้นตอนของการเพาะปลูก ซึ่งลักษณะการงอกของต้นกล้าจะส่งผลต่อการแตกกอของต้นข้าวและส่งผลกระทบต่อผลผลิตของข้าวตามมาได้ (Wang *et al.*, 2018) โดยสารควบคุมการเจริญของพืชที่ส่งผลโดยตรงต่อการงอกของข้าว ได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มจิบเบอเรลลินโดยเฉพาะกรดจิบเบอเรลลิน (Gibberellic acid) มีบทบาทสำคัญในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์อะไมเลสในชั้นอะลิวโรน (Aleurone layer) ระหว่างการงอกของข้าว โดยเอนไซม์อะไมเลสจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ซึ่งจะถูกใช้เป็นแหล่งซึบสเตรต และแหล่งพลังงานในการพัฒนาของเอ็มบริโอต่อไป (Kaneko *et al.*, 2002) ในขณะที่กรดอินโดล-3-แอซิดิกเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอีกชนิดหนึ่งซึ่งส่งผลต่อการงอกของเมล็ดเช่นกัน โดยกรดอินโดล-3-แอซิดิกจะกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการขยายตัวของเซลล์หลังการแบ่งตัว โดยทำให้ผนังเซลล์อ่อนตัว ทำให้เซลล์ขยายขนาดได้ง่ายซึ่งเรียกการเจริญเติบโตแบบนี้ว่าแอซิดโกรท (Acid growth) (Tanimoto, 2005)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด โดยเฉพาะกรดอินโดล-3-แอซิดิกถูกผลิตขึ้นได้จากแบคทีเรีย โดยมีรายงานว่าแบคทีเรียในจีนัส *Streptomyces* มีความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกและส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้ การใช้หัวเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถดังกล่าวมีความคาดหวังว่าจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของข้าวได้ เช่น การใช้หัวเชื้อ *Streptomyces corchorusii* สายพันธุ์ UCR3-16 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกร่วมกับความสามารถในการละลายฟอสเฟตและการผลิตเอนไซม์ดีอะมิเนส สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของเมล็ดข้าว ภายใต้สภาวะที่ได้รับเชื้อก่อโรคพืชในระดับกระถางทดลองได้ดี (Tamreihao *et al.*, 2016) การใช้หัวเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ KAI-3 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกเช่นกันมีบทบาทส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากและช่วยเพิ่มผลผลิตของเมล็ดข้าวได้เมื่อปลูกในแปลงทดสอบ (Gopalakrishnan *et al.*, 2013) สำหรับหัวเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกและส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว ได้แก่ *Pseudomonas fragi* และ *Bacillus cereus* ช่วยกระตุ้นให้ข้าวมีความสูงและมีน้ำหนักแห้งของเมล็ดเพิ่มขึ้น ส่วน *Bacillus amyloliquefaciens* ช่วยส่งเสริมให้น้ำหนักแห้งของรากเพิ่มสูงขึ้น เป็นต้น (Susilowati *et al.*, 2018) โดยงานวิจัยนี้ได้ทดสอบปัจจัยทางกายภาพบางประการ ได้แก่ อุณหภูมิ pH และผลของเกลือต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกของหัวเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* ได้แก่ *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 และ *Streptomyces* sp. SEF37 รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพของการใช้สารแขวนลอยของแบคทีเรียและน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* ทั้งสี่สายพันธุ์ต่อการกระตุ้นการงอกและการเจริญเติบโตในระยะต้นกล้าของข้าวขาวดอกมะลิ 105

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียกลุ่มสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกจำนวน 4 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 และ *Streptomyces* sp. SEF37 โดยแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึงกับ *S. coeruleorubidus* ร้อยละ 98, *S. thermotolerans* ร้อยละ 99, *S. venezuelae* ร้อยละ 99 และ *S. pseudogriseolus* ร้อยละ 98 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากลำดับเบสบน 16S rDNA การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียขึ้นใช้ในการทดลอง ทำโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนจานอาหาร PDA ที่ลดสารอาหารลงครึ่งหนึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยของแบคทีเรียแต่ละชนิดในสารละลายทวิน 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตหลังจากตรวจสอบการเจริญบนอาหาร PDA ที่ลดสารอาหารลงครึ่งหนึ่งเป็น 10^7 cfu/มล. เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก

ศึกษาผลของ pH อุณหภูมิ และโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ แต่ละทริทเมนต์ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่ลดสารอาหารลงครึ่งหนึ่งซึ่งผสมทริปโตเฟน 0.2 กรัม/ลิตร ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3, 5, 7 และ 9 แล้วใช้เชื้อตั้งต้นเป็นเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตเท่ากับ 10^6 cfu/มล. จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 14 วัน การทดสอบผลของอุณหภูมิโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มี pH 5 แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 37°C. และที่อุณหภูมิ ห้องซึ่งมีอุณหภูมิผันแปรระหว่าง 27-30°C. เป็นเวลา 14 วัน

การทดสอบผลของโซเดียมคลอไรด์ทำโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็นร้อยละ 0.85, 1.70 และ 2.55 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงดูดส่วนน้ำใสด้านบนปริมาตร 2 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของกรดอินโดล-3-แอซิดิกตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Ahmad *et al.* (2008) โดยหยดกรดออกโทฟอสฟอริกลงไป 2 หยด และน้ำยา Salkowski ปริมาตร 4 มล. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดอินโดล-3-แอซิดิกที่ผลิตได้ กับกราฟมาตรฐานของกรดอินโดล-3-แอซิดิก

ทดสอบผลของสารแขวนลอยของ *Streptomyces* และน้ำเลี้ยงเซลล์ต่อการงอกของข้าวขาวดอกมะลิ 105

เตรียมสารแขวนลอยของ *Streptomyces* แต่ละสายพันธุ์ตามวิธีการเตรียมหัวเชื้อให้ได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตเท่ากับ 10^6 cfu/มล. ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์เตรียมโดยเพาะเลี้ยง *Streptomyces* ในอาหาร PDB ที่ลดสารอาหารลงครึ่งหนึ่งและผสมทริปโตเฟน 0.2 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ถ่ายใส่ภาชนะที่ปราศจากเชื้อ การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการกระตุ้นการงอกของข้าวเริ่มจากการทำความสะอาดเมล็ดพันธุ์ข้าวโดยแช่เมล็ดในสารละลายไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที แต่ละครั้งของการแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวให้เขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นถ่ายเมล็ดพันธุ์ข้าวใส่ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง แต่ละครั้งให้เขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นจึงแช่เมล็ด

พันธุ์ข้าวในสารแขวนลอยของแบคทีเรียและน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเป็นเวลาที่เพียงพอต่อการทำให้เมล็ดพันธุ์ข้าวชุ่มไปด้วยสารแขวนลอยของแบคทีเรียและน้ำเลี้ยงเซลล์ จากนั้นจึงนำเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ผ่านการแช่มาเพาะลงในกระดาดทิชชูที่ชุ่มน้ำซึ่งปราศจากเชื้อทันทีโดยไม่ต้องล้างทำความสะอาด จากนั้นปิดทับด้วยกระดาดทิชชูที่ชุ่มน้ำอีกครั้ง รักษาความชื้นของกระดาดให้คงที่ โดยสังเกตการระเหยของน้ำแล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไปเพิ่มเติมเพื่อให้ความชื้นอยู่ในระดับเดียวกับวันแรกของการทดลอง ส่วนการทดลองในชุดควบคุมทำโดยแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวในสารละลายทวิน 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 บันทึกผลการทดลองวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ของการทดลอง โดยนับจำนวนต้นกล้าที่งอกในแต่ละวันจากการสังเกตการงอกตั้งแต่ 1 วันหลังการเพาะ โดยพิจารณาจากรากที่งอกออกมาและมีความยาวประมาณ 0.1 ซม. ให้ถือว่า เป็นต้นกล้าที่งอก วันสุดท้ายของการทดลองวัดความยาวยอดและความยาวรากของต้นกล้าที่งอกออกมา โดยใช้หน่วยเป็นมิลลิเมตร การทดลองทั้งหมดทำ 10 ซ้ำ แต่ละซ้ำเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวลงไป 10 เมล็ด จากนั้นคำนวณร้อยละการงอกทั้งหมดและเวลาเฉลี่ยในการงอกตามสูตร

ร้อยละการงอก (G_T) = $(Ng/Ns) \times 100$ โดย Ng = จำนวนเมล็ดที่งอกภายในระยะเวลาที่กำหนด และ Ns = จำนวนเมล็ดที่เริ่มเพาะ (Calvelo Pereira *et al.*, 2010)

เวลาเฉลี่ยในการงอก (MTG) = $\sum (gi \times di)/n$ โดย di = จำนวนวัน gi = จำนวนเมล็ดที่งอกที่วัน di และ n = จำนวนต้นกล้าที่งอกทั้งหมด (Chuanren *et al.*, 2004)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างทรีทเมนต์ด้วย one-way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ด้วย LSD โดยกำหนดระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการศึกษาปัจจัยทางกายภาพบางประการ ได้แก่ อุณหภูมิ pH และโซเดียมคลอไรด์ที่ส่งผลต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก โดย *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 และ *Streptomyces* sp. SEF37 แสดงดัง Table 1, 2, 3 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก โดย *Streptomyces* ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ อุณหภูมิห้องซึ่งมีอุณหภูมิขณะทำการทดลองระหว่าง 27-30°C. ระดับของกรดอินโดล-3-แอซิดิกที่ผลิตได้เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptomyces* ทั้งสี่สายพันธุ์ที่อุณหภูมิห้องมีค่ามากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37°C. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระดับของกรดอินโดล-3-แอซิดิกที่ผลิตได้เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptomyces* ทั้งสี่สายพันธุ์ที่อุณหภูมิห้องมีค่าระหว่าง 18.8-20.7 มก./ลิตร ส่วนปริมาณกรดอินโดล-3-แอซิดิกที่ผลิตได้เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptomyces* ทั้งสี่สายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 37°C. มีค่าระหว่าง 12.3-14.0 มก./ลิตร (Table 2) โดยช่วงอุณหภูมิห้องที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces* ชนิดอื่นๆ เช่น *Streptomyces atrovirens* ASU1 4 สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C (Abd-Alla, 2013)

pH และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่ส่งผลต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 และ *Streptomyces* sp. SEF37 มีความสอดคล้องกัน โดยสายพันธุ์ของ *Streptomyces* ที่สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ดีที่ pH เป็นต่าง และสามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกในสภาวะที่มีระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงด้วย เช่น *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11

และ *Streptomyces* sp. SEF28 ผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ดีที่ pH 9 ปริมาณกรดอินโดล-3-แอซิดิกที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 11.8, 25.6 และ 38.4 มก./ลิตร ตามลำดับ โดยแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 2.55 ได้ดีเท่ากับที่ระดับของโซเดียมคลอไรด์มีความเข้มข้นในระดับปกติ มีเพียง *Streptomyces* sp. SEF37 เท่านั้นที่ผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ดีที่สุดที่ pH 7 และ 9 แต่ไม่สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ดีที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1.70 และ 2.55 โดยปริมาณกรดอินโดล-3-แอซิดิกมีค่าเพียง 12.1 และ 12.8 มก./ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. SEF37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1.70 และ 2.55 ตามลำดับ ผลการศึกษายังพบอีกว่าในสภาวะที่เป็นกรดไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก โดย *Streptomyces* ทั้งสี่สายพันธุ์ โดยปริมาณกรดอินโดล-3-แอซิดิกถูกผลิตขึ้นได้เพียง 0.5-4.2 มก./ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 3 ผลการทดลองแสดงดัง Table 2 และ 3

จากรายงานที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ระบุว่า *Streptomyces* มีความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกมีแนวโน้มเจริญได้ดีที่ pH เป็นกลาง แต่ในสภาวะที่เป็นกรดหรือสภาวะที่เป็นด่างเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก (Khamna et al., 2010) แต่ในการศึกษานี้พบว่าสายพันธุ์ของ *Streptomyces* ที่เลือกนำมาศึกษาสามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ดีที่ pH เป็นต่างและมีโซเดียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นสูง ซึ่งลักษณะดังกล่าวสอดคล้องและพบใน *Streptomyces* สายพันธุ์อื่นๆ ที่ คัดแยกได้จากปุ๋ยมูลไส้เดือนเช่นกัน เช่น *Streptomyces* สายพันธุ์ CAI-13, CAI-85, CAI-93, CAI-140, CAI-155 และ KAI-180 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ที่พีเอชระหว่าง 7-11 และที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 8 ขึ้นไป

(Gopalakrishnan *et al.*, 2014) หรือ *Streptomyces* สายพันธุ์ VAI-7 และ VAI-40 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดก็สามารถเจริญได้ดีที่ระดับ

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 8 และ pH ระหว่าง 7-11 แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่พีเอชต่ำกว่า 5 (Sreevidya *et al.*, 2016) เป็นต้น

Table 1 Effect of temperature on IAA production (mg/l) by *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 and *Streptomyces* sp. SEF37 (data=mean±SE)

Temperature	SEF4	SEF11	SEF28	SEF37
RT (27-30°C)	20.3±2.04a	18.8±0.60a	20.7±0.75a	20.4±0.86a
37°C	13.8±1.05b	12.3±0.71b	14.0±1.86b	13.9±0.62b

Different lower case letter denote significant difference ($P < 0.05$) between IAA concentration in the same column.

Table 2 Effect of pH on IAA production (mg/l) by *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 and *Streptomyces* sp. SEF37 (data=mean±SE)

pH	SEF4	SEF11	SEF28	SEF37
3	3.3±0.34c	4.2±0.67d	2.5±0.09c	0.5±0.26c
5	8.9±1.16b	11.0±0.19c	13.2±0.68b	13.2±0.89b
7	8.1±0.35b	16.6±0.14b	40.7±0.42a	36.6±0.34a
9	11.8±0.37a	25.6±0.52a	38.4±2.54a	35.6±0.42a

Different lower case letter denote significant difference ($P < 0.05$) between IAA concentration in the same column.

Table 3 Effect of NaCl on IAA production (mg/l) by *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 and *Streptomyces* sp. SEF37 (data=mean±SE).

NaCl	SEF4	SEF11	SEF28	SEF37
0.85%	14.5±2.03a	23.4±0.92a	38.7±1.51a	19.4±1.18a
1.70%	10.5±0.33a	15.3±0.35b	28.5±2.81b	12.1±1.08b
2.55%	10.6±0.28a	24.7±1.00a	36.4±2.34ab	12.8±0.60b

Different lower case letter denote significant difference ($P < 0.05$) between IAA concentration in the same column.

ผลของสารแขวนลอยของ *Streptomyces* ต่อการงอกของข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่าการแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในสารแขวนลอยของ *Streptomyces* ทั้งสี่สายพันธุ์ไม่ส่งผลกระตุ้นการงอกของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ถึงแม้ร้อยละการงอกของข้าวขาวดอกมะลิ 105 จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในสภาวะที่แช่เมล็ดพันธุ์ในสารแขวนลอยของ *Streptomyces* แต่ละสายพันธุ์ก็ตาม โดยร้อยละการงอกอยู่ระหว่าง 64.0-72.0 เมื่อเปรียบเทียบกับ การแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในน้ำกลั่นซึ่งมีร้อยละการงอกเพียง 58.0 ส่วนระยะเวลาเฉลี่ยในการงอกของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่เมล็ดพันธุ์ในสารละลายสปอร์ของ *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 และ *Streptomyces* sp. SEF37 ประมาณ 2.7-2.8 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่มีแนวโน้มน้อยกว่าการแช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำกลั่นหรือสารละลายสปอร์ของ *Streptomyces* sp. SEF4 ซึ่งมีระยะเวลาเฉลี่ยในการงอกนานถึง 3.2 และ 3.8 วัน นอกจากนี้การแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในสารแขวนลอยของ *Streptomyces* ทั้งสี่สายพันธุ์มีแนวโน้มทำให้ความยาวรากของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ต่ำกว่าความยาวรากของต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ดพันธุ์ที่แช่ในน้ำกลั่น ถึงแม้การแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในสารแขวนลอยของ *Streptomyces* sp. SEF4 และ *Streptomyces* sp. SEF11 ทำให้ความยาวยอดของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 (3.4-3.5 ซม.) มากกว่าความยาวยอดของต้นกล้าที่แช่เมล็ดพันธุ์ในสารแขวนลอยของ *Streptomyces* sp. SEF28 และ

Streptomyces sp. SEF37 (2.7-2.9 ซม.) ก็ตาม แต่ค่าดังกล่าวไม่แตกต่างไปจากความยาวยอดของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำกลั่นก่อนเพาะ ผลการทดลองแสดงดัง Table 4 การที่สารแขวนลอยของ *Streptomyces* กระตุ้นการงอกของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ได้ไม่ได้อาจเป็นเพราะการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกของแบคทีเรียที่นำมาใช้ต้องอาศัยทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้น โดยวิธีการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกในจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีรายงานว่าใช้ทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้น และพบว่าจุลินทรีย์ที่สร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกด้วยวิธีที่ไม่อาศัยทริปโตเฟนนั้นพบได้น้อย (Tsavkelova, et al., 2006) และการบ่มสารแขวนลอยของ *Streptomyces* กับเมล็ดข้าวในงานวิจัยครั้งนี้ไม่ได้เติมทริปโตเฟนลงไปด้วย ซึ่งเป็นประเด็นที่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ในขณะทำการแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 และ *Streptomyces* sp. SEF37 ซึ่งวัดปริมาณกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้เท่ากับ 12.37, 57.21, 12.37 และ 35.44 มก./ลิตร ผลการทดลองพบว่า น้ำเลี้ยงเซลล์ไม่ส่งผลต่อร้อยละการงอกและระยะเวลาเฉลี่ยในการงอกของข้าวขาวดอกมะลิ 105 นอกจากนี้ยังพบว่าการแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวในน้ำเลี้ยงเซลล์ *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11 และ *Streptomyces* sp. SEF37 ยังส่งผลให้ความยาวยอดและความยาวรากของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีค่าน้อยกว่าการทดลองในชุดควบคุม ผลการทดลองแสดงดัง Table 5

Table 4 Growth and germination of the soaked rice seed with the suspension of *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 and *Streptomyces* sp. SEF37 (data=mean±SE)

Bacterial strains	Germination percentage (%)	Mean germinating time (days)	Shoot length (cm)	Root length (cm)
0.1% Tween 80	34.4±5.30a	3.3±0.11a	1.5±0.15a	2.5±0.22a
SEF4	36.0±6.18a	3.4±0.13a	1.3±0.13b	1.3±0.72c
SEF11	41.0±4.33a	3.4±0.10a	1.3±0.71b	2.2±1.19b
SEF28	36.0±3.71a	3.5±0.14a	1.5±0.16a	2.1±0.24b
SEFF37	35.6±5.56a	3.6±0.24a	1.2±0.12b	1.5±0.12c

Different lower case letter denote significant difference ($P<0.05$) between plant growth parameters in the same column.

การศึกษานี้พบว่าการใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* ทั้งสี่สายพันธุ์มีแนวโน้มกระตุ้นการงอกและลดระยะเวลาเฉลี่ยในการงอกของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ได้มากกว่าการเพาะเมล็ดพันธุ์ในน้ำกลั่น ถึงแม้จะไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากร้อยละการงอกของข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่าการใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ยังมีแนวโน้มกระตุ้นการงอกของข้าวได้ดีกว่าการใช้สารแขวนลอยของ *Streptomyces*

ทั้งนี้อาจเกิดจากในน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียมีสารออกฤทธิ์ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นมา รวมทั้งกรดอินโดล-3-แอซิดิกอยู่ในปริมาณที่พร้อมกระตุ้นการเจริญของเมล็ดพันธุ์ข้าวอยู่แล้ว ในขณะที่การใช้สารแขวนลอยของ *Streptomyces* ต้องอาศัยระยะเวลาให้แบคทีเรียที่เติมลงไปเจริญขึ้นก่อนแล้วจึงจะสามารถผลิตสารขึ้นส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้

Table 5 Growth and germination of the soaked rice seed with the culture filtrate of *Streptomyces* sp. SEF4, *Streptomyces* sp. SEF11, *Streptomyces* sp. SEF28 and *Streptomyces* sp. SEF37 (data=mean±SE)

Bacterial strains	IAA (mg/l)	Germination percentage (%)	Mean germinating time (days)	Shoot length (cm)	Root length (cm)
Distilled water	-	58.0±4.90a	3.2±0.57ab	3.2±0.16ab	3.3±0.26a
SEF4	12.37	72.0±6.11a	3.8±0.28a	3.5±1.18a	2.1±0.18b
SEF11	57.21	71.0±5.47a	2.7±0.06b	3.4±1.49a	2.2±0.12b
SEF28	12.37	65.0±6.54a	2.8±0.10b	2.7±0.17b	2.5±0.14b
SEFF37	35.44	64.0±6.36a	2.7±0.06b	2.9±0.13b	2.4±0.17b

Different lower-case letter denoted significant difference ($P<0.05$) between plant growth parameters in the same column.

ระดับกรดอินโดล-3-แอซิดิกที่ผลิตโดยแบคทีเรียทั้งสี่สายพันธุ์นี้อยู่ในระดับที่สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเมล็ดได้ ดังที่มีรายงานว่าเมล็ดยาสูบที่แช่ในสารละลายกรดอินโดล-3-แอซิดิก 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 10-100 มก./ลิตร ทำให้ระดับของกรดแอบไซซิกในเมล็ดลดลง และทำให้ระดับกรดจิบเบอเรลลินและกรดอินโดล-3-แอซิดิกภายในเมล็ดสูงขึ้น (Li *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตามรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้แบคทีเรียสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืช มีรายงานการใช้ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ทั้งสองรูปแบบ เช่น การใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces* CMU-H009 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกสามารถกระตุ้นการงอกและความยาวรากของข้าวโพด (*Zea mays*) และถั่วดำ (*Bruguiera parviflora*) (Khamna *et al.*, 2010) และ การใช้หัวเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. CIMAP-A₁ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก และไซโตไคน์โดยตรง สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *Pelargonium graveolens* L. โดยเพิ่มน้ำหนักสดได้ถึงร้อยละ 11.3 (Alam *et al.*, 2012) เนื่องจากงานวิจัยนี้ศึกษาการเจริญเติบโตในระยะต้นกล้าของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นเวลาเพียง 5 วัน ซึ่งอาจเป็นระยะเวลาที่ไม่เพียงพอที่จะให้เห็นผลชัดเจน แต่ก็มีแนวโน้มว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Streptomyces* ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง เนื่องจากแบคทีเรียทั้งสี่สายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ดีในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะ pH 9 และในสภาวะที่มีเกลือสูงถึงร้อยละ 2.55 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวขึ้นใช้สนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชที่ปลูกในสภาวะแวดล้อมซึ่งมีพิษหรือปริมาณเกลือในระดับที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของพืช โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีการแพร่กระจายของดินเค็มอยู่ทั่วไป (Sirawat and Kheoruenromne, 2006)

สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรีย *Streptomyces* sp. SEF11 และ *Streptomyces* sp. SEF28 สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกในสภาวะที่พิเศษเป็นต่างและยังคงความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิกในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูง การนำแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ไปใช้กระตุ้นการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวขาวดอกมะลิ 105 จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจากในการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. SEF11 และ *Streptomyces* sp. SEF28 ยังไม่สามารถกระตุ้นการงอกและการเจริญเติบโตของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ได้ดีไปกว่าการทดลองในชุดควบคุม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม สำหรับสถานที่ดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Abd-Alla, M.H., A. El-Sayed and A.-H.M. Rasmeey. 2013. Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil in Egypt. *Journal of Biology and Earth Sciences* 3: B182-B193.
- Ahmad, F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163: 178-181.

- Alam, M., S. Dharni, A. Khaliq, S.K. Srivastava, A. ad and M.K. Gupta. 2012. A promising strain of *Streptomyces* sp. with agricultural traits for growth promotion and disease management. **Indian J. Exp. Biol.** 50: 559-568.
- Calvelo Pereira, R.C., C. Monterroso and F. Macias. 2010. Phytotoxicity of hexachlorocyclohexane: effect on germination and early growth of different plant species. **Chemosphere**. 79: 326-333.
- Chuanren, D., W. Bochu, L. Wanqian, C. Jing, L. Jie and Z. Huan. 2004. Effect of chemical and physical factors to improve the germination rate of *Echinaceae angustifolia* seeds. **Colloids Surfaces B**. 37: 101-105.
- Gopalakrishnan, S., V. Srinivas, M.S. Vidya and A. Rathore. 2013. Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. **SpringerPlus** 2: 574.
- Gopalakrishnan, S., S. Vadlamudi, P. Bandikinda, A. Sathya, R. Vijayabharathi, O. Rupela, H. Kudapa, K. Katta and R.K. Varshney. 2014. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal Vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. **Microbiol. Res.** 169: 40-48.
- Kaneko, M., H. Itoh, M. Ueguchi-Tanaka, M. Ashikari and M. Matsuoka. 2002. The α -amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium. **Plant Physiol.** 128: 1264-1270.
- Khamna, S., A. Yokota, J.F. Peberdy and F. Lumyong. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. **EurAsia. J. BioSci.** 4: 23-32.
- Kukusamude, C. and S. Kongsri. 2018. Elemental and isotopic profiling of Thai jasmine rice (Khao Dawk Mali 105) for discrimination of geographical origins in Thung Kula Rong Hai area, Thailand. **Food Control**. 91: 357-364.
- Li, Z., J. Zhang, Y. Liu, J. Zhao, J. Fu, X. Ren and G. Wang. 2016. Exogenous auxin regulates multi-metabolic network and embryo development, controlling seed secondary dormancy and germination in *Nicotiana tabacum* L. **BMC Plant Biol.** 16: 41.
- Office of The National Economic and Social Development Board. 2017. **Gross Domestic Product, Chain Volume Measures: Q1/2017**. Bangkok: National Economic and Social development Board.

- Siriwat, S. and I. Kheoruenromne. 2006. Environmental condition of saline soils distributed in Sakon Nakhon Basin, Northeast Thailand. *In Proceedings of 44th Kasetsart University Annual Conference: Plants. 30 January – 2 Febuary, 2006.* Bangkok: Kasetsart University.
- Sreevidya, M., S. Gopalakrishnan, H. Kudapa and R.K. Varshney. 2016. Exploring plant growth-promotion *Actinomyces* from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. **Braz. J. Microbiol.** 47: 85-95.
- Susilowati, D.N., E.I. Riyanti, M. Setyowati and K. Mulya. 2002. Indole-3-acetic acid producing bacteria and its application on the growth of rice. **AIP Conference Proceedings 2002: 020016.**
- Tamreihao, K., D.S. Ningthoujama, S. Nimaichand, E.S. Singh, P. Reena, S.H. Singh and U. Nongthomb. 2016. Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. **Microbiol. Res.** 192: 260-270.
- Tanimoto, E. 2005. Regulation of root growth by plant hormones–roles for auxin and gibberellin. **Cri. Rev. Plant Sci.** 24: 249-265.
- Tsavkelova, E.A., S.Y. Klimova, T.A. Cherdyntseva and A.I. Netrusov. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochem. Microbiol.** 42: 117-126.
- Wang, Y., Y. Cui, G. Hu, X. Wang, H. Chen, Q. Shi, J. Xiang, Y. Zhang, D. Zhu and Y. Zhang. 2018. Reduced bioactive gibberellin content in rice seeds under low temperature leads to decreased sugar consumption and low seed germination rates. **Plant Physiol. Bioch.** 133: 1-10.