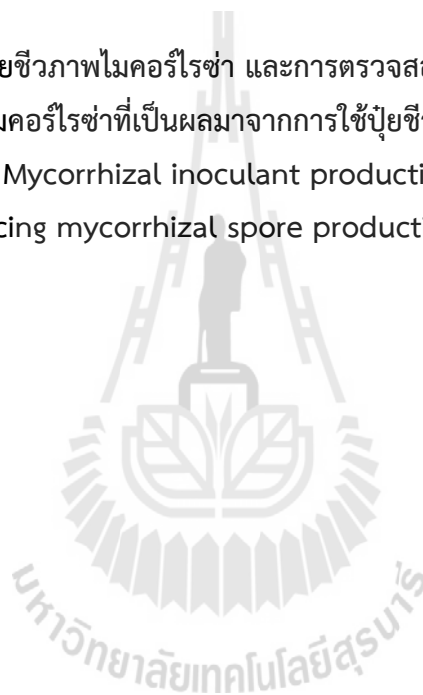




รายงานการวิจัย

การปรับปรุงการผลิตปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซ่า และการตรวจสอบกลไกการเพิ่มผลผลิต  
ของสปอร์ไมคอร์ไรซ่าที่เป็นผลมาจากการใช้ปุ๋ยชีวภาพ PGPR

Improvement of Mycorrhizal inoculant production and investigation the  
mechanism of enhancing mycorrhizal spore production as a result of PGPR



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การปรับปรุงการผลิตปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซ่า และการตรวจสอบกลไกการเพิ่มผลผลิต  
ของสปอร์ไมคอร์ไรซ่าที่เป็นผลมาจากการใช้ปุ๋ยชีวภาพ PGPR

Improvement of Mycorrhizal inoculant production and investigation the  
mechanism of enhancing mycorrhizal spore production as a result of PGPR

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2557

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2559

### กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสภาวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2555-2557 และดำเนินการภายใต้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ทดลอง และเครื่องมือวิเคราะห์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย



## บทคัดย่อ

ปัจจุบันเชื้อราไมคอร์ไรซ่า หรือหัวเชื้อไมคอร์ไรซ่าได้รับความนิยมในการนำมาใช้ในการเกษตรอย่างแพร่หลายและมีแนวโน้มจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะนำมาใช้ในการปลูกร่วมกับพืชสวน และการเกษตรอื่น ๆ เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและเสริมสร้างความแข็งแรงให้แก่พืช อย่างไรก็ตามการผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซ่า ยังคงมีความยุ่งยากและต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูง เนื่องจากเชื้อราไมคอร์ไรซ่าไม่สามารถเจริญหรือเพาะเลี้ยงได้โดยปราศจากพืชอาศัย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการพัฒนาวิธีการผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซ่าโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และเพื่อศึกษากลไกที่เชื้อจุลินทรีย์ส่งเสริมการสร้างสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซ่า ผลการทดลองพบว่าการใช้เชื้อ *Brevibacillus* sp. SUT47 ร่วมกับไมคอร์ไรซ่ามีส่วนช่วยส่งเสริมการเข้าสู่พืชของไมคอร์ไรซ่าและเพิ่มจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซ่าที่นำมาทดสอบทั้ง 2 ชนิดคือ *Claroideoglossum etunicatum* และ *Acaulospora tuberculata* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยอื่น ๆ เช่น ธาตุฟอสฟอรัส และฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน (indole acetic acid, IAA) เป็นอีกปัจจัยที่ส่งเสริมการเข้าสู่รากพืชและการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซ่าได้ แต่จำนวนสปอร์ที่เพิ่มขึ้นนั้นน้อยกว่าจำนวนสปอร์ที่เพิ่มขึ้นโดยใช้วิธีการปลูกเชื้อร่วมกับ SUT47 ผลการวิเคราะห์โปรตีนของข้าวโพดที่แสดงออกในช่วงที่มีปฏิสัมพันธ์กับไมคอร์ไรซ่า และเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis พบโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวของพืช และระบบภูมิคุ้มกันภายในพืช โดยเฉพาะในกลุ่มของ reactive oxygen specie (ROS) โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรีย SUT47 ช่วยลดการทำงานของกลไกการป้องกันและระบบภูมิคุ้มกันภายในพืชได้ โดยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม ROS-Scavenging ในพืช ส่งผลในการยับยั้งกลไกการป้องกันและระบบภูมิคุ้มกันภายในพืชลดลง และทำให้เชื้อราไมคอร์ไรซ่าเข้าสู่พืชได้มากขึ้น และสร้างสปอร์ได้มากขึ้น จากการทดลองนี้จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซ่าที่มีประสิทธิภาพและมีต้นทุนในการผลิตต่ำได้ต่อไป

## ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are increasingly considered in agriculture, horticulture and others. AMF can be applied to increase crop yield and support plant health. However, the obligate biotrophic nature of AMF has complicated to develop AMF inoculum. In this study, we aimed at development the method of AMF production by using plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and examined the mechanisms on how PGPR could improve mycorrhizal symbiosis and spore production in host plant. It was found that *Brevibacillus* sp. SUT47 was able to increase AMF spore production and root colonization more than 2 folds when compared with control of non-PGPR. Both genera of mycorrhiza, *Claroideoglossum etunicatum* and *Acaulospora tuberculata* significantly increased spore production when co-inoculated with SUT47. Low level of phosphorus and appropriate concentration of indole acetic acid (IAA) were also able to promote AMF spore production but in the level less than AMF spore production by using AMF co-inoculated with SUT47. The 2D-gel electrophoresis was used to examine the plant protein expressed during the interaction with AMF and SUT47. The results showed that the reactive oxygen species (ROS) were involved in this interaction. *Brevibacillus* sp. SUT47 could suppress plant ROS via induction of ROS scavenging enzymes and resulting in reducing plant defense system and plant immunity during mycorrhizal infection. Thus, the current data provide evidence that strain SUT47 can be used to enhance mycorrhizal colonization and spore production. This method can be applied for further efficient and low cost of mycorrhizal inoculum production.

## สารบัญเรื่อง

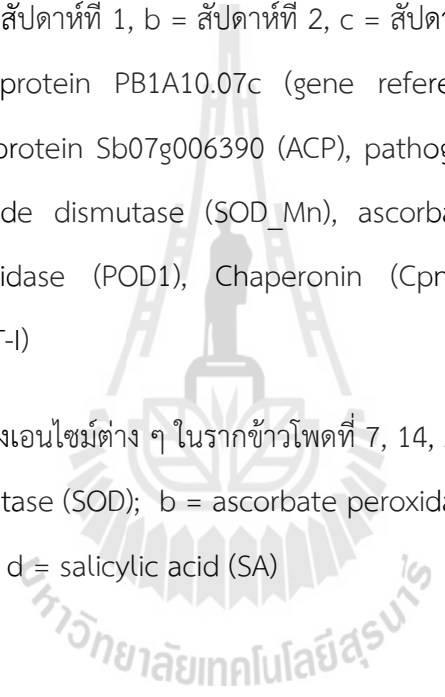
|  | หน้า |
|--|------|
| กิตติกรรมประกาศ.....   | ก    |
| บทคัดย่อภาษาไทย.....   | ข    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....  | ค    |
| สารบัญเรื่อง.....  | ง    |
| สารบัญตาราง.....   | จ    |
| สารบัญภาพ.....   | ฉ    |
| บทที่ 1 บทนำ.....  | 1    |
| 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....   | 1    |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....   | 2    |
| 1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....   | 2    |
| 1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....  | 3    |
| บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....  | 4    |
| 2.1 รวบรวมสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย.....  | 4    |
| 2.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ PGPR ที่ส่งเสริมการผลิตสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซ่า ...                                       | 4    |
| 2.3 การทดสอบอิทธิพลของธาตุอาหารต่อการเพิ่มจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซ่า .....   | 5    |
| 2.4 การทดสอบอิทธิพลของ IAA ต่อการส่งเสริมการเข้าสู่รากพืชและการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซ่า.....                   | 5    |
| 2.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเชื้อ SUT 47 หลังการได้รับสารที่ปลดปล่อยจากรากพืช .....                               | 5    |
| 2.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในรากข้าวโพดที่แสดงออกในช่วงที่มีปฏิสัมพันธ์กับเชื้อ SUT 47 และ เชื้อราไมคอร์ไรซ่า..... | 6    |
| 2.7 การศึกษาการแสดงออกของยีนในรากข้าวโพด.....  | 7    |
| 2.8 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในรากข้าวโพด .....  | 8    |
| บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....  | 10   |
| บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....   | 19   |
| บรรณานุกรม.....  | 20   |

## สารบัญตาราง

|  | หน้า |
|--|------|
| ตารางที่ 1 แสดงจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซ่าที่ปลูกร่วมกับเชื้อ PGPR ที่ 90 วันหลังการปลูก..  | 10   |
| ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากพืชของไมคอร์ไรซ่าที่ 90 วันหลังการปลูก.....   | 11   |
| ตารางที่ 3 แสดงจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซ่าที่ 90 วันหลังการปลูก.....  | 11   |
| ตารางที่ 4 แสดงผลของโปรตีนที่แสดงออกในเชื้อ <i>Brevibacillus</i> sp. SUT47 ในหลอดทดลอง<br>เมื่อได้รับสารที่ปล่อยจากรากข้าวโพด (root exudates) ที่อายุ 7 วัน เป็นเวลา 12<br>ชั่วโมง   | 13   |
| ตารางที่ 5 แสดงผลของโปรตีนที่แสดงออกในรากข้าวโพด ในแต่ละชุดการทดลอง ได้แก่ ข้าวโพด<br>(non-inoculation) ข้าวโพดที่ทำการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซ่า ข้าวโพดที่ปลูก<br>เชื้อจุลินทรีย์ SUT47 และ ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไร<br>ซ่า ที่ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ  | 14   |
| ตารางที่ 6 แสดงผลของโปรตีนที่แสดงออกในรากข้าวโพด ในแต่ละชุดการทดลอง ได้แก่ ข้าวโพด<br>(non-inoculation) ข้าวโพดที่ทำการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซ่า ข้าวโพดที่ปลูก<br>เชื้อจุลินทรีย์ SUT47 และ ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไร<br>ซ่า ที่ 30 วันหลังการปลูกเชื้อ | 15   |

สารบัญรูปภาพ

|   | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 1 กราฟแสดงจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซาต่อต้นเมื่อให้ไฟโตฮอร์โมน IAA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อ <i>Brevibacillus</i> sp. SUT47 .....   | 12   |
| รูปที่ 2 แสดงการเร่งการเจริญของขนราก (early root hair production) ของข้าวโพดที่เกิดจากการใช้เชื้อ <i>Brevibacillus</i> sp. SUT47 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....   | 13   |
| รูปที่ 3 แสดงผลการแสดงออกของยีนที่สัมพันธ์กับผลของโปรตีนในรากข้าวโพดที่ 30 วัน ในแต่ละสัปดาห์ โดย a = สัปดาห์ที่ 1, b = สัปดาห์ที่ 2, c = สัปดาห์ที่ 3 และ d = สัปดาห์ที่ 4<br>4 membrane protein PB1A10.07c (gene reference) (PB), Putative uncharacterized protein Sb07g006390 (ACP), pathogenesis-related protein 1(PR-1), Superoxide dismutase (SOD_Mn), ascorbate peroxidase (APX), ascorbate peroxidase (POD1), Chaperonin (Cpn) และGlutathione S-transferase 1 (GST-I) | 16   |
| รูปที่ 4 แสดงผลกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ในรากข้าวโพดที่ 7, 14, 21 และ 30 วัน โดย a = superoxide dismutase (SOD); b = ascorbate peroxidase (POD); c = Catalase (CT) และ d = salicylic acid (SA)   | 17   |





## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เชื้อราไมคอร์ไรซาเป็นเชื้อราในดินที่สามารถพบได้ทั่วไป มีรูปแบบการอยู่อาศัยแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับพืชอาศัย เชื้อราไมคอร์ไรซาสามารถเข้าอาศัยกับพืชได้หลากหลายชนิดทั่วโลก นอกจากนี้เชื้อราไมคอร์ไรซายังมีบทบาทและมีความสำคัญต่อระบบนิเวศของธรรมชาติ เชื้อราไมคอร์ไรซาเป็นที่ยอมรับและรู้จักกันดีในฐานะผู้ช่วยดูดซับสารอาหารให้แก่พืชอาศัย ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพิ่มจำนวนผลผลิตแก่พืช รวมถึงช่วยส่งเสริมให้พืชมีความต้านทานต่อความเครียดทั้งทางด้าน biotic และ abiotic stresses (S. E. Smith และ Read, 1996) นอกจากนี้เชื้อราไมคอร์ไรซายังช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดินให้มีคุณภาพและมีบทบาทในการเพิ่มประสิทธิภาพของการสะสมคาร์บอนในดิน (Miller และ Jastrow, 2000) ปัจจุบันการใช้เชื้อราไมคอร์ไรซาถูกนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายและเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะทางการเกษตร เช่น พืชสวน พืชไร่ การจัดสวน และการปลูกป่า แม้กระทั่งในการจัดการสิ่งแวดล้อม การกำจัดมลพิษตกค้างในดิน การเพิ่มผลผลิตในการปลูกพืชแบบเกษตรอินทรีย์ หรือการใช้เพื่อลดอัตราการใช้สารเคมีในการเกษตร (Johansson, Paul และ Finlay, 2004) บางผลิตภัณฑ์ของเชื้อราไมคอร์ไรซา เช่นปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซาถูกนำไปใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายพื้นที่ เช่น ใช้สำหรับการจัดสวนหย่อม หรือใช้ในการจัดการธาตุอาหารของหญ้าในสนามกอล์ฟ อย่างไรก็ตามในขณะที่ความต้องการของการใช้เชื้อราไมคอร์ไรซามีเพิ่มสูงขึ้นแต่การผลิตเชื้อราไมคอร์ไรซายังคงทำได้น้อยและใช้ค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากข้อจำกัดของเชื้อราไมคอร์ไรซาที่ไม่สามารถขยายจำนวนได้ถ้าขาดพืชอาศัย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซาให้ได้ปริมาณสูงขึ้น ในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพเชื้อราไมคอร์ไรซาขึ้นมาหลากหลายวิธี ทั้งนี้ Ijdo, Cranenbrouck และ Declerck (2011) ได้จัดประเภทของวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซาออกเป็น 3 วิธีการใหญ่ ๆ ด้วยกัน ได้แก่ 1) The substrate-base production system เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อราไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยโดยใช้วัสดุหมักและธาตุอาหารที่เหมาะสม; 2) The substrate – free cultivation system เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อราไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยโดยให้ธาตุอาหารที่เหมาะสมในรูปของของเหลวหรือสารละลาย; 3) The *in vitro* cultivation system เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อราไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยภายในห้องทดลองปลอดเชื้อและธาตุอาหารที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพเชื้อราไมคอร์ไรซาที่หลากหลาย

แต่การผลิตปุ๋ยชีวภาพเชื้อราไมคอร์ไรซายังคงได้ผลผลิตที่น้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อราไมคอร์ไรซาที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติมีปัจจัยจำเป็นอื่น ๆ ที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของเชื้อราที่ไม่สามารถสร้างขึ้นได้ในวิธีการเพราะเลี้ยงดังกล่าว ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไป ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อราไมคอร์ไรซาให้ได้มาตรฐาน ต้องใช้ต้นทุนการผลิตสูงและต้องทำการผลิตในหน่วยการผลิตขนาดใหญ่เพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการใช้ปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซา ปัจจุบันได้มีการรายงาน การทดลองใช้เชื้อราไมคอร์ไรซาร่วมกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อราไมคอร์ไรซาและได้ทำการศึกษถึงความสัมพันธ์ระหว่าง PGPR กับเชื้อราไมคอร์ไรซา โดยเฉพาะในการประยุกต์ใช้ในงานทางด้านเกษตร และการจัดการทางด้านระบบนิเวศวิทยา (Adesemoye และ Klopper, 2009) หลายผลการทดลองพบว่า เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR สามารถเพิ่มอัตราการเข้าสู่พืชอาศัยของเชื้อราไมคอร์ไรซาและเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อราไมคอร์ไรซาเป็นอย่างดี (Barea, Azcón และ Azcón-Aguilar, 2002; Barea, Pozo, Azcon และ Azcon-Aguilar, 2005) อย่างไรก็ตามความรู้เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราไมคอร์ไรซากับ PGPR ยังไม่ชัดเจน ดังนั้นหากทราบถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว จะสามารถนำข้อมูลมาประยุกต์ใช้ในการผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซาได้ ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษถึงความสัมพันธ์หรือกลไกระหว่าง PGPR และเชื้อราไมคอร์ไรซา ในการส่งเสริมการเข้าสู่พืชและการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซา ซึ่งจะนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพไมคอร์ไรซาให้มีประสิทธิภาพและได้ผลผลิตที่สูงขึ้นได้ โดยการใช้เชื้อในกลุ่ม PGPR ต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR และไมคอร์ไรซาที่สามารถใช้ร่วมกันสำหรับการเพิ่มผลผลิตสปอร์ไมคอร์ไรซาได้
- 1.2.2 เพื่อให้ทราบอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซา
- 1.2.3 เพื่อให้ทราบถึงกลไกในระดับชีวโมเลกุลที่เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR สามารถทำให้เพิ่มจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซาได้

### 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR ร่วมกับเชื้อราไมคอร์ไรซาเพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าสู่พืชอาศัยและการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซาเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อราไมคอร์ไรซาที่ไม่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR จากนั้นทำการทดสอบเพาะเลี้ยงเชื้อราไมคอร์ไรซา ร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR โดยการลดระดับของธาตุฟอสฟอรัสให้อยู่ในระดับต่ำ และทำการทดสอบระดับของไฟโตฮอร์โมน (ออกซิน; indole acetic acid (IAA)) เพื่อทำการตรวจสอบปัจจัยที่เป็นไปได้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าสู่พืชอาศัยและการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซา จากนั้นทำการคัดเลือกตัวรับ (Treatment) ที่สามารถส่งเสริมประสิทธิภาพในการเข้าสู่พืชอาศัยและการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซาสูงสุด มาศึกษากลไกในระดับชีวโมเลกุลของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR และในพืช ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเข้าสู่พืชอาศัยและการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซาโดยใช้เทคนิคทางด้าน Proteomics

### 1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

- 1.4.1 ได้ข้อมูลของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่สามารถส่งเสริมการเข้าสู่รากพืชอาศัย และเพิ่มจำนวนสปอร์เชื้อราไมคอร์ไรซาได้
- 1.4.2 ได้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR เพื่อใช้ร่วมกับไมคอร์ไรซา สำหรับการพัฒนาให้เป็นปุ๋ยชีวภาพ
- 1.4.3 ได้ทราบถึงอิทธิพลหรือปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเข้าสู่รากพืชอาศัย และเพิ่มจำนวนสปอร์เชื้อราไมคอร์ไรซา
- 1.4.4 ได้ทราบถึงผลของการใช้ PGPR ร่วมกับไมคอร์ไรซา ในการส่งเสริมการเข้าสู่รากพืชอาศัย และเพิ่มจำนวนสปอร์เชื้อราไมคอร์ไรซา
- 1.4.5 ได้ทราบถึงกลไกทางโมเลกุลของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ในการส่งเสริมการเข้าสู่รากพืชอาศัย และเพิ่มจำนวนสปอร์เชื้อราไมคอร์ไรซา

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 2. วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 1 จะดำเนินการดังต่อไปนี้

##### 2.1 รวบรวมสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย

เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR และเชื้อราไมคอร์ไรซ่า จาก ม. เทคโนโลยีสุรนารี และกรมวิชาการเกษตร โดยเชื้อในกลุ่ม PGPR จะมุ่งเน้นไปที่เชื้อที่เคยทำการรายงานว่าส่งเสริมการเจริญในข้าวโพดได้เป็นอย่างดี เนื่องจากในการทดลองนี้จะใช้ข้าวโพดเป็นพืชอาศัยให้แก่เชื้อราไมคอร์ไรซ่า โดยเชื้อ PGPR ที่คัดเลือกมา ได้แก่ เชื้อ *Pseudomonas* sp. (SUT19), *Bacillus* sp. (SUT1), *Brevibacillus* sp. (SUT 47), เชื้อ *Azospirillum* sp. และเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase สูง โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนเข้าสู่ระยะ Stationary phase (ระยะคงจำนวนเซลล์) ก่อนนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

การเพาะเลี้ยงเชื้อราไมคอร์ไรซ่าร่วมกับ PGPR ทำได้โดย นำเมล็ดข้าวโพดสุวรรณหที่ใช้ในการทดลอง ทำการล้างและฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดข้าวโพด ด้วย 75% (v/v) ethanol นาน 1 นาที จากนั้นล้างด้วย 10% (w/v) sodium hypochlorite solution 5 นาที และล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง ก่อนนำไปทำการเพาะให้เมล็ดงอกบนกระดาษที่มีเปอร์เซ็นต์ความชื้น ประมาณ 60 % และบ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง ข้าวโพดที่งอกจะนำไปปลูกในกระถาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร สูง 16 เซนติเมตร ปลูกเชื้อราไมคอร์ไรซ่าที่ใช้ในการทดสอบแต่ละสายพันธุ์ คือ *Claroideoglossum etunicatum* และ *Acaulospora tuberculata* จำนวน 100 สปอร์ต่อต้น โดยใช้ข้าวโพดสุวรรณหจำนวน 2 ต้นต่อ 1 กระถาง รดด้วยสารอาหารน้ำ Hoagland solution จนพืชมีอายุครบ 90 วัน จากนั้นทำการร่อนด้วยตะแกรง ขนาดมากกว่า 30 แต่ไม่ต่ำกว่า 500 ไมครอน ทำการปั่นแยกสปอร์ด้วยน้ำตาล 50% ด้วยความเร็วรอบ 5000 rpm ทำการคัดเลือกสปอร์ที่มีคุณภาพ และทำการ surface sterilized ด้วย antibiotic mixture (penicillin G [Sigma], streptomycin sulfate [Calbiochem], และ neomycin sulfate [Sigma], อย่างละ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ล้างด้วยน้ำสะอาด เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

## 2.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ PGPR ที่ส่งเสริมการผลิตสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซา

ทำการปลูกพืชดังอธิบายในข้อ 2.1 จนพืชมีอายุครบ 90 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การครอบครองราก (root colonization) และการเข้าสู่รากข้าวโพด โดยวิธีย้อมด้วย trypan blue ตามวิธีมาตรฐานของ International Culture Collection of VA Mycorrhizal Fungi (INVAM) และทำการนับสปอร์ เพื่อทดสอบการส่งเสริมการเข้าสู่รากพืชและการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซา โดยใช้เชื้อ PGPR ในแต่ละชนิด

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 2 จะดำเนินการดังต่อไปนี้

## 2.3 การทดสอบอิทธิพลของธาตุอาหารต่อการเพิ่มจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซา

เชื้อ *Brevibacillus* sp. SUT 47 และไมคอร์ไรซา *C. etunicatum* ที่ได้จากการทดลองที่ 2.2 ได้นำมาทดสอบหาปัจจัยของธาตุอาหารต่อการส่งเสริมการเข้าสู่รากพืชและการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซา โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราไมคอร์ไรซา *C. etunicatum* ร่วมกับเชื้อ SUT 47 ที่คัดเลือกได้ ในกระถางตามการทดลองที่ 2.2 และให้ธาตุอาหาร Hoagland solution ที่แตกต่างกัน (Millner และ Kitt, 1992) ได้แก่ 1) Hoagland solution สูตรเต็ม; 2) Hoagland solution สูตรเต็ม แต่ให้ธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณต่ำ (2.0 ppm); 3) Hoagland solution ครึ่งสูตร; 4) Hoagland solution ครึ่งสูตรแต่ให้ธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณต่ำ (2.0 ppm) (Ergle และ Eaton, 1957) ให้สารอาหาร ในแต่ละสูตร ทุก ๆ 7 วัน จนครบ 90 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบการเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากข้าวโพด และทำการนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซา

## 2.4 การทดสอบอิทธิพลของ IAA ต่อการส่งเสริมการเข้าสู่รากพืชและการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซา

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ SUT 47 และไมคอร์ไรซา *C. etunicatum* ในกระถาง ตามการทดลองที่ 2.2 และให้ธาตุอาหาร Hoagland solution สูตรปกติ ผสมกับ ไนโตรอินโดล 3-อะซิติก (IAA) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ ที่ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ppm ทุก ๆ 7 วัน จนครบ 90 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากข้าวโพด และทำการนับสปอร์เปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงเชื้อราไมคอร์ไรซาที่ให้ Hoagland solution สูตรปกติเพียงอย่างเดียว และ ใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR ร่วมด้วย

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 3 จะดำเนินการดังต่อไปนี้

## 2.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเชื้อ SUT 47 หลังการได้รับสารที่ปลดปล่อยจากรากพืช

ทำการเพาะเมล็ดข้าวโพดในหลอดทดลองกับน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อและทำการเก็บน้ำในหลอดทดลองที่มีสารที่ผลิตจากรากข้าวโพด (root exudates) ที่ระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน จากนั้นนำน้ำตัวอย่างดังกล่าว มาใช้ทดสอบกับเชื้อ SUT 47 โดยทำการผสม PGPR ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอัตรา 1:1 ทั้งไว้ในที่มีดินนานต่างกัน 1, 6 และ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตกตะกอนเซลล์ และนำเซลล์ที่ได้มาสกัดโปรตีนทั้งหมด โดยใช้ 500 ไมโครลิตรของสารละลาย lysis buffer ( 9 M urea, 0.5% v/v Triton X-100, 4% w/v CHAPS, 100 mM DTT and 2% v/v IPG buffer pH 3–10) แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกโดย เครื่อง Sonicator (Qsonica LLC, Newtown, CT) บนน้ำแข็ง ที่ 100 W และ 20 kHz นาน 30 วินาที 1-5 ครั้ง หรือจนได้ของเหลวใสเทียบเท่า lysis buffer ที่ไม่มีเซลล์ จากนั้นทำการตกตะกอนเซลล์ ด้วย เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 15 นาที แล้วดูดเก็บส่วนใสที่มีโปรตีนละลายอยู่ และทำการหาปริมาณโปรตีน โดยใช้วิธี Bradford assay เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีน ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis ต่อไป

## 2.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในรากข้าวโพดที่แสดงออกในช่วงที่มีปฏิสัมพันธ์กับเชื้อ SUT 47 และเชื้อราไมคอร์ไรซา

ทำการสกัดโปรตีนจากรากข้าวโพดในแต่ละชุดการทดลอง ได้แก่ ข้าวโพด (non-inoculation), ข้าวโพดที่ทำการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซา, ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 และข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ร่วมกับเชื้อราไมคอร์ไรซา (W. Wang, Vignani, Scali และ Cresti, 2006) โดยนำรากพืชในแต่ละตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 มิลลิกรัม มาบดรวมกับการใช้ในไตรเจนเหลวให้ละเอียดด้วย โกร่ง จากนั้นเติม 10% TCA 500 มิลลิตร ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 5 นาที เก็บส่วนใส และล้างด้วย 80% methanol ผสม 0.1 M ammonium acetate ทำการตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอน ด้วย 80% acetone ทำการตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตะกอนที่ได้ปล่อยให้แห้ง ณ อุณหภูมิห้อง ก่อนเติม 1 มิลลิตร ของ

สารละลาย SDS extraction buffer (1% (w/v) SDS, 0.15 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 M DTT, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF, protease inhibitors (1:1,000)) ผสม Phenol อัตรา 1:1 ผสมสารละลายด้วยเครื่องเขย่า (Vortex) บ่มเป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปทำการตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 5 นาที ตูดเก็บส่วนบนของสารละลาย ใส่หลอดใหม่ เติม 500 ไมโครลิตร ของ 0.1 M ammonium acetate ละลายใน methanol บ่มใน -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ก่อนนำไปทำการตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 นาที ตกตะกอนที่ได้ปล่อยให้แห้งไว้ให้แห้ง ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนใน 50 ไมโครลิตร ด้วยสารละลาย rehydration buffer (8 M Urea, 20 mM DTT, 2% v/v CHAPS, 2% v/v IPG buffer pH 3–10 and bromophenol blue) ทำการหาจำนวนโปรตีน โดยใช้วิธี Bradford assay เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีน ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis ต่อไป

การวิเคราะห์โปรตีนโดยเทคนิค 2D gel electrophoresis ทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีนเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาผสมกับสารละลาย rehydration buffer ให้ได้ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ก่อนนำไปบ่ม ร่วมกับ nonlinear pH 3–10 IPG strips (Immobiline DryStrip gels, GE Healthcare Life Sciences) นาน 1 คืน และนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System ตั้งค่าการวิเคราะห์อัตโนมัติ เพื่อทำการแยกโปรตีนในแนวระนาบ (แยกตามค่า isoelectric point) จากนั้นนำ Strip ที่ได้มาทำการแยกโปรตีนในแนวตามขนาด molecular weight ใน 12 % acrylamide gel ให้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ ด้วยเครื่อง electrophoresis ผลโปรตีนที่ได้นำมาวิเคราะห์ spot โดยใช้โปรแกรม 2 De-gel image master 7 เพื่อคัดเลือก spot ของโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันเทียบกับตัวอย่างที่ใช้เชื้อราไมคอร์ไรซ่าเพียงอย่างเดียว กับตัวอย่างที่ใช้เชื้อราไมคอร์ไรซ่าร่วมกับ PGPR จากนั้นทำการเก็บ spot ของโปรตีนที่ต้องการและนำไปย่อยด้วย trypsin [Sequencing grade modified Trypsin V5111, Promega, Madison] นำโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) นำผลที่ได้มาตรวจสอบชนิดของโปรตีน โดยใช้การตรวจสอบ Peptide Mass Fingerprint (PMF) โดยใช้โปรแกรม MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) และฐานข้อมูล เช่น SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB, and GenBank CDS

## 2.7 การศึกษาการแสดงออกของยีนในรากข้าวโพด

เพื่อยืนยันผลของโปรตีนที่พบว่ามีการแสดงออกในระหว่างปฏิสัมพันธ์ จึงได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สัมพันธ์กับโปรตีนนั้น ๆ ในระดับ mRNA โดยได้ทำการสกัด RNA รากพืช ที่ทำการปลูกในสภาพอะเช่นเดียวกันกับการทดสอบกลไกของ PGPR และ เชื้อราไมคอร์ไรซา ในต้นข้าวโพด โดยการทดลองประกอบไปด้วยชุดการทดลอง ดังนี้ ข้าวโพด, ข้าวโพดที่ทำการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซา, ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 และ ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซา ทำการสกัด RNA ออกมารากรากพืช ในแต่ละชุดการทดลองด้วย “RNeasy Plant Mini Kit” จากบริษัท QIAGEN จากนั้นนำ RNA ดังกล่าวมาเปลี่ยนให้เป็น DNA คู่สม (cDNA) ด้วย ‘Quantitect Reverse Transcription Kit’ สำหรับ cDNA Synthesis จากบริษัท QIAGEN ขั้นตอนถัดไป นำ cDNA ที่ได้มาทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนดังกล่าว ด้วยเครื่อง real-time PCR (The LightCycler® 480 System) โดยใช้ primer ที่ได้รับการออกแบบอย่างเจาะจงจากลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม (cDNA) ที่จากฐานข้อมูล SWISS-PROT และเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยทำการออกแบบ primer ของแต่ละโปรตีน ด้วย GenScript (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>) ดังตาราง

| Spot no. | Protein name  | Primers 5'-3'   | TM °C    | Size (bp) |
|----------|---|---|----------|-----------|
| 0        | Beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein (ACP) dehydratase | Fw = GGTGGATCTCGAGCAACTTC<br>Rw = TCAGTGATCGCCAGCAATC   | 58<br>59 | 82        |
| 1        | Pathogenesis-related protein 1 (PR-1)                   | Fw = CCTGGGTGTCCGAGAAGCA<br>Rw = ACAGCCGATGGCGGTGGAGT   | 60<br>60 | 133       |
| 2        | Superoxide dismutase (SOD_Mn)                           | Fw = TTTGGAAGAACCTCAAGCCT<br>Rw = GCCTTCTGCATTCATCCTCT  | 58<br>59 | 125       |
| 5        | APx1 - Cytosolic Ascorbate Peroxidase (APX)             | Fw = TAGGGAGGACAAGCCTCAAC<br>Rw = CTCAGGTGGTCAGAACCTT   | 59<br>59 | 72        |
| 8        | Ascorbate peroxidase (POD1)                             | Fw = CAGGGAGGACAAGCCTCAG<br>Rw = CAGAACCCTTAGTGGCATCA   | 58<br>58 | 63        |
| 19       | Chaperonin (Cpn)  | Fw = TATGCTGGGACTGAGTTGA<br>Rw = TGAGAGGCTTCATGTCCTTCAC | 56<br>57 | 134       |
| 20       | Glutathione S-transferase 1 (GST-I)                     | Fw = AGAGCTGTTGAGGGAAGGAA<br>Rw = AGCGGTGACTGGTTAGCCT   | 56<br>59 | 82        |
| 8        | APx1 - Cytosolic Ascorbate Peroxidase                   | Fw = GCAACGATGTCCTGATCACT<br>Rw = AGAGGGCAACATGTCCTGAT  | 57<br>57 | 73        |



## 2.8 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในรากข้าวโพด

ทำการสกัดเอนไซม์แต่ละชนิดออกมาจากรากชุดเดียวกันกับที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของ ยีน โดยใช้รากพืช 0.5 กรัมต่อการสกัดเอนไซม์แต่ละชนิด นำมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว และใช้ สารละลายในการสกัดที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละเอนไซม์

การสกัดเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) ด้วย 0.2 M citrate phosphate buffer (pH 6.5) ที่ 4 องศาเซลเซียส ผสมสารละลายของปฏิกิริยา (reaction mixture) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร (50 mM phosphate buffer pH 7.8 ,13 mM methionine ,75  $\mu$ M nitroblue tetrazolium (NBT), 0.1 mM Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA), 0.05 ml enzyme extract, 2  $\mu$ M riboflavin) ใส่ 2  $\mu$ M riboflavin เป็นสารตัวสุดท้าย ผสมให้เข้ากันและนำ หลอดผสมสารละลาย ของปฏิกิริยา ไปวางไว้ที่มีแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 18 W เป็นเวลา 10 นาที ระยะห่าง 5 เซนติเมตร ปฏิกิริยาจะเริ่มเกิด ส่วนหลอดผสมสารละลายของปฏิกิริยาที่ไม่ได้ใส่ สารละลายเอนไซม์สกัด เป็นหลอด ควบคุมปฏิกิริยา ส่วนหลอดผสมสารละลายของปฏิกิริยาที่ไม่ถูกแสง เป็นหลอดไม่เกิดปฏิกิริยา (Blank) และเมื่อครบ 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดผสมสารละลายของ ปฏิกิริยาไปไว้ในที่มืด และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (1 หน่วยของ เอนไซม์ (unit enzyme) เท่ากับ 50% ของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm ของหลอด ควบคุม) (Beauchamp และ Fridovich, 1971)

การสกัดเอนไซม์ Ascorbate peroxidase (APX) (EC1.11.1.1) ด้วย 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้ 1 มิลลิลิตร ของ 0.25 มิลลิลิตร of 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.25 มิลลิลิตร of 1 mM ascorbate, 0.25 มิลลิลิตร of 0.4 mM EDTA-4H, 0.19 มิลลิลิตร distilled น้ำ, 0.05 มิลลิลิตร enzyme extract and 0.01 มิลลิลิตร of 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร แล้ว ตรวจสอบการดูดแสงที่ลดลงของ ascorbate (Nakano และ Asada, 1981)

การสกัดเอนไซม์ Catalase (CT) (E.C.1.11.1.6) ทำได้โดยใช้ 50 mmol phosphate buffer (pH 7.0) ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย 0.95 มิลลิลิตร ของ 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) ผสมกับ 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ 0.05 มิลลิลิตร enzyme

extract และนำไปวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร จากการดูดแสงที่ลดลงของ  $H_2O_2$  (Nakano และ Asada, 1981)

การตรวจสอบปริมาณ Salicylic acid (SA) โดยการสกัด SA ออกมาจากรากโดยใช้ ethanol จากนั้นทำการตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ โดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ปฏิกริยาการดูดกลืนแสง ของ  $FeCl_3$  ที่เปลี่ยนไป เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Salicylic acid บริสุทธิ์ จากบริษัท Sigma (Warrier, Paul และ Vineetha, 2013)



### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

จากผลการทดลองในระยะเวลา 90 วัน พบว่า เชื้อ *Brevibacillus* sp. SUT47 เมื่อใช้ร่วมกับไมคอร์ไรซาแล้วให้ผลส่งเสริมการเข้าสู่รากพืชของไมคอร์ไรซาและเพิ่มจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซาทั้งสองสายพันธุ์ได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) (ตารางที่ 1) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้นำเชื้อ SUT47 มาใช้ในการทดลองต่อไป เพื่อหาปัจจัยที่มีผลต่อการส่งเสริมการเข้าสู่รากพืชของไมคอร์ไรซาและเพิ่มจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซา โดยในการทดลองขั้นต่อไปได้เลือกทดสอบเฉพาะไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ *A. tuberculata* เนื่องจากมีผลการสร้างสปอร์ได้สูงที่สุด โดยได้ทำการศึกษาอิทธิพลของธาตุอาหารต่อการเข้าสู่รากพืชและการสร้างสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซา และเชื้อราไมคอร์ไรซาเมื่อใช้ร่วมกับ SUT47 ทั้งนี้ผลการทดลองพบว่า อาหารทั้ง 4 สูตร ได้แก่ 1) Hoagland solution สูตรเต็ม, 2) Hoagland solution สูตรเต็ม แต่ให้ธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณต่ำ (2.0 ppm), 3) Hoagland solution ครึ่งสูตร, 4) Hoagland solution ครึ่งสูตร แต่ให้ธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณต่ำ (2.0 ppm) มีอิทธิพลในการส่งเสริมการเข้าสู่พืช โดย Hoagland solution สูตรเต็มให้ธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณต่ำ (2.0 ppm) ให้ผลส่งเสริมการเข้าสู่พืช และการสร้างสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซาได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ดังตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซาที่ปลูกร่วมกับเชื้อ PGPR ที่ 90 วันหลังการปลูก

| Treatments                         | Spores No.                |                          | % Roots colonization      |                           |
|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                    | <i>A. tuberculata</i>     | <i>C. etunicatum</i>     | <i>A. tuberculata</i>     | <i>C. etunicatum</i>      |
| Control                            | 350 ± 130 <sup>c</sup>    | 210 ± 34.96 <sup>c</sup> | 49.33 ± 6.62 <sup>b</sup> | 42.10 ± 3.19 <sup>b</sup> |
| SUT 47 ( <i>Brevibacillus</i> sp.) | 1931 ± 206.5 <sup>a</sup> | 558 ± 47.50 <sup>a</sup> | 70.97 ± 8.00 <sup>a</sup> | 51.31 ± 1.68 <sup>a</sup> |
| SUT 19 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)   | 1086 ± 136.7 <sup>b</sup> | 453 ± 45.94 <sup>b</sup> | 64.55 ± 5.66 <sup>a</sup> | 47.87 ± 2.64 <sup>a</sup> |
| SUT 1 ( <i>Bacillus</i> sp.)       | 180 ± 27.75 <sup>c</sup>  | 225 ± 25 <sup>c</sup>    | 48.12 ± 8.69 <sup>b</sup> | 43.52 ± 3.36 <sup>b</sup> |

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากพืชของไมคอร์ไรซาที่ 90 วันหลังการปลูก

| Percent Root colonization         |                          |                             |                         |                             |
|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Treatment                         | Hoagland's solution      |                             |                         |                             |
|                                   | Full strength            | Full strength low phosphate | Half strength           | Half strength low phosphate |
| Control                           | 12.626±0.83 <sup>b</sup> | 6.876±0.81 <sup>c</sup>     | 7.398±0.83 <sup>b</sup> | 7.698±1.44 <sup>b</sup>     |
| ACC deaminase containing bacteria | 17.538±1.62 <sup>b</sup> | 13.606±1.30 <sup>b</sup>    | 9.812±0.98 <sup>b</sup> | 10.818±1.28 <sup>b</sup>    |
| <i>Sinorhizobium</i> BL3          | 18.004±3.01 <sup>b</sup> | 10.392±1.16 <sup>bc</sup>   | 9.114±0.81 <sup>b</sup> | 8.892±2.18 <sup>b</sup>     |
| <i>Azospirillum</i> sp.           | 13.488±2.51 <sup>b</sup> | 10.558±1.35 <sup>bc</sup>   | 7.034±0.83 <sup>b</sup> | 11.43±2.32 <sup>b</sup>     |
| <i>Brevibacillus</i> sp. SUT47    | 26.284±2.51 <sup>a</sup> | 18.720±2.13 <sup>a</sup>    | 16.25±1.37 <sup>a</sup> | 19.87±1.87 <sup>a</sup>     |

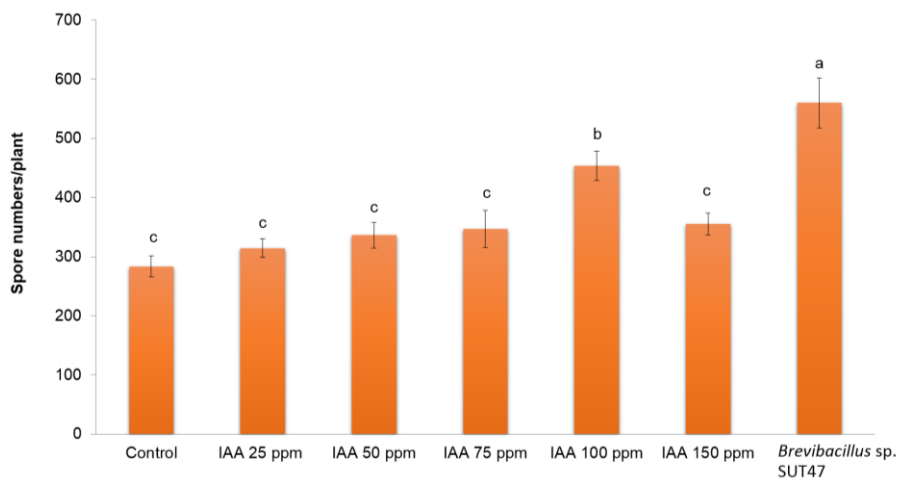
ตารางที่ 3 แสดงจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซาที่ 90 วันหลังการปลูก

| Number of spores production       |                     |                             |                           |                             |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Treatment                         | Hoagland's solution |                             |                           |                             |
|                                   | Full strength       | Full strength low phosphate | Half strength             | Half strength low phosphate |
| Control                           | 161.34±11.17        | 136.00±7.23 <sup>b</sup>    | 125.00±32.05 <sup>b</sup> | 174.00±10.06 <sup>ab</sup>  |
| ACC deaminase containing bacteria | 134.33±10.27        | 151.00±5.51 <sup>b</sup>    | 172.67±8.37 <sup>ab</sup> | 176.33±4.63 <sup>ab</sup>   |
| <i>Sinorhizobium</i> BL3          | 170.00±15.31        | 133.67±4.48 <sup>b</sup>    | 199.33±9.35 <sup>a</sup>  | 139.00±10.69 <sup>b</sup>   |
| <i>Azospirillum</i> sp.           | 145.00±17.01        | 160.67±8.41 <sup>b</sup>    | 169.33±6.74 <sup>ab</sup> | 175.33±3.18 <sup>ab</sup>   |
| <i>Brevibacillus</i> sp. SUT47    | 172.00±5.51         | 253.00±17.10 <sup>a</sup>   | 211.67±8.67 <sup>a</sup>  | 206.33±35.98 <sup>a</sup>   |

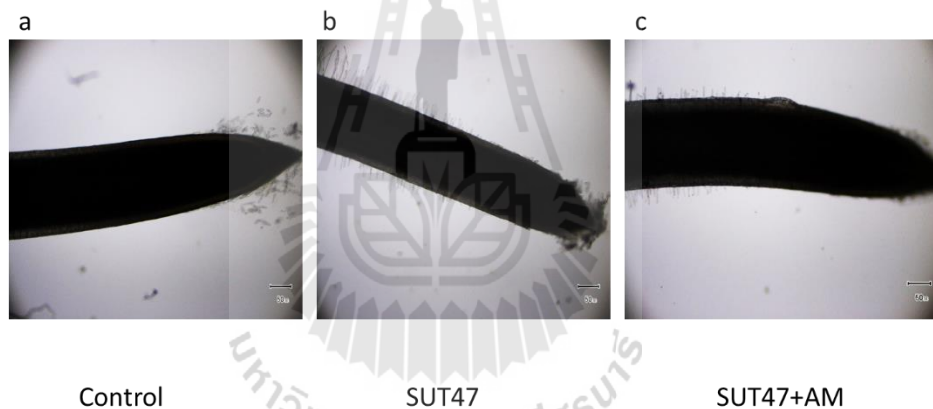
จากผลการทดลองเห็นได้ว่า การที่พืชได้รับธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณต่ำ มีส่วนช่วยทำให้พืชยอมรับ เชื้อราไมคอร์ไรซาให้เข้าอาศัยในรากเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเชื้อไมคอร์ไรซาเองมีคุณสมบัติในการดูดซับ และส่งถ่ายธาตุฟอสฟอรัสไปให้พืชได้ เพื่อแลกเปลี่ยนกับน้ำตาลที่ได้จากการสังเคราะห์แสงของพืช ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่เชื้อราไมคอร์ไรซาจะได้รับจากพืชได้เพียงทางเดียวเท่านั้น (Johansson และคณะ

2004; F. Smith และ Smith, 1997) ในส่วนของ เชื้อ SUT47 ที่มีการส่งเสริมการผลิตสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซ่าได้สูงนั้น ส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะ เชื้อ SUT47 เป็น PGPR ที่สามารถผลิต ไฟโตฮอร์โมน (IAA) และสร้าง biofilm ได้ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการดูดซับฟอสฟอรัสได้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ เชื้อ *Paenibacillus* ที่แยกได้จากเชื้อไมคอร์ไรซ่าเองก็มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเส้นใยของเชื้อราไมคอร์ไรซ่าได้ (Horii และ Ishii, 2006) อย่างไรก็ตามปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อการส่งเสริมการผลิตสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซ่าได้สูงนั้นไม่ได้เกิดจาก PGPR หรือเชื้อราไมคอร์ไรซ่าเพียงอย่างเดียว แต่ยังคงอยู่ภายใต้การควบคุมของพืชด้วย โดยเฉพาะ กลไกการป้องกันตัวเอง (plant defense system) และระบบภูมิคุ้มกันของพืช (plant immunity) และปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องอีกเช่น ระบบการส่งสัญญาณทางชีวภาพ (symbiotic signaling) และปัจจัยภายนอกอื่น เช่น ภาวะเครียด อุณหภูมิ ความชื้น เป็นต้น (Baron และ Zambryski, 1995; Bonfante และ Requena, 2011; García - Garrido และ Ocampo, 2002)

ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบการเพิ่มจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซ่าที่อาจได้รับอิทธิพลมาจากไฟโตฮอร์โมน IAA โดยผลการทดลองพบว่า การใช้ เชื้อ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซ่า ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซ่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไฟโตฮอร์โมน IAA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของ IAA 100 ppm ให้ผลการเพิ่มจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซ่าเพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ IAA ที่ระดับความเข้มข้นอื่น ๆ (รูปที่ 1) ดังนั้นจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ไฟโตฮอร์โมน IAA มีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซ่าด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ SUT47 สามารถเร่งการเจริญเติบโตของรากและขนราก (early root hair production) ได้ (รูปที่ 2) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่ เชื้อ SUT47 สามารถผลิตไฟโตฮอร์โมน IAA ได้ ซึ่งการเร่งการเจริญเติบโตของรากและขนรากได้นี้เป็นการเพิ่มพื้นที่ในการทำให้เชื้อราไมคอร์ไรซ่าเข้าสู่รากพืชได้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่มีรายงานมาก่อน (X. Wang, Pan, Chen, Yan และ Liao, 2011) อย่างไรก็ตามการใช้ IAA มีผลทั้งในทั้งเชิงบวกและเชิงลบขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่เหมาะสมแก่พืช เป็นที่น่าสังเกตว่าจากการทดลองไฟโตฮอร์โมน IAA สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซ่าได้จริง แต่ยังคงน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อ SUT47 จากข้อสังเกตนี้ สามารถตั้งสมมุติฐานได้ว่า เชื้อ SUT47 มีกลไกสำคัญบางอย่างนอกเหนือจากที่กล่าวมาในเบื้องต้นนี้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเพื่อตรวจสอบและพิสูจน์หากกลไกอื่น ๆ ต่อไปโดยใช้เทคนิคทางการวิเคราะห์ด้วยโปรตีน (Proteomics technique)



รูปที่ 1 กราฟแสดงจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซาต่อต้น เมื่อให้ไฟโตฮอร์โมน IAA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อ *Brevibacillus sp. SUT47*



รูปที่ 2 แสดงการเร่งการเจริญของขนราก (early root hair production) ข้าวโพดที่เกิดจากการใช้เชื้อ *Brevibacillus sp. SUT47* เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตั้งนั้นเชื้อจุลินทรีย์ *Brevibacillus sp. SUT47* จึงถูกนำมาตรวจสอบภาพรวมของการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์จุลินทรีย์โดยวิธี 2-Dimension Gel Electrophoresis (2-DE) เพื่อให้ทราบกลไกที่มีผลต่อการเพิ่มการเข้าสู่รากพืชและการเพิ่มของสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซา โดยการทดลองพบว่า หลังจากเชื้อ SUT47 ได้รับสารที่ผลิตจากรากข้าวโพด (root exudates) ที่ 7 วัน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ SUT47 มีการแสดงออกของโปรตีนแตกต่างจากเชื้อ SUT47 ที่ไม่ได้รับสารที่ผลิตจากรากข้าวโพดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งโปรตีนดังกล่าว แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลของโปรตีนที่แสดงออกในเชื้อ *Brevibacillus* sp. SUT47 ในหลอดทดลองเมื่อได้รับสารที่ปล่อยจากรากข้าวโพด (root exudates) ที่อายุ 7 วัน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

| Spot no. | Tophit protein  | Organisms                    | Peptide matched <sup>d</sup> | Mascot score <sup>a</sup> | MW <sup>f</sup> (kDa) | PI <sup>f</sup> | Fold change | Anova (p) |
|----------|---|------------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|-------------|-----------|
| 141      | L-lactate dehydrogenase OS                                | Bacillus megaterium          | 5                            | 275                       | 35,129                | 0.66            | 1.4         | 0.001     |
| 57       | ATP synthase F1 subunit alpha                             | Bacillus megaterium DSM 319  | 23                           | 1208                      | 54,613                | 2.07            | 1.2         | 0.010     |
| 140      | L-lactate dehydrogenase                                   | Bacillus megaterium DSM 319  | 14                           | 680                       | 35,227                | 1.50            | 1.4         | 0.010     |
| 127      | L-lactate dehydrogenase                                   | Bacillus megaterium QM B1551 | 12                           | 558                       | 35,227                | 1.25            | 1.5         | 0.011     |
| 34       | delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase             | Bacillus megaterium QM B1551 | 20                           | 930                       | 56,671                | 1.29            | 1.7         | 0.016     |
| 49       | inosine-5'-monophosphate dehydrogenase                    | Bacillus megaterium QM B1551 | 21                           | 915                       | 52,810                | 0.98            | 1.7         | 0.017     |
| 136      | malate dehydrogenase                                      | Bacillus megaterium QM B1551 | 8                            | 416                       | 33,336                | 0.71            | 1.5         | 0.017     |
| 164      | GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor CodY    | Bacillus megaterium QM B1551 | 7                            | 254                       | 28,870                | 0.13            | 1.4         | 0.017     |
| 12       | translation elongation factors (GTPase)-like protein      | Bacillus megaterium WSH-002  | 18                           | 1034                      | 77,359                | 1.02            | 1.4         | 0.022     |
| 95       | acetyl-CoA acetyltransferase                              | Bacillus megaterium QM B1551 | 18                           | 910                       | 41,074                | 2.71            | 1.4         | 0.024     |
| 55       | inosine-5'-monophosphate dehydrogenase                    | Bacillus megaterium QM B1551 | 22                           | 996                       | 52,810                | 1.12            | 1.4         | 0.030     |
| 35       | delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase             | Bacillus megaterium QM B1551 | 19                           | 852                       | 56,842                | 1.01            | 2.0         | 0.032     |
| 108      | catabolite control protein A                              | Bacillus megaterium QM B1551 | 5                            | 286                       | 38,713                | 0.32            | 1.3         | 0.041     |
| 100      | pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha         | Bacillus megaterium QM B1551 | 13                           | 653                       | 41,405                | 1.38            | 1.6         | 0.042     |
| 77       | iron containing alcohol dehydrogenase                     | Bacillus megaterium QM B1551 | 5                            | 281                       | 42,092                | 0.41            | 1.4         | 0.044     |
| 42       | delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase             | Bacillus megaterium QM B1551 | 19                           | 918                       | 56,671                | 1.77            | 1.2         | 0.048     |
| 102      | NADH dehydrogenase Ndh                                    | Bacillus megaterium QM B1551 | 6                            | 345                       | 41,728                | 0.54            | 6.4         | 0.150     |
| 197      | universal stress protein family domain-containing protein | Bacillus megaterium QM B1551 | 9                            | 400                       | 18,453                | 3.58            | 5.7         | 0.198     |
| 200      | 30S ribosomal protein S8                                  | Bacillus nealsonii           | 3                            | 150                       | 14,768                | 0.26            | 9.9         | 0.364     |
| 170      | hypothetical protein BMQ_4708                             | Bacillus megaterium QM B1551 | 5                            | 172                       | 23,160                | 0.16            | 5.4         | 0.411     |

ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีนระหว่าง เชื้อจุลินทรีย์ SUT47 กับการแสดงออกของโปรตีนในพืชที่ปลูกด้วยเชื้อไมคอร์ไรซ่านั้น ได้ทำการศึกษาโดยสกัดโปรตีนจากรากข้าวโพด ในแต่ละชุดการทดลองดังนี้ ข้าวโพด, ข้าวโพดที่ทำการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซ่า, ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 และ ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซ่า เพื่อดูผลการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในรากข้าวโพดเปรียบเทียบกัน โดยวิธี 2-DE ที่ 7 และ 30 วัน ผลการทดลองพบว่า มีการแสดงออกของโปรตีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อนำผลของการแสดงออกของโปรตีนในแต่ละชุดการทดลองมาเปรียบเทียบกัน ซึ่งโปรตีนดังกล่าว แสดงไว้ในตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 แสดงผลของโปรตีนที่แสดงออกในรากข้าวโพด ในแต่ละชุดการทดลอง ได้แก่ ข้าวโพด (non-inoculation) ข้าวโพดที่ทำการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซา ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 และ ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซา ที่ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ

| Spot no. | Tophit protein                       | Gene ontology/Biological Process                    | Organisms | Peptide matched <sup>a</sup> | Mascot score | Mass  | PI   | Protein up(↑)/down(↓) regulate |            |              |                   |
|----------|--------------------------------------|---|-----------|------------------------------|--------------|-------|------|--------------------------------|------------|--------------|-------------------|
|          |                                      |   |           |                              |              |       |      | Maize                          | Maize +AMF | Maize +SUT47 | Maize +AMF +SUT47 |
| 26       | alpha-soluble NSF attachment protein | intracellular protein transport                     | Zea mays  | 17                           | 572          | 32605 | 1.10 | 15.78                          | -          | 4.21 ↓       | 4.07 ↓            |
| 21       | Mitochondrial ATP synthase           | -   | Zea mays  | 17                           | 462          | 27573 | 0.72 | 1.36                           | 4.03 ↑     | 6.98 ↑       | 12.92 ↑           |
| 34       | adenosine kinase                     | phosphotransferase activity                         | Zea mays  | 21                           | 854          | 36465 | 0.97 | 4.97                           | 1.66 ↓     | -            | 36.23 ↑           |
| 81       | Legumin-like protein                 | nutrient reservoir activity                         | Zea mays  | 7                            | 223          | 38047 | -    | 2.09                           | 3.95 ↑     | 11.21 ↑      | -                 |
| 123      | hypothetical protein                 | glycine decarboxylation via glycine cleavage system | Zea mays  | 7                            | 218          | 17372 | -    | 17.14                          | 14.63 ↓    | -            | -                 |
| 230      | S-adenosylmethionine synthase        | S-adenosylmethionine biosynthetic process           | Zea mays  | 16                           | 623          | 43202 | 0.94 | 10.88                          | 5.86 ↓     | -            | -                 |

↑ = โปรตีนมีการแสดงออก เพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับ ชุดควบคุม

↓ = โปรตีนมีการแสดงออก ลดลงขึ้น เมื่อเทียบกับ ชุดควบคุม

- = ไม่พบ การแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว



**ตารางที่ 6** แสดงผลของโปรตีนที่แสดงออกในรากข้าวโพด ในแต่ละชุดการทดลอง ได้แก่ ข้าวโพด (non-inoculation) ข้าวโพดที่ทำการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซา ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 และ ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซา ที่ 30 วันหลังการปลูกเชื้อ

| Spot no. | Tophit protein                                     | Gene ontology/Biological Process                           | Organisms | Peptide matched <sup>a</sup> | Mascot score | Mass  | PI   | Protein up(▲)/down(▼) regulate |            |              |                   |
|----------|--|--|-----------|------------------------------|--------------|-------|------|--------------------------------|------------|--------------|-------------------|
|          |  |  |           |                              |              |       |      | Maize                          | Maize +AMF | Maize +SUT47 | Maize +AMF +SUT47 |
| 0        | Putative uncharacterized protein Sb07g006390 (ACP) | hydro-lyase activity / defense response to fungus          | Sorghum   | 6                            | 223          | 24479 | 0.35 | -                              | 44.67▲     | -            | 3.00▲             |
| 1        | pathogenesis-related protein 1 (PR-1)              | Cellular Component   | Zea mays  | 1                            | 55           | 15304 | 4.38 | -                              | 5.67▲      | -            | 36.00▲            |
| 2        | Superoxide dismutase (SOD_Mn)                      | superoxide dismutase activity/superoxide metabolic process | Zea mays  | 10                           | 466          | 25571 | 1.44 | -                              | 34.33▲     | -            | 31.67▲            |
| 5        | ascorbate peroxidase (APX)                         | peroxidase activity/response to oxidative stress           | Zea mays  | 15                           | 524          | 27468 | 1.3  | -                              | 38.00▲     | -            | 11.33▲            |
| 8        | ascorbate peroxidase (POD1)                        | peroxidase activity/response to oxidative stress           | Zea mays  | 15                           | 571          | 27468 | 2.04 | 16.33                          | 7.67▼      | 6.67▼        | 8.00▼             |
| 19       | Chaperonin (Cpn)                                   | ATP binding  | Zea mays  | 7                            | 364          | 25796 | 0.69 | 11                             | 26.67▲     | 57▲          | -                 |
| 20       | Glutathione S-transferase 1 (GST-I)                | glutathione transferase activity                           | Zea mays  | 9                            | 339          | 24003 | 5.44 | 16                             | 6▼         | 32▲          | -                 |
| 28       | APx1 - Cytosolic Ascorbate Peroxidase              | peroxidase activity/response to oxidative stress           | Zea mays  | 12                           | 455          | 27462 | 1.03 | 12.67                          | 10.67▼     | -            | -                 |

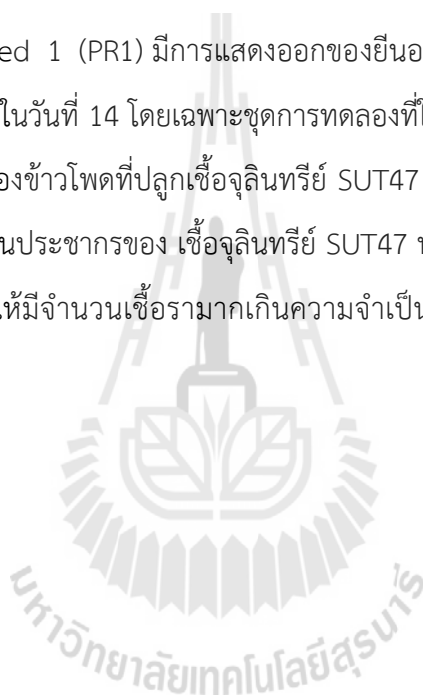
▲ = โปรตีนมีการแสดงออก เพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับ ชุดควบคุม

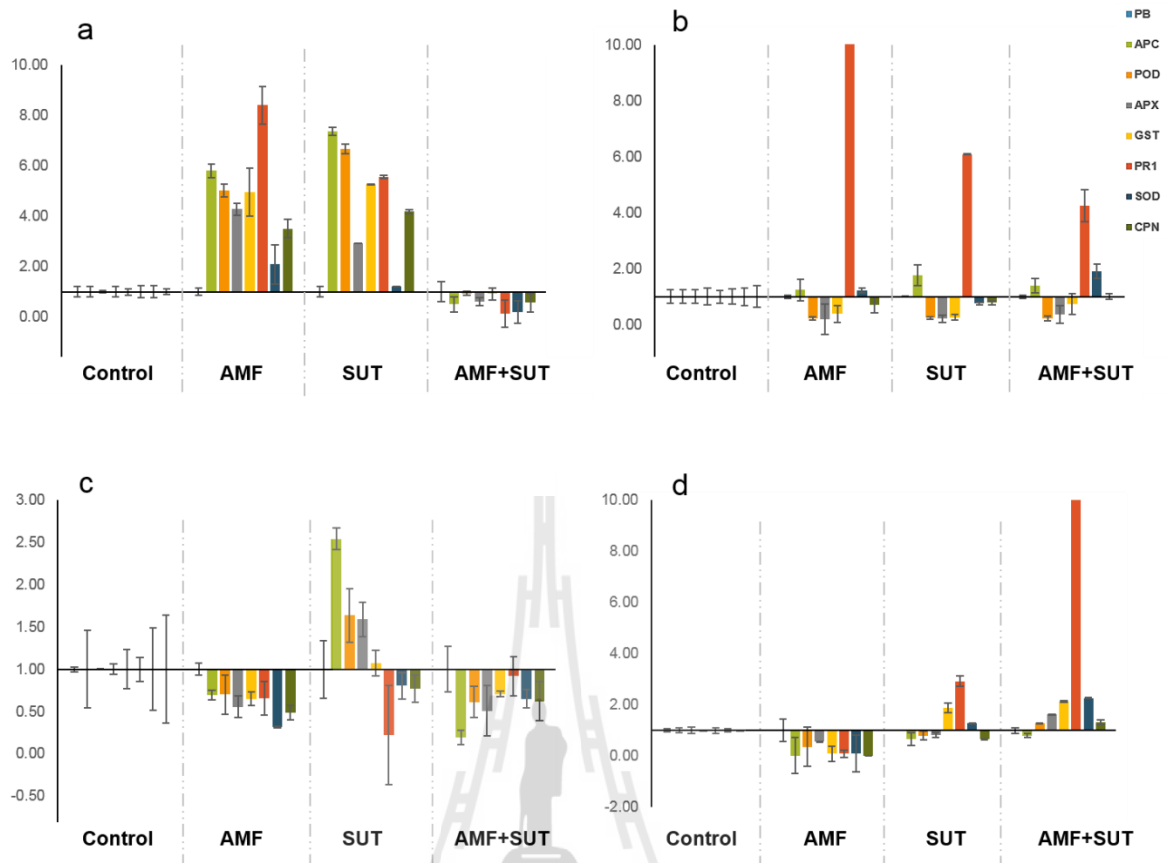
▼ = โปรตีนมีการแสดงออก ลดลงขึ้น เมื่อเทียบกับ ชุดควบคุม

- = ไม่พบ การแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว

โดยผลการแสดงออกของโปรตีนจากรากข้าวโพดที่ 30 วัน แสดงผลการแสดงออกของโปรตีนที่น่าสนใจ โดยเป็นกลุ่มของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวของพืช (plant defense system) และ ระบบภูมิคุ้มกันภายในพืช (plant immunity) ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการทำงานของโปรตีนในกลุ่มดังกล่าว จึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนของกลุ่มโปรตีนที่ตรวจพบโดยใช้เทคนิค Quantitative Reverse Transcriptase-PCR (qRT-PCR) ผลการทดลองแสดงในรูปภาพที่ 3 พบว่ามีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันตัวของพืช (plant defense system) ได้แก่ pathogenesis-related 1 (PR1) และระบบภูมิคุ้มกันภายในพืช สอดคล้องกับผลการทดสอบโปรตีน โดยเฉพาะโปรตีนในกลุ่มของ Relative oxygen specie (ROS) ได้แก่ superoxide dismutase (SOD) และ กลุ่มของ ROS-scavenging ได้แก่ ascorbate peroxidase (POD) และ (APX) ซึ่งยีนในกลุ่ม

ดังกล่าวมีการแสดงออกของยีนโดยรวมในปริมาณที่สูงในช่วง 7 วัน ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เชื้อราไมคอร์ไรซา กำลังเข้าสู่พืชในระยะแรก (pre-symbiosis) และยีนจะลดการแสดงออกลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการพิจารณาในแต่ละชุดการทดลองในแต่ละวัน พบว่า ชุดการทดลองข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซา มีการแสดงออกของยีนในกลุ่มดังกล่าวต่ำกว่าการใช้เชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะที่ 7 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อ SUT47 มีส่วนช่วยในการลดการป้องกันและระบบภูมิคุ้มกันของพืชได้ซึ่งมีผลทำให้เชื้อราไมคอร์ไรซาสามารถเข้าสู่รากพืชได้มากและง่ายขึ้น เป็นที่น่าสังเกตว่า การลดลงของระบบภูมิคุ้มกันของพืชนั้นจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อปลูกเชื้อ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซา ในทำนองเดียวกันยีนที่สร้างโปรตีน (protein-encoding genes) pathogenesis-related 1 (PR1) มีการแสดงออกของยีนอยู่ในระดับที่สูงที่สุด และพบว่าการแสดงออกของยีนที่สูงเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 โดยเฉพาะชุดการทดลองที่ใช้เชื้อราไมคอร์ไรซาเพียงอย่างเดียว และที่ 30 วันในชุดการทดลองข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชมีการควบคุมจำนวนประชากรของ เชื้อจุลินทรีย์ SUT47 หรือเชื้อไมคอร์ไรซา ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมเป็นระยะ เพื่อไม่ให้มีจำนวนเชื้อรามากเกินความจำเป็น ซึ่งสอดคล้องกับความคิดเห็นของ Gilroyและคณะ (2014)

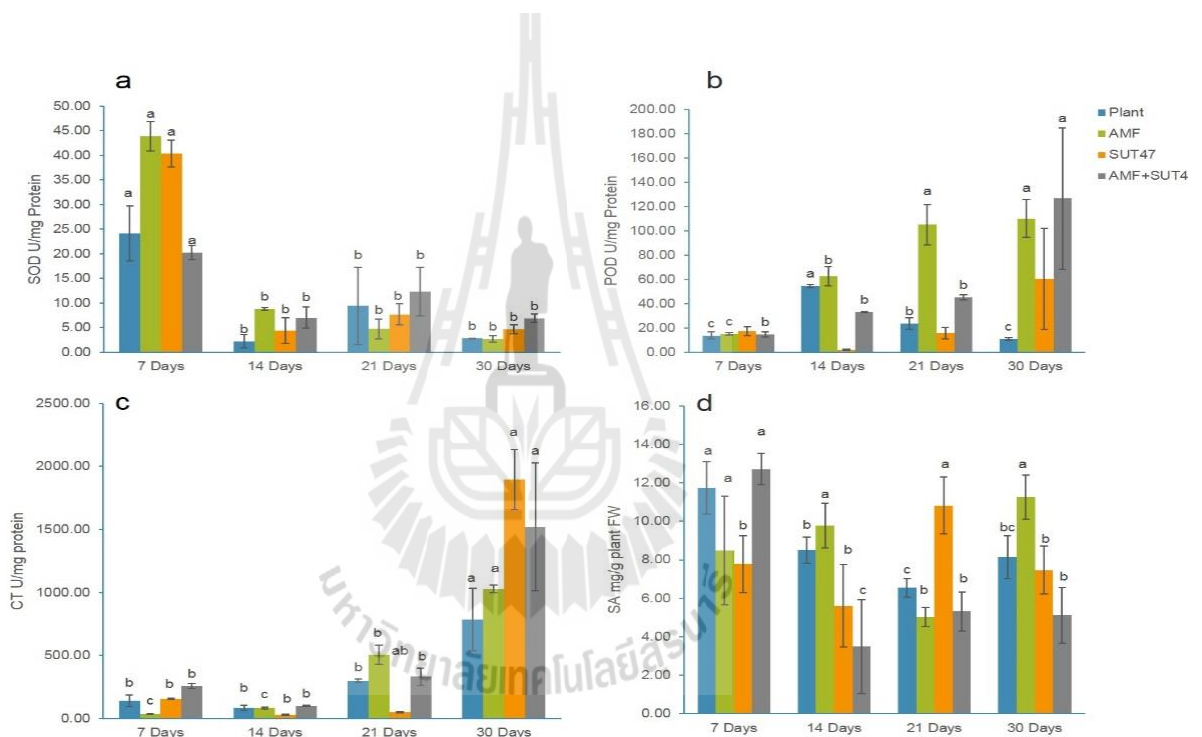




รูปที่ 3 แสดงผล การแสดงออกยีน จากผลของโปรตีนในรากข้าวโพดที่ 30 วัน ในแต่ละสัปดาห์ โดย a = สัปดาห์ที่ 1, b = สัปดาห์ที่ 2, c = สัปดาห์ที่ 3 และ d = สัปดาห์ที่ 4 membrane protein PB1A10.07c (gene reference) (PB), Putative uncharacterized protein Sb07g006390 (ACP), pathogenesis-related protein 1(PR-1), Superoxide dismutase (SOD\_Mn), ascorbate peroxidase (APX), ascorbate peroxidase (POD1), Chaperonin (Cpn) และGlutathione S-transferase 1 (GST-I)

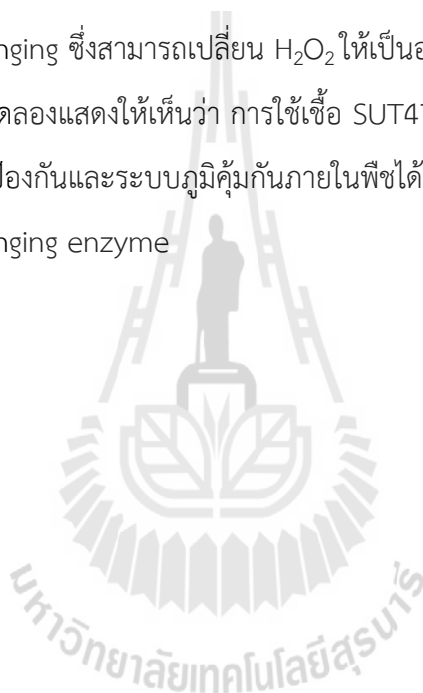
เมื่อได้ทำการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกระบบการป้องกันและภูมิคุ้มกันภายในพืช ได้แก่ SOD, POD, CT (catalase) และ SA (salicylic acid) ตามวิธีมาตรฐาน (Methods of Enzymatic Analysis) พบว่ารากข้าวโพดทั้ง 4 ตำรับการทดลอง มีกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่ม ROS สูงที่อายุ 7 วัน และลดลง ที่ 14, 21 และ 30 วัน สอดคล้องกับผลการแสดงออกของยีนที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยพืชอายุ 7 วันในชุดการทดลองข้าวโพดที่ทำการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซา และข้าวโพดที่ปลูก

เชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ให้ผลของกิจกรรมของเอนไซม์ SOD สูงกว่าพืชควบคุม (รูปที่ 3. a) แต่ในทางตรงกันข้าม ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซาให้ผลกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ต่ำกว่าพืชควบคุม ในส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่ม ROS-scavenging ได้แก่ CT และ POD พบมีผลกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น เมื่อพืชมีอายุสูงขึ้น โดยพบว่าข้าวโพดดำรับที่ทำการปลูกเชื้อไมคอร์ไรซา ข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 และข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซา มีแนวโน้มของกิจกรรมของเอนไซม์ ROS-scavenging สูงกว่าในพืชควบคุม (รูปที่ 3. b และ c) ซึ่งให้ผลตรงกันข้ามกับการทำงานของเอนไซม์ SOD ซึ่งตรงกับกลไกของการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในพืช



รูปที่ 4 แสดงผลกิจกรรมของเอนไซม์ในรากข้าวโพดที่ 7, 14, 21 และ 30 วัน โดย a = superoxide dismutase (SOD) b = ascorbate peroxidase (POD) c = catalase (CT) และ d = salicylic acid (SA)

ในส่วนของการตรวจสอบปริมาณ SA พบว่าสามารถตรวจพบ SA อยู่ในทุก ๆ ช่วงอายุของพืช แต่พบว่าพืชอายุ 7 วัน ในชุดการทดลองข้าวโพดที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซา ตรวจพบ SA สูงที่สุด แต่จะลดลงเมื่อพืชมีอายุสูงขึ้น และมีกิจกรรมน้อยกว่าทุกชุดการทดลอง ที่ 14, 21 และ 30 วัน (รูปที่ 4. d) กล่าวโดยสรุปคือ เมื่อพืชได้รับความเครียดที่เกิดจากอิทธิพลของสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic) หรือ จากอิทธิพลสิ่งมีชีวิต (biotic) ก็ตาม จะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระสะสมภายในเซลล์พืช พืช จะกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นด้วยเอนไซม์ SOD และเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์  $H_2O_2$  ซึ่งถ้าสะสมอยู่ในปริมาณมากจะเป็นพิษต่อเซลล์พืช และกระตุ้นให้เกิดการสร้างกรดซาลิไซลิก (SA) ซึ่งชักนำให้เซลล์พืชตาย (program cell death) ดังนั้นเพื่อลดจำนวนการสะสมของ  $H_2O_2$  พืชจะผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม ROS-scavenging ซึ่งสามารถเปลี่ยน  $H_2O_2$  ให้เป็นออกซิเจน และน้ำได้ (Atkinson และ Urwin, 2012) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การใช้เชื้อ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซานั้นสามารถลดการทำงานของกลไกการป้องกันและระบบภูมิคุ้มกันภายในพืชได้ โดยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม ROS-scavenging enzyme



## บทที่ 4

### บทสรุปการทดลอง

การใช้เชื้อ *Brevibacillus* sp. SUT47 ร่วมกับไมคอร์ไรซามีส่วนช่วยส่งเสริมการเข้าสู่พืชของไมคอร์ไรซาและเพิ่มจำนวนสปอร์ของไมคอร์ไรซาได้ นอกจากนี้ยังพบว่าธาตุฟอสฟอรัส และไฟโตฮอร์โมน IAA มีผลต่อการส่งเสริมการเข้าสู่พืชของไมคอร์ไรซา และการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซาเช่นกัน จากผลการวิเคราะห์โปรตีน พบโปรตีนในกลุ่มของ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวของพืช และ ระบบภูมิคุ้มกันภายในพืช และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนที่ตรวจพบ รวมถึงการตรวจสอบการทำงานของกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบ plant defense system ที่เกี่ยวข้อง พบว่ามีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันตัวของพืช ได้แก่ PR1 และระบบภูมิคุ้มกันภายในพืช สอดคล้องกับผลการทดสอบโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเฉพาะในกลุ่มของ ROS ได้แก่ SOD และกลุ่มของ ROS-scavenging ได้แก่ POD, APX และ CT รวมถึง SA ที่มีปริมาณลดลงเมื่อใช้เชื้อ SUT47 ร่วมกับเชื้อไมคอร์ไรซา ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงทำให้เข้าใจถึงกลไกในการส่งเสริมการเข้าสู่พืชของไมคอร์ไรซา และการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซาได้ โดยสรุปได้ว่า เชื้อ SUT47 ช่วยลดการทำงานของกลไกการป้องกันและระบบภูมิคุ้มกันภายในพืชได้ โดยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม ROS-scavenging ส่งผลในการยับยั้งกลไกการป้องกันและระบบภูมิคุ้มกันภายในพืชให้ลดลง จึงทำให้เชื้อราไมคอร์ไรซาเข้าสู่พืชได้มากขึ้น และสร้างสปอร์ได้มากขึ้นด้วย

## บรรณานุกรม

- Adesemoye, Anthony O, & Kloepper, Joseph W. (2009). Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(1), 1-12.
- Atkinson, Nicky J, & Urwin, Peter E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental Botany*, 63(10), 3523-3543.
- Barea, José-Miguel, Azcón, Rosario, & Azcón-Aguilar, Concepción. (2002). Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 343-351.
- Barea, José-Miguel, Pozo, María José, Azcon, Rosario, & Azcon-Aguilar, Concepcion. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 56(417), 1761-1778.
- Baron, C, & Zambryski, Patricia C. (1995). The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annual review of genetics*, 29(1), 107-129.
- Beauchamp, Charles, & Fridovich, Irwin. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Bonfante, Paola, & Requena, Natalia. (2011). Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current opinion in plant biology*, 14(4), 451-457.
- Ergle, David R, & Eaton, Frank M. (1957). Aspects of Phosphorus Metabolism in the Cotton Plant. *Plant physiology*, 32(2), 106.
- García-Garrido, José Manuel, & Ocampo, Juan A. (2002). Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of experimental Botany*, 53(373), 1377-1386.

- Gilroy, Simon, Suzuki, Nobuhiro, Miller, Gad, Choi, Won-Gyu, Toyota, Masatsugu, Devireddy, Amith R, & Mittler, Ron. (2014). A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in plant science*, 19(10), 623-630.
- Horii, Sachie, & Ishii, Takaaki. (2006). Identification and function of *Gigaspora margarita* growth-promoting microorganisms. *Symbiosis (Rehovot)*, 41(3), 135-141.
- Ijdo, Marleen, Cranenbrouck, Sylvie, & Declerck, Stéphane. (2011). Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. *Mycorrhiza*, 21(1), 1-16.
- Johansson, Jonas F, Paul, Leslie R, & Finlay, Roger D. (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS microbiology ecology*, 48(1), 1-13.
- Miller, RM, & Jastrow, JD. (2000). Mycorrhizal fungi influence soil structure *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function* (pp. 3-18): Springer.
- Millner, PD, & Kitt, DG. (1992). The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 2(1), 9-15.
- Nakano, Yoshiyuki, & Asada, Kozi. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880.
- Smith, FA, & Smith, SE. (1997). Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New phytologist*, 137(3), 373-388.
- Smith, Sally E, & Read, David J. (1996). *Mycorrhizal symbiosis*: Academic press.
- Wang, Wei, Vignani, Rita, Scali, Monica, & Cresti, Mauro. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis-An International Journal*, 27(13), 2782-2786.
- Wang, Xiurong, Pan, Qiang, Chen, Fengxian, Yan, Xiaolong, & Liao, Hong. (2011). Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. *Mycorrhiza*, 21(3), 173-181.



Warrier, RR, Paul, M, & Vineetha, MV. (2013). Estimation of salicylic acid in Eucalyptus leaves using spectrophotometric methods. *Genetics and Plant Physiology*, 3(1-2), 90-97.

