

สุธี คิตติ : การใช้วิธีการทางชีวภาพ และกายภาพในการพัฒนาการผลิตสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (BIOTIC AND ABIOTIC APPROACHES TO DEVELOP METHOD FOR ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI SPORE PRODUCTION) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.พรรณลดา ติตตะบุตร, 111 หน้า.

คำสำคัญ : อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา/บรีเวบาซิลลัส สายพันธุ์ SUT47/บาซิลลัส เวเลเซนซิส สายพันธุ์ S141/แสงแอลอีดี/กรดไขมัน

ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาวิธีการทั้งทางชีวภาพ และทางกายภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Arbuscular Mycorrhizal Fungi; AMF) เพื่อใช้ผลิตเป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพในการเกษตร โดยในบรรดาวิธีการทางชีวภาพ พบว่าการใช้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Mycorrhization Helper Bacteria; MHB) มาปลูกร่วมกับพืชอาศัย เป็นวิธีการที่สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราได้ โดยงานวิจัยนี้พบแบคทีเรียบางชนิดที่นอกจากจะมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชแล้ว (Plant Growth Promoting Rhizobacteria; PGPR) ยังมีผลเชิงบวกต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเชื้อราภายใต้ระบบการผลิตแบบใช้วัสดุปลูกพืชทั่วไปด้วย ทั้งนี้การค้นพบประการแรกคือ สารที่ปลดปล่อยออกมา (secretion compounds) จากเชื้อแบคทีเรีย บรีเวบาซิลลัส สายพันธุ์ SUT47 (*Brevibacillus* sp. SUT47) เมื่อใช้ร่วมกันกับการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ *Acaulospora tuberculata* สามารถส่งเสริมการผลิตสปอร์ให้เพิ่มขึ้นในรากข้าวโพดได้ โดยการใส่สารที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อแบคทีเรียเข้มข้นที่ระดับ 360 มิลลิกรัม ร่วมกับการปลูกเชื้อราให้ผลจำนวนการผลิตสปอร์มากที่สุดประมาณ 1,500 สปอร์ต่อต้น ในระยะเวลา 120 วัน หลังการปลูกเชื้อ อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้แบคทีเรียในรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิตยังคงส่งเสริมการผลิตจำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่สูงกว่า โดยให้จำนวนสปอร์มากกว่า 2,000 สปอร์ต่อต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับวิธีการใส่สารที่ปลดปล่อยออกมาจากแบคทีเรีย ประการที่สอง พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* S141 มีความสามารถในการส่งเสริมให้เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาสายพันธุ์ *Rhizophagus irregularis* เมื่ออยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) กับต้นถั่วโลตัส (*Lotus japonicus*) โดยการปลูกเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ S141 ร่วมกันนี้ ส่งผลเชิงบวกต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเชื้อรา รวมถึงการเข้าครอบครองพื้นที่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา การเพิ่มจำนวนสปอร์ และการดูดซับธาตุอาหารของพืช ในลักษณะการมีปฏิสัมพันธ์แบบไตรภาคี อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบกลไกความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น พบว่าฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน (indole-3-acetic acid; IAA) ที่แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถผลิตได้ ไม่ใช่กลไกหลักที่ทำให้เกิดการส่งเสริมการอยู่ร่วมกันของพืช และเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจว่า

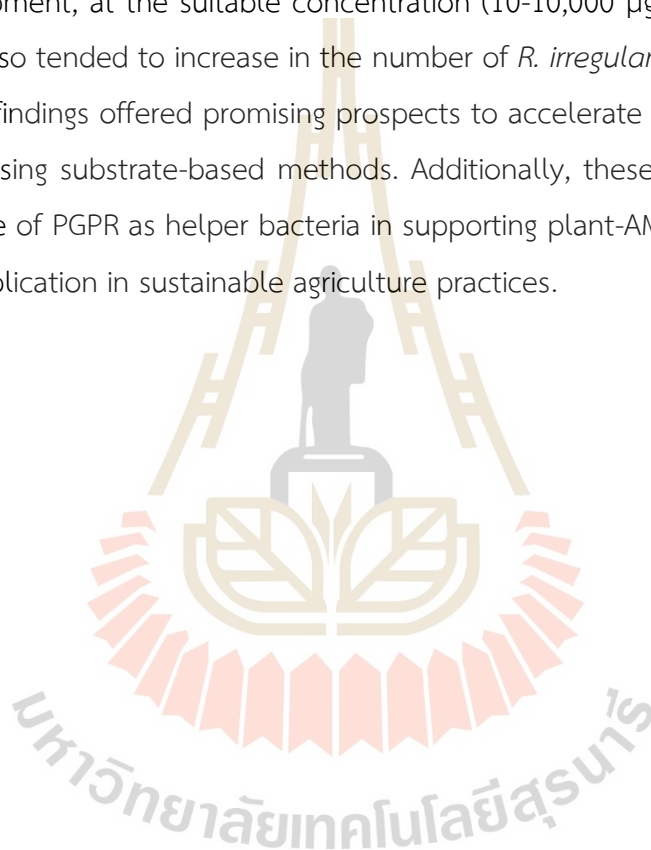
SUTEE KIDDEE : BIOTIC AND ABIOTIC APPROACHES TO DEVELOP METHOD FOR ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI SPORE PRODUCTION. THESIS ADVISOR : PANLADA TITTABUTR, Ph.D., 111 PP.

Keyword: Arbuscular mycorrhizal fungi/*Brevibacillus* sp. SUT47/*Bacillus velezensis* S141/LED light/Fatty acid

Biotic and abiotic approaches have been explored to enhance the efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spore propagation for the purpose of producing AMF inoculum to be used in agriculture. Among biotic approaches, the use of mycorrhization helper bacteria (MHB) is a technique that can boost AMF spore numbers when co-inoculated with AMF in host plants. In this study, some plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) had a positive effect on promoting fungal abundance under the substrate-based production system. Firstly, the secretion compounds from *Brevibacillus* sp. SUT47 were discovered to promote AMF spore production of *Acaulospora tuberculata* when co-inoculated on maize roots. The highest number of spores was produced when 360 mg of concentrated secretion compounds were applied which significantly increased the highest AMF spore number of 1,500 spores per plant at 120 days after inoculation. However, the application of whole cell bacteria still significantly promoted a higher number of AMF spores than that of co-inoculation with secretion compounds approximately at 2,000 spores per plant. Secondly, *Bacillus velezensis* S141 was found to promote *Rhizophagus irregularis* in symbiosis with *Lotus japonicus*. Co-inoculation with strain S141 positively influenced fungal growth and development, including AMF root colonization, spore number, and plant nutrient uptake during the tripartite interaction. Surprisingly, the ability of strain S141 to produce indole-3-acetic acid was not the key mechanism promoting this symbiosis. Nevertheless, S141 could penetrate into plant root cells and establish itself as an endophytic bacterium. Moreover, its presence induced the expression of marker genes related to the early phases of AMF colonization, nutrient uptake in host plants, and upregulation of AMF genes involved in cell cycle regulation.

Regarding abiotic approaches, Light Emitting Diode (LED) technology was employed specifically using a red and blue light ratio of 60:40, at a total light intensity of $300 \mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$ to promote *R. irregularis* colonization in maize (*Zea mays* L.) root. LED light demonstrated a significant acceleration in AMF spore production under the substrate-based condition. The AMF spore number of approximately 1,500 spores per plant was produced after 90 days after inoculation. Besides, the application of an appropriate concentration of myristic acid, a fatty acid required for AMF development, at the suitable concentration (10-10,000 μg) together with maize cultivation also tended to increase in the number of *R. irregularis* spore production.

These findings offered promising prospects to accelerate large-scale AMF spore production using substrate-based methods. Additionally, these findings highlight the potential role of PGPR as helper bacteria in supporting plant-AMF symbiosis and their potential application in sustainable agriculture practices.



School of Biotechnology
Academic Year 2023

Student's Signature Sutee Kiddee

Advisor's Signature [Signature]

Co-advisor's Signature N. J. W. O.

Co-advisor's Signature Nantana Pochul