การส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวดอกมะลิ 105 โดยแบคทีเรีย ที่ปลูกภายใต้สภาวะความเค็ม

Promoting rice seedling Khao Dawk Mali 105 growth by *Pseudomonas putida* grown under saline condition

จิราวรรณ สิทธิสวนจิก[1], ทิราภรณ์ กนกฉันท์[1], เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์[2*], จันทรา อินทนนท์[3]
Jirawan Sitisuanjik[1], Tiraporn kanokchan[1], Saethawat Chamsart[2*], Chantra Indananda[3]

Received: 22 July 2020 ; Revised: 13 August 2020 ; Accepted: 21 September 2020

บทคัดย่อ

ดินเค็มเป็นปัญหาสำคัญในการปลูกข้าว ความเค็มของดินส่งผลให้พืชชะงักการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชลดลง กลยุทธ์หนึ่งที่ช่วยพืชให้สามารถทนทานต่อสภาวะความเค็มของดินได้คือ การใช้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPR) การศึกษาครั้งนี้จึงนำแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 มาทดสอบความสามารถสร้างสารไซเดอโรฟอร์ ฮอร์โมนพืช IAA และเอนไซม์ ACC deaminase (ACCD) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 200-1,000 มิลลิโมลาร์ และศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบเติบโตของต้นข้าว (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) ผลทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารไซเดอโรฟอร์ ฮอร์โมนพืช IAA และเอนไซม์ ACCD ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ได้ สามารถทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ที่ความเข้มข้น 5% (w/v) และพบว่าแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวได้ โดยมีความยาวราก ความยาวลำต้น น้ำหนักสดลำต้น และน้ำหนักแห้งลำต้นเพิ่มขึ้นดีกว่าต้นข้าวที่ไม่ได้รับเชื้อ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีคุณสมบัติเป็น PGPR ที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวในสภาวะดินเค็มได้

คำสำคัญ: แบคทีเรียซูโดโมแนส พูทิด้า ไซเดอโรฟอร์ ฮอร์โมนพืช IAA เอนไซม์ ACCD สภาวะความเค็ม

Abstract

Soil salinity is a serious problem in rice cultivation causing plants to stop growing and resulting in reducing crop yields. One of the strategies to enable plants to tolerate saline soils is to use plant growth-promoting bacteria (PGPR). In this study, *Pseudomonas putida* ATCC 17484 was used to test the ability to produce siderophore, indole-3-acetic acid (IAA) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD), in the broth media supplemented with 200-1,000 mM NaCl solution, and to evaluate the ability to promote the growth of rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). The results showed that the bacteria produced siderophore, IAA and ACCD in the presence of 200-1000 mM of NaCl solution, under 5% (w/v) NaCl. It was found that *P. putida* ATCC 17484 could promote the growth of rice seedlings. The root length, shoot length, shoot fresh weight and shoot dry weight were higher than those of rice seedlings grown without bacteria. This study shows that this bacterium is a PGPR and can promote the growth of rice seedling in saline soil conditions.

Keywords: *Pseudomonas putida*, Siderophores, Indole-3-acetic acid, ACC deaminase, Saline condition

---

[1] นิสิตปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[3] อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[1] Master's Degree Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University
[2] Assistant professor, Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University
[3] Lecturer, Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University
* Corresponding Author: saethawa@buu.ac.th

บทนำ

ปัญหาความเค็มของดิน เนื่องจากปริมาณเกลือในดินสูงเป็นหนึ่งปัจจัยความเครียดที่สำคัญสำหรับพืช (Yan *et al*., 201) เกลือในดินทำให้เกิดความดันออสโมติก ส่งผลให้การดูดซึมน้ำสารอาหารของรากพืชลดลง และพืชที่ปลูกในพื้นที่ดินเค็มลำต้นจะมีลักษณะแคระแกร็น ส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตพืชลดลง (Paul & Lade, 2014 ; Patil, 2015) นอกจากนี้การใช้สารเคมีหรือปุ๋ยเคมีทำการเกษตรสะสมเป็นระยะเวลายาวนานยังส่งผลต่อสภาพแวดล้อมและความอุดมสมบูรณ์ของดินลดลง (Rütting *et al*., 2018) การแก้ปัญหาดินเค็มนั้นอาจใช้วิธีการพันธุวิศวกรรมสร้างพืชที่ต้านทานต่อความเครียดพืชได้ (Honma & Shimomura, 1978 ; Vaishnav *et al*., 2016) เช่นรายงานวิจัยของ (Grover *et al*., 2003) พัฒนายีนที่ทนต่อความเครียดในพืชต้นแบบเช่น ยาสูบ, ต้นอะราบิดอฟซิส (*Arabidopsis*) และข้าว ซึ่งวิธีทางพันธุวิศวกรรมนี้อาจใช้ระยะเวลานานและมีต้นทุนสูง ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยอาศัยแบคทีเรียที่มีชีวิตอิสระในดินและบริเวณรอบรากพืช Plant Growth-promoting Rhizobacteria (PGPR) ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถปรับตัวและเจริญเติบโตรอบรากพืชได้อย่างรวดเร็ว และช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชผ่านกลไกทางตรงและทางอ้อมหลายอย่าง (Kloepper & Schroth, 1978 ; Kloepper, 1993 ; Ahemad & Kibret, 2014 ; Goswami *et al*., 2016) โดยการสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) เช่น ฮอร์โมนพืช IAA (indole-3-acetic acid), จิบเบอเรลลิน (gibberellins) และไซโตไคนิน (cytokinins) (Patten & Glick, 2002 ; Kang *et al*., 2014) ช่วยลดระดับเอทิลีนในพืชโดยการย่อยสลายเอนไซม์ 1-aminocyclo-propane-1-carboxylate (ACC) deaminase (Han *et al*., 2015 ; Wang *et al*., 2018) ละลายฟอสเฟต (Srivastava & Srivastava, 2020) ช่วยดูดซับละลายสารอาหารและการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (Richardson *et al*., 2009) สร้างไซเดอโรฟอร์ (siderophore) เพื่อจับอิออนของเหล็กในสิ่งแวดล้อม (Haas & Défago, 2005 ; Neal & Ton, 2013) สามารถผลิตยาปฏิชีวนะหรือสารต้านเชื้อราภายนอกเซลล์เช่น กลูแคเนส, ไคติเนส, ซาลิไซลิก, แอซิด และไซยาไนด์ (Bakker *et al*., 2013 ; Kamou *et al*., 2015)

PGPR ที่มีการศึกษาแล้วว่าสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้แก่สกุล *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* และ *Serratia* (Glick, 1995; Jones *et al*., 2007; Barea, 2015) และหนึ่งสายพันธุ์ที่โดดเด่นคือ *Pseudomonas putida* ซึ่งเป็น Rhizobacterium ที่สามารถใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทางการเกษตร (Hassan *et al*., 2011) มีรายงานว่าแบคทีเรีย *P. putida* สายพันธุ์ TSAU1 สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA และส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชได้ (Hernández-Montiel *et al*., 2017) เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Egamberdieva *et al* (2009) พบว่า *P. putida* สร้างฮอร์โมนพืช IAA และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าวสาลีในสภาวะความเค็มได้

ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกตรวจสอบแบคทีเรีย PGPR ที่มีคุณสมบัติในการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและช่วยพืชทนทานต่อสภาวะความเค็มได้

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ เชื้อแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 (ATCC: The American Type Culture Collection) ถูกทำให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็งสูตร Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting; PGP) ทดสอบการสร้างสารไซเดอโรฟอร์ตามวิธีการของ Rungin *et al* (2012) นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร NA (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร) ไปวางในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร Chrome azurol S (CAS) (Schwyn & Neiland, 1987) และเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ (ทำ 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เชื้อแบคทีเรียที่สร้างไซเดอรโรฟอร์ได้จะปรากฏฮาโลโซนรอบ ๆ โคโลนีเป็นสีส้ม จากนั้นทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ในอาหารเหลวสูตร Yeast extract-Dextrose (YD) ที่เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ ตามวิธีการของ Sadeghi *et al* (2012) บ่มบนเครื่องเขย่าตลอดเวลาที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียสในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บสารละลายส่วนใสไปทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ด้วยสารละลาย Salkowski reagent ตามวิธีการของ Ahmad *et al* (2008) จากนั้นวัดการเจริญของเชื้อ โดยการหาน้ำหนักแห้ง ทดสอบการสร้างเอนไซม์ ACCD ในอาหารที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียว (Honma & Shimomur, 1978) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร Minimal medium (Hopwoo, 1967) Minimal medium ที่เติม 0.1% $(NH_4)_2SO_4$ และ Minimal medium ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์ (ทำ 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เชื้อที่สามารถเจริญได้ในอาหาร Minimal medium ที่เติม ACC แสดงว่ามีการสร้างเอนไซม์ ACCD ตามวิธีการของ El-Tarabil (2008) จากนั้นทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD ตามวิธีการของ Jaemsaeng *et al* (2018)

นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลวสูตร YD มาล้างเซลล์ด้วย 0.9% Normal Saline และดูดเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium ที่เติม ACC 0.3 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บสารละลายส่วนใสและย้ายใส่หลอดทดลองใหม่ แล้วจึงเติมสารละลาย 2,4-Dinitro-phenylhydrazine และวัดปริมาณการสร้างเอนไซม์ ACCD ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร

3. ทดสอบความสามารถทนเค็ม 0-7% (w/v) ด้วยการนำเชื้อแบคทีเรียไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YD ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1-7% (w/v) (ทำ 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

4. การศึกษากิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าว (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) ทำการฆ่าเชื้อบนผิวเมล็ดข้าวด้วย 70% เอทานอล เป็นเวลา 5 นาที และ 1% โซเดียมไฮเปอคลอไรด์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างให้สะอาดอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และแช่เมล็ดในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเมล็ดมาคลุกกับเชื้อ (10^6 CFU/ml) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตามวิธีของ Rungin *et al*. (2012) จากนั้นนำไปทดสอบอัตราการงอกเมล็ด ซึ่งเมล็ดที่ไม่ได้รับเชื้อเป็นชุดควบคุม โดยนำเมล็ดมาเรียงในเพลทที่มีกระดาษเยื่อและเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองชุดละ 30 เมล็ด (ทำ 5 ซ้ำ) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 3 วันและอีก 4 วันในที่มีแสงตามวิธีของ Ramadoss *et al*. (2013) สำหรับกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวในสภาวะโรงเรือนจะคัดเลือกต้นข้าวที่มีความแข็งแรงอายุ 1 สัปดาห์มาทำการตัดปลายรากด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วจึงย้ายต้นข้าวที่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับเชื้อไปปลูกในกระถางที่มีดินและเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์ โดยแต่ละชุดการทดลองถูกนำมาเก็บรักษาไว้ภายใต้สภาวะโรงเรือนและรดน้ำวันละ 1 ครั้งหลังจากครบ 15 วัน จึงใส่ปุ๋ย และเมื่อครบระยะเวลา 30 วัน จึงวัดความยาวราก ความยาวลำต้น และชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง

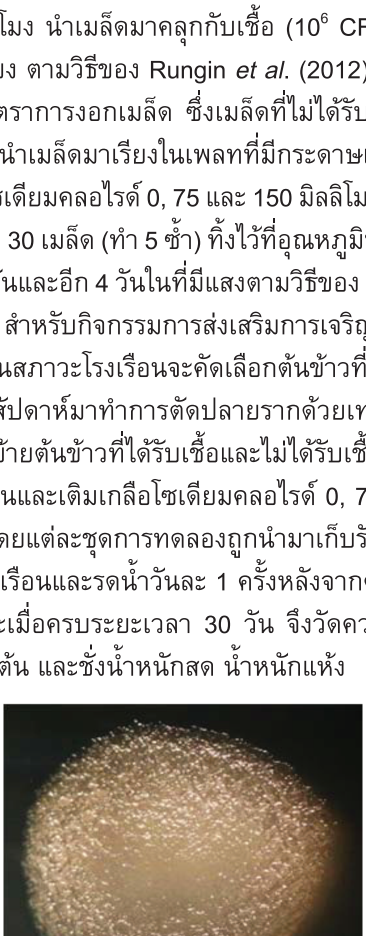

Figure 1 Colony of *P. putida* ATCC 17484 on NA agar, incubated at 29 ºC for 24 h.

5. การวิเคราะห์ข้อมูลผลทางสถิติ วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Minitab เวอร์ชั่น 18 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดทดลองโดยใช้ Tukey Multiple Comparison ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ P<0.05

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การทำให้เชื้อบริสุทธิ์พบว่า สามารถทำให้เชื้อแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 แยกเป็นโคโลนีเดียวและบริสุทธิ์ได้ (Figure 1)

2. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGP) พบว่าแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สร้างไซเดอโรฟอร์ได้สูงสุด 2.20 เซนติเมตร ในอาหารแข็งสูตร CAS ที่ไม่เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ แต่เมื่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นความสามารถในการสร้างไซเดอโรฟอร์จะค่อย ๆ ลดลงคือ 1.33, 1.20, 0.77, 0.47 และ 0.33 เซนติเมตร ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 200, 400, 600, 800 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (Table 1, Figure 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Deshwal *et al*. (2013) พบว่าแบคทีเรีย *P. putida* สร้างสารไซเดอโรฟอร์ได้ในอาหารแข็งสูตร CAS ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 2.25% ผลการสร้างฮอร์โมนพืช IAA สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีส้มอมชมพูและหากไม่มีการสร้างฮอร์โมนพืช IAA สารละลายจะไม่เปลี่ยนสีหรือยังคงสีน้ำตาลอมเหลืองของอาหารเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยพบว่าแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงสุด 17.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 400 มิลลิโมลาร์ และการเจริญเติบโตสูงสุด 109.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 800 มิลลิโมลาร์ นั่นคือเมื่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้นการสร้างฮอร์โมนพืช IAA และการเจริญเติบโตจะค่อยๆ ลดลง (Table 1, Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Deshwal *et al*. (2013) รายงานว่าแบคทีเรีย *P. putida* สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้และสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.25 และ 2.50% ตามลำดับ เช่นเดียวกับ *P. putida* สายพันธุ์ R4 สามารถสร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้ 8.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5% หรือ 257 มิลลิโมลาร์ (Egamberdieva *et al*., 2015) ผลการสร้างเอนไซม์ ACCD พบว่าแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารแข็งสูตร Minimal medium ที่เติม ACC สามารถเปลี่ยน ACC โดยใช้เอนไซม์ ACCD ให้เป็นแอมโมเนียและ Ketobutyrate ซึ่งนำไปใช้เพื่อดำรงชีวิตและเจริญได้ (El-Tarabily, 2008) และพบว่ามีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ ACCD ได้สูงถึง 126.50 nmol α-keto mg protein^{-1}h^{-1} ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่

ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สร้างเอนไซม์ ACCD ได้ 9.40 และ 79.60 nmol α-keto mg protein^{-1}h^{-1} ตามลำดับ (Figure 4) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pastor *et al.* (2016) พบว่า *P. putida* PCI2 มีการเจริญได้ดีในอาหารที่มี ACC ซึ่งเป็นแหล่งไนโตเจนเพียงแหล่งเดียว เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มี ACC พบว่า *P. putida* PCI2 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และงานวิจัยของ Nadeem *et al.* (2010) พบว่า *P. putida* W2 สร้างเอนไซม์ ACCD ได้ 364 μmol kg^{-1} h^{-1} และสร้างฮอร์โมนพืช IAA สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ภายใต้สภาวะความเค็ม

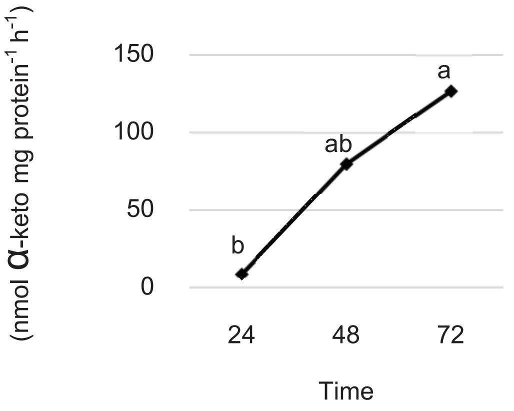

Figure 4 ACC deaminase production.

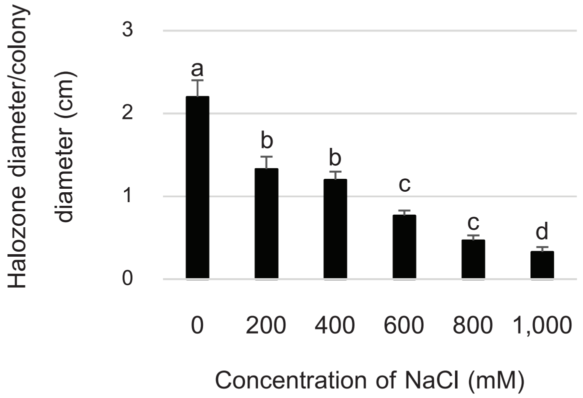

Figure 2 The effect of NaCl on siderophore production *P. putida* ATCC 17484 Halo zone diameter/colony diameter.

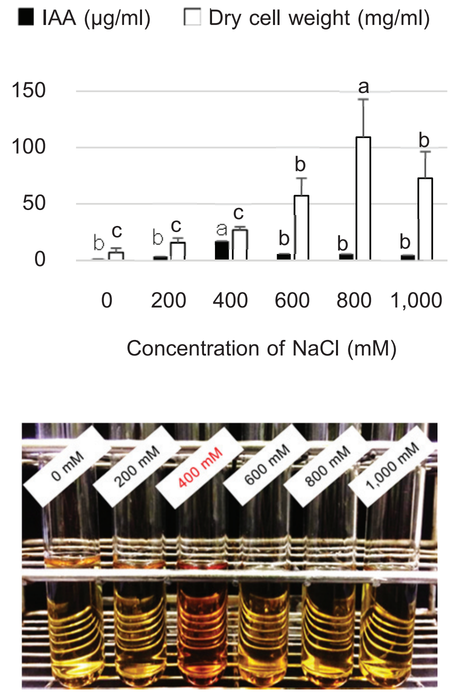

Figure 3 The effect of NaCl on IAA production *P. putida* ATCC 17484.

Table 1 Determination of plant growth promoters production.

NaCl (mM)	Plant growth promoting		
	Siderophore (cm)	IAA (μg/ml)	Dry cell weight (mg/ml)
0	2.20±0.20a	1.07±0.02b	6.96±3.86c
200	1.33±0.15b	3.77±0.01b	15.77±4.03c
400	1.20±0.10bc	17.18±0.12a	27.11±2.86c
600	0.77±0.06c	5.82±0.01b	57.31±15.94b
800	0.47±0.06cd	5.58±0.01b	109.33±34.17a
1,000	0.33±0.06d	4.75±0.01b	72.89±23.76b

Values are means ± standard deviation, different letters indicate significant difference between means at $P<0.05$

3. ความสามารถในการทนเค็ม 0-7% (w/v) พบว่าแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สามารถเจริญได้สูงสุดบนอาหารแข็งสูตร YD ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5% (w/v) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ He *et al.* (2018) พบว่า *P. putida* Rs-198 ทนเค็มได้ 5% (w/v)

4. กิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าว (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์ แบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 สามารถส่งเสริมความยาวราก ความยาวลำต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้นเพิ่มสูงขึ้นได้ดีกว่าต้นข้าวที่ไม่ได้รับเชื้อ (ชุดควบคุม) (Table 2) ซึ่งมีความยาวราก 11.59, 14.48 และ 13.15 เซนติเมตร ความยาวลำต้น 36.26, 34.06 และ 33.71 เซนติเมตร (Figure 6) น้ำหนักสดลำต้น 2.17, 1.63 และ 1.70 กรัม (Figure 7) น้ำหนักแห้งลำต้น 0.35, 0.25 และ 0.28 กรัม ตามลำดับ (Figure 8) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yan *et al.* (2014) ศึกษาแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum* L.) ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 90 และ 190 มิลลิโมลาร์ พบว่าต้นมะเขือ

เทศที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *P. putida* UW4 เจริญเติบโตสูงกว่าต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับเชื้อ และเมื่อระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นทั้งในต้นที่ไม่ได้รับเชื้อและต้นที่ได้รับเชื้อ ความยาวลำต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลดลง แต่ที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 90 มิลลิโมลาร์ ต้นที่ได้รับเชื้อมีความยาวลำต้นเพิ่มสูงขึ้น 34.3 มิลลิเมตร ซึ่งยาวกว่าต้นที่ไม่ได้รับเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 190 มิลลิโมลาร์ พบว่าความยาวลำต้น 22.7 มิลลิเมตร ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับต้นที่ไม่ได้รับเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์ ต้นข้าวที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 และไม่ได้รับเชื้อมีอัตราการงอกเมล็ด (Figure 5) และน้ำหนักสดรากไม่แตกต่างกัน (Figure 7) และที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 75 มิลลิโมลาร์ ต้นข้าวที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียและไม่ได้รับเชื้อมีน้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอร์ 150 มิลลิโมลาร์ ต้นข้าวที่ได้รับเชื้อมีน้ำหนักแห้งรากเพิ่มขึ้นสูงกว่าต้นข้าวที่ไม่ได้รับเชื้อ (Figure 8)

Table 2 Effect of the application of *P. putida* ATCC 17484 on growth characteristics of rice plants grown in normal and salt (75 and 150 mM NaCl) stress conditions.

Bacteria	Promote plant growth	Concentration of NaCl (mM)		
		0	75	150
Control	Germination (%)	80.67±8.63a	62.00±1.82a	43.33±11.30a
P. putida		68.67±11.93a	54.000±10.11a	50.67±10.38a
Control	Root length (cm)	9.96±0.30b	7.33±0.29b	6.46±0.19b
P. putida		11.59±0.30a	14.48±0.75a	13.15±0.79a
Control	Shoot length (cm)	32.51±0.90b	26.96±0.47b	19.96±0.71b
P. putida		36.26±2.13a	34.06±2.04a	33.71±2.56a
Control	Root fresh weight (g)	1.10±0.29a	0.90±0.19a	0.67±0.10a
P. putida		1.25±0.09a	0.82±0.22a	0.87±0.22a
Control	Shoot fresh weight (g)	1.37±0.12b	0.75±0.15b	0.51±0.05b
P. putida		2.17±0.08a	1.63±0.19a	1.70±0.09a
Control	Root dry weight (g)	0.10±0.03a	0.09±0.01a	0.06±0.01b
P. putida		0.11±0.01a	0.08±0.01a	0.10±0.01a
Control	Shoot dry weight (g)	0.23±0.01b	0.15±0.02b	0.13±0.02b
P. putida		0.35±0.01a	0.25±0.03a	0.28±0.02a

Values are means ± standard deviation, different letters indicate significant difference between means at $P<0.05$

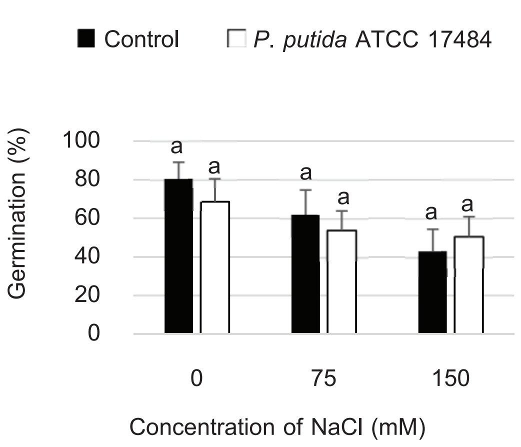

Figure 5 Effects of bacterial inoculation on germination percentage of rice seedlings at 0, 75 and 150 mM NaCl concentration along with control (sterilized water).

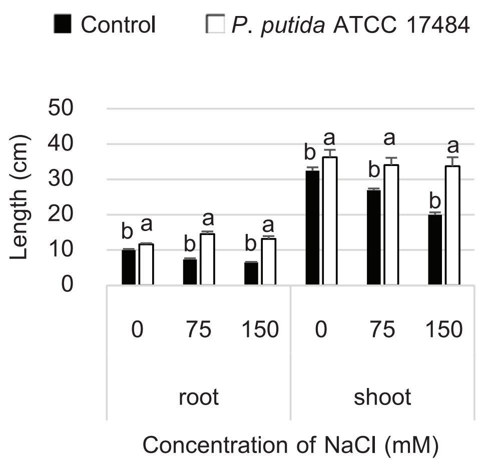

Figure 6 Effect of bacterial inoculation on root and length (cm) of rice under different concentrations of NaCl.

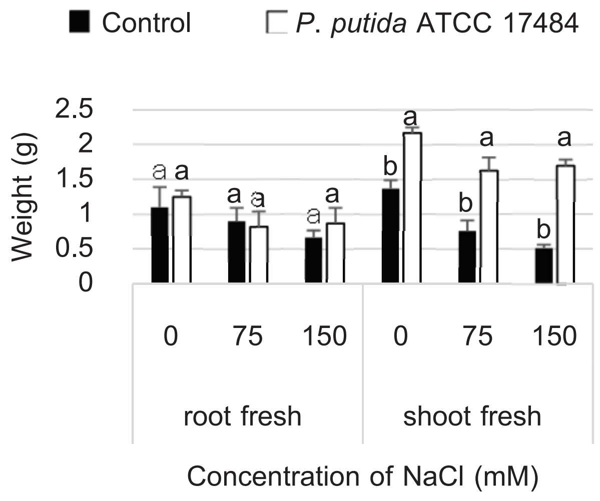

Figure 7 Effect of bacterial inoculation on fresh weight (g) of rice under different concentrations of NaCl.

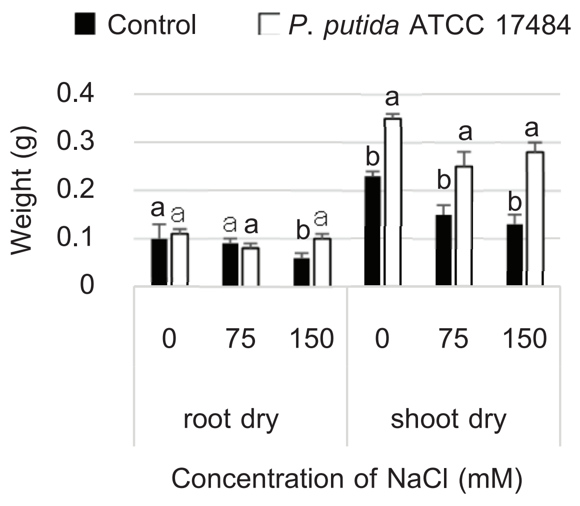

Figure 8 Effect of bacterial inoculation on dry weight (g) of rice under different concentrations of NaCl.

สรุปผลการวิจัย

การทดสอบคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรีย *P. putida* ATCC 17484 พบว่าสร้างสารไซเดอโรฟอร์ได้ โดยการเกิดวงใสสีส้มรอบ ๆ โคโลนีบนอาหารแข็งสูตร CAS ที่ไม่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ได้สูงสุด 2.20 เซนติเมตร สร้างฮอร์โมนพืช IAA ได้สูงสุด 17.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 400 มิลลิโมลาร์ และเจริญเติบโตได้สูงสุดคือ 109.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 800 มิลลิโมลาร์ สามารถสร้างเอนไซม์ ACCD ได้และมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 126.50 nmol α-keto mg protein^{-1}h^{-1} ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ความสามารถในการทนเค็มซึ่งเจริญได้ในอาหารแข็งที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงสุด 5% (w/v) และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตข้าวได้ โดยต้นข้าวมีความยาวราก ความยาวลำต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลำต้นเพิ่มขึ้นในขณะที่อัตราการงอกเมล็ด น้ำหนักสดรากไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับต้นข้าวที่ไม่ได้รับเชื้อ (ชุดควบคุม) ที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 75 และ 150 มิลลิโมลาร์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอ้างอิง

Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, *163*(2), 173-181. https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001

Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University Science*, *26*(1), 1-20. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001

Bakker, P.A.H.M., Doornbos, R.F., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., & Pieterse, C.M.J. (2013). Induced systemic resistance and the rhizosphere microbiome. *The Plant Pathology Journal*, *29*(2), 136-143. https://doi.org/10.5423/PPJ.SI.07.2012.0111

Barea, J.M. (2015). Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *15*(2), 261-282. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000021

Dalvand, M.G., Y., & Askari, H. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of Streptomyces under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(4), 1503-1509. https://doi.org/10.1007/s11274-011-0952-7

Deshwal, V.K., & Kumar, P. (2013). Effect of salinity on growth and PGPR activity of Pseudomonads. *Journal of Academia and Industrial Research*, *2*(6), 353-356. http://www.jairjp.com/NOVEMBER%202013/10%20VISHAL.pdf

Egamberdieva, D. (2009). Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Act Physiologiae Plantarum*, *31*(4), 861-864. https://doi.org/10.1007/s11738-009-0297-0

Egamberdieva, D., Jabborova, D., & Hashem, A. (2015). Pseudomonas induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *22*(6), 773-779. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.019

El-Tarabily, K.A. (2008). Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant and Soil*, *308*(1), 161-174. https://doi.org/10.1007/s11104-008-9616-2

Glick, B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, *41*(2), 109-117. https://doi.org/10.1139/m95-015

Goswami, D., Thakker, J.N., & Dhandhukia, P.C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, *2*(1), 1127500. https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500

Grover, A., Aggarwal, P.K., Kapoor, A., Katiyar-Agarwal, S., Agarwal, M., & Chandramouli, A. (2003). Addressing abiotic stresses in agriculture through transgenic technology. *Current Science*, *84*(3), 355-367. https://www.researchgate.net/publication/237284788

Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(4), 307-319. https://doi.org/10.1038/nrmicro1129

Han, Y., Wang, R., Yang, Z., Zhan, Y., Ma, Y., Ping, S., Zhang, L., Lin, M., & Yan, Y. (2015). 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas stutzeri* A1501 facilitates the growth of rice in the presence of salt or heavy metals. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(7), 1119-1128. https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12053

Hassan, M.N., Afghan, S., & Hafeez, F.Y. (2011). Biological control of red rot in sugarcane by native pyoluteorin-producing *Pseudomonas putida* strain NH-50 under field conditions and its potential modes of action. *Pest Management Science*, *67*(9), 1147-1154. https://doi.org/10.1002/ps.2165

Hernández-Montiel, L.G., Chiquito Contreras, C.J., Murillo Amador, B., Vidal Hernández, L., Quiñones Aguilar, E.E., & Chiquito Contreras, R.G. (2017). Efficiency of two inoculation methods of *Pseudomonas putida* on growth and yield of tomato plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *17*(4), 1003-1012. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000400012

He, Y., Wu, Z., Wang, W., Ye, B.C., Zhang, F., & Liu, X. (2018). Different responses of *Capsicum annuum* L. root and shoot to salt stress with *Pseudomonas putida* Rs-198 inoculation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 799-811. https://doi.org/10.1007/s00344-018-9891-y

Honma, M., & Shimomura, T. (1978). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylicacid. *Agricultural and Biological Chemistry*, *42*(10), 1825-1831. http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1978.10863261

Hopwood, D.A. (1967). Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriological Reviews*, *31*(4), 373-403. https://mmbr.asm.org/content/mmbr/31/4/373.full.pdf

Jaemsaeng, R., Jantasuriyarat, C., Thamchaipenet, A. (2018). Molecular interaction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD)-producing endophytic *Streptomyces* sp. GMKU 336 towards salt-stress resistance of *Oryza sativa* L.cv.KDML 105. *Scientific Reports*, 8, 1950. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19799-9

Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M. E., & Walker, G.C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(8), 619-633. https://doi.org/10.1038/nrmicro1705

Kamou, N.N., Karasali, H., Menexes, G., Kasiotis, K.M., Bon, M.C., Papadakis, E.N., Tzelepis, G.D., Lotos, L., & Lagopodi, A.L. (2015). Isolation screening and characterization of local beneficial rhizobacteria based upon their ability to suppress the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici* and tomato foot and root rot. *Biocontrol Science and Technology*, *25*(8), 928-949. https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1020762

Kang, S.M., Radhakrishnan, R., Khan, A.L., Kim, M.J., Park, J.M., Kim, B.R., & Lee, I.J. (2014). Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 15-124. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.001

Kloepper, J.W. (1993). Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In E.B. Metting (Eds.), *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management* (pp. 255-274). New York: Marcel Dekker.

Kloepper, J.W., & Schroth, M. (1978). Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria* (pp. 879-882). France: Angers. http://www.bashanfoundation.org/contributions/Kloepper-J/kloepperradish.pdf

Nadeem, S.M., Zahir, Z.A., Naveed, M., Asghar, H., & Arshad, M. (2010). Rhizobacteria capable of producing ACC deaminase may mitigate salt stress in wheat. *Soil Science Society of America Journal*, *74*(2), 533-542. https://doi.org/10.2136/sssaj2008.0240

Neal, A.L., & Ton, J. (2013). Systemic defense priming by *Pseudomonas putida* KT2440 in maize depends on benzoxazinoid exudation from the roots. *Plant signaling & behavior*, *8*(1), e22655. https://doi.org/10.4161/psb.22655

Patten, C.L., & Glick, B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(8), 3795-3801. https://doi.org/10.1128/aem.68.8.3795-3801.2002

Patil, A. D. (2015). Alleviating salt stress in crop plants through salt tolerant microbes. *International Journal of Science and Research*, *4*(1), 1297-1302. https://www.ijsr. net/search_index_results_paperid.php?id=SUB15417

Pastor, N., Masciarelli, O., Fischer, S., Luna, V., & Rovera, M. (2016). Potential of *Pseudomonas putida* PCI2 for the protection of tomato plants against fungal pathogens. *Current Microbiology*, *73*(3), 346-353. https://doi.org/10.1007/s00284-016-1068-y

Paul, D., & Lade, H. (2014). Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, *34*(4), 737-752. https://doi.org/10.1007/s13593-014-0233-6

Ramadoss, D., Lakkineni, V.K., Bose, P., Ali, S., & Annapurna, K. (2013). Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *SpringerPlus*, *2*(1), 6. https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-6

Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M., & Combaret, C.P. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321, 305-339. https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2

Rungin, S., Indananda, C., Suttiviriya, P., Kruasuwan, W., Jaemsaeng, R., & Thamchaipenet, A. (2012). Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). *Antonie van Leeuwenhoek*, *102*(3), 463-472. https://doi.org/10.1007/s10482-012-9778-z

Rütting, T., Aronsson, H., & Delin, S. (2018). Efficient use of nitrogen in agriculture. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, *110*(1), 1-5. https://doi.org/10.1007/s10705-017-9900-8

Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P.A., Javid, Schwyn, B., & Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Analytical Biochemistry*, *160*(1), 47-56. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9

Srivastava, S., & Srivastava, S. (2020). Prescience of endogenous regulation in Arabidopsis thaliana by *Pseudomonas putida* MTCC 5279 under phosphate starved salinity stress condition. *Scientific Reports*, *10*(1), 5855. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62725-1

Vaishnav, A., Varma, A., Tuteja, N., & Choudhary, D.K. (2016). PGPR-Mediated amelioration of crops under salt stress. In D. K. Choudhary, A. Varma & N. Tuteja (Eds.), *Plant-Microbe Interaction: An approach to sustainable agriculture* (pp. 205-226). Singapore: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2854-0_10

Wang, L., Fu, B., Chen, X., & Wang, W. (2018). Isolation and identification of *Pseudomonas putida* from *Medicago sativa* rhizosphere soil. *Bangladesh Journal of Botany*, *47*(3), 779-784. http://www.bdbotsociety.org/journal/journal_issue/2018%20September%20(Special)/27.pdf

Yan, K., Shao, H., Shao, C., Chen, P., Zhao, S., Brestic, M., & Chen, X. (2013). Physiologicaladaptive mechanisms of plants grown in saline soil and implications for sustainable saline agriculture in coastal zone. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 2867-2878. https://doi.org/10.1007/s11738-013-1325-7

Yan, J., Smith, M., Glick, B., Liang, Y. (2014). Effects of ACC deaminase containing rhizobacteria on plant growth and expression of Toc GTPases in tomato (*Solanum lycopersicum*) under salt stress. *Botany*, *92*(11), 775-781. https://doi.org/10.1139/cjb-2014-0038.