นันทิดา วัฒนโรจนาพร: เชื้อราไมคอร์ไรซ่า : การยับยั้งเชื้อราก่อโรค ชุมชนของเชื้อราไมคอร์ไรซ่าในระบบการปลูกข้าว และการพัฒนาเทคนิคในการติดตาม (ARBUSCULAR MYCORRHIZA (AM) FUNGI : *PHYTOPHTHORA* SUPPRESSION, AM COMMUNITY IN RICE ROOT AND DEVELOPMENT OF T-RFLP TECHNIQUE FOR AM MORNITORING) อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง, 242 หน้า.

เชื้อราไมคอร์ไรซ่าเป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่ในรากพืช เส้นใยของราที่รากพืชส่วนหนึ่งจะงอกสู่ดิน ทำหน้าที่ดูดน้ำ และธาตุอาหาร เช่น ฟอสฟอรัส จากสารละลายดินให้ก่อรากพืช เส้นใยของราชนิดนี้ ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดกินธาตุอาหาร จึงทำให้พืชได้รับธาตุอาหารเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ราชนิดนี้ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งโรคพืชในดิน โดยเฉพาะ เชื้อราก่อโรค *Phytophthora* เชื้อราไมคอร์ไรซ่านี้พบในรากพืชหลากหลายชนิดแบบพึ่งพาอาศัยกัน และได้ถูกจำแนกอยู่ในไฟลัมGlomeromycotaโดยอาศัยข้อมูลจากลำดับเบสของดีเอ็นเอ การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราชนิดนี้เป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้เกิดการนำไปใช้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 เรื่อง ซึ่งมีทั้งการใช้เชื้อราไมคอร์ไรซ่า และกรศึกษาชุมชนของเชื้อราชนิดนี้บริเวณรอบรากพืช นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์หาความลำเอียงในการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) เพื่อการหาชุมชนไมคอร์ไรซ่าอีกด้วย

ในหัวข้อแรกนั้น มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกเชื้อราไมคอร์ไรซ่าที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการเจริญเติบโต และการดูดกินธาตุฟอสฟอรัสในส้ม นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรครากเน่าโคนเน่า *Phytophthora* ในรากส้ม ผลการศึกษาพบว่า เชื้อราสายพันธุ์ *Glomus etunicatum* สามารถเพิ่มค่า mycorrhizal efficiency index ในส้มสายพันธุ์โชกุน และเขียวหวานได้ดีที่สุด ในขณะที่ส้มสายพันธุ์เขียวหวาน และ C-35 citrange ที่มีการใส่เชื้อ *G. etunicatum* ร่วมกับการใส่ปุ๋ย ได้ให้ผลปริมาณฟอสฟอรัสในใบมากที่สุด จากผลที่ได้ บ่งบอกว่า *G. etunicatum* เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการเจริญเติบโต และการดูดกินฟอสฟอรัสในส้ม ในส่วนของการยับยั้งเชื้อก่อโรครากเน่า พบว่า การใส่เชื้อราไมคอร์ไรซ่าร่วมกับการใส่เชื้อราก่อโรคนั้น ทำให้อาการของโรครากเน่าที่รากส้มลดลง ผลการทดลองได้บ่งบอกว่า ชนิดของพืช และชนิดของเชื้อราไมคอร์ไรซ่าที่แตกต่างกันนั้น ทำให้ได้ผลการเจริญเติบโตของพืช และผลของการต้านทานโรคที่แตกต่างกัน ดังนั้นการใช้เชื้อราไมคอร์ไรซ่านี้ พบว่า มีศักยภาพที่จะนำไปผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซ่าสำหรับการใช้ในสวนส้มได้

ในการศึกษาที่สองนั้นมุ่งเน้นเพื่อหาว่า ระบบการปลูกข้าวแบบประณีต (system of rice intensification, SRI) และระบบดั้งเดิม(conventional system, CS) และการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการใส่เชื้อแบคทีเรียพีจีพีอาร์ (*Azosprillum largimobile* และ *Azotobacter vinelandii*) นั้น มีผลต่อโครงสร้างชุมชนของเชื้อราไมคอร์ไรซ่าในแต่ละช่วงอายุของการปลูกข้าวหรือไม่ ผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ พบว่า เชื้อราส่วนใหญ่อยู่ในจีนัส *Glomus* และ *Acaulospora* ในการวิเคราะห์กลุ่มชุมชนเชื้อราไมคอร์ไรซ่าโดยการใช้การวิเคราะห์ principle component analysis (PCA) พบว่า ในอายุข้าวที่ 60 วัน, 90 วัน และ 120 วันนั้น มีการแยกกลุ่มชุมชนเชื้อราระหว่างระบบSRI และ CS ในส่วนของการกระจายตัวของกลุ่มชุมชนเชื้อราโดยอาศัยข้อมูลจากT-RFLP นั้น พบว่า มีการแยกกลุ่มกันระหว่างระบบ SRI และ CS อย่างชัดเจน นอกจากนี้ ผลการทดลองยังพบว่า ข้าวที่ปลูกภายใต้ระบบ SRI นั้น มีความหลากหลายของชุมชนเชื้อราในรากมากกว่าระบบCS โดยอาศัยการประเมินจาก Shannon-Weaver index of diversity (H')

ในหัวข้อสุดท้าย ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการหาความลำเอียงของเทคนิคT-RFLP ในการหากลุ่มชุมชนไมคอร์ไรซ่า ในการทดลองนี้ ได้ทำการเลียนแบบธรรมชาติ โดยการสร้างชุมชนเชื้อราไมคอร์ไรซ่าขึ้นมาเพื่อเป็นตัวแทนของกลุ่มชุมชนที่แท้จริง ในการทดลองนี้ ได้ทำการผสมพลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อราไมคอร์ไรซ่าสองสายพันธุ์กับดีเอ็นเอของรากแครอท เทคนิค PCR-TRFLP ได้ถูกนำมาใช้เพื่อประเมินปริมาณของชิ้นส่วนT-RF ที่ได้ จุดประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อหาว่า จำนวนรอบของ PCR มีผลต่อปริมาณชิ้นส่วนของ T-RF อย่างไร และเพื่อหาว่า ผลของวิธีการทำดีเอ็นเอของรากแครอทให้บริสุทธิ์ และผลของการใส่พลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อราไมคอร์ไรซ่าสองสายพันธุ์ในอัตราส่วนต่างๆ นั้น จะมีผลต่อความลำเอียงของอัตราส่วนของผลผลิตที่ได้หรือไม่ ผลการทดลองที่ได้ พบว่า การใช้จำนวนรอบของPCR ที่มากกว่า 18 รอบ นั้นจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ plateau และพบว่า วิธีการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีphenol-chloroform นั้น จะให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ของT-RF ใกล้เคียงกับปริมาณในทางทฤษฎีมากที่สุด ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ไม่มีการทำให้บริสุทธิ์นั้น ทำให้เกิดความลำเอียงของปริมาณT-RF ที่ได้ ซึ่งอาจมีปริมาณมากกว่า หรือน้อยกว่าปริมาณในทางทฤษฎี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

NANTIDA WATANAROJANAPORN : ARBUSCULAR MYCORRHIZA (AM) FUNGI : *PHYTOPHTHORA* SUPPRESSION, AM COMMUNITY IN RICE ROOT AND DEVELOPMENT OF T-RFLP TECHNIQUE FOR AM MORNITORING. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NEUNG TEAUMROONG, Ph.D., 242 PP.

Arbuscular mycorrhiza (AM) fungi/*Glomus etunicatum*/ *Acaulospora tuberculat/Phytophthora/*CITRUS/*Oryza sativa*/ COMMUNITY STRUCTURE/PGPR/SYSTEM OF RICE INTENSIFICATION (SRI)/T-RFLP/PCR CYCLE NUMBER/PURIFICATION METHOD

Arbuscular mycorrhiza (AM) fungi are symbionts in roots of higher plants. There are extraradical hypae originated from root fragment in the soil. The extraradical mycelium has several functions, the most important of which is the uptake and translocation of water and mineral nutrients such as phosphorus from the soil solution to roots. The highly branched nature of the absorbing hyphae increases the surface area for nutrient uptake, leading to the enhanced nutrient accumulation in plant tissues. Additionally, AM fungi inhibit the root rot caused by soilborne fungal pathogens especially *Phytophthora*. They are formed in an enormously wide variety of host plants by obligately symbiotic fungi which have recently been reclassified on the basis of DNA sequences into a separate fungal phylum, the Glomeromycota. Mycorrhizal fungi have become an important object of investigations to create new opportunities for utilizing these fungi in biotechnology. This thesis, which was divided into three topics, presents both biotechnological applications of mycorrhiza and the AM community structure in rhizosphere. Additionally, the biases in detecting

AM community by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) method were also elucidated in the last chapter.

In the first topic, the aims were to: (i) select efficient indigenous mycorrhizal fungi and investigate the influence of effective indigenous mycorrhizal species on citrus growth and phosphorus uptake, and (ii) determine the influence of AM on *Phytophthora* root rot in citrus (*Citrus* sp.). The results of citrus growth revealed that Shogun *(C. reticulata* Blanco cv. Shogun) and Tangerine (*C. reticulate*) inoculated with *Glomus etunicatum* produced the highest mycorrhizal efficiency index (MEI). Tangerine and C-35 citrange amended with fertilizers and *G. etunicatum* demonstrated the highest P content in leaves. This indicated that *G. etunicatum* had an influence on citrus growth and P uptake, suggesting it to be a highly effective strain. Shogun scion/C-35 citrange rootstock combinations that were inoculated by both *P. nicotianae* and different AM fungi (*G. etunicatum* or *Acaulospora tuberculata*) showed minor root rot symptom. Our results indicated the facts that different host plants and different AM species produced different outcomes in terms of growth and pathogen resistance. The application of both AM isolates, therefore, has an enormous potential to produce the inoculum for citrus orchards.

In the next topic, we explored whether rice root AM community structures (based on T-RFLP derived from 18S rDNA) were affected by rice cultivation systems (the system of rice intensification (SRI) and the conventional rice cultivation system (CS)), and by application of compost and plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (*Azospirillium largimobile* and *Azotobacter vinelandii*) during different growth stages in field experiment. The Blast results showed that AM fungal sequences belonged to members of the phylum *Glomeromycota*, the genera *Glomus*

and *Acaulospora*. AM community structure was compared between the different cultivation types (CS and SRI) and different PGPR applications by principle component analysis (PCA). In the 2nd (60 days), the 3rd (90 days) and the 4th (120 days) sampling times, the AM assemblages of conventionally managed system (CS) were separated from those of SRI management. The distribution of AM community composition based on T-RFLP data demonstrated that the AM fungal community structures associated with the different cultivation plots (CS and SRI) were clearly separated. Our output also indicated that rice plants grown under SRI had more diverse AM fungal communities than those grown under CS condition when Shannon-Weaver index of diversity (*H'*) estimation was employed.

For the last topic, the microbial communities profiling method, T-RFLP, was focused in order to detect biases of real community structures in environment. In order to investigate T-RFLP community profiles in terms of relative abundance representing real community structures, artificial pairwise mixtures of 18S ribosomal RNA gene clones derived from two arbuscular mycorrhiza (AM) fungi sequences were designed to construct simple "pairwise mixes". PCR T-RFLP was used for estimation of T-RFs product to answer the questions regarding how the number of PCR cycle could affect T-RFs product in pairwise mixes and how effect of plant genomic DNA purification method and varied ratio of AM plasmid DNA template could affect the bias of template-to-product ratio in relative T-RFs peak area. The result of varying numbers of PCR cycle indicated that T-RFs products were still in the exponential phase at the 18 cycles or less before approaching the plateau. The best T-RFs product quantities based on T-RF peak areas were obtained by using phenol-chloroform purification. Non-purified plant genomic DNA might create T-RFLP

pattern that was not consistent with theoretical yield. Therefore, this generated a bias towards underestimation or overestimation of relative abundance in this study.

School of Biotechnology

Academic Year 2010

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____