

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด ปี 2558

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ
ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร
กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์ในการจัดการดิน
กิจกรรมย่อย : การพัฒนาผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การทดลองที่ 1.5.4 การจำแนก genus และ species ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต
ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Identification of phosphate solubilizing microorganism from phosphate solubilizing bio fertilizer.
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : นายอธิปต์ คลังบุญครอง กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน : นางสาวปรานี มั่นหมาย กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
: นางภาวนา ลิกขนานนท์ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตบริสุทธิ์ชนิดแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท และรา 2 ไอโซเลท คือ PSBW510, PSB73I2, PSBT8R3K4, RPS 003 F และ DCPF210157 ตามลำดับ เพื่อจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยแบคทีเรียศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA และราศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ beta-tubulin พบว่าแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท คือ PSBW510, PSB73I2 และ PSBT8R3K4 จำแนกได้เป็น *Serratia macescens* (%similarity เท่ากับ 99.61%), *Pantoea dispersa* (%similarity เท่ากับ 100.00%) และ *Burkholderia gladioli* (%similarity เท่ากับ 99.83%) ตามลำดับ สำหรับเชื้อรา 2 ไอโซเลท คือ RPS 003 F และ DCPF210157 จำแนกได้เป็น *Talaromyces flavus* voucher BYD07-13 (%similarity เท่ากับ 99.00%) และ *Aspergillus niger* (%similarity เท่ากับ 100.00%) ตามลำดับ

Abstract

Isolation of phosphate solubilizing microorganism as 3 isolates of bacteria and 2 isolate of fungi include PSBW510, PSB73I2, PSBT8R3K4, RPS 003 F and DCPF210157 respectively. Molecular identification of bacterial 16S rDNA was performed, the results showed that the 3 isolates PSBW510, PSB73I2 and PSBT8R3K4 were *Serratia macescens* (99.61% similarity), *Pantoea dispersa* (100.00% similarity) and *Burkholderia gladioli* (99.83% similarity) respectively. Identification of tubulin genes from 2 fungi, the results showed that the 3 isolates RPS 003 F

and DCPF210157 were *Talaromyces flavus* voucher BYD07-13 (99.00% similarity) and *Aspergillus niger* (100.00% similarity) respectively.

6. คำนำ

การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด ในการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้ประโยชน์ด้านปุ๋ยกำลังเป็นที่สนใจของเกษตรกร เพราะจุลินทรีย์เป็นส่วนประกอบหลักของระบบ ดิน-พืช การที่จุลินทรีย์มีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์นี้จะมีผลต่อการพัฒนาของพืช จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถละลายหินฟอสเฟตออกมาเป็นประโยชน์ได้ (Sperber, 1958; Louw and Weble, 1959; Gerretsen, 1984) ดังนั้นการทำให้ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นจากหินฟอสเฟตจากกระบวนการของจุลินทรีย์ จึงเป็นแนวทางที่น่าจะนำไปถึงจุดมุ่งหมายในการทำการเกษตรอย่างยั่งยืนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำเกษตรอินทรีย์ โดยมีรายงานว่าจุลินทรีย์สามารถปลดปล่อยกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆออกมา ทำให้หินฟอสเฟตเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดอินทรีย์โมเลกุลต่ำสามารถเพิ่มความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในสารละลายโดยกลไกที่เกี่ยวข้องกับ chelation และปฏิกิริยาแลกเปลี่ยน (Fox and Comerford, 1990; Gerkel, 1992) จึงมีการนำเชื้อราเส้นใยมาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดอินทรีย์อย่างแพร่หลาย (Matte, 1992; Vassilev and Vassileva, 1992) เฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Penicillium sp.* บางสายพันธุ์ โดยมีการศึกษาในระบบหมักร่วมกันกับหินฟอสเฟต หรือโดยการเพาะเชื้อโดยตรงเพื่อให้ไปละลายหินฟอสเฟต (Kucey, 1987; Asea *et al.*, 1988; Cerezine *et al.*, 1988; Cunningham and Kuyak, 1992) ด้วยเหตุนี้การจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต จึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ เพื่อกำหนดทิศทางการศึกษาและใช้งานจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตได้อย่างเหมาะสม และมีประสิทธิภาพสูง

การวิเคราะห์ในระดับอณูชีววิทยา (molecular biology) ได้เข้ามามีบทบาทในการจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถสกัดดีเอ็นเอ ออกมาได้โดยตรงจากตัวอย่างที่มีอยู่ใน สิ่งแวดล้อมทุกประเภท และปัจจุบันวิธีเปรียบเทียบกับ การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้อย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีให้ข้อมูลความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ในการวัดการสืบทอดทางพันธุกรรมร่วมกัน โดย Ribosomal RNA gene ถูกเลือกนำมาศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตอย่างแพร่หลาย

ในปัจจุบันเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดย การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้นำมาใช้อย่างกว้างขวาง และพบว่ามีประสิทธิภาพดี สามารถใช้จัดจำแนกชนิดราที่ยากต่อการระบุชนิด ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อการระบุชนิด เช่น บริเวณ ribosomal DNA (rDNA) และ internal transcribed spacers (ITS) รวมทั้งยีนของ alpha-actin, beta-tubulin, RNA polymerase I (RPB1) และ II (RPB2) และ elongation factor I (EF1) เป็นต้น (Hsieh; *et al.* 2005; Rehner and Buckley. 2005; Suwannasai *et al.* 2005) ดังนั้นการใช้เทคนิคดังกล่าวเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต จึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการศึกษาและใช้งานจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตได้อย่างเหมาะสม และมีประสิทธิภาพสูง

7. วิธีดำเนินการ

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต และทำการแยกเชื้อให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak ร่วมกับการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยจุลินทรีย์ชนิดราใช้อาหาร PDA ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ และ จุลินทรีย์ชนิดแบคทีเรียใช้อาหาร NA ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ จนมั่นใจว่าไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ และ ยังคงมีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตโดยการตรวจสอบการละลายฟอสเฟตและเกิดวงใสบนอาหาร pikovskaya เมื่อแยกได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วทำการสกัด DNA และทำ sequence เพื่อตรวจสอบ genus และ species ของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการคัดแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต 5 ไอโซเลท โดยเป็นแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท และรา 2 ไอโซเลท คือ PSBW510, PSB73I2, PSBT8R3K4, RPS 003 F และ DCPF210157 ตามลำดับ ให้มีความบริสุทธิ์ ทำการ สกัด DNA และทำ sequence เพื่อตรวจสอบ genus และ species ได้ผลดังนี้

| | |
|---------------------------|---------------------------|
| รหัส | PSBW510 |
| ชนิด | แบคทีเรีย |
| จำแนกเป็น | <i>Serratia macescens</i> |
| %similarity | 99.61% |
| ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'>3') | |

```
TCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGGAGCTTGCTC
CCTGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAA
ACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATG
TGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAG
AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATT
GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACT
TTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGGAGCTTAATACGCTCATCAATTGACGTTACTCGAGAAGAAGCACCCGG
CTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAAGTGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACT
GGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG
GAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG
GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAAT
TGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGACATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTCTACTCT
TGATTCCAGAGAACTTGACAGAGATGCNTTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGA
```

รหัส PSB7312
 ชนิด แบคทีเรีย
 จำแนกเป็น *Pantoea dispersa*
 %similarity 100.00%
 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'>3')

TCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGAAGAGCTTGCTC
 TTTNGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAA
 ACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACACCATCGGATG
 TGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAG
 AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
 GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACT
 TTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATAACCTNGCCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGG
 CTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
 CGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGAAACT
 GGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG
 GAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG
 GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAAT
 TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGC
 CTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGA

รหัส PSBT8R3K4
 ชนิด แบคทีเรีย
 จำแนกเป็น *Burkholderia gladioli*
 %similarity 99.83%
 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'>3')

TCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGACCT
 GGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGCGAAAGC
 CGGATTAATACCGCATAACGATCCATGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCC
 GATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGA

CGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGAC
 AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTG
 TCCGGAAAGAAATCCTGAGGGCTAATATCCTTCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAA
 CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTG
 CGCAGGCGGTTTTGTTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCA
 AGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAT
 ACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
 ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAA
 CGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACG
 GGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGA
 CATGGTCGGAACCTTGGAGAGATCTGAGGGTGCTCGAAAGAGAACCGA

รหัส RPS 003 F
 ชนิด รา
 จำแนกเป็น *Talaromyces flavus* voucher BYD07-13
 %similarity 99.00%

ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'>3')

ATCATTACCGAGTGCGGGCCCTCGCGGCCCAACCTCCCACCCTTGTCTC
 TCTACCCCTGTTGCTTTGGCGGGCCACCGGGGCCACCTGGTCGCCGGGGGACGCACGTC
 CCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGCGCTCTGTGAACCCTGATGAAGATGGGCTGTCTGAGTA
 CGATGAAAATTGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAC
 GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAA
 CGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCT
 CAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCGGGGACCTGCCCCGAAAGGCAGCGGGC
 ACGTCCGTCTGGTCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACTCGCTCGGGAAGGACCTGCGGG
 GGTTGGTCACCACCATATTTTACCACGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAGTTACCCGCTG

รหัส DCPF210157
 ชนิด รา
 จำแนกเป็น *Aspergillus niger*
 %similarity 100.00%

ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'>3')

TCGGTGCTGCTTTCTGGTACGTATAACAACCTGCCGTTGGATTGGGGATGG
 AACATCGTCTCTTAGGCTATCTCAGCTTGAGTTCAGATGTTGTCCATTAGGTACATGCTA
 TCGGTCTAAGAACACGTCTAACAATTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTT
 GACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTTACACCTCTCAATTGGTCAACAATGGGCAA
 AGGGTTGGGTCTTCTGACACGCAGGATAGTTACAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAG
 CGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGAGATCCATCGGACCTTGGCTTTTACACGACAAT
 ATCATCAATGTCCTAATCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGTGCCGT
 CCTCGTCGACCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCTTTTCGGCCAGCT
 CTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCCAAGGG
 TCACTAC

จากการจำแนกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล ความบริสุทธิ์ของเชื้อตลอดจนสารและอุปกรณ์ในการทดสอบเป็นสิ่งสำคัญ เพราะหากเกิดการปนเปื้อนจะทำให้การแปรผลเกิดความผิดพลาด หรือไม่ สามารถแปรผลได้ ซึ่งจะทำให้สิ้นเปลืองเวลา สารเคมี จึงต้องใส่ใจและระวังเรื่องนี้เป็นพิเศษ

9.สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สามารถใช้การจำแนกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตได้ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยจำแนกเป็นจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้

| Isolates | ชนิด | genus และ species | %similarity |
|----------|-----------|---------------------------|-------------|
| PSBW510 | แบคทีเรีย | <i>Serratia macescens</i> | 99.61 |
| PSB7312 | แบคทีเรีย | <i>Pantoea dispersa</i> | 100.00 |

| | | | |
|------------|-----------|--|--------|
| PSBT8R3K4 | แบคทีเรีย | <i>Burkholderia gladioli</i> | 99.83 |
| RPS 003 F | รา | <i>Talaromyces flavus</i> voucher BYD07-13 | 99.00 |
| DCPF210157 | รา | <i>Aspergillus niger</i> | 100.00 |

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถใช้การจำแนกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตได้ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลในการจำแนกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตได้ และจุลินทรีย์ที่ได้รับการจำแนกแล้ว จะทำให้สะดวกต่อการสืบค้นข้อมูล เพื่อกำหนดทิศทางการวิจัย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ให้สูงยิ่งขึ้นได้ ตัวอย่างเช่น Mamta *et al.* (2012) ศึกษาผลของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตต่อการปลูกว่านหางจระเข้ พบว่ามีมวลเพิ่มขึ้น 673%, 294%, 276%, 119% และ 108% เมื่อใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต *Pseudomonas synxantha*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia gladioli* และ *Enterobacter hormaechei* ตามลำดับ Mamta *et al.* (2010) พบว่าการใช้เชื้อร่วมกันของ *Burkholderia gladioli* 10216, *Burkholderia gladioli* 10217, *Enterobacter aerogenes* 10208 และ *Serratia marcescens* 10238 สามารถเพิ่มความยาวยอด ความยาวราก น้ำหนักใบแห้ง น้ำหนักต้นแห้ง ปริมาณ glycoside ของหญ้าหวาน ซึ่งจะเห็นถึงความเป็นไปได้ของการใช้ประโยชน์จาก *Serratia marcescens* และ *Burkholderia gladioli* ที่เราจำแนกได้จากการทดลองนี้ โดยสามารถศึกษาข้อที่เป็นประโยชน์ และข้อจำกัดของจุลินทรีย์ได้ง่ายขึ้น จากการตรวจสอบกับผลงานวิจัยอื่นๆ ที่ผ่านมา

11. เอกสารอ้างอิง

- Cerezine, P.C., E., Nahas and D.A. Ban Zatto. 1988. Soluble phosphate accumulation by *Aspergillus niger* from fluoapatite. *Appl Microbiol Biotechnol* 29: 501-505.
- Cunningham J.E. and C. Kuiak. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaji* *Appl Environ Microbiol* 52: 1451-1458.
- Fox, T. and N. Comerford. 1990. Low-molecular weight acids in selected forest soils of the southeastern USA.. *Soil Sci Soc Am J* 54: 1139-1144.
- Gerkel. 1992. Phosphate, aluminium and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. *Pflanzenernahr Bodenkn.* 155: 339-343.
- Gerretsen, F.C. 1984. The influence of microorganisms on the phosphate uptake by plant. *Plant Soil*, 1: 51-81.
- Hsieh, Huei-Mei, Ju, Yu-Ming and Rogers, Jack D. (2005). Molecular Phylogeny of *Hypoxylon* and Closely Related Genera. *Mycologia.* 97(4): 844–865.
- Katsura, K., Kawasaki, H., Potacharoen, W., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and

- Komagata, K. (2001). *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 559-563.
- Kawasaki, H., Hoshino, Y., Hirata, A. and Yamasato, K. (1993). Is intracytoplasmic membrane structure a generic criterion? It does not coincide with phylogenetic interrelationships among photosynthetic purple non-sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* 160, 358-362.
- Kucey, R.M.N. 1987. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilajii* and with mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol* 55: 2699-2703.
- Louw, H.A. and Weble. 1959. A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds. *J. Appl. Bacteriol.* 22: 171-196.
- Mamta G., P. Rahic, V. Pathaniad, A. Gulatic, B. Singhd, R. Kumar hanwrae and R. Tewari. 2010. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Soil Ecology.* 46 :222–229.
- Mamta G., Sh. Kiranc, A. Gulatic, B. Singhd and Rupinder Tewari. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiological Research.* 167: 358–363.
- Mandels, M and J. Weber. 1969. Cellulase and their application. *Advances in Chemistry Series.* 95: p.391
- Matte, M. 1992. The production of organic acids. *Rev Biotechnol.* 12: 87-132.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Soomogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380.
- Rehner. Stephen A. and Buckley, Ellen. (2005). A *Beauveria* Phylogeny Inferred from Nuclear ITS and EF1- α Sequences: Evidence for Cryptic Diversification and Links to *Cordyceps* Teleomorphs. *Mycologia.* 97(1): 84-98.
- Sperber, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soli. *Aust.. J. Agriic. Res.* 9: 778-781.
- Suwannasai, Nuttika; Rodtong, Sureelak; Thienhirun, Surang; & Whalley, Anthony J.S. (2005). New Species and Phylogenetic Relationships of *Hypoxyton* Species Found in Thailand Inferred from the Internal Transcribed Spacer Regions of Ribosomal DNA sequences. *Mycotaxon.* 94: 303–324.

Vassilev, N. and M. Vassileva. 1992. Production of organic acids by immobilized filamentous fungi. *Mycol Res* 96: 563-570.

Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T., and Komagata, K. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 823-829.

ภาคผนวก

การจำแนกแบคทีเรีย

16S rDNA sequencing

PCR amplification ของ 16S rDNA

ทำ PCR ด้วย *Taq* polymerase ตามวิธีของ Kawasaki (1993), Yamada *et al* (2000) และ Katsura *et al* (2001) โดยใช้ 2 primer คือ 20F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') และ 1500R (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3') ขั้นตอน PCR amplification จะเริ่มจากสารผสมของ One hundred μ l of a reaction mixture contained 15-20 ng template DNA, 2.0 μ moles ของ primers แต่ละตัว, 2.5 units ของ *Taq* polymerase, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP และ 10 μ l ของ 10xTaq buffer, pH 8.8, ซึ่งประกอบด้วย 750 mM Tris-HCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄ และ 0.1% Tween 20

ขั้นตอน PCR amplification เริ่มจากขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 25 รอบ ตามด้วยขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยขั้นตอน elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และขั้นตอนสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตรวจสอบ PCR product ใน 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis และ purified ด้วย GenepHlow™ Gel/PCR Kit เก็บ PCR product บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทำ Direct sequencing ของ 16S rDNA

ทำ sequencing PCR product บริสุทธิ์ด้วย ABI Prism® 3730XL DNA Sequence ใช้ primers 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') หรือ 800R (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3') และ 518F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3') หรือ 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') สำหรับการทำให้ sequencing ของ single strand 16S rDNA สำหรับการทำให้ sequencing ของ double strands 16S rDNA ใช้ 4 primers ได้แก่ 27F, 518F, 800R และ 1492R

Sequence analyses

ใช้ Cap contig assembly program ในการทำ nucleotide sequences ทำ identification ของ phylogenetic neighbors ด้วย BLASTN

การจำแนกราก

การสกัด DNA

1. ตักเส้นใยเชื้อราใส่ในหลอด microtube ที่บรรจุ CTAB buffer (600 ul)
2. ทำการบดเส้นใย
3. บ่ม microtube ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
4. เติม CHCl₃ : IAA (24:1)
5. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
6. กำจัดของเหลวส่วนบนออกไป
7. เติม isopropanol ที่เย็น ผสมให้เข้ากัน แช่ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
8. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
9. กำจัดของเหลวส่วนบนออกไป เติม 1X TE 30 ul

PCR : Beta-Tubulin

ทำการ amplified ด้วยส่วนผสมของ 1X buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, primer Bt2a และ Bt2b อย่างละ 0.2 uM และ 1 U *Taq* DNA polymerase กระบวนการ PCR เริ่มจาก denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 35 cycle สำหรับขั้นตอน extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

Gel electrophoresis และ sequencing

ตรวจสอบ PCR product ใน 1% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide ตรวจสอบภายใต้แสง ultraviolet จากนั้นทำ sequencing ด้วยเครื่อง DNA sequencer