พฤกษา หล้าวงษา : หลักการพื้นฐานทางความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลระหว่าง *Pseudomonas* และพืชอาศัยในการควบคุมเชื้อก่อโรคในพืช (MOLECULAR BASIS OF *PSEUDOMONAS*-HOST INTERACTIONS IN BIOCONTROL OF PHYTOPATHOGENS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง, 193 หน้า.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting *Pseudomonas* spp.) จากดินบริเวณรอบรากข้าว และข้าวโพด ใช้เทคนิค amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) ตรวจสอบความหลากหลายทางจีโนไทป์พบว่าสามารถจัดจำแนก *Pseudomonas* ได้ 2 กลุ่ม ตามชนิดของพืช โดยความสามารถของ *Pseudomonas* ในการควบคุมโดยชีววิธี และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทดสอบโดยการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาต่อเชื้อรา และแบคทีเรียก่อโรคในพืช ความสามารถในการสร้าง indole-3-acitic acid (IAA) และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน พบว่า *Pseudomonas* ที่ถูกคัดแยกมาจากดินบริเวณรอบรากข้าวนั้นมีความสามารถในการสร้าง IAA และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และแบคทีเรียก่อโรคในพืชสูงกว่า *Pseudomonas* ที่ถูกคัดแยกมาจากดินบริเวณรอบรากข้าวโพด การทดลองนี้บ่งชี้ว่ามี *Pseudomonas* หลากหลายไอโซเลตที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และช่วยควบคุมโรคพืชทั้งในข้าว และข้าวโพด ในการทดลองต่อไปแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ R31 ซึ่งคัดแยกมาจากดินบริเวณรอบรากข้าวในประเทศไทยที่มีความสามารถในการสร้าง IAA และมีความสามารถในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืชนั้นได้ถูกนำมาทดสอบหาความสามารถในการสร้างสารประกอบทุติยภูมิ เช่น pyoluteorin, pyrrolnitrin, hydrogen cyanide และ 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) จากนั้น ความสามารถในการผลิต DAPG ของสายพันธุ์ R31 ถูกทดสอบโดยเปรียบเทียบกับ *P. fluorescens* สายพันธุ์ F113 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิต DAPG ซึ่งคัดแยกมาจากดินบริเวณรอบรากต้นชูการ์บีทในประเทศไอร์แลนด์ ในการทดลองนี้แผนภูมิต้นไม้ที่สร้างจากยีน *phlD* และยีน housekeeping ถูกสร้างขึ้นเพื่อหาวิวัฒนาการของสายพันธุ์ R31 และการผลิต DAPG ของสายพันธุ์ R31 ถูกทดสอบโดยตรงด้วย HPLC และโดยอ้อมด้วยการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรายงานผล *phlA-gfp* ร่วมกับ RT-PCR ของยีน *phlA* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการผลิต DAPG ของสายพันธุ์ R31 นั้นต่ำกว่าสายพันธุ์ F113 ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *phlA-gfp* เป็นที่น่าสนใจว่าลำดับ และทิศทางโอเปอรอน *phl* ของสายพันธุ์ R31 นั้นเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับสายพันธุ์ F113 แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีจำนวนเบสแตกต่างกันในส่วนของ *phlA-phlF* intergenic ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่ากิจกรรมของโปรโมเตอร์ของ

ยีน *phlA* (*phlA* promoter) นั้นไม่ได้เป็นตัวชี้วัดที่ดีสำหรับการผลิต DAPG และอาจจะเกี่ยวข้องกับการที่สายพันธุ์ R31 ผลิต DAPG ได้ในระดับต่ำ นอกจากนี้อิทธิพลของ exudates ในแต่ละชนิดของพืชเจ้าบ้านยังถูกนำมาทดสอบถึงผลกระทบต่อยีน *phlA* ด้วย โดยพบว่าชนิดของพืชเจ้าบ้านเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน *phlA* ในสายพันธุ์ R31 เมื่อมีการเติม exudates จากรากข้าว นอกจากนั้นพบว่าสายพันธุ์ R31 และสายพันธุ์ F113 แสดงผลในการเป็นปรปักษ์กับเชื้อราก่อโรคพืช *Pythium* spp. ในต้นข้าว ยิ่งไปกว่านั้นการประยุกต์ใช้สายพันธุ์ R31 กับเมล็ดข้าวนั้นยังช่วยเพิ่มความสูงของต้นข้าว น้ำหนักแห้งต้น และรากข้าว ในขณะเดียวกันการประยุกต์ใช้สายพันธุ์ F113 กับเมล็ดข้าวนั้นให้ค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา พฤกษา หล้าวงษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

PHRUEKSA LAWONGSA : MOLECULAR BASIS OF *PSEUDOMONAS*-HOST INTERACTIONS IN BIOCONTROL OF PHYTOPATHOGENS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NEUNG TEAUMROONG, Dr. rer. nat., 193 PP.

PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA/*PSEUDOMONAS*/ 2,4-DIACETYLPHLOROGLUCINOL (DAPG)/RICE/MAIZE

The objective of this experiment was to investigate bacterial diversity in a wetland rhizosphere soil under rice (*Oryza sativa*) cultivation and a desiccated rhizosphere soil under maize (*Zea mays*) cultivation of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. The genotypic diversity of isolates was determined on a basis of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA). This analysis showed that both plant species selected for two distinct populations of *Pseudomonas*. The actual biocontrol of these strains was confirmed by bioassays on fungal and bacterial plant pathogens, and the plant growth promotion abilities of these strains were confirmed by indole-3-acetic acid (IAA) production and carbon source utilization. The ability to produce IAA and antagonistic activity of a selected group of pathogens of rhizosphere *Pseudomonas* was higher than maize rhizosphere *Pseudomonas*. This work clearly identified a number of isolates having the potential for being used as plant growth promotion and biocontrol agents on rice and maize. In the following experiment, *Pseudomonas fluorescens* R31 was isolated from rice rhizosphere in Thailand. This strain which had the ability to produce IAA and to control plant pathogens was selected to screen for the production of the secondary metabolites such as pyoluteorin, pyrrolnitrin, hydrogen cyanide and 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG). Then, DAPG

production by strain R31 was investigated in comparison with the DAPG production by DAPG-produced *P. fluorescens* strain F113 which was isolated from sugar beet rhizosphere in Ireland. In this study, the *phlD* gene tree and housekeeping genes tree were constructed to uncover the evolution of strain R31. DAPG production by strain R31 was investigated directly by high performance liquid chromatography (HPLC), and indirectly by quantifying the expression of a *phlA-gfp* reporter gene fusion and also by RT-PCR of *phlA*. The results revealed that DAPG produced by strain R31 was lower than that by strain F113, which is similar to the *phlA-gfp* expression. Interestingly, the same orientation of each gene in *phl* operon of strain R31 was found whereas many different nucleotides between strain R31 and F113 in *phlA-phlF* intergenic region were discovered. This information demonstrated that *phlA* promoter activity was not a good indicator of DAPG production and associated with the presence of low level of DAPG production by strain R31. Moreover, the effect of plant host exudates on *phlA* gene revealed that the host cultivar had a major influence on *phlA* gene expression in strain R31 in the rice exudates amendment. Furthermore, the result of *in vivo* antagonistic activity illustrated that *Pythium* spp. was suppressed by strains R31 and F113. In addition, the application of strain R31 on rice seeds showed significant increase in plant height, shoots dry weight and roots dry weight of rice while the application of strain F113 on rice seeds showed no significant differences when compared to those of the control.

School of Biotechnology

Academic Year 2010

Student's Signature Phrueksa Lawongsa

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature