

การส่งเสริมการเจริญของข้าวโดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจน ที่แยกได้จากข้าวปลูกและข้าวป่า

ชนิกานต์ คุ่มนก

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

corresponding author e-mail: chanikarn@yahoo.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ประกอบด้วยการศึกษาการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนจากรากและลำต้นของข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวป่า *Oryzarufipogon* พบว่าได้ทั้งหมด 52 ไอโซเลต โดยแยกได้จากข้าวป่า 32 ไอโซเลต และข้าวปลูก 20 ไอโซเลต แบคทีเรียที่แยกได้เป็นแบคทีเรียในสกุล *Azospirillum* 34 ไอโซเลต, *Herbaspirillum* 8 ไอโซเลต และ *Pseudomonas* 12 ไอโซเลต แบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 52 ไอโซเลตมีอัตราการตรึงไนโตรเจนระหว่าง 0.72-138.13 นาโนโมลาร์ของเอทิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และมีการสร้างกรดอินโดลอะซีติก (IAA) อยู่ระหว่าง 25.22-67.91 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร คัดเลือกแบคทีเรีย เอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนที่มีอัตราการตรึงไนโตรเจนและสร้างกรดอินโดลอะซีติกสูง จำนวน 6 ไอโซเลต ทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในระยะแรกของการเจริญ พบว่าทุกไอโซเลต สามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ช่วงอายุ 30 วัน โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 ทำให้น้ำหนักแห้งของลำต้นและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดินมากที่สุด โดยมีค่าน้ำหนักแห้งของลำต้นเท่ากับ 1.69 กรัมต่อกระถางและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดินเท่ากับ 29.19 มิลลิกรัมต่อกระถาง ตามลำดับ รองลงมา คือ ไอโซเลต CMOR06 โดยมีค่าน้ำหนักแห้งของลำต้นเท่ากับ 1.58 กรัมต่อกระถาง และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดินเท่ากับ 27.93 มิลลิกรัมต่อกระถาง ตามลำดับ ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนทั้งสองไอโซเลตนี้ให้กับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในกระถางสภาพเรือนทดลอง พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 ทำให้ความสูงของ ลำต้นและจำนวนกอต่อต้นของข้าวมากที่สุด และมีค่า log number ของจำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนทั้งในส่วนรากและลำต้น อยู่ระหว่าง 4.81-4.85 และ 4.16-4.72 ตามลำดับ โดยพบจำนวนแบคทีเรีย ไอโซเลต CMOR15 มากกว่าไอโซเลต CMOR06 ในส่วนของรากมากกว่าลำต้น แบคทีเรีย ไอโซเลต CMOR15 และ CMOR06 ทำให้น้ำหนักแห้งของลำต้นและรากของข้าวที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตมากกว่าชุดควบคุม โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 9.36-15.43 และ 4.63-11.56 กรัม/กระถาง ตามลำดับ

คำสำคัญ: ข้าวป่า ข้าวปลูก แบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจน การส่งเสริมการเจริญของพืช

Rice Growth Promotion by Diazotroph Endophytic Bacteria; Isolated from Cultivated Rice and Wild Rice

Chanikarn Koomnok

Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University
corresponding author e-mail: chanikarnk@yahoo.com

Abstracts

This research described a study of rice growth promotion by diazotroph endophytic bacteria. It comprised an isolation of diazotroph endophytic bacteria from root and stem of cultivated rice cultivars; Khao Dawk Mali 105 and wild rice; *Oryza rufipogon*. The nitrogen fixing ability and Indole-acetic acid (IAA) production from these bacteria were investigated. It was found that there were 52 purified isolates of diazotroph bacteria obtained from wild rice 32 isolates and cultivated rice 20 isolates. *Azospirillum* was dominant with 34 isolates identified while 8 and 12, respectively was *Herbaspirillum* and *Pseudomonas*. The nitrogenase activity of these diazotroph endophytic bacteria were about 0.72-138.13 nmol.C₂H₂/mg protein/hr, and IAA production about 25.22-67.91 µmol/ml. Six high N₂ fixing and IAA production isolates were selected for evaluation of their effects on early growth of Khao Dawk Mali 105 in green house experiments. During 30 days after transplanting, all of diazotroph were found to increase shoot dry weight and N-uptake significantly which CMOR15 was the highest rice growth promotion followed by CMOR06. The rice which inoculated with CMOR15 was shoot dry weight about 1.69 gm/pot, and N-uptake about 29.19 mg/pot, respectively. While the rice inoculated with CMOR06 had shoot dry weight about 1.58 gm/pot, and N-uptake about 27.93 mg/pot, respectively. These two isolates were selected for future test for stimulation effect on Khao Dawk Mali 105 growth in green house experiments. It was found that the rice plants inoculated with CMOR15 were the tallest and significantly increased the number of tillers per plant. The log numbers of diazotroph in root and stem was about 4.81-4.85 and 4.16-4.72, respectively, while the population of CMOR15 were greater than CMOR06. The rice plants inoculated with diazotroph, CMOR15 and CMOR06 had the highest shoot and root dry weight of rice plants compared to the uninoculated control. There were shoot and root dry weight of rice about 9.36-15.43 and 4.63-11.56 g/pot, respectively.

Keywords: wild rice, rice, diazotroph endophytic bacteria plant growth promotion

บทนำ

ข้าวเป็นอาหารที่สำคัญของประชากรในกลุ่มประเทศอาเซียนและมากกว่า 90% เป็นข้าวที่ผลิตได้ในเอเชีย ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ข้าวเป็นพืชที่ต้องการธาตุไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตอย่างมาก (Sahrawat, 2000) จังหวัดพิษณุโลกมีพื้นที่ปลูกข้าวอยู่มากโดยเฉพาะในเขตชลประทาน ปัจจุบันการปลูกข้าวยังคงใช้ไนโตรเจนในรูปของปุ๋ยวิทยาศาสตร์ ซึ่งส่งผลให้ต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูงและสิ้นเปลืองรวมทั้งทำให้ดินเสื่อมคุณภาพและส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมด้านมลพิษ หากมีการหันมาใช้ประโยชน์จากการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพได้จะช่วยลดต้นทุนการผลิตและการรักษาความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตรวมทั้งคุณภาพของสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่ง

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจน (Endophytic diazotroph bacteria) ที่อาศัยในเนื้อเยื่อของพืชและสามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศโดยวิธีทางชีวภาพให้กับพืชอาศัยสามารถพบได้ทั้งในส่วนที่เป็นใบ ลำต้นและรากของพืชตระกูลหญ้า เช่น *Acetobacter diazotrophicus* ซึ่งแยกได้จากลำต้นและใบของอ้อย สามารถเพิ่มปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงโดยวิธีชีวภาพถึง 150 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อเฮกตาร์ต่อปี ในขณะที่แบคทีเรีย *Azoarcus* sp. ที่แยกได้จากรากของหญ้าคอลลาร์ (Kollar grass) ช่วยให้หญ้าซึ่งปลูกในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำได้น้ำหนักแห้งของหญ้าเพิ่มขึ้นถึง 20-40 ตันของหญ้าต่อเฮกตาร์ต่อปี (Boddey et al., 1995) สำหรับแบคทีเรีย *Herbaspirillum seropedicae* มีพืชเจ้าบ้านที่หลากหลายมากกว่าและแยกได้จากพืชตระกูลหญ้า เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง อ้อย และหญ้าอาหารสัตว์ มักพบแบคทีเรียเหล่านี้ที่บริเวณเนื้อเยื่อลำเลียงของราก ลำต้น และใบของกลุ่มพืชดังกล่าว Elbaltagy et al., (2001); Koomnok (2006) พบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ 4 ชนิด คือ *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* sp., *Beijerinckia* sp. และ *Pseudomonas* sp. จากราก ลำต้น และใบของ ข้าวป่า 3 ชนิด คือ *O. rufipogon* *O. granulate* และ *O. nivara*

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรึงไนโตรเจนได้ยังมีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ (James, 2002; Martinez et al., 2003; Gasser et al., 2011) ตัวอย่าง ได้แก่แบคทีเรียสกุล *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconobacter*, *Herbaspirillum* และ *Klebsiella* เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้ส่งเสริมการเจริญของพืชได้โดยช่วยให้พืชหลังฮอร์โมนพืชไปสู่พื้นผิวรากทำให้ช่วยเพิ่มการดูดซึมธาตุอาหาร (Okon and Labandera-Gonzalez, 1994; Yanni et al., 2001) หรือช่วยในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Bashan and de Bashan, 2002) การตอบสนองของพืชต่อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชนั้นซับซ้อน ซึ่งอาจเกิดจากกลไกการควบคุมหลายชนิดร่วมกันเพื่อให้มีการพัฒนาระบบรากให้สามารถดูดซับสารอาหารได้ดีขึ้น (Compant et al., 2010) แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Enterobacter* สามารถแยกได้จากพืชตระกูลหญ้า (El-Khawas and Adachi, 1999; Hoflich et al., 1994) การทดลองคลุกเชื้อ *Azospirillum* sp. ให้กับข้าวพบว่ารากฝอยและรากแขนงมีความยาวและความหนาแน่นมากขึ้น ซึ่งเป็นการช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการดูดซับอาหาร (Dubrovsky et al., 1994) อันเป็นผลจากการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืช เช่น Auxin Gibberellins และ Cytokinins โดยฮอร์โมนพืชในกลุ่ม Auxin คือ Indole acetic acid (IAA) มีบทบาททำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของรากพืชมากที่สุด (Beyeler et al., 1997)

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้และส่งเสริมการเจริญของข้าว และเพื่อทดสอบการส่งเสริมการเจริญในข้าวเพื่อเป็นทางเลือกใหม่สำหรับทดแทนการใช้ปุ๋ยวิทยาศาสตร์ในระบบการปลูกข้าวในนาคนต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ดี

1.1 แยกเชื้อและรวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวสายพันธุ์หอมมะลิ 105 และข้าวพันธุ์ป่า *O. rufipogon* โดยนำชิ้นส่วนของรากและลำต้นพืชที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกโดยการคัดเลือกแบบสุ่ม นำมาทำการฆ่าเชื้อพื้นผิวภายนอก แล้วนำไปวางบนจานอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน (Modified N-free medium: Koomnok, 2006) บ่มรากพืชไว้ 3-7 วัน คัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่เจริญด้านข้างของรากพืชบนจานอาหาร ทำให้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บในอาหารวุ้นเอียง (Slant)

1.2 วัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylene reduction assay (ARA method) และวัดความสามารถในการสร้างกรดอินโดลอะซีติก (Indole-3-acetic acid; IAA) ด้วยวิธี Colorimetrically spectrophotometry (Koomnok, 2006)

1.3 ทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนที่แยกได้โดยใช้หลักการของ Bergey's manual of determinative of bacteriology nine edition (Holt et al., 1994)

1.4 คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลตที่ตรึงไนโตรเจนได้มากกว่า 100 นาโนโมลของเอทธิลีน/มิลลิกรัมโปรตีน/ชั่วโมง และมีปริมาณ IAA สูงมากกว่า 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าว

2. ทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าว

2.1 ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอกของเมล็ดข้าวสายพันธุ์หอมมะลิ 105 ด้วยวิธี Triple surface sterile method (Koomnok, 2006) แล้วนำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อผิวภายนอกแล้วเพาะให้งอกใน water Agar (WA)

2.2 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกไว้จำนวน 6 ไอโซเลตในอาหาร Modified N-free medium จนมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร

2.3 ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนให้กับต้นกล้าของข้าวสายพันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 ที่งอกได้ 2 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) แล้วย้ายต้นกล้าลงในกระถางขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพาะเลี้ยงต้นกล้าเหล่านี้ในโรงเรือนทดลองเป็นเวลา 30 วัน รักษาให้อยู่ในสภาพน้ำท่วมขังด้วยการเติมน้ำกลั่น

2.4 เมื่อครบเวลา 30 วัน ทำการตัดต้นกล้าส่วนที่อยู่เหนือดินไปอบให้แห้งเพื่อชั่งน้ำหนักแห้งของส่วนลำต้น คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนที่ให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของลำต้น และปริมาณ N-uptake สูง จำนวน 2 ไอโซเลต

2.5 ทำการปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 2 ไอโซเลตที่คัดเลือกไว้ในข้อ 2.4 ให้กับต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 อายุ 2 วัน แล้วย้ายลงในกระถางที่มีดินปลูก 1 กิโลกรัม รักษาสภาพน้ำท่วมขังด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งเก็บเกี่ยวที่อายุ 75 วัน โดยทำการวัดความสูงจำนวนกอดต่อต้น

ความสมบูรณ์ของกอ ในวันที่ 30 45 60 และ 75 วันหลังย้ายปลูก เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ปลูกที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

2.6 เมื่ออายุครบ 75 วัน ทำการถอนต้นข้าวออกจากกระถางด้วยความระมัดระวัง ตัดส่วนลำต้นที่อยู่เหนือดินและส่วนรากออกจากกัน นำไปล้างดินออกและนำไปปั่นจำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบในส่วนรากและลำต้น รวมทั้งนำส่วนรากและลำต้นไปอบหาวน้ำหนักแห้ง เปรียบเทียบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าว

ผลการวิจัย

แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนจากส่วนรากและลำต้นของข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวป่า *O. rufipogon* ได้ทั้งหมด 52 ไอโซเลต โดยแยกได้จากรากข้าวป่า 21 ไอโซเลต และรากข้าวปลูก 13 ไอโซเลต ส่วนของลำต้นของข้าวป่า 11 ไอโซเลต และข้าวปลูก 7 ไอโซเลต ตามลำดับ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ เช่น การใช้ น้ำตาล การสร้างกรด การสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ เพคตินเนส แล้วนำไปจัดจำแนกโดยใช้หลักการของ Bergey's manual of determinative of bacteriology nine edition สามารถจำแนกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ออกเป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 กลุ่มของแบคทีเรีย คุณสมบัติและสกุลของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากราก และลำต้นของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวป่า *O. rufipogon*

กลุ่มที่	แบคทีเรียเอนโดไฟท์				คุณลักษณะของแบคทีเรีย
	จำนวน	ไอโซเลต			
1	34 (65%)	PSKS04	CMOS06	CMOR15	<i>Azospirillum</i> : โคโลนีมีขนาดใหญ่สีขาวและเป็นเมือก เมื่อเจริญบนอาหาร BSM มีโคโลนีสีชมพู แกรมลบ เซลล์รูปแท่งโค้ง เคลื่อนที่ได้ การทดสอบคอกเคส และ ออกซิเดส ให้ผลบวก
		PSKS05	CMOS07	CMOR16	
		PSKS06	CMOS08	CMOR17	
		PSKS07	CMOS09	CMOR18	
		PSKR06	CMOS10	CMOR19	
		PSKR07	CMOS11	CMOR20	
		PSKR08	CMOR04	CMOR21	
		PSKR09	CMOR06		
		PSKR10	CMOR09		
		PSKR11	CMOR12		
		PSKR12	CMOR13		
		PSKR13	CMOR14		
2	8 (15%)	PSKS01	CMOS01	CMOR01	<i>Herbaspirillum</i> : โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาวและเป็นเมือก เมื่อเจริญบนอาหาร BSM มีโคโลนีสีน้ำตาล แกรมลบ เซลล์รูปแท่งโค้งเคลื่อนที่ได้ การทดสอบคอกเคสและออกซิเดส บวก
		PSKR01	CMOS02	CMOR02	
		PSKR02		CMOR03	
		PSKR01			
		PSKR02			
3	10 (20%)	PSKS02	CMOS03	CMOR05	<i>Pseudomonas</i> : โคโลนีมีขนาดเล็กสีขาวถึงเหลือง เซลล์รูปแท่งขนาดเล็ก ทดสอบออกซิเดสผลบวก แต่ไม่หมัก น้ำตาล
		PSKS03	CMOS04	CMOR07	
		PSKR03	CMOS05	CMOR08	
		PSKR04		CMOR11	
		PSKR05			

PSKS: แยกได้จาก *O. sativa* พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ส่วนลำต้น CMOS: แยกได้จาก *O. rufipogon* ส่วนลำต้น

PSKR: แยกได้จาก *O. sativa* พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ส่วนราก CMOR: แยกได้จาก *O. rufipogon* ส่วนราก

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมด 52 ไอโซเลต มีอัตราการตรึงไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 0.72-138.13 นาโนโมลาร์ของเอทิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ตรึงไนโตรเจนได้ต่ำและปานกลาง มีเพียง 8 ไอโซเลต หรือร้อยละ 15 เท่านั้นที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนได้สูง

มากกว่า 100 นาโนโมลาร์ของเอทิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และศักยภาพการสร้าง IAA ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวปลูกอยู่ระหว่าง 9.54-42.26 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ในขณะที่แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวปามีอัตราการสร้าง IAA ตั้งแต่ 25.22-67.91 ไมโครโมลาร์/มิลลิลิตร แบคทีเรียเอนโดไฟท์จำนวน 41 ไอโซเลต เป็นกลุ่มที่สร้าง IAA ในระดับต่ำถึงปานกลาง มีจำนวน 11 ไอโซเลตที่สร้าง IAA มากกว่า 50 นาโนโมลาร์/มิลลิลิตร แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและสร้าง IAA ได้สูงเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากรากของข้าวป่า *O. rufipogon*

คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนได้มากกว่า 100 นาโนโมลาร์ของเอทิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิต IAA สูงกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ 6 ไอโซเลต ซึ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวป่า *O. rufipogon* ดังตารางที่ 2

ผลการปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญในระยะแรกของข้าว

ผลจากการปลูกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนจำนวน 6 ไอโซเลตที่คัดเลือกไว้ให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 แล้วปลูกในสภาพน้ำท่วมขังภายในโรงเรือนทดลองเป็นเวลา 30 วัน พบว่าน้ำหนักแห้งของส่วนลำต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนทุกไอโซเลตมีค่ามากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ โดยที่น้ำหนักแห้งของส่วนลำต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR015 มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด คือ มีค่าเท่ากับ 1.69 กรัมต่อกระถาง รองลงมาได้แก่ต้นข้าวที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR06 มีค่าเท่ากับ 1.63 กรัมต่อกระถาง และแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR09 และ CMOR04 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมมีน้ำหนักแห้งของส่วนลำต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 น้อยที่สุด คือ มีค่าเท่ากับ 1.32 กรัมต่อกระถาง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 อัตราการตรึงไนโตรเจน อัตราการสร้าง IAA และสกุลของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนและสร้างกรดอินโดลอะซีติกได้สูง

แบคทีเรีย	แบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลต	อัตราการตรึงไนโตรเจน [*] (nmol C ₂ H ₄ /mg protein/hr)	อัตราสร้าง IAA [*] (µg/ml)
<i>Herbaspirillum</i> sp.	CMOS08	127.57±5.20	55.37 ±2.03
<i>Azospirillum</i> sp.	CMOR01	109.23 ±6.17	57.49 ±1.65
<i>Azospirillum</i> sp.	CMOR04	131.27 ±1.87	58.61 ±2.08
<i>Azospirillum</i> sp.	CMOR06	120.55 ±0.74	67.91 ±2.39
<i>Azospirillum</i> sp.	CMOR09	127.82 ±6.43	54.22 ±4.11
<i>Azospirillum</i> sp.	CMOR15	138.13 ±2.45	61.43 ±1.72

* ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญในระยะแรกของข้าว

ตารางที่ 3 น้ำหนักแห้งส่วนของลำต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อายุ 30 วัน และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน (N-uptake)

กรรมวิธีที่	ปลูกถ่ายเชื้อ	น้ำหนักแห้งส่วนของลำต้น* (กรัม/กระถาง)**	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน (N-uptake)* (มิลลิกรัม/กระถาง)**
1	ชุดควบคุม (ไม่ปลูกถ่ายเชื้อ)	1.32 ± 0.03^e	21.35 ± 0.60^e
2	CMOS08	1.51 ± 0.02^d	25.17 ± 0.63^d
3	CMOR01	1.53 ± 0.03^d	25.86 ± 0.69^{cd}
4	CMOR04	1.57 ± 0.02^c	26.53 ± 0.33^c
5	CMOR06	1.63 ± 0.02^b	27.93 ± 0.67^b
6	CMOR09	1.58 ± 0.01^c	26.18 ± 0.56^{cd}
7	CMOR15	1.69 ± 0.02^a	29.18 ± 0.65^a

* ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

** ตัวอักษรในคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ โดย Duncan's Multiple Range Test ($P=0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน (N-uptake) พบว่าส่วนลำต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 มีค่ามากที่สุด รองลงมาได้แก่ส่วนลำต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR06 ในขณะที่ส่วนลำต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR01 และ CMOR09 มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ คัดเลือกแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลต คือ CMOR15 และ CMOR06 เพื่อทำการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาพเรือนทดลอง

ผลการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในสภาพเรือนทดลอง

ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรึงไนโตรเจน ไอโซเลต CMOR15 มีความสูงของลำต้นมากกว่าชุดควบคุมตั้งแต่วันที่ 30 ของการย้ายปลูกไปจนถึงวันที่ 75 ของการย้ายปลูกอย่างมีนัยสำคัญ และมีความสูงของลำต้นมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญในต้นข้าวที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR06 ตั้งแต่วันที่ 45 60 และ 75 วันหลังย้ายปลูกตามลำดับ (ยกเว้นที่อายุ 30 วัน หลังย้ายปลูก)

ในส่วนของจำนวนกอต่อต้น ที่ช่วงอายุ 30 วันหลังย้ายปลูก พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในต้นข้าวที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR06, CMOR1 และชุดควบคุม ในขณะที่ช่วงอายุตั้งแต่ 45 60 และ 75 วันหลังย้ายปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกถ่ายด้วยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนทั้งสองไอโซเลตมีจำนวนกอต่อต้นไม่แตกต่างกัน แต่มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ความสูงของข้าว และจำนวนกอต่อต้น ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจน เมื่ออายุ 30 45 60 และ 75 วันหลังย้ายปลูก

	ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่ออายุ**			
	30 วัน	45 วัน	60 วัน	75 วัน
ความสูงของต้นข้าว (ซม.)*				
control	56.2 ± 0.6 ^b	68.5 ± 0.6 ^c	79.4 ± 0.6 ^c	82.7 ± 0.7 ^c
CMOR06	57.1 ± 0.2 ^{ab}	74.9 ± 0.6 ^b	81.9 ± 0.6 ^b	88.4 ± 0.9 ^b
CMOR15	57.7 ± 0.6 ^a	76.3 ± 0.5 ^a	83.3 ± 0.5 ^a	91.9 ± 0.8 ^a
จำนวนกอต่อต้น*				
control	4.0 ± 0.0 ^{ns}	6.0 ± 0.0 ^b	8.3 ± 0.6 ^b	8.3 ± 0.6 ^b
CMOR06	4.3 ± 0.6 ^{ns}	7.3 ± 0.6 ^a	10.0 ± 0.6 ^a	10.0 ± 0.6 ^a
CMOR15	4.3 ± 0.6 ^{ns}	7.7 ± 0.6 ^a	10.7 ± 0.6 ^a	10.7 ± 0.6 ^a

* ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

** ตัวอักษรในคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ โดย Duncan's Multiple Range Test ($P=0.05$)

ns ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ

สำหรับน้ำหนักแห้งในส่วนของลำต้นและรากของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่ออายุ 75 วันพบว่าข้าวที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนทั้งสองสายพันธุ์ให้น้ำหนักแห้งของลำต้นและรากมากกว่าชุดควบคุม โดยข้าวที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CMOR15 ให้น้ำหนักมากที่สุดในส่วนจำนวนแบคทีเรียที่พบในลำต้นและรากของข้าว ให้ผลการวิจัยในทำนองเดียวกันคือ พบจำนวนแบคทีเรียของไอโซเลต CMOR15 มากที่สุด โดยพบในส่วนของรากมากกว่าลำต้น (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 จำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบในส่วนรากและลำต้น น้ำหนักแห้ง (กรัม) ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่ออายุ 75 วัน

	น้ำหนักแห้ง (กรัม)*		จำนวน log number ของจุลินทรีย์*	
	ลำต้น***	ราก***	ลำต้น***	ราก***
Control**	9.35 ± 0.08 ^c	4.63 ± 0.09 ^c	-	-
CMOR06	14.87 ± 0.21 ^b	11.25 ± 0.15 ^{ab}	4.41 ± 0.07 ^b	4.87 ± 0.27 ^b
CMOR15	15.41 ± 0.35 ^a	11.20 ± 0.28 ^{ab}	4.72 ± 0.10 ^a	5.45 ± 0.49 ^a

* ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ** ชุดควบคุม ไม่ได้นับจำนวนจุลินทรีย์

*** ตัวอักษรในคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ โดย Duncan's Multiple Range Test ($P=0.05$)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจน แยกได้จากส่วนของรากของทั้งข้าวปลูกและข้าวป่ามากกว่าส่วนของลำต้นโดยพบถึงร้อยละ 66 ของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด เช่นเดียวกับ Zinniel et al. (2002) ที่ระบุว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากข้าว พบมากที่สุดในส่วนที่เป็นรากและค่อย ๆ ลดลงจากส่วนที่เป็นลำต้นและใบ Prakamhang et al. (2009) พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์พบในรากของข้าวขาวดอกมะลิ 105 มากกว่าส่วนของลำต้นและใบตามลำดับ การพบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในส่วนต่างๆ ของพืชแตกต่างกันนั้น Boddey and Dobereiner (1995) คาดว่าเป็นเพราะว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์จะแสดงศักยภาพในการ ตรึงไนโตรเจนภายในพืชอาศัยในสภาวะที่มีปริมาณ O_2

ต่ำกว่าบริเวณผิวภายนอกบรอกพืช แบคทีเรียเหล่านั้นส่วนใหญ่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีถึงปานกลาง มีพวกที่ตรึงไนโตรเจนได้สูงเพียงร้อยละ 15 โดยเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวป่า *O. rufipogon* เช่นเดียวกับ Koomnok et al. (2007) ที่แยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าวป่า *O. rufipogon* และมีกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้สูงเพียงร้อยละ 11 และ Rodrigues et al. (2008) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากรากมากกว่าลำต้นของข้าว และร้อยละ 74 ของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดอยู่ในสกุล *Azospirillum* และมีเพียงร้อยละ 9 เท่านั้นที่มีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนสูง

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จัดอยู่ในสกุล *Azospirillum* *Pseudomonas* และ *Herbaspirillum* มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและสร้าง IAA ได้สูง *Azospirillum* เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบได้ในพืชอาศัยหลายชนิดโดยเฉพาะข้าวป่าและข้าวปลูกมีศักยภาพ ในการเป็นจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญของพืชเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Koomnok et al. (2007) ที่พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ปลูกและข้าวพันธุ์ป่าในประเทศไทยเป็นแบคทีเรียในสกุล *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Beijerinckia* และ *Pseudomonas* และ *Azospirillum* sp. CM15 และ *Azospirillum* sp. CM44 เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของข้าวขาวดอกมะลิ 105 *Azospirillum* เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่เจริญแบบอิสระ แต่สามารถเข้าสู่พืชอาศัยและสามารถอยู่ร่วมกับพืชอาศัยแบบเอนโดไฟท์ได้บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ โดย *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. irekense*, *A. halopraeferens* และ *A. amazonense* แยกได้จากข้าวปลูกและข้าวป่า (Mano and Morisaki, 2008) สำหรับ *Herbaspirillum* เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวปลูกและข้าวป่าที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชด้วยการตรึงไนโตรเจนและการสร้าง IAA (Elbeltagy et al., 2001) ในส่วนของ *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากพืชหลายชนิด และสามารถตรึงไนโตรเจนได้ (Xie et al., 2006) และส่งเสริมการเจริญให้กับต้นข้าวที่ถูกปลูกถ่ายเชื้อนี้ในประเทศจีน (Desnoues et al., 2003; Hallmann et al., 1997)

การปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนสกุล *Herbaspirillum* และ *Azospirillum* ที่มีอัตราการตรึงไนโตรเจนและอัตราการสร้าง IAA ได้สูง ทั้ง 6 ไอโซเลตให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ทำการเพาะเลี้ยงในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 250 กรัมในสภาพเรือนทดลอง ในช่วงแรกของการเจริญเติบโต แล้วพบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนทุกไอโซเลตส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวสูงกว่าชุดควบคุม โดยที่น้ำหนักแห้งส่วนลำต้นและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดินของมีผลในทำนองเดียวกัน คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลต CMOR15 มีค่าสูงสุด มีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงสุด ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลต CMOR06 สามารถสร้าง IAA ได้สูงที่สุด โดยแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของข้าวในระยะแรกของการเจริญได้ดีคือแบคทีเรียในสกุล *Azospirillum* สอดคล้องกับ Koomnok (2006) ที่รายงานว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ถูกปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน มีจำนวนน้ำหนักแห้งของลำต้นเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุม รวมทั้งปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน โดยที่แบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนที่ให้ผลสูง 5 อันดับ จากทั้งหมด 15 ไอโซเลต คือ *Azospirillum* CM15, *Beijerinckia* CM12, *Azospirillum* CM23, *Azospirillum* CM44 และ *Beijerinckia* CM35 ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการสร้าง IAA ได้สูงเช่นเดียวกัน ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของข้าวได้จากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและการสร้างฮอร์โมนที่สำคัญในการเจริญเติบโต เช่น IAA (Doni et al., 2013; Costacurta et al., 1998)

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mia et al. (2012) ที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (PGPR) 4 สายพันธุ์ให้กับข้าวแล้วพบว่าเร่งการงอกของกล้าข้าวการเจริญของ กล้าข้าว และการเจริญของรากข้าว นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Ashrafuzzaman et al. (2009) ที่พบว่าการปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช ซึ่งแยกได้จากดิน Mymensingh สามารถส่งเสริมการเจริญของข้าว โดยทุกไอโซเลตจะทำให้ความสูงของลำต้น ความยาวของราก และน้ำหนักแห้งทั้งในส่วนรากและลำต้นเพิ่มขึ้น

ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนในทุกช่วงอายุตั้งแต่ อายุ 30 วันจนถึง 75 วันหลังย้ายปลูกให้ความสูงของลำต้นมากกว่าชุดควบคุม โดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลต CMOR15 ส่งเสริมให้ส่วนของลำต้นข้าวสูงกว่าไอโซเลต CMOR06 แต่เมื่อพิจารณาถึงจำนวนกอดต่อดันแล้วแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนทั้งสองไอโซเลตส่งเสริมให้มีจำนวนกอดต่อดันของข้าวไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้จำนวนกอดต่อดันเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตของข้าวในที่สุด (Gunarto et al., 1999; Koomnok, 2006) การส่งเสริมการเจริญของข้าวมีความสัมพันธ์กับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในเนื้อเยื่อพืช โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 มีจำนวนมากกว่าไอโซเลต CMOR06 และพบว่าในส่วนของรากมีจำนวนแบคทีเรียมากกว่าส่วนของลำต้น จำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนในข้าวนี้จะสอดคล้องกับน้ำหนักแห้งของรากและลำต้นที่ช่วงอายุ 75 วัน โดยข้าวที่ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 จะมีค่ามากกว่าการปลูกถ่ายด้วยไอโซเลต CMOR06 แม้ว่าจะไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ

งานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่แยกได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวป่า *O. rufipogon* มีแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและสร้าง IAA สูง ที่ส่งเสริมการเจริญของข้าวในระยะแรกของการเจริญโดยมีน้ำหนักแห้งและปริมาณไนโตรเจนที่สะสมในส่วนเหนือดินสูงจำนวน 2 ไอโซเลต คือ CMOR15 และ CMOR06 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในสกุล *Azospirillum* โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 ส่งเสริมการเจริญของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยทำให้ความสูงของลำต้น และจำนวนกอดต่อดันมากกว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR06 และชุดควบคุมที่ทุกช่วงอายุตั้งแต่ 30 วัน จนถึง 75 วัน หลังย้ายปลูก รวมทั้งน้ำหนักแห้งของลำต้นและรากที่ช่วงอายุ 75 วันหลังย้ายปลูก โดยพบจำนวนแบคทีเรียในรากมากกว่าลำต้น ทำให้เชื่อได้ว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ตรึงไนโตรเจนไอโซเลต CMOR15 น่าจะเป็นแบคทีเรียที่เหมาะสมในการเป็นจุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญของข้าว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

เอกสารอ้างอิง

- Ashrafuzzman, M., Hossen, F.A., Ismail, M.R., Hoque, M.A., Islam, M.Z., Shahidullah, S.M., & Meon, S. (2009). Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8, 1247-1252.
- Bashan, Y., & de Bashan, L.E. (2002). Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 2637-2643.
- Beyeler, M., Michaux, P., Keel, C., & Haas, D. (1997). Effect of enhanced production of indole-3-acetic acid by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO on plant

- growth. In: Ogoshi, A., Kobayashi, K., Homma, Y., Kodama, F., Kondo, N., Akino, S. (eds). (1997). Proceedings of the Fourth International Work-shop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Sapporo, Japan, October 18-22. Sapporo University. pp, 310-312.
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants. Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, 42, 669-678.
- Costacurta, A., Mazzafera, P., & Rosato, Y.B. (1998). Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri is increased in the presence of plant leaf extracts. **FEMS Microbiol Lett**, 159, 215–220.
- Desnoues, N., Lin, M., Guo, X., Ma, L., Carreño-Lopez, R., & Elmerich, C. (2003). Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. **Microbiology**, 149, 2251–2262.
- Doni, F., Al-Shorgani, N.K.N., Tibin, E.M.M., Abuelhassan, N.N., Isahak, A., Zain, C.R.CH., & Yusoff, W.M.W. (2013). Microbial involvement in growth of paddy. **Curr. Research Journal of Biological Sciences**, 5(6), 285-290.
- Dubrovsky, J.G., Puente, M.E., & Bashan, Y. (1994). *Arabidopsis thaliana* as a model system for the study of the effect of inoculation by *Azospirillum brasilens* Sp-245 on root hair growth. **Soil Biology and Biochemistry**, 26, 1657-1664.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H., & Minamisawa, K., (2001). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice. **American Society for Microbiology**, 67, 5285-5293.
- El-Khawas, H.M. & Adachi, K. (1999). Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, 28, 377-381.
- Gasser, I., Cardinale, M., Muller, H., Heller, S., Eberl, L., Lindenkamp, N., Kaddor, C., Steinbuchel, A., & Berg, G. (2011). Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. **Plant and Soil**, 347, 125-136.
- Gunarto, L., Adachi, K., & Senboku, T. (1999). Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. from a subtropical island, and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. **Biology and Fertility of Soils**, 28, 129-135.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. & Kloepper, J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43, 895-914.
- Hoflich, G., Wiehe, W., & Kuhn, G. (1994). Plant growth stimulation with symbiotic and associative rhizosphere microorganism. **Experientia**, 50 (10), 879-905.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J.T., & Williams, S.T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9th edition. Williams and Wilkins, Baltimore.
- James, E.K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W.L., Reddy, P.M., Pietro, P.M., Olivares, F.L., & Ladha, J.K. (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 15 (9), 894-906.
- Koomnok, C. (2006). **Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand**. Ph.D. Thesis. Graduated School, Chiang Mai University. Chiang Mai Thailand.
- Koomnok, C., Teamroong, N., Rerksem, B., & Lumyong, S. (2007). Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. **Science Asia**, 33, 429-435.

- Mano, H., & Morisaki, H. (2008). Endophytic bacteria in the rice plants. **Microbes and Environments**, 23, 109-117.
- Martinez, L., Caballero-Mellado, J., Orozco, J., & Martinez-Romero, J. (2003). Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). **Plant Soil**, 257(1), 35-47.
- Mia, M.A.B., Shamsuddin, Z.H., & Mahmood, M. (2012). Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice. **African Journal of Biotechnology**, 11(16), 3758-3765.
- Okon, Y., & Labandera-Gonzalez, C.A. (1994). Agronomic application of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, 26, 1591-1601.
- Prakamhang, J., Minamisawa, K., Teamtaisong N. & Teaumroong, N. (2009). The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology Journal**, 42, 141-149.
- Rodrigues, E.P., Rodrigues, L.S., Oliveira, A.L.M., Baldani, V.L.D., Teixeira, K.R.S., Urquiaga, S. & Reis, V.M. (2008). *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Soil**, 302, 249-261.
- Sahrawat, K.L. 2000. Macro and micronutrients removed by upland and lowland rice cultivars in West Africa. **Commun Soil Sci Plant Anal**. 31, 717-723.
- Xie, G.H., Cui, Z., Yu, J., Yan, J., Hai, W. & Steinberger, Y. (2006). Identification of nifgenes in N₂-fixing bacterial strains isolated from rice fields along the Yangtze River Plain. **Journal of Basic Microbiology**, 46, 56-63.
- Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Abd El-Fattah, F.K., Squartini, A., Corich V., Giacomini A., De Bruijn. F., Rademaker, J., Maya-Flores J., & Ostrom, P. (2001). The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifoli* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, 28, 845-870.
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta R.G., & Vidaver, A.K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, 68, 2198- 2208.