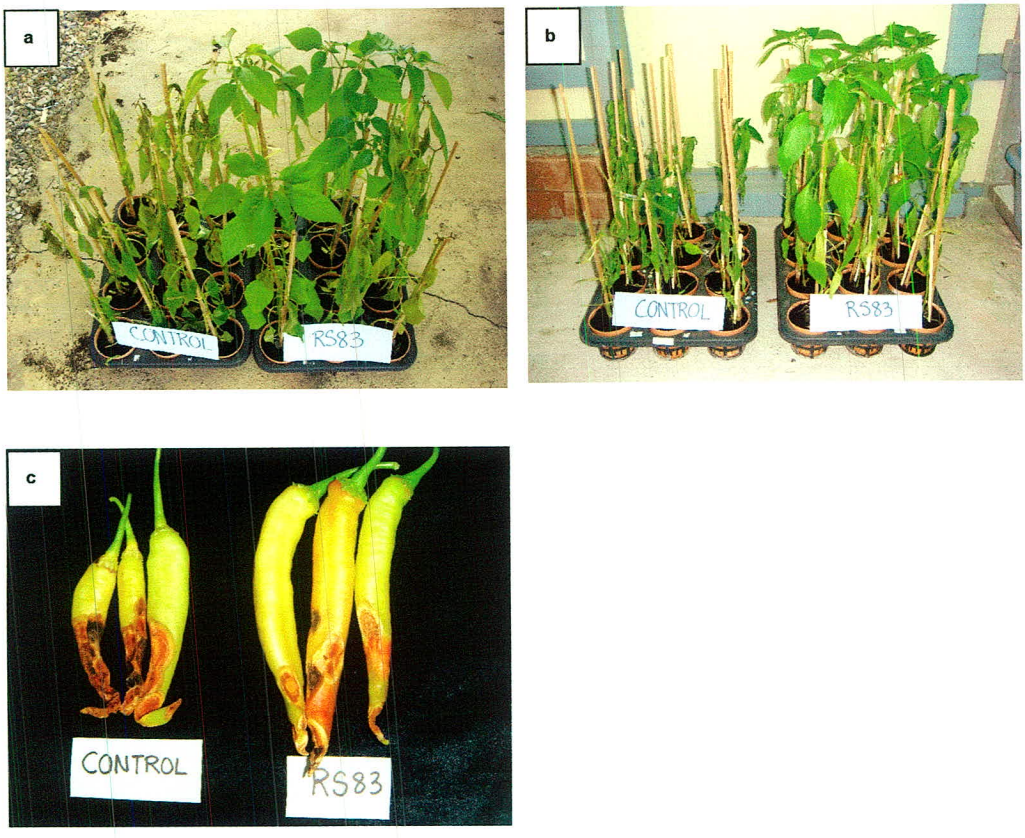
บทนำ

มีรายงานเกี่ยวกับตัวกำหนดของเชื้อไรโซแบคทีเรียหลากหลายชนิดที่มีผลต่อการกระตุ้นพืชต้านทานโรค ประกอบด้วยสารที่เชื้อแบคทีเรียปลดปล่อยออกมา เช่น กรดซาลิไซลิก (salicylic acid; SA) สารไซเดอร์โรฟอร์ สารปฏิชีวนะ และสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ (volatile organic compounds; VOC) รวมถึงองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรียคือ ไลโพโพลิแซกคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีตัวกำหนดของเชื้อไรโซแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหลากหลายชนิดทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ยกตัวอย่างเช่น ฮอร์โมน indole-3-acetic acid (IAA) ฮอร์โมน cytokinin ฮอร์โมน gibberellins สาร 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase สารซิเดอร์โรฟอร์ (siderophore) สารประกอบอินทรีย์ระเหย และกรดอินทรีย์ (organic acid) ที่เชื้อปลดปล่อยออกมา อย่างไรก็ตามตัวกำหนดของเชื้อแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นพืชต้านทานโรค หรือส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นนั้น เชื้อแบคทีเรียบางชนิดหรือบางสายพันธุ์อาจมีเพียงตัวกำหนดชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือตัวกำหนดหลายชนิดเกี่ยวข้องกับประโยชน์ที่พืชจะได้รับจากเชื้อแบคทีเรียชนิดของเชื้อ และชนิดของพืชที่ใช้ศึกษา

จากการศึกษาของผู้วิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อไรโซแบคทีเรีย *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 เป็นเชื้อที่แยกจากดินรอบรากพืชมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกของเกษตรกรตำบลบ้านกร่าง อำเภอเมือง จ.พิษณุโลก สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพริกได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 1) อีกทั้งเชื้อดังกล่าวสามารถกระตุ้นพริกต้านทานโรคได้หลากหลายชนิด อาทิเช่น โรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โรคเหี่ยวเขียวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ทั้งในเรือนทดลอง (รูปที่ 2) และแปลงปลูก (กัญชลี และ ศักดิ์ชัย 2552 รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายเกษตร) นอกจากนี้การทดสอบ *in vitro* antibiosis ระหว่างเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 กับเชื้อสาเหตุโรคพืชทั้งสามชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อสายพันธุ์ RS83 ไม่สร้างสารต้านจุลชีพ

ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคแต่อย่างใด ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ RS83 ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการกระตุ้นพืชให้สร้างภูมิคุ้มกันโรค หรือที่เรียกว่า “induced systemic resistance (ISR)

รูปที่ 1 ผลของเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 ที่มีต่อการส่งเสริมการเจริญของพริกชี้ฟ้าภายหลังราดเซลล์แขวนลอยของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ลงในกระถางพลาสติกที่บรรจุ soiless peat นาน 14 วัน



รูปที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 ในการกระตุ้นพริกชี้ฟ้าพันธุ์ชัญญา 111 ต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Sclerotrium rolfsii* (a) โรคเหี่ยวเขียวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (b) และ โรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (c) ในเรือนทดลอง

จากการศึกษาที่ผ่านมาตัวกำหนดของเชื้อที่มีบทบาทต่อการกระตุ้นพืชสร้างภูมิคุ้มกันโรค และ/หรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ส่วนใหญ่มักศึกษากับเชื้อไรโซแบคเรียที่อยู่ในจีนัส *Bacillus* และ *Pseudomonas* ยังมีการศึกษากันน้อยมากกับเชื้อไรโซแบคทีเรียจีนัสอื่นๆ โดยเฉพาะเชื้อ *Enterobacter asburiae* ซึ่งเป็นเชื้อไรโซแบคทีเรียธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อพืชทั้งสองด้าน ดังนั้นการศึกษาตัวกำหนดของเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นพืชต้านทานโรค และ/หรือ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้เกิดความเข้าใจกลไกเชิงลึกทางด้านวิทยาศาสตร์มากขึ้น

วัตถุประสงค์ที่ 1: เพื่อตรวจหาตัวกำหนดที่เป็นไปได้ของเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรคของพืช

1.1 ศึกษาความเกี่ยวข้องของ Lipopolysaccharide (LPS) ของเชื้อสายพันธุ์ RS83

1.1.1 *การสกัด lipopolysaccharide (LPS) จากเชื้อ Enterobacter asburiae สายพันธุ์ RS83*

ย้ายเชื้อสายพันธุ์ RS83 จากตู้แช่แข็งความเย็นยิ่งยวด (-80 องศาเซลเซียส) เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลวประกอบด้วย glucose ปริมาณ 10 กรัม; yeast extract (Difco) ปริมาณ 5 กรัม Casamino acids (Difco) ปริมาณ 1 กรัม; $(NH4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัม และ Na_2HPO_4 ปริมาณ 0.5 กรัม ต่อปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH=7.0 ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ โดยบ่มเชื้อในเครื่อง Environmental-Shaker Incubator ES-20 นาน 24 ชั่วโมง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปั่นเหวี่ยงเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ควบคุมอุณหภูมิได้ (SORVALL Biofuge Stratos, Kendro Laboratory Products, Geramany) ที่ความเร็ว 10,000*g* นาน 5 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้งโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเดิม ครั้งละ 5 นาทีก่อนเข้าสู่ขั้นตอน

การสกัด LPS ออกจากเยื่อหุ้มชั้นนอกของเซลล์แบคทีเรียโดยดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Uchida และ Mizushima (Agric. Biol. Chem. 51(11), 3107-3114, 1987) ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนแรก: ชั่งเซลล์เปียก (wet cells) ของแบคทีเรียประมาณ 0.2 กรัม (200 มิลลิกรัม) ใส่ลงในหลอดแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 10 มิลลิเมตรX 100 มิลลิเมตร เติมน้ำกลั่นสองครั้งที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 4.4 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 100mM Tris-HCl (pH 8.0) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร 0.5M $MgCl_2$ ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และ 8% Triton X-100 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปิดฝาหลอดให้แน่นก่อนแช่ในน้ำเดือดประมาณ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็ว 15,000*g* นาน 15 นาทีภายหลังสารเย็นลงแล้ว และล้างส่วนที่ตกตะกอน 1 ครั้งด้วย 10mM Tris-HCl (pH 8.0)-10mM $MgCl_2$ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร

ขั้นตอนที่สอง: เติมน้ำกลั่นสองครั้งที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตามด้วย 0.2M EDTA (pH 8.0) 2M NaCl และ 8% Triton X-100 อย่างละ 2 มิลลิลิตรลงไปในหลอดที่มีตะกอน จากนั้นคนสารให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ Vortex-Genie®2 รุ่น G560E (Scientific Industries, Inc., NY, USA) เติมเอนไซม์ proteinase K (20 μg/ml; Invitrogen, USA) และเอนไซม์ DNase I (20 μg/ml; Invitrogen, USA) บ่มไว้ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000*g* นาน 15 นาที ย้ายส่วนน้ำใสปริมาตร 6 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงชนิด Beckman (USA) ขนาดบรรจุปริมาตร 10.4 มิลลิลิตร

ขั้นตอนที่สาม: เติม 1M $MgCl_2$ ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นำสารละลายที่ปรากฏความขุ่นเล็กน้อยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 100,000*g* (32,000 rpm) ในเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (รุ่น Beckman Optima XL-90 Ultracentrifuge, IN, USA รูปที่ 3) ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เหลือเพียงตะกอนใสด้านล่าง เติมน้ำกลั่นสองครั้งที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแล้วคนให้ตะกอนใสกระจายตัวสม่ำเสมอ ทดสอบการปลอดเชื้อของสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 โดยการใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะแล้วลากลงบนอาหารแข็ง TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศา

เซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง TSA ก่อนนำสารสกัดหยาบ LPS เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวัดปริมาณสารสกัดหยาบ LPS และวิเคราะห์สารสกัดหยาบ LPS ต่อไป

รูปที่ 3 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงสำหรับใช้ตกตะกอน crude LPS ที่สกัดออกมาจากเชื้อสายพันธุ์ RS83

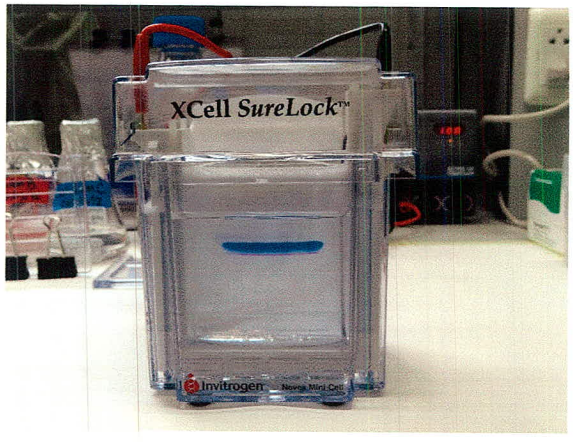
1.1.2 *การวัดปริมาณ Lipopolysaccharide (LPS)*

ผู้วิจัยใช้วิธีการ Thiobarbituric acid (เป็นวิธีที่พัฒนาโดย Waravdekar and Saslaw ในปีค.ศ. 1959) วัดปริมาณของ 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO) ที่ปรากฏตรงบริเวณ core oligosaccharide ของ LPS ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ใช้สาร 2-Keto-3-deoxyoctonate ammonium salt (Sigma-Aldrich, MO, USA) ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1µg ถึง 15µg เป็นสารมาตรฐานสำหรับใช้เป็นตัวเปรียบเทียบเพื่อวัดความเข้มข้นของของสารสกัดหยาบ LPS ที่แยกได้จากเชื้อสายพันธุ์ RS83 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Double Beam UV/Vis Spectrophotometer (OPTIZEN 3220UV; Korea)

ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ความเข้มของสีชมพูที่เกิดขึ้นภายหลังการทำปฏิกิริยาทางเคมีเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความปริมาณของ LPS

1.1.3 *การวิเคราะห์ LPS ด้วย Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

ปิเปตสารสกัดหยาบ LPS ที่แยกจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 ปริมาตร 16 ไมโครลิตรผสมกับ 5X sample buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากันโดยใช้ Vortex นำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 2,500 rpm ประมาณ 10 วินาที ก่อนต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 2,500 rpm อีก 10 วินาที ก่อนนำไปวิเคราะห์ LPS ด้วยเครื่อง XCell Surelock™ Mini-Cell Electrophoresis system (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) โดย load สารลงในช่องของ acrylamide gel ใช้ 15% SDS separating gel และ 5% stacking gel ภายใต้ reducing condition ที่ 100mA นานประมาณ 2-3 ชั่วโมง (รูปที่ 4) ย้อมเจลด้วยชุดน้ำยา SilverXpress® Silver Staining kit (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) ใช้ LPS บริสุทธิ์ที่สกัดจาก *Escherichia coli* 0127:B8 ความเข้มข้น 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, MO, USA) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ LPS ที่แยกออกมาจากสายพันธุ์ RS83



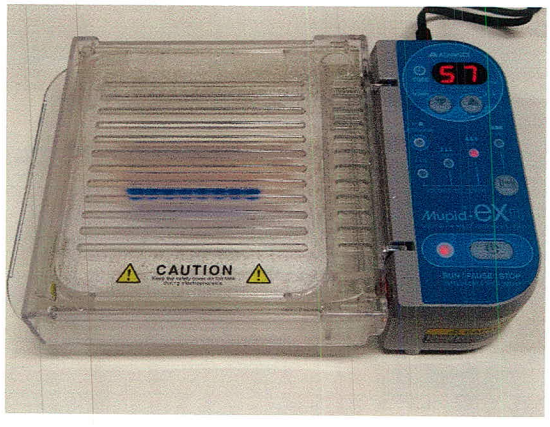
รูปที่ 4 การ run SDS-PAGE เพื่อวิเคราะห์ lipopolysaccharide ที่แยกออกมาจากเชื้อสายพันธุ์ RS83

1.1.4 *การตรวจสอบการปนเปื้อนโปรตีน และกรดนิวคลิอิก ในสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อสายพันธุ์ RS83*

ใช้วิธีทางชีวเคมีจำนวน 2 วิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของโปรตีนในสารสกัดหยาบ LPS ที่แยกจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 คือการทำปฏิกิริยาทางเคมีกับ Bradford reagent (Sigma-Aldrich, MO, USA) โดยเปรียบเทียบกับค่ากับกราฟมาตรฐานของสาร Bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, MO, USA) และการทำปฏิกิริยากับชุดตรวจสอบโปรตีน Quant-iT® Protein Assay Kits และตรวจวัดในเครื่อง Qubit™ fluorometer version 1.27 (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) ดังแสดงในรูป 5

ตรวจสอบการปนเปื้อนของกรดนิวคลิอิกโดยใช้เจล 1% agarose (รูป 6) ที่มี 1kb plus DNA ladder (Invitrogen, USA) เป็น marker เปรียบเทียบตำแหน่งของ DNA และ load เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml เป็น positive control ย้อมเจลด้วย SYBR® safe DNA gel stain (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) และส่องดูแถบ DNA ด้วยชุดถ่ายภาพและโปรแกรมวิเคราะห์ผล DNA (ยี่ห้อ vilber lourmat รุ่น E-BOX-1000/26Mi, Deutschland, Germany) นอกจากนี้ยังตรวจสอบการปนเปื้อนของกรดนิวคลิอิกด้วยชุด Quant-iT® dsDNA BR Assay Kit และตรวจวัดในเครื่อง Qubit™ fluorometer

รูปที่ 5 เครื่องมือ Qubit™ fluorometer และชุดตรวจสอบโปรตีน และ dsDNA

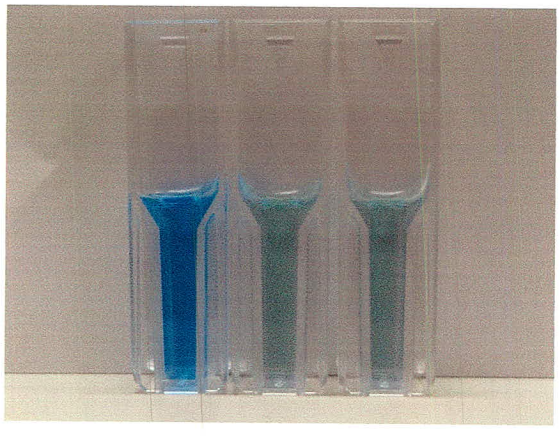


รูปที่ 6 การ run agarose gel เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของ DNA ในสารสกัดหยาบ LPS ที่แยกออกมาจากเชื้อสายพันธุ์ RS83

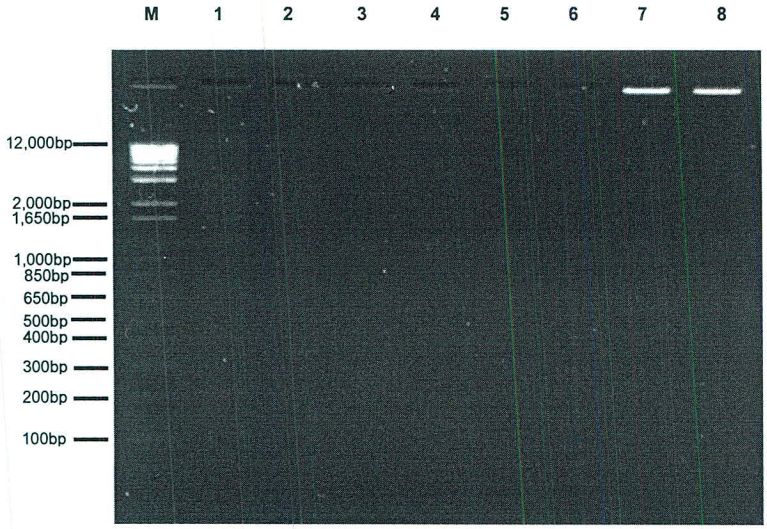
<u>ผลการศึกษา</u>

ไม่พบจุลินทรีย์เจริญบนอาหารแข็ง TSA ภายหลังการทดสอบสารสกัดหยาบ LPS ที่แยกจากสายพันธุ์ RS83 บนอาหารนาน 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบ LPS ที่แยกจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ เมื่อวัดปริมาณ LPS ในสารสกัดหยาบจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 พบว่ามีความเข้มข้นประมาณ 1,500µg/mL หรือ 15µg/10µl

ผลการวัดการปนเปื้อนโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ในสารสกัดหยาบ LPS ที่แยกจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 นั้นพบว่าค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง blank control และสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 มีค่าเท่ากันหรือสีของปฏิกิริยาใกล้เคียงกัน (รูปที่ 7) แต่เมื่อวัดด้วยเครื่อง Qubit fluorometer กลับพบว่ามีปริมาณโปรตีนปนเปื้อนเล็กน้อยประมาณ 4.5µg/mL สำหรับผลการวัดการปนเปื้อนกรดนิวคลิอิกด้วยการดูแถบกรดนิวคลิอิกบนเจล 1% agarose นั้น ไม่พบแถบกรดนิวคลิอิกปรากฏใน lane ของสารสกัดหยาบ LPS ที่แยกจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 (รูปที่ 8) แต่กลับพบการปนเปื้อนของกรดนิวคลิอิกจำนวนน้อยมากประมาณ 0.6µg/mL เมื่อวัดด้วยเครื่อง Qubit fluorometer หากคิดเป็นสัดส่วนของการปนเปื้อนในสารสกัดหยาบ LPS ที่แยกมาจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 พบว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนเพียง 0.3% และ ปนเปื้อนกรดนิวคลิอิกเพียง 0.04% จากปริมาตรรวมของสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อสายพันธุ์ RS83

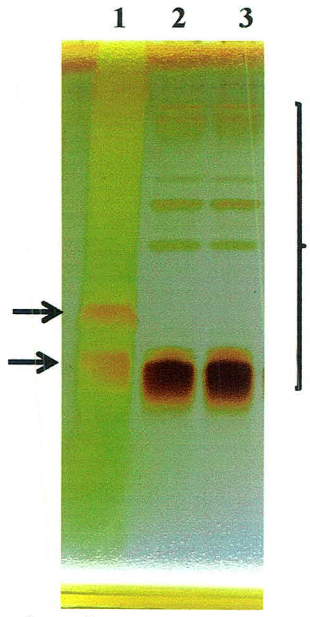


รูปที่ 7 ผลการทำปฏิกิริยาทางชีวเคมีของสาร Bovine serum albumin ความเข้มข้น 5µg (cuvette ซ้าย) น้ำกลั่น (cuvette กลาง) และสารสกัดหยาบ LPS จากเชื้อสายพันธุ์ RS83 (cuvette ขวา) ภายหลังการทำปฏิกิริยากับ Bradford reagent นาน 25 นาที



รูปที่ 8 การตรวจสอบการปนเปื้อนของ DNA ในสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 บนเจล 1% agarose (lane M=1kb plus DNA ladder marker; lane 1 และ 2=LPS บริสุทธิ์ที่สกัดจากเชื้อ *E. coli* 0127:B8 ปริมาณ 10 µg/lane; lanes 3-6=สารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ปริมาตร 10 µl/lane; lanes 7-8=เซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตของเชื้อสายพันธุ์ RS83

ผลของ SDS-PAGE แสดงให้เห็นแถบของ LPS แตกต่างกันระหว่าง LPS บริสุทธิ์ของเชื้อ *E coli* 0127:B8 และ สารสกัดหยาบ LPS จากสายพันธุ์ RS83 โดยที่ LPS ของเชื้อ *E. coli* ปรากฏเพียงสองแถบ ในขณะที่สารสกัดหยาบ LPS จากเชื้อสายพันธุ์ RS83 มีแถบใหญ่ที่สุดปรากฏด้านล่างของ lane และมีแถบเล็กๆ จำนวนหนึ่งปรากฏตรงกลาง และด้านบนของ lane (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 รูปแบบของแถบ LPS บริสุทธิ์ของเชื้อ *Escherichia coli* 0127:B8 (lane 1 ลูกศรชี้ด้านซ้าย; 15µg/lane) เปรียบเทียบกับรูปแบบของแถบ LPS (ในวงเล็บด้านขวา) ของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 (lane 2 และ 3) ที่ปรากฏบน 15% polyacrylamide gel ย้อมด้วยสารละลาย silver

1.1.5. *การทดสอบ in vitro bioassay ของสารสกัดหยาบ LPS ที่แยกจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 ในการกระตุ้นพืชต้านทานโรค*

โมเดลที่ใช้ทดสอบ plant-patho system คือผักกาดหอม (*Lactuca sativa*) และโรคเน่าเละที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* (Pcc) รูปแบบการทดลองคือการสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือกรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย LPS บริสุทธิ์ของเชื้อ *Escherichia coli* 0127:B8 ความเข้มข้น 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, MO, USA) แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซึ่งแต่ละซ้ำคือจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต้นผักกาดหอมจำนวน 10 ต้น/จาน ทำการทดสอบซ้ำอย่างน้อยสองครั้ง

ฆ่าเชื้อผิวเมล็ดผักกาดหอมในสารละลาย 1% sodium hypochlorite (1%NaOCl) นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วอย่างน้อย 3 ครั้ง ย้ายเมล็ดวางบนกระดาษกรองในจานอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว หยดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนกระดาษกรองพอชื้น บ่มเมล็ดในที่มืดอุณหภูมิห้องนาน 3 วัน ก่อนย้ายต้นกล้ามาเลี้ยงบนอาหารแข็ง 50% Murashige and Skoog (50%MS; *Phyto*Technology Laboratories®, KS, USA) ที่บรรจุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (90X15 มิลลิเมตร; BIOMED CO., LTD, Thailand) หยดสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 และ LPS บริสุทธิ์ของ *E. coli* 0127:B8 ปริมาณ 15µg/ต้น โดยหยดตรงรากพืชในแต่ละกรรมวิธี ส่วนกรรมวิธีควบคุมนั้นหยดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10µl บริเวณรากพืชต่อต้น ปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อและพันขอบจานอาหารด้านบนและด้านล่างด้วยพาราฟิมล์ก่อนย้ายจานอาหารวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน 5 วัน ตั้งระบบการให้แสงฟลูออเรสเซนส์ขนาด 18W กับพืชนาน 14 ชั่วโมง และไม่ให้แสงกับพืชนาน 10 ชั่วโมงต่อวัน ความชื้นสัมพัทธ์ 50-60% ควบคุมอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละ Pcc. ที่เจริญบนอาหารแข็ง TSA นาน 24 ชั่วโมงให้กับต้นผักกาดหอมทุกต้นภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรแทงเป็นบาดแผลเล็กน้อยบริเวณลำต้นพืชแต่ละต้นที่อยู่เหนือผิวอาหารแข็ง 50%MS ประมาณ 10 มิลลิลิตร จากนั้นใช้เข็มฉีดยาแตะโคโลนีของเชื้อ Pcc มาวางตรงตำแหน่งที่ทำบาดแผลเป็นหยดเล็กๆ (รูปที่ 10) ปิดฝาจานอาหารและพันขอบจานอาหารด้วยพาราฟิมล์ก่อนย้ายไปวางบนชั้นตามเดิม สังเกตและบันทึกการพัฒนาการเกิดโรคทุกวันภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคจนกระทั่งต้นพืชในกรรมวิธีควบคุมแสดงอาการเน่าเละทุกต้น

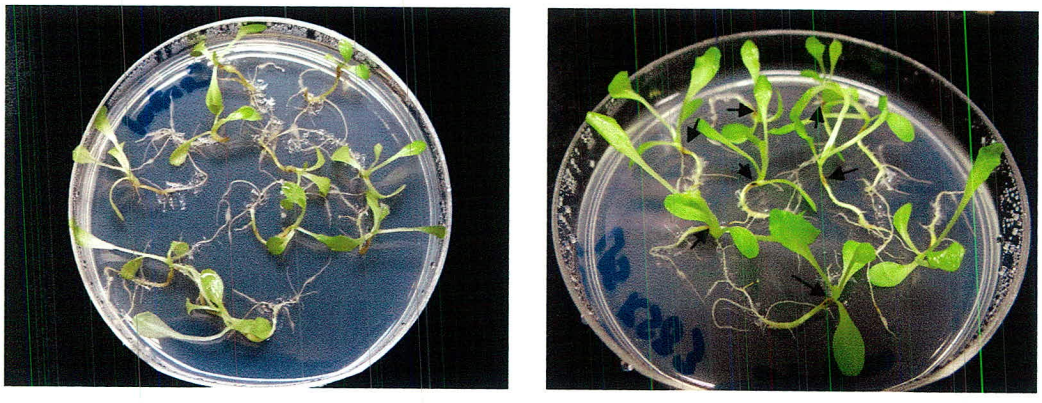
<u>ผลการศึกษา</u>

ต้นผักกาดหอมกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 แสดงอาการตายของเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำตาล (necrosis) เฉพาะบริเวณแผลที่ปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 24 ชั่วโมง ในขณะที่ต้นผักกาดหอมกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย LPS บริสุทธิ์ของเชื้อ *E. coli* และกรรมวิธีควบคุมยังปรากฏหยดของกลุ่มแบคทีเรียบริเวณแผลที่ปลูกเชื้อ ภายใน 24 ชั่วโมงต่อมา

บริเวณแผลที่ปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละของต้นผักกาดหอมทุกต้นในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 แสดงการแห้งของบาดแผลเป็นสีน้ำตาลคล้ำมากขึ้น แต่ไม่มีพัฒนาการของโรคถัดออกจากบริเวณที่ติดเชื้อ สำหรับกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย LPS บริสุทธิ์ของเชื้อ *E. coli* นั้นกลับพบว่าประมาณ 35% ของต้นพืชทดสอบแสดงอาการตายของเนื้อเยื่อตรงบาดแผล และมีลักษณะของอาการฉ่ำน้ำของเนื้อเยื่อถัดจากบริเวณที่ติดเชื้อเล็กน้อย ส่วนต้นผักกาดหอมกรรมวิธีควบคุมทุกต้นยังปรากฏหยดของกลุ่มแบคทีเรีย อีกทั้งมีพัฒนาการฉ่ำน้ำของเนื้อเยื่อที่อยู่ถัดจากบริเวณบาดแผลที่ปลูกเชื้อก่อโรคประมาณ 2 มิลลิเมตร

ต้นที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อเน่าเละเริ่มแสดงอาการครั้งแรกภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคให้กับพืชนาน 5 วัน อาการฉ่ำน้ำของเนื้อเยื่อบนลำต้นของผักกาดหอมในต้นที่อ่อนแอขยายไปยังลำต้นด้านบนและด้านล่างมากขึ้น และอีกสองวันต่อมาใบพืชทุกต้นของกรรมวิธีควบคุมเปลี่ยนเป็นน้ำตาลคล้ำและแสดงการเน่าเละ ส่วนพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย LPS บริสุทธิ์ของเชื้อ *E. coli* แสดงอาการเน่าเละประมาณ 95% ในขณะที่ต้นผักกาดหอมในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ยังเจริญเติบโตเป็นปกติ (รูปที่ 11 และ ตารางที่ 1) เมื่อติดตามการพัฒนาการของโรคกับต้นผักกาดหอมทุกกรรมวิธีอีก 3 วันพบว่ามีต้นพืชแสดงอาการเน่าเละเพียง 10 เปอร์เซนต์เท่านั้น ส่วนกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย LPS ของเชื้อ *E. coli* บริสุทธิ์แสดงการติดเชื้อ 100%

รูปที่ 10 แสดงการปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละ (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; Pcc) กับต้นพืชผักกาดหอม (สังเกตเห็นกลุ่มแบคทีเรียของเชื้อก่อโรคตรงลำต้นที่ปลูกเชื้อดังลูกศรชี้)



รูปที่ 11 ต้นผักกาดหอมกรรมวิธีควบคุมแสดงอาการเน่าเละทุกต้นภายหลังปลูกเชื้อ Pcc นาน 7 วัน (รูปซ้าย) เปรียบเทียบกับผักกาดหอมในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ซึ่งมีลักษณะเป็นปกติทุกต้น (รูปขวา) โดยแสดงอาการตายของเนื้อเยื่อบริเวณที่ปลูกเชื้อเท่านั้นดังลูกศรชี้

ตารางที่ 1 ผลของสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 ที่มีต่อการกระตุ้นผักกาดหอมต้านทานโรคเน่าเละซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *P. c.* subsp. *carotovora*

กรรมวิธี[w]	ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นที่แสดงอาการเน่าเละ[x]	
	7 วันภายหลังการติดเชื้อ	10 วัน ภายหลังการติดเชื้อ
กรรมวิธีควบคุม	10.00a[y]	10.00a
สารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อ RS83	0.00c	1.16b
LPS บริสุทธิ์ของเชื้อ *E. coli* 0127:B8	9.50b	10.00a
$LSD_{0.05}$	0.57	0.79

[w]แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย 3 ซ้ำโดยที่หนึ่งซ้ำคือจานอาหารบรรจุอาหารแข็ง 50%MS ที่มีต้นผักกาดหอมจำนวน 10 ต้น ปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละ Pcc ให้กับพืชภายหลังย้ายต้นกล้าเลี้ยงบนอาหารแข็ง 50%MS นาน 5 วัน

[x]เป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นที่แสดงอาการเน่าเละจากผลการทดลองสองครั้ง

[y]ตัวเลขที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยใช้การทดสอบ least significant difference (LSD)

1.1.6 *กิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคเน่าเละ*

เนื่องจากกิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และเอนไซม์ peroxidase (PO) มีรายงานวิจัยมากมายที่ชี้ว่าเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคพืช เพื่อพิสูจน์ว่า LPS ที่สกัดมาจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 สามารถกระตุ้นผักกาดหอมสร้างเอนไซม์ SOD และ/หรือ PO ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ (Pcc) หรือไม่ ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ *in vitro* bioassay system ในห้องปฏิบัติการโดยมีรูปแบบการทดลองเป็น completely randomized factorial designประกอบด้วย 4 กรรมวิธีคือ กรรมวิธีควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืช กรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืช กรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรคในระยะเวลาต่อมา และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย LPS บริสุทธิ์ของเชื้อ *E. coli* 0127:B8 แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรคในระยะเวลาต่อมา แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย 3 ซ้ำ โดยที่แต่ละซ้ำคือ

จานอาหารที่บรรจุอาหารแข็ง 50%MS ซึ่งมีต้นผักกาดหอมจำนวน 10 ต้น/จานอาหาร factor คือการเก็บตัวอย่างพืชมาสกัดเอนไซม์ในระยะเวลาต่างกัน คือ 0 24 48 และ 72 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ ทำการทดลองเพื่อทดสอบกิจกรรมเอนไซม์อย่างน้อย 2 ครั้ง

ฆ่าเชื้อผิวเมล็ดผักกาดหอม และล้างผิวเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเหมือนวิธีการดังที่ได้กล่าวไว้ในส่วนวิธีการศึกษาของ 1.1.5 ย้ายเมล็ดวางบนกระดาษกรองในจานอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว หยดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนกระดาษกรองพอชื้น บ่มเมล็ดในที่มืดอุณหภูมิห้องนาน 3 วัน ก่อนย้ายต้นกล้าเลี้ยงบนอาหารแข็ง 50%MS ที่บรรจุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 90X15 มิลลิเมตร หยดสารสกัดหยาบ LPS ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 หรือ LPS บริสุทธิ์ของ *E. coli* 0127:B8 (1 mg/ml) ปริมาณ 15µg/ต้น โดยหยดตรงรากพืชในแต่ละกรรมวิธี ส่วนกรรมวิธีควบคุมนั้นหยดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10µl บริเวณรากพืชต่อต้น ปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อและพันขอบจานอาหารด้านบนและด้านล่างด้วยพาราฟิมล์ก่อนย้ายจานอาหารวางบนชั้นเพาะเลี้ยงต้นพืชนาน 5 วัน ตั้งระบบการให้แสงฟลูออเรสเซนส์ขนาด 18W กับพืชนาน 14 ชั่วโมง และไม่ให้แสงกับพืชนาน 10 ชั่วโมงต่อวัน ความชื้นสัมพัทธ์ 50-60% ควบคุมอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละ Pcc. กับต้นผักกาดหอมทุกต้นภายใต้ตู้ปลอดเชื้อยกเว้นต้นพืชในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค สำหรับวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคทำโดยใช้ sterilize disposable syringe ขนาด 1 มิลลิลิตรที่มีเข็มตรงปลายแทงเป็นบาดแผลเล็กน้อยบริเวณกึ่งกลางของลำต้นพืชแต่ละต้นที่อยู่เหนืออาหาร 50%MS จากนั้นใช้ปลายเข็มแตะโคโลนีของเชื้อ Pcc เล็กน้อยที่เจริญบนอาหารแข็ง TSA นาน 24 ชั่วโมงมาแตะตรงตำแหน่งบาดแผล ปิดฝาจานอาหารและพันขอบจานอาหารด้วยพาราฟิมล์ก่อนย้ายไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงต้นพืชเหมือนเดิม

เก็บตัวอย่างพืชของแต่ละกรรมวิธีตามระยะเวลาที่กำหนดไว้ข้างต้นโดยใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดเนื้อเยื่อใบพืชบริเวณที่ติดกับก้านใบของแต่ละต้นซึ่งเป็นเนื้อเยื่อปกติอยู่เหนือตำแหน่งที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค แต่ละครั้งที่เก็บตัวอย่างพืชนำเนื้อเยื่อของพืชในกรรมวิธีเดียวกันมารวมกันแล้วสุ่มเลือกเนื้อเยื่อพืชชั่งน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัมใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อแล้ว ก่อนนำไปแช่เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อรอการสกัดเอนไซม์ในวันต่อไป

1.1.6.1 การสกัดและวัดปริมาณโปรตีนของพืช

นำตัวอย่างพืชที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียสออกมาแล้วเติมสารละลายแช่เย็น 0.1M Tris-HCl buffer (pH 6.0) ที่มีส่วนผสมของ 1% polyvinyl polypyrrolidone (Sigma-Aldrich, Inc, MO, USA) ในสัดส่วน 1:10 เท่าของน้ำหนักเนื้อเยื่อพืช บดเนื้อเยื่อพืชให้ละเอียดโดยใช้ sterile disposable polypolyrene pestle ความยาว 8.5 เซนติเมตร (Bel-Art Scienceware®, NJ, USA) ปั่นเหวี่ยงเนื้อเยื่อที่บดละเอียดแล้วในเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (SORVALL® Biofuge Stratos, Kendro Laboratory Products, Geramany) ความเร็ว 12,000*g* นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนน้ำใสด้านบนใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงอันใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

ตรวจวัดปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี colorimetric assay ด้วยเครื่อง DR/4000 Spectrophotometer (HACH Company, CO, USA) ซึ่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์หรือโปรตีนที่ใส่ลงไปในปฏิกิริยา ใช้ Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Inc, MO, USA) ความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารมาตรฐาน

1.1.6.2 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ SOD

วัดกิจกรรมเอนไซม์ SOD ในสารสกัดเอนไซม์ทั้งหมดโดยใช้ระบบ riboflavin/methionine ที่พัฒนาโดย Beauchamp and Fridovich (1971) บรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตรในหลอดแก้วขนาด 3 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 13 mM methionine, 75 µM nitroblue tetrazolium, 2 µM riboflavin และเอ็นไซม์ที่อยู่ในสารสกัด เติม riboflavin เป็นส่วนผสมสุดท้ายก่อนคนสารให้เข้ากัน เริ่มปฏิกิริยาโดยนำไปฉายแสงภายใต้หลอด fluorescent ขนาด 18 วัตต์ จำนวนสองหลอดเป็นเวลานาน 10 นาที เทส่วนผสมทั้งหมดในหลอดลง cuvette แล้ววัดกิจกรรมเอนไซม์ SOD รวม ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยที่หนึ่งหน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ SOD คือปริมาณที่ยับยั้ง photoreaction ของ nitro-blue tetrazolium ได้ 50% ภายใต้สภาวะของการทดสอบ

1.1.6.3 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ PO

วัดกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ในสารสกัดเอนไซม์ทั้งหมดโดยดัดแปลงวิธีการทดสอบจาก Hammerschimdt และคณะ (1982) ใช้ guaiacol เป็น hydrogen donor ทำปฏิกิริยาส่วนผสมปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตรใน cuvette ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 0.25%(v/v) guaiacol ใน 0.01M sodium phosphate buffer (pH 6.0) สารสกัดเอนไซม์ และ 0.1M H_2O_2 เติมสารสกัดเอนไซม์เป็นลำดับสุดท้ายเพื่อเป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา บันทึกการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 30 วินาที ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร นาน 2 นาที กิจกรรมของเอนไซม์แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงต่อนาทีของปริมาณโปรตีนทดสอบ 1 มิลลิกรัม สารเคมีที่ใช้ทดสอบทุกชนิดซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich, Inc.

1.1.6.4 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทุกชนิดโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) และใช้ Fisher's protected least significant difference (LSD) test ความเชื่อมั่น 95% ของโปรแกรม SAS (SAS Institute, Gary, NC, USA) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกรรมวิธีทดสอบ

ผลการศึกษา

กิจกรรมเอนไซม์ Superoxide Dismutase (SOD)

ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืช (0HAC) พบว่าพืชผักกาดหอมที่กระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบ LPS จากเชื้อสายพันธุ์ RS83 มีกิจกรรมเอนไซม์ SOD ทั้งหมดมากที่สุด ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญประมาณ 61% และ 92% เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย LPS บริสุทธิ์จากเชื้อ *E. coli* และกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคตามลำดับ แม้ว่ากิจกรรมเอนไซม์ SOD ทั้งหมดในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย LPS บริสุทธิ์จากเชื้อ *E. coli* จะมีมากกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุถึง 20% ก็ตาม แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติแล้วไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

กิจกรรมเอนไซม์ SOD ทั้งหมดของผักกาดหอมทุกกรรมวิธีเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละให้กับพืช ช่วงเวลาระหว่าง 24-72 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค พบว่า

พืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบ LPS จากเชื้อสายพันธุ์ RS83 มีกิจกรรมเอนไซม์ SOD ทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญประมาณ 33-43% และ 41-53% เมื่อเปรียบเทียบกับพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย LPS บริสุทธิ์จากเชื้อ *E. coli* และกรรมวิธีควบคุมตามลำดับ ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย LPS บริสุทธิ์จากเชื้อ *E. coli* มีมากกว่าในกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อก่อโรคแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สำหรับผักกาดหอมในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อสาเหตุโรคมีกิจกรรมเอนไซม์ SOD ทั้งหมดโดยธรรมชาติบางส่วนและเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป (ตารางที่ 2 และรูปที่ 12)

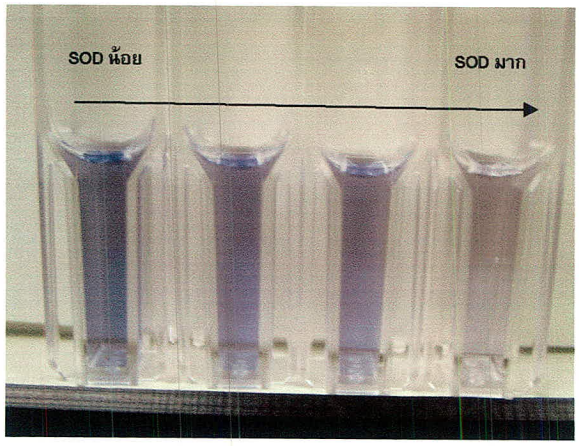
ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดหยาบ lipopolysaccharide (LPS) ที่แยกจากเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 ที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์ SOD ก่อนและหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) กับพืชผักกาดหอม

Treatment[w]	Total SOD activity/mg protein[x]			
	0HAC	24HAC	48HAC	72HAC
Nonchallenged control	78.35b[y]	88.46c	88.16c	95.51c
Challenged control	80.91c	172.63b	214.78b	305.06b
LPS สายพันธุ์ RS83	155.80a	264.61a	318.26a	414.61a
LPS บริสุทธิ์เชื้อ *E.* coli 0127:B8	96.51b	183.94b	225.31b	312.61b
$LSD_{0.05}$	20.17	29.91	32.61	28.49

[w]แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย 3 ซ้ำโดยที่หนึ่งซ้ำคือจานอาหารบรรจุอาหารแข็ง 50%MS ที่มีต้นผักกาดหอมจำนวน 10 ต้น ปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละ Pcc ให้กับพืชภายหลังย้ายต้นกล้าเลี้ยงบนอาหารแข็ง 50%MS นาน 5 วัน

[x]เป็นค่าเฉลี่ย total SOD activity จากผลการทดลองสองครั้ง (0HAC=0 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค; 24HAC=24 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค; 48HAC=48 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค; 72HAC=72 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค)

[y]ตัวเลขที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยใช้การทดสอบ least significant difference (LSD)



รูปที่ 12 แสดงผลของกิจกรรมเอนไซม์ SOD ที่มีอยู่ในสารสกัดจากพืชภายหลังการทำปฏิกิริยาโดยที่สีน้ำเงินที่จางลงเป็นสิ่งชี้วัดถึงปริมาณเอนไซม์ SOD ที่มีมากขึ้นในสารสกัดจากพืชทดสอบ ดังแสดงให้เห็นตามทิศทางของลูกศร

กิจกรรมเอนไซม์ Peroxidase (PO)

โดยทั่วไปพบว่าก่อนการปลูกเชื้อก่อโรคให้กับพืชนั้น ต้นพืชที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบ LPS จากเชื้อสายพันธุ์ RS83 และ LPS บริสุทธิ์จากเชื้อ *E. coli* มีกิจกรรมเอนไซม์ PO ทั้งหมดมากกว่าพืชในกรรมวิธีควบคุมทั้งสองกรรมวิธี

พืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบ LPS จากเชื้อสายพันธุ์ RS83 มีกิจกรรมเอนไซม์ PO ทั้งหมดมากกว่าประมาณ 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับพืชในกรรมวิธีควบคุมภายหลังการปลูกเชื้อ 24-48 ชั่วโมง และมากกว่าประมาณ 1.6 เท่าภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรคนาน 72 ชั่วโมง แม้ว่ากิจกรรมเอนไซม์ PO ทั้งหมดในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย LPS บริสุทธิ์จากเชื้อ *E. coli* มีมากกว่าในกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อก่อโรคก็ตาม แต่ทั้งสองกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างทางสถิติแต่อย่างใด ผักกาดหอมในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อก่อโรคมีกิจกรรมเอนไซม์ PO ทั้งหมดในระดับหนึ่งโดยธรรมชาติอยู่แล้ว อีกทั้งเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป (ตารางที่ 3 และรูปที่ 13)

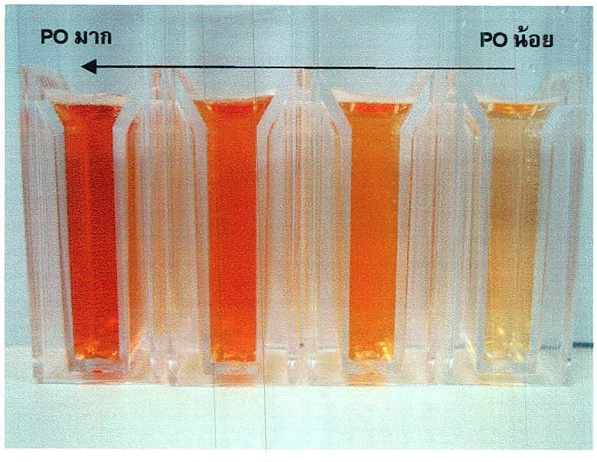
ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดหยาบ lipopolysaccharide (LPS) ที่แยกจากเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 ที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ PO ก่อนและหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) ให้กับพืชผักกาดหอม

Treatment[w]	Total Peroxidase activity/mg protein[x]			
	0HAC	24HAC	48HAC	72HAC
Nonchallenged control	7.33a[y]	9.06c	8.78c	9.72c
Challenged control	8.55a	10.77bc	27.32b	33.88b
LPS สายพันธุ์ RS83	10.85a	23.69a	52.39a	55.52a
LPS บริสุทธิ์เชื้อ *E.* coli 0127:B8	9.00a	18.51ab	34.30b	42.77ab
$LSD_{0.05}$	3.62	8.98	14.83	12.92

[w]แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย 3 ซ้ำโดยที่หนึ่งซ้ำคือจานอาหารบรรจุอาหารแข็ง 50%MS ที่มีต้นผักกาดหอมจำนวน 10 ต้น ปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละ Pcc ให้กับพืชภายหลังย้ายต้นกล้าเลี้ยงบนอาหารแข็ง 50%MS นาน 5 วัน

[x]เป็นค่าเฉลี่ย total peroxidase activity จากผลการทดลองสองครั้ง (0HAC=0 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค; 24HAC=24 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค; 48HAC=48 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค; 72HAC=72 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค)

[y]ตัวเลขที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยใช้การทดสอบ least significant difference (LSD)



รูปที่ 13 แสดงผลของกิจกรรมเอนไซม์ PO ที่มีอยู่ในสารสกัดจากพืชภายหลังการทำปฏิกิริยาโดยสีส้มที่เข้มขึ้นเป็นสิ่งชี้วัดถึงปริมาณเอนไซม์ PO ที่มีมากขึ้นในสารสกัดจากพืชทดสอบ ดังแสดงให้เห็นตามทิศทางของลูกศร

1.2 ศึกษาความเกี่ยวข้องของสารซิเดอร์โรฟอร์ (siderophore)

เชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 สามารถผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์บนอาหารแข็ง Chrome azurol S (CAS) โดยปรากฏรัศมีสีเหลืองส้มล้อมรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 14)

รูปที่ 14 การผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์ของเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 บนอาหารแข็ง CAS ปรากฏเป็นรัศมีสีเหลืองส้มล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเริ่มทำการกลายพันธุ์เชื้อเพื่อไม่ให้เชื้อผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์ จากนั้นทดสอบความสามารถของเชื้อชนิดกลายพันธุ์ในการกระตุ้นพืชต้านทานโรคในเรือนทดลองโดยเปรียบเทียบกับเชื้อชนิด wild type

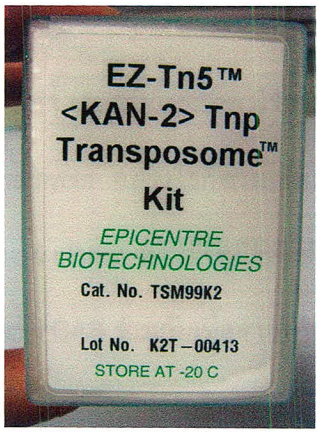
1.2.1 *การกลายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 โดยวิธี Transposon Mutagenesis*

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 ในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในตู้ orbital shaker (Stuart, model SI500, Keison Products, Essex, England) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 1 คืน จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีจนกระทั่งเชื้อมีความขุ่น (OD) ประมาณ 0.6-0.7 โดยวัดในเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เทเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียทั้งหมดลงในหลอด

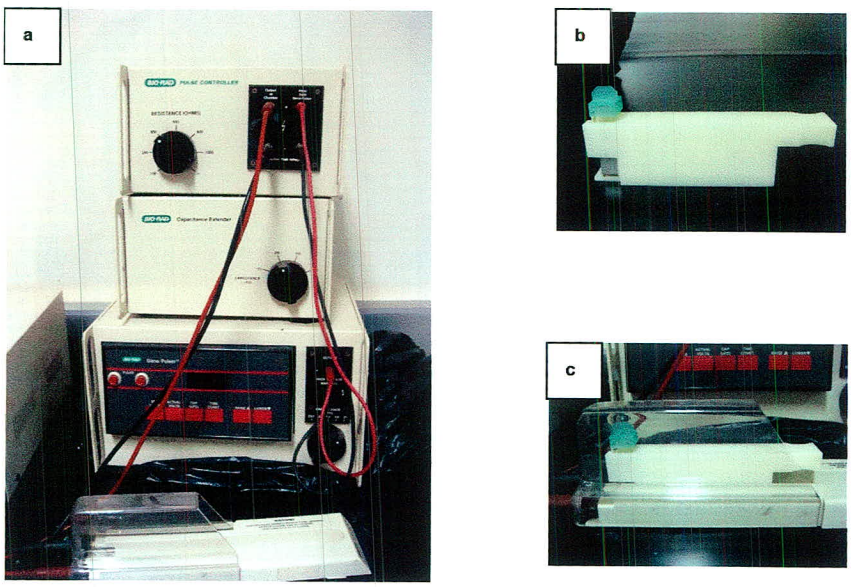
ปั่นเหวี่ยงปริมาตรความจุ 500 มิลลิลิตรภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500*g* อุณหภูมิ 4C นาน 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติม 10% glycerol ที่แช่เย็นในน้ำแข็งปริมาตร 200 มิลลิลิตรลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ปิเปตดูดของเหลวขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้ตะกอนเซลล์แบคทีเรียกระจายตัวสม่ำเสมอ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500*g* อุณหภูมิ 4C นาน 15 นาทีอีกครั้ง เพื่อล้างเซลล์แบคทีเรีย เท glycerol ออก และเติม 10% glycerol ที่แช่เย็นปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ปิเปตของเหลวขึ้นและลงเบาๆ อย่างรวดเร็ว เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียกระจายตัวสม่ำเสมอ แบ่งเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็น competent cells ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร และแช่ลงในไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็วก่อนนำไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งความเย็นยิ่งยวด (-80 องศาเซลเซียส) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

นำ competent cells ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ออกมาจากตู้แช่แข็ง (-80 องศาเซลเซียส) แล้วแช่ในภาชนะที่บรรจุน้ำแข็งจนกระทั่งเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียละลาย เติม EZ-Tn5^{TM}<KAN> Tnp Transposome^{TM} Kits ดังแสดงในรูปที่ 15 (EPICENTRE$^{®}$ Biotechnologies, Madison, WI, USA) ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงในหลอด microcentrifuge ภายในตู้ปลอดเชื้อ ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ เทส่วนผสมลงใน cuvette แช่เย็น (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). ที่มีช่องกว้างขนาด 2 มิลลิเมตร ทำการ Electroporation เซลล์แบคทีเรียโดยใช้อุปกรณ์ Gene Pulser II (รูปที่ 16; BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) ที่ 2.5 kV, 25 μF และ 400 Ω เติมอาหารเหลว SOC medium (ประกอบด้วย Bacto—tryptone 20กรัม; Bacto-yeast extract 5 กรัม; NaCl 0.5 กรัม; 1M KCl 2.5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ก่อนฆ่าเชื้อ และเติม 20 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อแล้วของ 1M glucose ก่อนใช้) ปริมาตร 900 ไมโครลิตรลงใน cuvette ทันทีภายหลังการทำ Electroporation จากนั้นรีบเทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อแล้วในตู้ปลอดเชื้อ บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อชนิด orbital shaker อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 60 นาที ปั่นเหวี่ยงที่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 10,000*g* นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วเติมอาหารเหลว TSB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงดังกล่าวภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ ปิเปตเบาๆ

เพื่อให้ตะกอนของ recombinant cells กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในอาหารเหลว ดูด recombinant cells ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงบนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA) ที่มีส่วนผสมของ kanamycin (50 µg/ml) เกลี่ยให้ทั่วผิวอาหารจนแห้ง บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ย้ายโคโลนีของเชื้อที่ปรากฏบนผิวอาหารแข็ง TSA ที่มีส่วนผสมของสารปฏิชีวนะ kanamycin ลงบนอาหารแข็ง CAS เพื่อคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่หมดความสามารถในการสร้างสารซิเดอร์โรฟอร์ต่อไป



รูปที่ 15 ผลิตภัณฑ์ EZ-Tn5™<KAN> Tnp Transposome™ Kits ที่ใช้สำหรับการทำ Tn5 Transposon mutagenesis ด้วยวิธี Electroporation



รูปที่ 16 เครื่อง Electroporator ที่ใช้สำหรับการทำ mutagenesis (a) แท่งพลาสติกที่มี cuvette ซึ่งมีส่วนผสมของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียสายพันธุ์ RS 83 และผลิตภัณฑ์ EZ-Tn5™<KAN> Tnp Transposome™ เสียบตรงช่องด้านซ้าย (b) และการเสียบแท่งพลาสติกเข้าไปในแท่นช้าตท์ก่อนกดปล่อยกระแสไฟ(c)

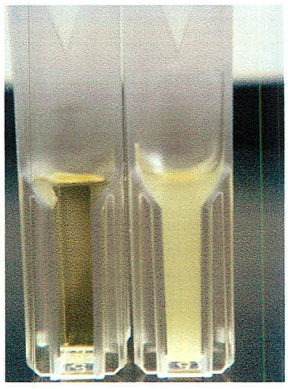
แม้ว่า clones อื่นๆ ที่เหลือของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ซึ่งผ่านการทำ electroporation แล้วยังสามารถผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์บนอาหารแข็ง CAS ก็ตาม อาจสัณนิษฐานได้ว่าผลิตภัณฑ์ EN-Tn5™<KAN> Tnp Transposome™ ไปแทรกตรงตำแหน่งยีนของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ที่ไม่มีผลต่อการผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์ ดังนั้นโคโลนีของเชื้อชนิดกลายพันธุ์ที่มีเพียงสีเหลืองจางๆ ล้อมรอบโคโลนีเพียงเล็กน้อยอาจมีลำดับยีนของผลิตภัณฑ์ EN-Tn5™<KAN> Tnp Transposome™ แทรกตรงตำแหน่งยีนของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ที่มีผลกระทบต่อการผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์

เก็บเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 ที่กลายพันธุ์ไว้ในตู้แช่เข็งความเย็นยิ่งยวดอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อพิสูจน์ตำแหน่งยีนของเชื้อที่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างสรารซิเดอร์โรฟอร์ต่อไป

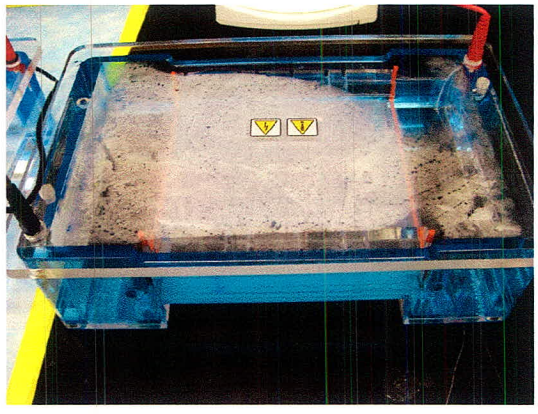
1.1.2 *การศึกษาตำแหน่งยีนของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ซึ่งมีผลกระทบต่อการผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์*

1.1.2.1 การเลี้ยงเชื้อและการสกัด genomic DNA (gDNA) ของเชื้อ RS83 ชนิดกลายพันธุ์

ย้ายเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS 83 ที่กลายพันธุ์ซึ่งเก็บไว้ใน -80 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหาแข็ง TSA และอาหารเหลว TSB ที่มีส่วนผสมของ kanamycin (50µg/ml) บ่มเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง บ่มเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวใน incubating orbital shaker 230V (VWR International, LLC, PA, USA) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 130 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ตรวจวัดความขุ่นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียให้ได้ประมาณ OD=1.00-1.20 โดยวัดในเครื่อง spectrophotometer ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (รูปที่ 19) สกัด gDNA ของเชื้อที่เลี้ยงทั้งบนอาหารแข็ง และอาหารเหลวโดยใช้วิธี CTAB standard operating procedure ของ DOE Joint Genome Institute (US Departmental of Energy, Office of Science) ทำการตรวจสอบ gDNA ด้วยการ run electrophoresis บนเจล 0.8% agarose ที่ 72Volt นาน 3 ชั่วโมง ใน 1xTAE buffer ใช้ 1kb DNA ladder (Blue/Orange loading dye; Promega, USA) เป็น Marker เปรียบเทียบตำแหน่งของการเคลื่อนที่ของ gDNA (รูปที่ 20)



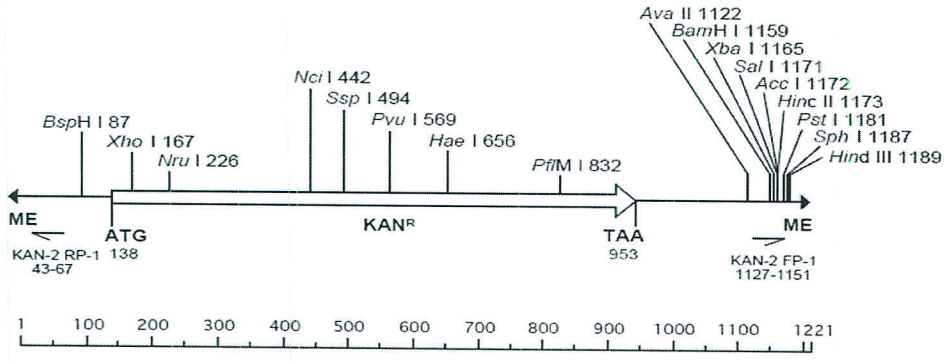
รูปที่ 19 ความขุ่นของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว TSB นาน 24 ชั่วโมง โดยมีความขุ่น OD^{600} =1.028 (ขวา) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB อย่างเดียว (ซ้าย)



รูปที่ 20 การ run electrophoresis ของ gDNA บนเจล 0.8% agarose ที่ 72V ใน 1x TAE buffer

1.2.2.2 Inverse polymerase chain reaction (IPCR)

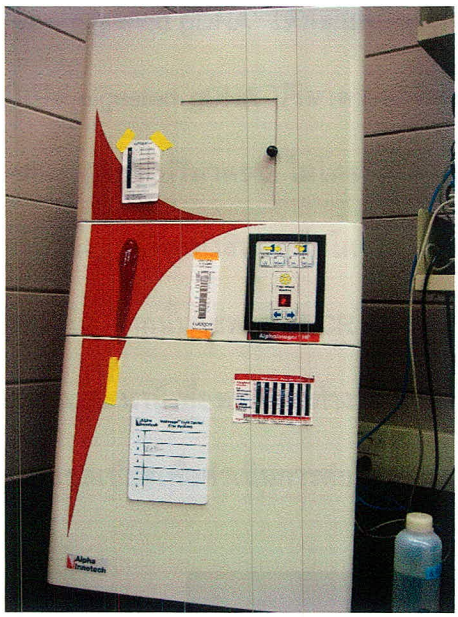
สิ่งจำเป็นที่สำคัญของวิธีการนี้คือการเลือก restriction enzyme ที่ตัดบ่อยครั้งเพื่อให้ได้ชิ้นส่วน gDNA ที่มีขนาดเล็กทำให้ง่ายต่อการ amplify ในปฏิกิริยาการทำ polymerase chain reaction (PCR) ในขั้นตอนต่อไป เอ็นไซม์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ Restriction enzyme ชนิด Pvu I (Invitrogen, USA) ที่ตัดเพียงตำแหน่งเดียวตรงลำดับเบสที่ 569 ของ EZ-Tn5^{TM} <KAN> Transposon ซึ่งแทรกใน genomic DNA ของเชื้อ RS83 (รูปที่ 21)

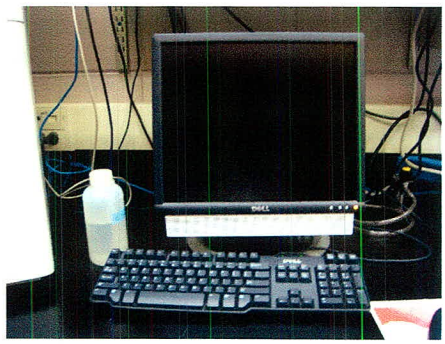


รูปที่ 21 ไดอะแกรมแสดง EZ-Tn5™ <KAN> Transposon ที่มีลำดับเบสทั้งหมด 1221 เบส และแสดงตำแหน่งที่ restriction enzymes ต่างๆ ที่สามารถตัดบริเวณ kanamycin resistant gene (KAN^R)ได้

1.2.2.2.1 การตัดชิ้นส่วน gDNA

ปิเปต gDNA ปริมาตร 4 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Restriction Enzyme Reaction Mix (Invitrogen, USA) ที่ประกอบด้วยเอ็นไซม์ Pvu I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10x buffer K ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 0.1%BSA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 12.0 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาในอ่างเก็บความร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นย้ายไปบ่มในอ่างเก็บความร้อนที่อุณหภูมิ 75-80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอ็นไซม์ Pvu I ตรวจสอบผลการตัดชิ้นส่วนของ gDNA โดยการ run electrophoresis บนเจล 0.8% agarose ที่ 200V ใน 1x sodium boric acid (SE) buffer นาน 1 ชั่วโมง หรือจนกระทั่ง DNA เคลื่อนมาประมาณ 2/3 ของเจล ย้อมเจลด้วย ethidium bromide นาน 20 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นสองครั้งนาน 10 นาที ส่องดูแถบ DNA ภายใต้แสง UV ในเครื่องอ่านเจล (AlphaImager® HP Imaging System; USA) (รูปที่ 22)



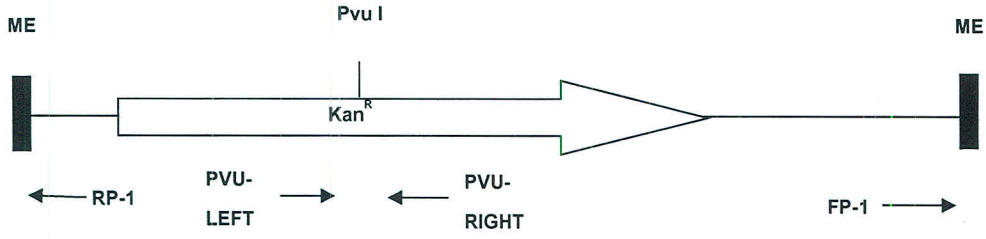


รูปที่ 22 เครื่องอ่านแถบ DNA AlphaImager® HP Imaging System (ซ้าย) และ คอมพิวเตอร์ที่เชื่อมต่อเพื่อดูแถบ DNA ที่ปรากฏบนจอภาพภายหลังการฉายแสง UV ในเครื่องอ่านเจล

1.2.2.2.2 การเชื่อมต่อ digested gDNA

ตกตะกอน digested gDNA โดยปิเปต digested gDNA ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นสองครั้งที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 15 ไมโครลิตร 3M sodium acetate buffer (pH 5.2) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ absolute ethanol ที่เย็นปริมาตร 70 ไมโครลิตร กลับหลอดปั่นเหวี่ยงขึ้นลงเพื่อคนสารให้เข้ากัน จากนั้นแช่หลอดปั่นเหวี่ยงในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงสารที่ความเร็วรอบ 18,000*g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เทส่วนน้ำใสออกให้เหลือแต่ตะกอน gDNA เติม 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วคนให้กระจายเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 rpm อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที เทส่วนน้ำใสออกอย่างระมัดระวัง ปล่อยให้ digested DNA แห้งสนิท โดยใช้ air dry หรือ vaccum จากนั้นเติมน้ำกลั่นสองครั้งที่ฆ่าเชื้อแล้ว หรือ TE buffer ปริมาตร 15-20µl

สำหรับการ amplify ลำดับ Tz-flanking ทั้งสองด้าน ดังแสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 24 แสดงองค์ประกอบของ Tz transposon-like ของ transposome ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ประกอบด้วย kanamycin resistance gene (KAN^R) ที่มี mosaic ends (ME) อยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของ Tn5 transposon และ primers ต่างๆ ที่ใช้สำหรับการทำ IPCR

เตรียมปฏิกิริยาก่อนที่จะนำไปใส่ในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาอัตโนมัติ Polymerase Chain Reactor (PCR) เพื่อให้สร้าง IPCR product จำนวน 2 products คือ Left-product และ Right product โดยมีปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

Reaction สำหรับผลิต IPCR left product		Reaction สำหรับผลิต IPCR right product	
Sterile water	9µl	Sterile water	9µl
Go-Green PCR mix	12µl	Go-Green PCR mix	12µl
KAN-2 RP-1 primer (10µM)	1.25µl	KAN-2 FP-1 primer (10µM)	1.25µl
PVU-LEFT primer (10µM)	1.25µl	PVU-RIGHT primer (10µM)	1.25µl
Ligated gDNA	1µl	Ligated gDNA	1µl
Total	25µl	Total	25µl

หมายเหตุ: Go-Green PCR mix และ primers ทั้งสี่ชนิด เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Invitrogen, USA

จากนั้นนำปฏิกิริยาทั้งสองไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR (Bio-Rad, USA; รูปที่ 25) โดยตั้งโปรแกรมเป็น Gradient PCR ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาดังนี้

Cycle 1 (1X) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสนาน 4 นาที

Cycle 2: (35X) Amplification ประกอบด้วย

Denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

Anneal ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที

Cycle 3: (1x) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

รูปที่ 25 เครื่องควบคุมปฏิกิริยาอัตโนมัติ (Polymerase Chain Reaction machine) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

1.2.2.3 การตรวจสอบ IPCR product และวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการลดการผลิตสารซิ-เดอร์โรฟอร์

นำ IPCR product ที่ได้ไปตรวจสอบโดยการ run electrophoresis บนเจล 0.8% agarose ใน 1xTBE buffer ที่ 100V เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง 25 นาที โดยใช้ 1kb DNA ladder (Blue/Orange loading dye; Promega, WI, USA) เป็น marker เพื่อใช้เป็นตัวชี้ตำแหน่งน้ำหนักโมเลกุลของ IPCR product ที่ได้ เมื่อพิสูจน์ว่าได้ IPCR product ภายหลังการ run agarose gel แล้วทำการ clean IPCR product ที่เหลือจากการ run electrophoresis ด้วย E.Z.N.A. Cycle-Pure Kits (Omega Bio-tek, GA, USA) วัดความเข้มข้นของ IPCR product ด้วยเครื่อง NanoDrop 1000 Spectrophotometer UV-VIS

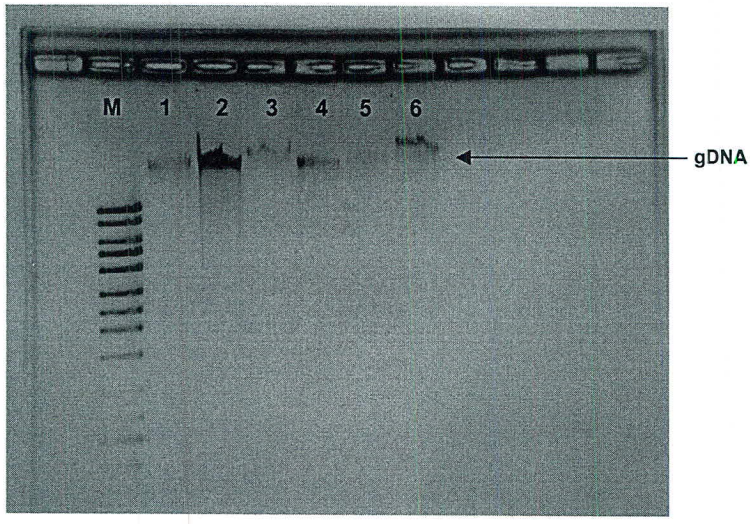
Protein Nucleic รุ่น V3.7 (Thermo Fisher Scientific Inc, DE, USA) ความยาวคลื่น 260 nm ดังแสดงในรูปที่ 26 ก่อนส่งไปsequence ลำดับ DNA ของ IPCR product ที่ Genomics and Sequencing Laboratory, Department of Biological Sciences, Auburn University, Alabama, USA โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI 3100 Genetic Analyzer นำข้อมูลที่ได้ไปประมวลผลข้อมูลด้วยโปรแกรม Chromas Pro version 1.5 (Technelysium Pty Ltd, MN, USA) จากนั้นส่งข้อมูลไปเปรียบเทียบกับลำดับ DNA กับฐานข้อมูล public translated DNA sequence ของ National Center for Biotechnology Information (USA) โดยใช้ฐานข้อมูลของ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

รูปที่ 26 เครื่อง NanoDrop 1000 Spectrophotometer UV-VIS Protein Nucleic ที่ใช้วัดความเข้มข้นของ IPCR product ก่อนส่งไปตรวจสอบลำดับ DNA ของ IPCR product

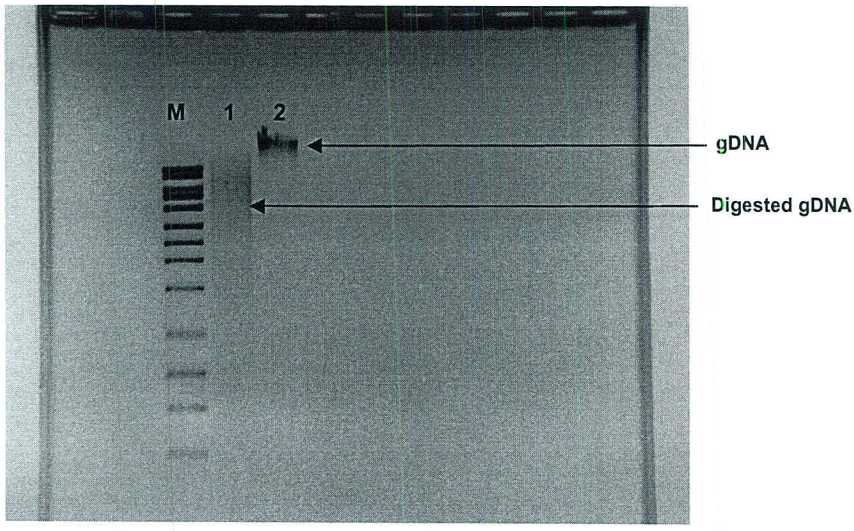
ผลการศึกษา

ภายหลังการ run electrophoresis พบว่า gDNA ซึ่งสกัดจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB มีปริมาณมากกว่า gDNA ที่สกัดจากเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA ดังแสดงในรูปที่ 27 ดังนั้น gDNA ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวจึงถูกนำไปใช้ในขั้นตอนของการตัดชิ้นส่วนของ gDNA ตรงตำแหน่ง kanamycin gene ลำดับเบสที่ 569 ด้วย restriction enzyme Pvu I

และพบว่าเอ็นไซม์ Pvu I สามารถตัดชิ้นส่วน gDNA ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 เป็นชิ้นเล็กๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีลักษณะเป็นปื้นลงมาตามช่องที่ load gDNA ในขณะที่ gDNA ของเชื้อที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ยังมีลักษณะเป็นแถบเดียวอยู่ด้านบนเนื่องจากมีโมเลกุลขนาดใหญ่จึงเคลื่อนที่ช้า (รูปที่ 28)

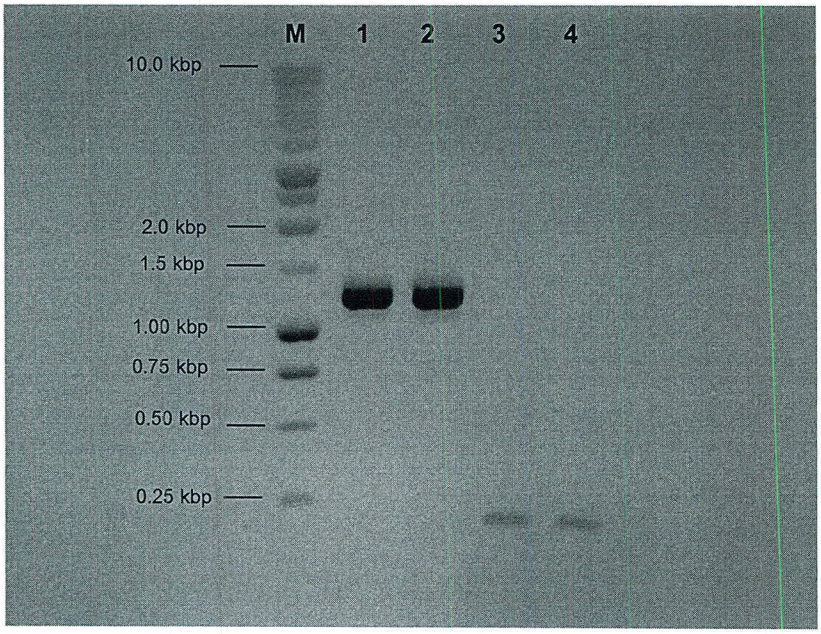


รูปที่ 27 Genomic DNA (gDNA) ของเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ภายหลังการ run electrophoresis บนเจล 0.8% agarose (M=1kb DNA ladder; Lane 1=gDNA ที่สกัดออกมาจากเชื้อซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA; Lane 2=gDNA ที่สกัดออกจากเชื้อซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว TSB; Lane 3-6=gDNA ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RS83)



รูปที่ 28 Digested gDNA ของเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์มีลักษณะเป็นปื้นลงมาภายหลังตัดด้วยเอ็นไซม์ Pvu I (Lane 1) ในขณะที่ gDNA ซึ่งไม่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ Pvu I มีลักษณะเป็นแถบเดียวอยู่ด้านบน (Lane 2) โดยมี 1kb DNA ladder เป็น marker (M) เปรียบเทียบ

เมื่อนำ Digested gDNA ที่ผ่านการเชื่อมด้วยเอ็นไซม์ T4 ligase ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเลสเสร็จสิ้นแล้ว และตรวจสอบโดย electrophoresis พบว่า IPCR left product ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง ligated gDNA template ฝั่งซ้าย กับ RP-1 primer PVU-LEFT primer และ Taq DNA polymerase เกิดเป็นแถบเดียวที่มีความเข้มของแถบชัดเจนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.3kbp ทั้งนี้อาจเป็นเพราะชิ้นส่วน ligated gDNA template ฝั่งซ้ายมีขนาดที่พอเหมาะทำให้ primer ทั้งสองเกาะจับและทำปฏิกิริยาได้ดีส่งผลให้เกิดการสร้าง product ในปริมาณที่มาก ในขณะที่ IPRC right product ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง ligated gDNA template ฝั่งขวา กับ FP-1 primer PVU-RIGHT และ Taq DNA polymerase เกิดแถบเล็กๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 250bp อาจเป็นเพราะชิ้นส่วนของ template มีขนาดที่เล็กเกินไปส่งผลให้เกิด product ที่มีโมเลกุลต่ำ ดังแสดงในรูปที่ 29

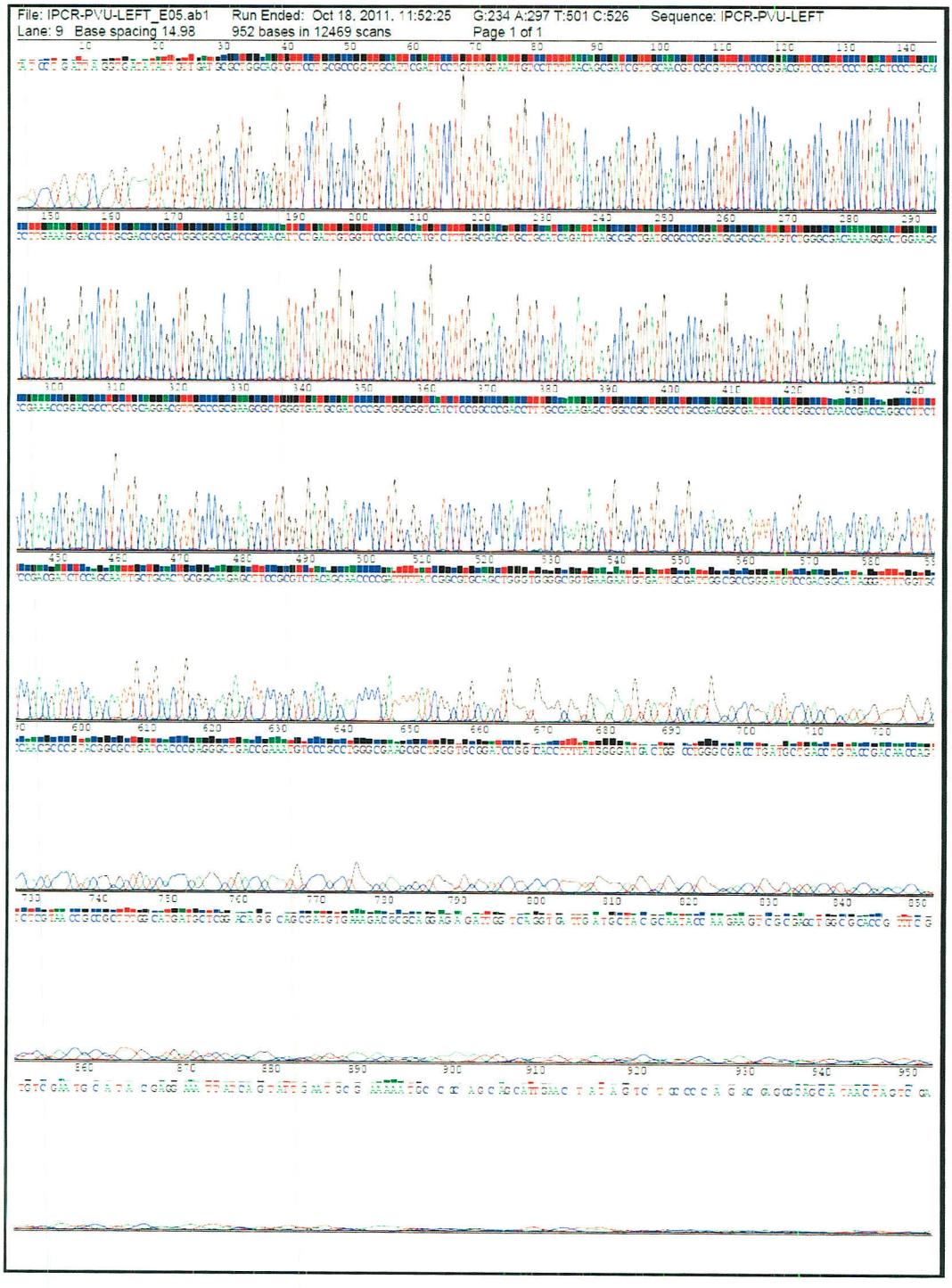


รูปที่ 29 แสดงผลการ run electrophoresis ของ IPCR products บน 0.8% agarose gel ที่ย้อมด้วย gel-red nucleic acid (M =1kb DNA ladder; Lane 1 และ 2 = IPCR product 1ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนลำดับเบสปลายด้านซ้ายของ transposon insertion โดยใช้ KAN-2 RP-1 primer และ PVU-LEFT primer; Lane 3 และ 4 = IPCR product 2 ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนลำดับเบสปลายด้านขวาของ transposon insertion โดยใช้ KAN-2 FP-1 primer และ PVU-RIGHT primer)

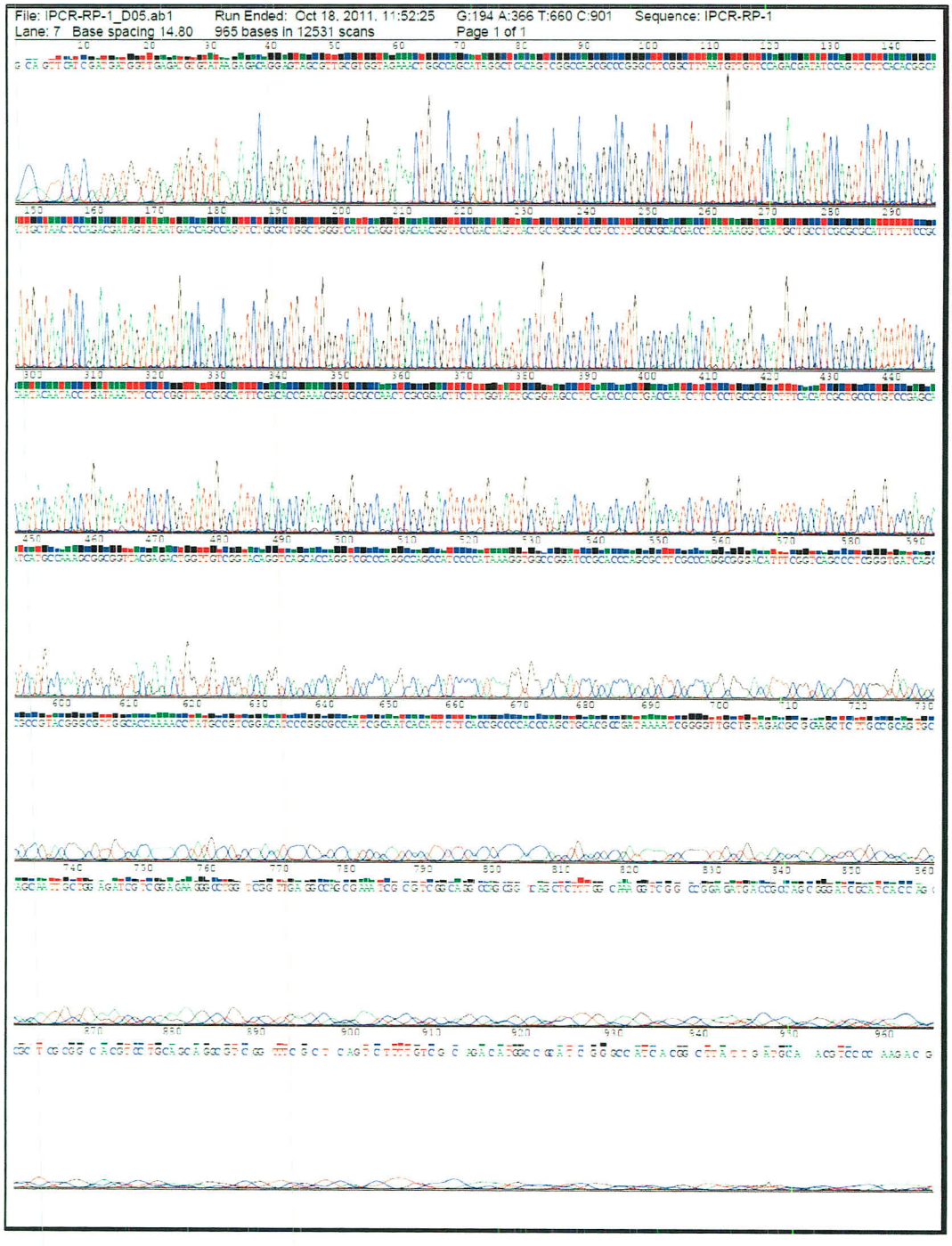
ภายหลังการนำ IPCR left product ปริมาตรที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสไปผ่านการ clean ด้วย Cycle-Pure Kits แล้วพบว่ามีความเข้มข้นของ DNA ประมาณ 60.4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มากพอสำหรับการส่งไป sequence ลำดับ DNA ซึ่งผลโครมาโตแกรมของ IPCR left product มีลักษณะที่ดีไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งอื่น ดังแสดงในรูปที่ 30 และ 31 จากนั้นรวมลำดับเบสของ IPCR-product ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของ primer ทั้งสอง (รูปที่ 32) ก่อนส่งข้อมูลไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบส DNA โดยใช้ฐานข้อมูลของ BLAST ซึ่งพบว่าลำดับเบสของ PCR product มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอ็นไซม์ Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD (P)+) ของเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ LF7a ประมาณ

98% ดังแสดงในรูปที่ 33 และ 34 ซึ่งเอ็นไซม์ดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการสร้างไขมันบริเวณ cytoplasmic membrane ของแบคทีเรีย

แม้ว่าผลิตภัณฑ์ EZ-Tn5^{TM} <KAN> Transposon ไม่ได้แทรกตรงตำแหน่งยีนที่เกี่ยวกับการผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์ของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ก็ตาม ผลการกลายพันธุ์ของเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ 83 ที่เกิดตรงยีน Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD (P)+) อาจมีผลต่อการควบคุมกระบวนการส่งผ่านสาร enterobactin ออกมาจากเซลล์ตรงบริเวณ inner membrane ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งถูกควบคุมโดย enterobactin transport system และอาจส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยปริมาณสาร enterobactin ออกมาน้อยกว่าเชื้อชนิด wild type



รูปที่ 30 แสดงโครมาโตแกรมลำดับเบสของ IPCR left product ที่ amplify โดย PVU-LEFT primer



รูปที่ 31 แสดงโครมาโตแกรมลำดับเบสของ IPCR right product ที่ amplify โดย KAN-2 RP-1 primer

>RS83

CATCGATGATGGTTGAGATGTGTATAAGAGACAGGAGTAGCGTTGCGTGGTAGAAACTGGC

CAGCATAGGCTCACAGTCGGCCAGCGCCCGGGCTTCGGCTTTAATGTTGTTCCAGACGATA

TCCAGTTCTTCACACGGCATTGCTAACTCCAGACGATAGTATAATGACCAGCCAGTTCTGCG

CTGGCTGGGTCATTCAGGTGACAACGGTTCCGACTAGTTACTGCTGCGCTCGTCCTTGCGC

GCACGACCTAATAAGGTCAATGCTGCCTCGCGCGCATTTTTTCCGCAATACAATACCTGATA

AATTTCCTCGGTTATTGGCATTTCGACACCGAAACGGTGCGCCAACTCGCGGACTTCTTTGG

TATTGCGGTAGCCTTCAACCACCTGACCAATCTTCTCCTGCGCGTCTTTCACATCGCTGCCC

TGTCCGAGCATCATGCCAAAGCGGCGGTTACGAGACTGGTTGTCGGTACAGGTCAGCAcCA

GGTCGCCCAGGCCAGcCATCCCCATtAAAGGTGgCCGGATCCGCACCCAGCGCTTCGCCCA

GGCGGGACATTTCGGTCAGCCCTCGGGTGATCAGCGCCGTACGGGCGTTGGCACCAAAAc

CCTATGCCGTCGGACATCCCGGCGCCAATCGCAATCACATTCTTCACCGCCCCACCCAGCT

GCACGCCGATtAAAATCGGGGTTGCTGTAGACGCGgAAGCTCTTGCCGCAGTGCAGCAATTG

CTGGAGATCGTCGGAGAAgGGCCTGGTCGGTTGAGGCCAGCGAAATCGCCGTCGGCAGGC

CAGCGGCCAGCTCTTTGGCAAAGGTCGGGCCGGAGATGACCGCCAGCGGGATCGCATCAC

CCAGCGCTTCGCGGGCAACGTCCTGCAGCAGGCGTCCGGTTTCGGCTTCCAGTCCTTTTGT

CGCCCAGACAATGCGCGCATCCGGGCGCATCAGCGGCTTAATCTGATGCAGCACGTCGCC

AAAGACATGGCTCGGAACCACAATCAGAATGTTGCGGCTGGCCGCCAGCGCGGTCGCAAG

GTCACTTTCAAGGTGCAGGGAGTCAGGGAACGGAACGTCCGGGAGAAACGCGACGTTGCA

ACGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACT

GCCAGCGCATCAACAA

รูปที่ 32 แสดงลำดับเบสทั้งหมดของ IPCR product ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของ KAN-2 RP-1 primer และ PVU-LEFT primer

BLAST ®

Basic Local Alignment Search Tool

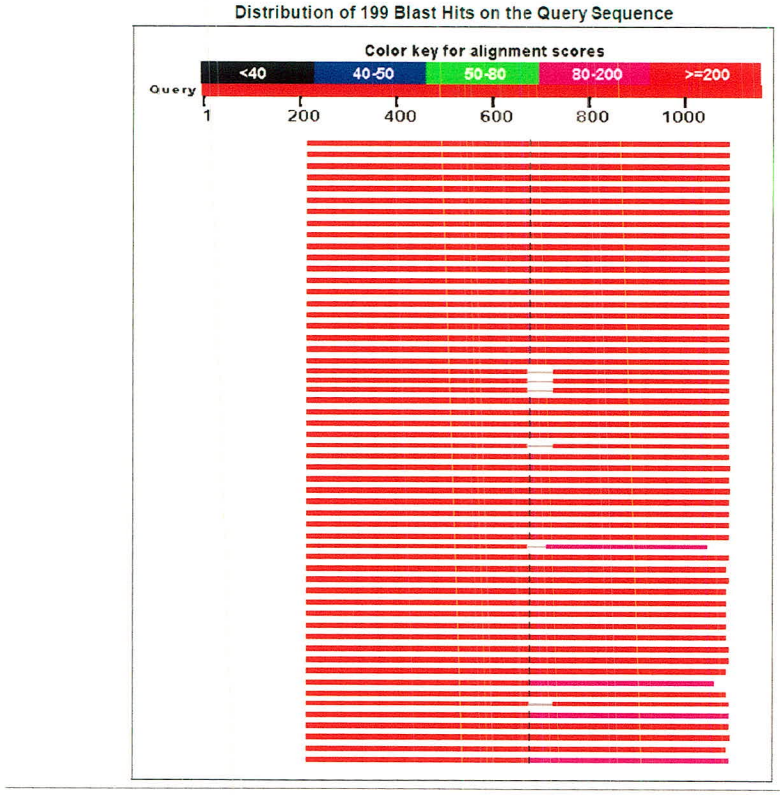
NCBI/ BLAST/ blastx/ **Formatting Results - 9XZ7HV1101R**
Formatting options
Download

Contig0

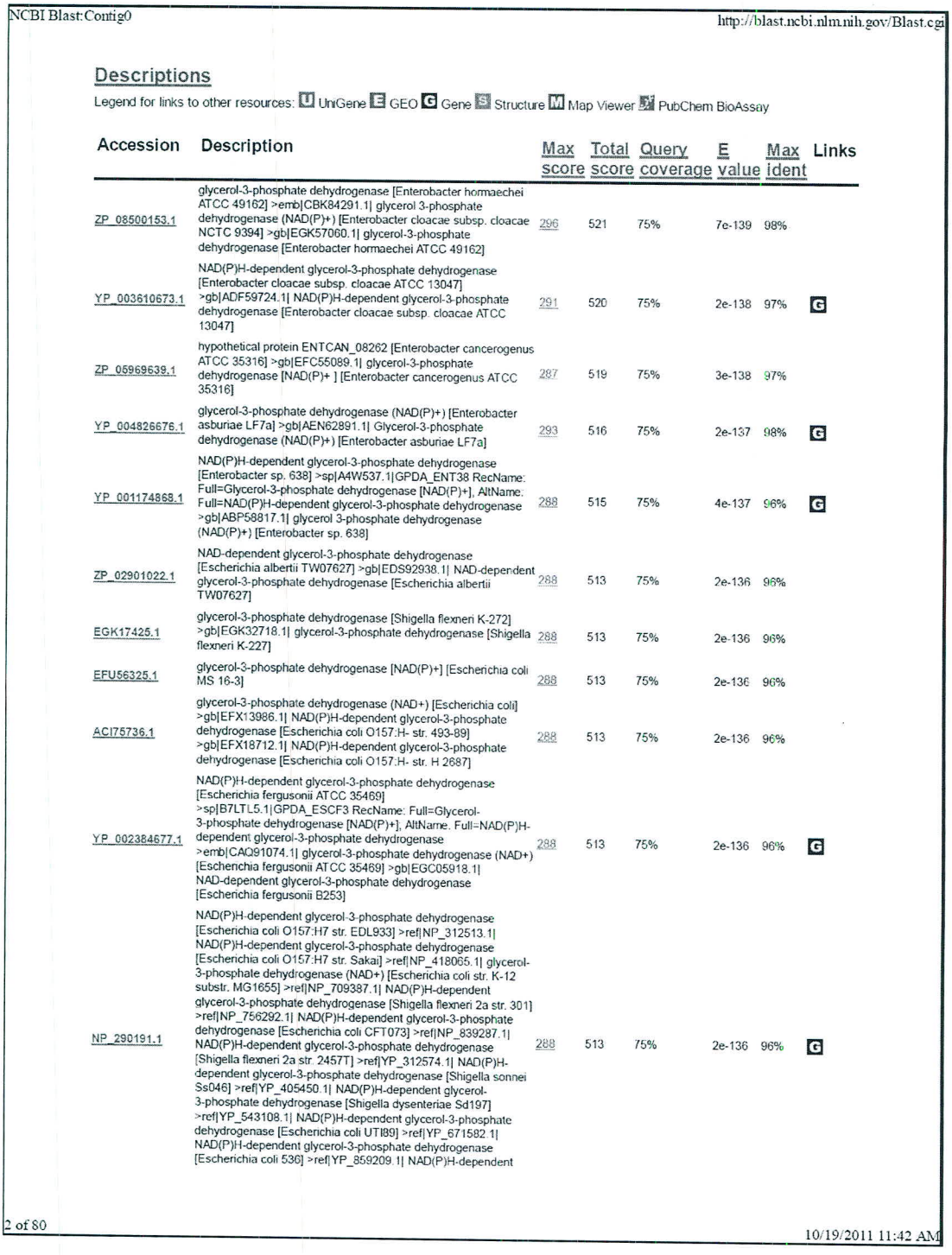
Query ID	lcl|54367
Description	Contig0
Molecule type	nucleic acid
Query Length	1153

Database Name	nr
Description	All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
Program	BLASTX 2.2.25+

Graphic Summary



รูปที่ 33 แสดงกราฟฟิคของลำดับเบส IPCR product ที่เหมือนกับลำดับเบสในฐานข้อมูล BLAST



NCBI Blast:Contig0 http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Descriptions

Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
ZP_08500153.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Enterobacter hormaechei ATCC 49162] >emb|CBK84291.1| glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)+) [Enterobacter cloacae subsp. cloacae NCTC 9394] >gb|EGK57060.1| glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Enterobacter hormaechei ATCC 49162]	296	521	75%	7e-139	98%	
YP_003610673.1	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Enterobacter cloacae subsp. cloacae ATCC 13047] >gb|ADF59724.1| NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Enterobacter cloacae subsp. cloacae ATCC 13047]	291	520	75%	2e-138	97%	G
ZP_05969639.1	hypothetical protein ENTCAN_08262 [Enterobacter cancerogenus ATCC 35316] >gb|EFC55089.1| glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+] [Enterobacter cancerogenus ATCC 35316]	287	519	75%	3e-138	97%	
YP_004826676.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)+) [Enterobacter asburiae LF7a] >gb|AEN62891.1| Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)+) [Enterobacter asburiae LF7a]	293	516	75%	2e-137	98%	G
YP_001174868.1	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Enterobacter sp. 638] >sp|A4W537.1|GPDA_ENT38 RecName: Full=Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+], AltName: Full=NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase >gb|ABP58817.1| glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)+) [Enterobacter sp. 638]	288	515	75%	4e-137	96%	G
ZP_02901022.1	NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Escherichia albertii TW07627] >gb|EDS92938.1| NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Escherichia albertii TW07627]	288	513	75%	2e-136	96%	
EGK17425.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Shigella flexneri K-272] >gb|EGK32718.1| glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Shigella flexneri K-227]	288	513	75%	2e-136	96%	
EFU56325.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+] [Escherichia coli MS 16-3]	288	513	75%	2e-136	96%	
ACI75736.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) [Escherichia coli] >gb|EFX13986.1| NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Escherichia coli O157:H- str. 493-89] >gb|EFX18712.1| NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Escherichia coli O157:H- str. H 2687]	288	513	75%	2e-136	96%	
YP_002384677.1	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Escherichia fergusonii ATCC 35469] >sp|B7LTL5.1|GPDA_ESCF3 RecName: Full=Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+], AltName: Full=NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase >emb|CAQ91074.1| glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) [Escherichia fergusonii ATCC 35469] >gb|EGC05918.1| NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Escherichia fergusonii B253]	288	513	75%	2e-136	96%	G
NP_290191.1	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933] >ref|NP_312513.1| NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai] >ref|NP_418065.1| glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655] >ref|NP_709387.1| NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Shigella flexneri 2a str. 301] >ref|NP_756292.1| NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Escherichia coli CFT073] >ref|NP_839287.1| NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Shigella flexneri 2a str. 2457T] >ref|YP_312574.1| NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Shigella sonnei Ss046] >ref|YP_405450.1| NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Shigella dysenteriae Sd197] >ref|YP_543108.1| NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Escherichia coli UTI89] >ref|YP_671582.1| NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Escherichia coli 536] >ref|YP_859209.1| NAD(P)H-dependent	288	513	75%	2e-136	96%	G

2 of 80 10/19/2011 11:42 AM

รูปที่ 34 ผลการประมวลลำดับเบสของ IPCR product ที่มีผลใกล้เคียงกับยีน Glycerol-3-phosphate dehydrogenase ของเชื้อต่างๆที่อยู่ในฐานข้อมูล BLAST

1.2.3 *การสกัด และวิเคราะห์สารซิเดอร์โรฟอร์ที่ผลิตออกมาจากเชื้อสายพันธุ์ wildtype และ mutant*

1.2.3.1 การสกัดสารซิเดอร์โรฟอร์

ย้ายเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type และชนิดกลายพันธุ์จากตู้แช่แข็งความเย็นยิ่งยวด (-80 องศาเซลเซียส) เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA ที่ไม่ผสม kanamycin (สำหรับชนิด wild type) และอาหารแข็ง TSA ที่ผสม kanamycin ความเข้มข้น 50μg/ml (สำหรับชนิดกลายพันธุ์) บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยการเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง TSA มาเลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB; Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (อาหารเหลว LB ที่ใช้เลี้ยงเชื้อชนิดที่กลายพันธุ์มีส่วนผสมของ kanamycin 50μg/ml) บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Environmental-Shaker Incubator ES-20; BIOSAN, Riga, Latvia) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ดูดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียจากอาหารเหลว LB ของเชื้อชนิด wild type และชนิดกลายพันธุ์ ชนิดละ 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลว the second basal (BM2) ปริมาตร 200 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร (อาหาร BM2 ประกอบด้วย 0.03M glucose, 0.04M K_2HPO_4, 0.022M KH_2PO_4, 0.007M $(NH_4)_2SO_4$ ที่มีส่วนผสมของ 0.5mM $MgSO_4$ ซึ่งเป็นอาหารที่มีเหล็กน้อย เติม 0.2 mM Shikimic acid (Merck;), 1mM methionine, 1μg/ml thiamine hydrochloride และ 50μM $FeSO_4$ $7H_2O$ ลงในอาหารเหลว BM2 ภายหลังการฆ่าเชื้อแล้ว (ปรับวิธีการจากกรรมวิธีของ Poole et al; 1990, Journal of Bacteriology, 172(12): 6991-6996) สำหรับอาหาร BM2 ที่ใช้เลี้ยงเชื้อชนิดกลายพันธุ์มีส่วนผสมของ kanamycin ความเข้มข้น 50μg/ml บ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะปลายของ log phase (ปรับวิธีการจาก Costa and Loper; 1994, Molecular Plant Microbe Interaction, 7(4):440-448)

ปั่นเหวี่ยงเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ควบคุมอุณหภูมิได้ (SORVALL Biofuge Stratos, Kendro Laboratory Products, Germany) ความเร็วรอบ 15,000*g* นาน

15 นาที เก็บส่วนน้ำใสเพื่อนำมาปรับค่า pH ด้วย 10N HCl ให้ได้ 2.5 (ดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Furrer et al., 2002, Molecular Microbiology, 44(5), 1225-1234) สกัดสารออกจากส่วนน้ำใสจำนวน 2 ครั้งด้วย ethyl acetate โดยใช้ปริมาตรระหว่างส่วนน้ำใส และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 (รูปที่ 35) นำส่วน ethyl acetate มากลั่นระเหยโดยใช้เครื่องกลั่นสารระเหยแบบหมุน (BÜCHI Rotavapor model R200, BÜCHI Labortechnik GmbH, Deutschland, Germany) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเพื่อกลั่น ethyl acetate ออกมาจากสารสกัด จนกระทั่งเหลือเพียงสารสกัดหยาบที่เป็นคราบสีน้ำตาลติดบริเวณด้านล่างของ evaporator flask (รูปที่ 36) ละลายคราบสีน้ำตาลออกจากบริเวณด้านล่างของ evaporator flask ด้วย absolute methanol (HPLC grade) ใส่ในขวดสีชาขนาดเล็ก และหากไม่วิเคราะห์สารทันทีให้เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography ต่อไป

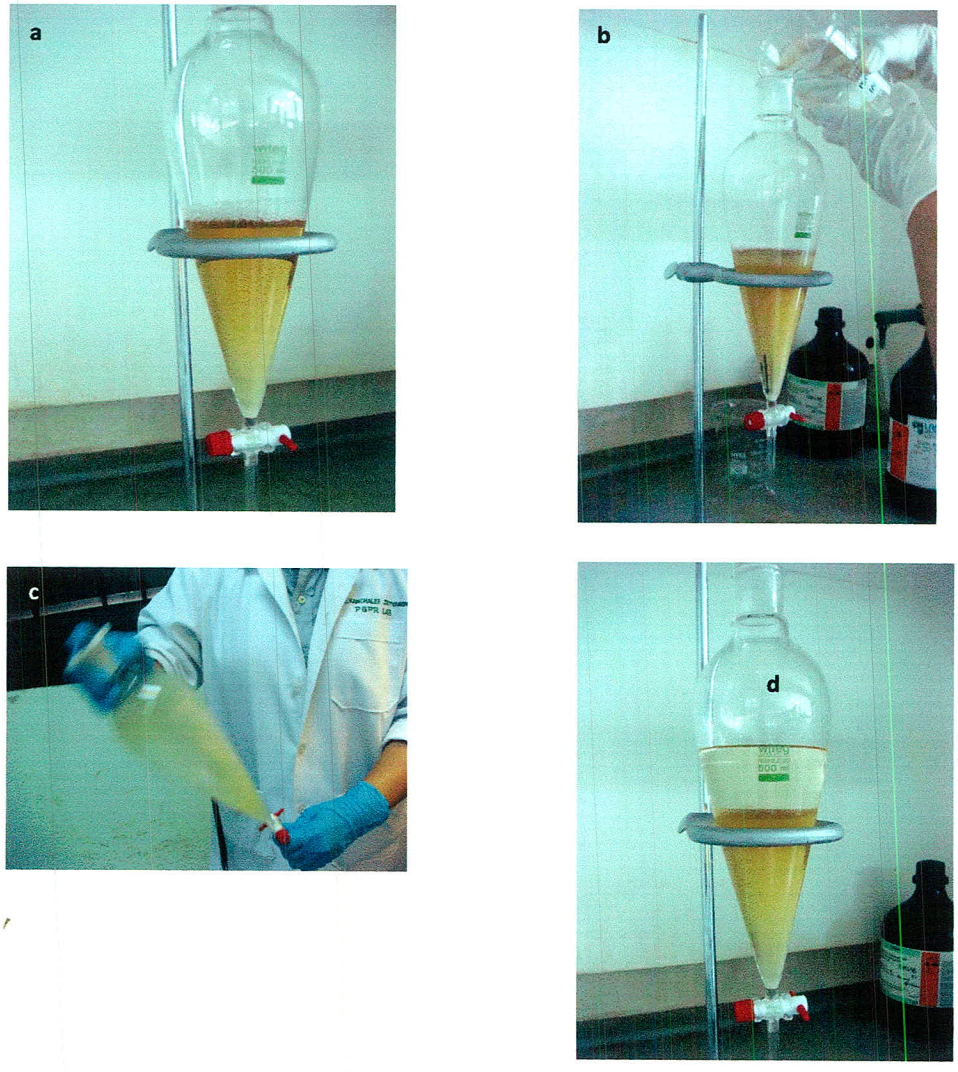
1.2.3.2 การวิเคราะห์ชนิดของสารซิเดอร์โรฟอร์

เจือจางสารสกัดหยาบที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อชนิด wild type ประมาณ 2,000 เท่า และชนิดกลายพันธุ์ประมาณ 500 เท่า ก่อนฉีดสารสกัดหยาบแต่ละชนิดปริมาตร 30 ไมโครลิตรเข้าไปในเครื่อง High Liquid Performance Chromatography (HPLC; รุ่น Shimadzu CLASS-VP V6.14 SP1, Tokyo, Japan) โดยผ่าน VertiSep™ Silica-Based IRS C18 HPLC column (3.9X300 mm, 10µm, Vertical Chromatography Co., Ltd, Thailand) สารสกัดหยาบในตัวอย่างจะถูกแยกออกมาโดยการนำพาของ solvent A (methanol ที่มีส่วนผสมของ 0.1% formic acid) และ solvent B (acetonitrile) ที่มีอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ fluorescence detector ที่ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 281 นาโนเมตร (excitation) และ ความยาวคลื่นที่ปลดปล่อย (emission) 340 นาโนเมตร เป็นตัวตรวจวิเคราะห์สาร enterobactin (ดัดแปลงวิธีการจาก Fiedler et al., 2001, FEMS Microbiology Letters 196: 147-151) ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

เจือจางสารมาตรฐาน enterobactin (รูปที่ 26) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/100 ไมโครลิตร ที่ผลิตโดย *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich; USA) ประมาณ 100 เท่าก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อใช้เป็น

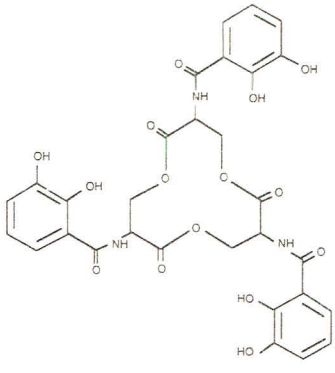
positive control เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบที่สกัดจากเชื้อ wild type และ mutant ของสายพันธุ์ RS83

หมายเหตุ: เครื่องแก้วทุกชิ้นที่ใช้ทำการทดลองต้องล้างด้วยสารละลาย 5% dichromate-sulfuric acid ล้างด้วยน้ำร้อน 1 ครั้ง และน้ำ deionized 1 ครั้ง



รูปที่ 35 แสดงขั้นตอนการสกัด enterobactin ออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ a) เริ่มจากการเทอาหารที่ปั่นเหวี่ยงแบคทีเรียออกไปและปรับ pH แล้วลงในกรวยแยกสาร b) เท ethyl acetate ตามลงไปในอัตราส่วน 1:1 c) เขย่ากรวยแยกสารเพื่อให้ส่วนผสมรวมตัวกัน d) การแยกชั้นของ ethyl acetate ออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการตั้งทิ้งไว้บน stand

รูปที่ 36 การกลั่นระเหย Ethyl acetate ออกจาก evaporator flask ไปยัง receiving flask (ภาพซ้าย) และสารสกัดหยาบปรากฏคราบน้ำตาลบริเวณด้านล่างของ evaporator flask ภายหลังการกลั่นระเหย ethyl acetate เสร็จสิ้นแล้ว (ภาพขวา)



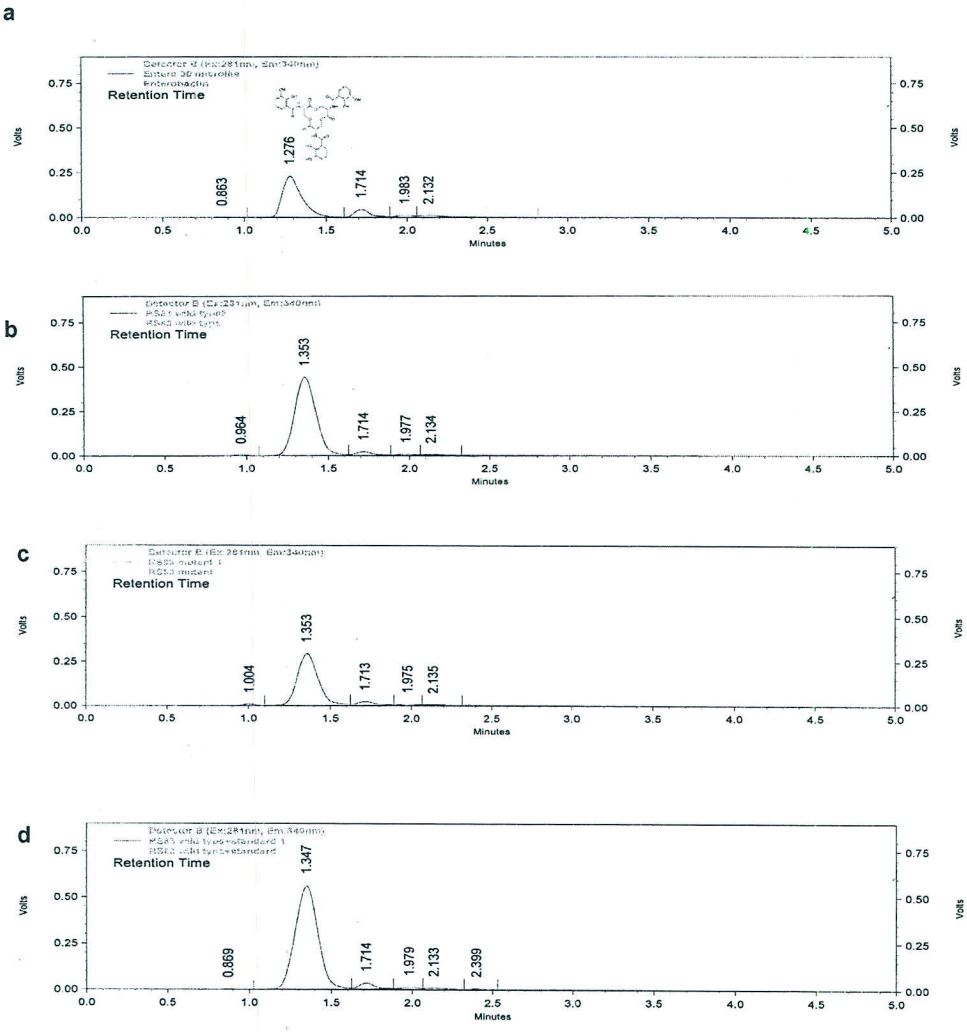
รูปที่ 37 โครงสร้างโมเลกุลของสารซิเดอร์โรฟอร์ชนิด enterobactin

ผลการศึกษา

พบว่าโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน enterobactin ปรากฏ peak เด่นจำนวน peak เดียวตรงตำแหน่ง retention time ที่ 1.276 มีพื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยประมาณ 1,876,413 คิดเป็น 78.68% ของพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด สำหรับสารสกัดหยาบจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อชนิด wild type ปรากฏ peak ที่เด่นอยู่ในตำแหน่ง retention time ที่ 1.355 มีพื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย 4,004,860 คิดเป็น 94.04% ของพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด ส่วนสารสกัดหยาบจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อชนิดกลายพันธุ์ปรากฏ peak ตรงตำแหน่ง retention time เช่นเดียวกับชนิด wild type โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย 2,578,051 คิดเป็น 90.47% ของพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด

แม้ว่าโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน enterobactin และโครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดไม่ตรงกันทีเดียวนัก เมื่อผสมสารมาตรฐาน enterobactin กับสารสกัดหยาบจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อชนิด wild type ในอัตราส่วน 1:2 และฉีดเข้าไปในเครื่อง HPLC กลับพบว่ามีโครมาโตแกรมปรากฏเด่นเพียง peak เดียว ตรงตำแหน่ง retention time ที่ 1.347 (รูปที่ 38) ซึ่งส่วนสูงของโครมาโตแกรมที่เพิ่มขึ้นมาตรง retention time ดังกล่าวน่าจะเป็นปริมาณของสารมาตรฐาน enterobactin ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อชนิด wild type และชนิดกลายพันธุ์น่าจะเป็น enterobatin

เมื่อคำนวณพื้นที่ใต้กราฟร่วมกับความเข้มข้นที่เจือจางของสาร enterobactin ที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type และชนิดกลายพันธุ์ เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานบริสุทธิ์ enterobactin เพื่อคำนวณความเข้มข้นเริ่มต้นของสาร enterobactin ที่เชื้อทั้งสองชนิดปลดปล่อยออกมายังอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว พบว่าเชื้อชนิด wild type ปลดปล่อย enterobactin ออกมาประมาณ 12.805 มิลลิกรัม ในขณะที่เชื้อชนิดกลายพันธุ์ปลดปล่อยออกมาเพียง 2.06 มิลลิกรัม ซึ่งน้อยกว่าชนิด wild type ประมาณ 83.90% จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงความสอดคล้องกับการปลดปล่อยสาร enterobactin ของเชื้อทั้งสองชนิดบนอาหารแข็ง CAS ที่ปรากฏในรูปที่ 17 ข้างต้น



รูปที่ 38 การวิเคราะห์ HPLC ของ enterobactin ที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 a) โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานบริสุทธิ์ enterobactin ที่ผลิตโดย *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) b) โครมาโตแกรมสารสกัดหยาบจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อชนิด wildtype c) โครมาโตแกรมสารสกัดจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อชนิด mutant d) โครมาโตแกรมของส่วนผสมระหว่างสารสกัดจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type และสารมาตรฐานบริสุทธิ์ enterobactin

1.2.4 *การทดสอบความสามารถของเชื้อชนิด wild type และ ชนิดกลายพันธุ์ในการกระตุ้นพืชต้านทานโรคในสภาพเรือนทดลอง*

ทำการทดสอบในเรือนทดลองกับพืชสองชนิดคือพริกชี้ฟ้า และมะเขือเทศ โดยแยกการทดสอบพืชทั้งสองชนิดออกจากกัน แต่ละพืชมีรูปแบบการทดลองคือ Randomized complete block design ประกอบด้วย 3 กรรมวิธีคือ กรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ โดยที่หน่วยการทดลอง หรือ ซ้ำคือกระถางพลาสติกที่บรรจุต้นพืช 1 ต้น

ย้ายเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type (ผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์) และ ชนิดกลายพันธุ์(ลดการผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์ 80%) จากตู้แช่แข็งความเย็นยิ่งยวดอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Environmental-Shaker Incubator ES-20; BIOSAN, Riga, Latvia) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อชนิด mutant มีส่วนผสมของ kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (SORVALL Biofuge Stratos, Kendro Laboratory Products, Germany) ความเร็วรอบ 10,000*g* อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสออกล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร)

แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าพันธุ์หนุ่มขาว และมะเขือเทศพันธุ์ลูกท้อ (บริษัทเจียไต๋ ประเทศไทย) ในสารละลาย 2% NaOCl นาน 5 นาทีเพื่อฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ด ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งเมล็ดให้แห้งก่อนแช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียชนิด wild type และชนิดกลายพันธุ์ นาน 60 นาที จากนั้นปลูกเมล็ดในถาดเพาะกล้าพลาสติกชนิด polystylene ที่บรรจุ soilless peat ที่ฆ่าเชื้อแล้วในเรือนทดลอง ส่วนกรรมวิธีควบคุมนั้นแช่เมล็ดในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วก่อนปลูกลงในถาดเพาะกล้า

พลาสติก ย้ายต้นกล้าอายุ 10 วันปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้วที่บรรจุ soilless peat ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อต้นพืชอายุ 1 เดือน ราดเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียชนิด wild type และชนิดกลายพันธุ์ (10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อกระถาง สำหรับกรรมวิธีควบคุมราดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อกระถาง อีก 14 วันต่อมาปลูกเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง (Southern blight disease) ที่เจริญบนอาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA) นาน 5 วันกับต้นพืชทุกกรรมวิธีโดยตัดชิ้นวุ้นเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 10 ตารางมิลลิเมตร วางบนผิวของ soilless peat โดยให้ชิ้นวุ้นชิดลำต้นด้านล่างของพริกชี้ฟ้า และมะเขือเทศ พร้อมปักเข็มหมุดตรงกลางวุ้นเพื่อป้องกันไม่ให้วุ้นออกห่างลำต้นพืช สังเกตและบันทึกจำนวนต้นพืชที่ติดเชื้อและแสดงอาการโรคทุกวันจนกระทั่งต้นพืชในกรรมวิธีควบคุมทุกต้นแสดงอาการติดเชื้อ

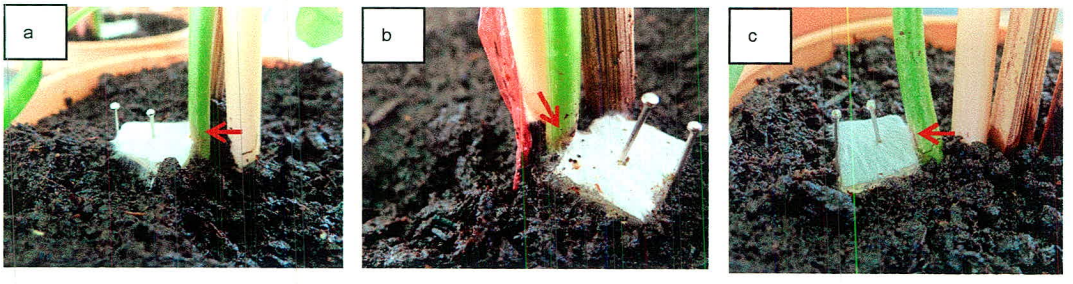
นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) แยกความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนต้นพืชที่ติดเชื้อของแต่ละกรรมวิธีโดยใช้ Fisher's protected least significant difference (LSD) ที่ $P \leq 0.05$ และที่ $P \leq 0.01$ ภายหลังการเสร็จสิ้นการทดลองแรกทำการทดสอบกับพืชทั้งสองชนิดซ้ำอีกครั้ง

ผลการศึกษา

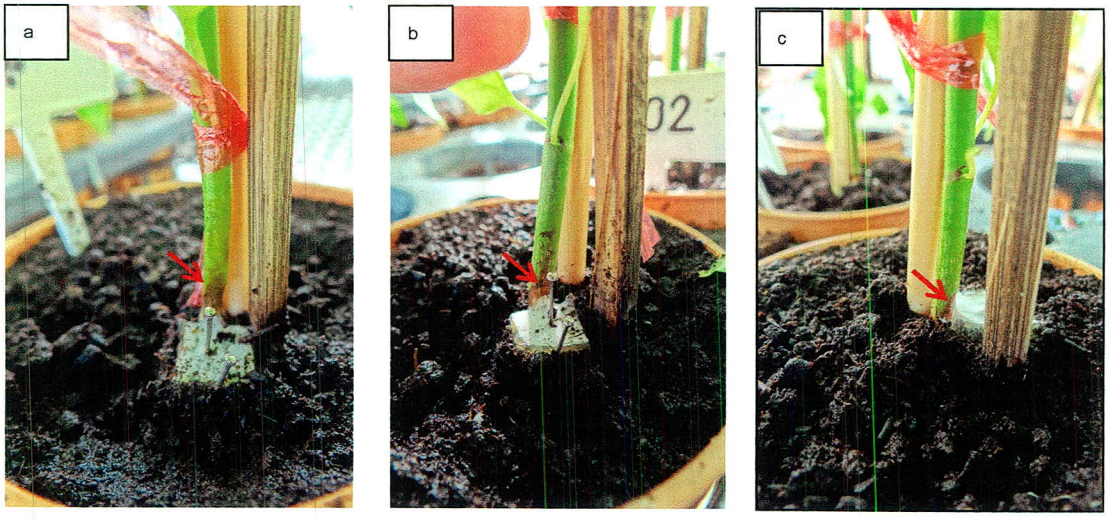
โรคเหี่ยวเหลืองของพริกชี้ฟ้า

ภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคให้กับพริกชี้ฟ้าเพียง 24 ชั่วโมง พบว่าเนื้อเยื่อลำต้นด้านล่างของพริกชี้ฟ้าที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *S. rolfsii* ในกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ ส่วนใหญ่แสดงอาการฉ่ำน้ำสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อพืชที่อยู่ถัดบริเวณเนื้อเยื่อพืชซึ่งสัมผัสกับเชื้อสาเหตุโรค ในขณะที่ต้นพริกที่ต้านทานต่อเชื้อโรคในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type แสดงอาการตายเพียงจุดตายขนาดเล็กที่มีลักษณะแห้งของเนื้อเยื่อพืชบริเวณที่สัมผัสกับเชื้อเท่านั้น และอาการดังกล่าวพัฒนาอาการตายของเนื้อเยื่อเป็นไปอย่างช้าๆ ดังแสดงในรูปที่ 39 และ 40

หกวันภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพบว่า เนื้อเยื่อลำต้นของพืชซึ่งอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อราแสดงอาการสีน้ำตาลซีดลุกลามขึ้นไปยังด้านบนของลำต้น อีกทั้งเกิดอาการยุบตัวของเนื้อเยื่อคอดเข้าไปยังเนื้อเยื่อลำเลียงของลำต้นพืช ใบเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง มีอาการเหี่ยว และเนื้อเยื่อตายจากบริเวณปลายใบเข้ามายังลำต้น รวมถึงการหลุดร่วงใบล่างของต้นพืชในระยะเวลาต่อมา อย่างไรก็ตามต้นพืชที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type ส่วนใหญ่แสดงการต้านทานโรคโดยมีพัฒนาการของโรคเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ

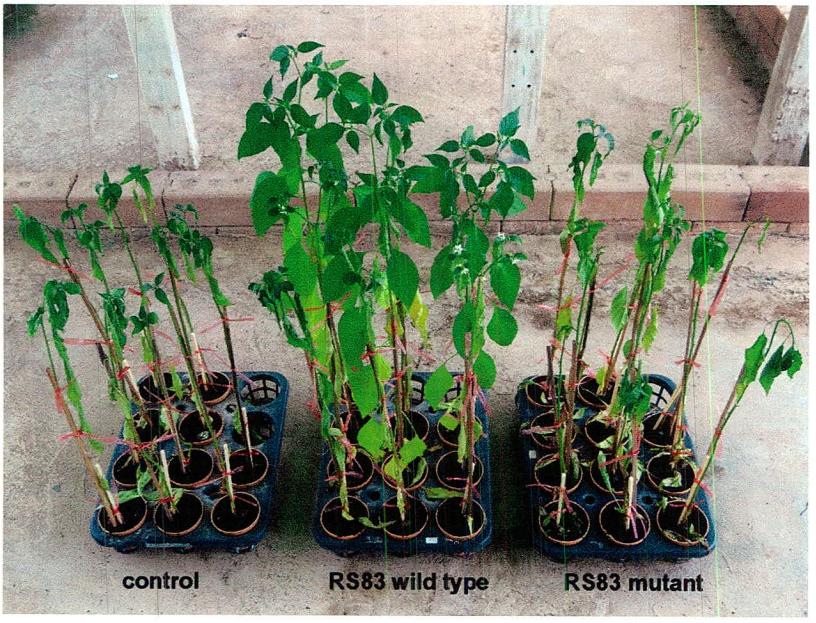


รูปที่ 39 อาการฉ่ำน้ำร่วมกับการปรากฏเนื้อเยื่อสีน้ำตาล (ลูกศรชี้) บริเวณด้านล่างของลำต้นพริกชี้ฟ้าที่อยู่ถัดจากบริเวณที่สัมผัสกับเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของต้นพริกกรรมวิธีควบคุม (a) และกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ (b) ในขณะที่ต้นพริกกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type แสดงอาการตายของเนื้อเยื่อบริเวณที่สัมผัสกับเชื้อสาเหตุโรคเท่านั้นภายหลังการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง (c)



รูปที่ 40 แสดงการลุกลามของเนื้อเยื่อสีน้ำตาลบริเวณที่อยู่เหนือจุดซึ่งสัมผัสกับเชื้อโรค (ลูกศรชี้)ของพริกที่อ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคในกรรมวิธีควบคุม (a) และกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ (b) เปรียบเทียบกับต้นพริกที่ต้านทานต่อเชื้อโรคในกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type (c) ที่ยังแสดงอาการตายของเนื้อเยื่อตรงบริเวณที่สัมผัสกับเชื้อโรคภายหลังการปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง

เมื่อบันทึกผลจำนวนต้นพริกที่ติดเชื้อภายหลังการปลูกเชื้อราโรคพืชนาน 11 วันพบว่า พืชในกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ แสดงอาการเหี่ยวเหลืองทุกต้นหรือคิดเป็น 100% ของการติดเชื้อ ในขณะที่ต้นพืชกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type แสดงอาการติดเชื้อเพียง 55% และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีที่ใส่เชื้อชนิดกลายพันธุ์ (รูปที่ 51 และตารางที่ 4) นอกจากนี้ต้นพืชที่ต้านทานในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อชนิด wild-type ยังให้ผลการต้านทานหรือมีการเจริญเติบโตที่เป็นปกติแม้เวลาจะผ่าน 2 สัปดาห์ก็ตาม



รูปที่ 51 ศักยภาพของเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type ในการกระตุ้นพริกชี้ฟ้าต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *S. rolfsii* ภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 11 วัน เปรียบเทียบกับพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์

ตารางที่ 4 ผลของเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type และชนิดกลายพันธุ์ ที่มีต่อการยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวเหลืองซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* กับพริกชี้ฟ้า และมะเขือเทศในสภาพเรือนทดลอง[u]

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นพริกชี้ฟ้า[v] ที่แสดงอาการติดเชื้อ	ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นมะเขือเทศ[w] ที่แสดงอาการติดเชื้อ
Control	10.0a[y]	10.0a
RS83 ชนิด wild type	5.5b	4.5b
RS83 ชนิดกลายพันธุ์	10.0a	10.0a
$LSD_{0.05}$	1.76	1.76

[u]รูปแบบการทดลองของพริกชี้ฟ้า และมะเขือเทศคือ Randomized complete block design แต่ละการทดลองประกอบด้วย 3 กรรมวิธีคือ กรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย กรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ โดยที่ซ้ำคือ 1 ต้นของพริกชี้ฟ้าที่ปลูกในกระถาง ตัวเลขที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากผลการทดลองสองครั้ง

[v]บันทึกผลจำนวนต้นพริกที่ติดเชื้อ 11 วันภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค *S. rolfsii*

[w]บันทึกผลจำนวนต้นมะเขือเทศที่ติดเชื้อ 6 วันภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค *S. rolfsii*

[x]ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยใช้การทดสอบ Least significant difference (LSD)

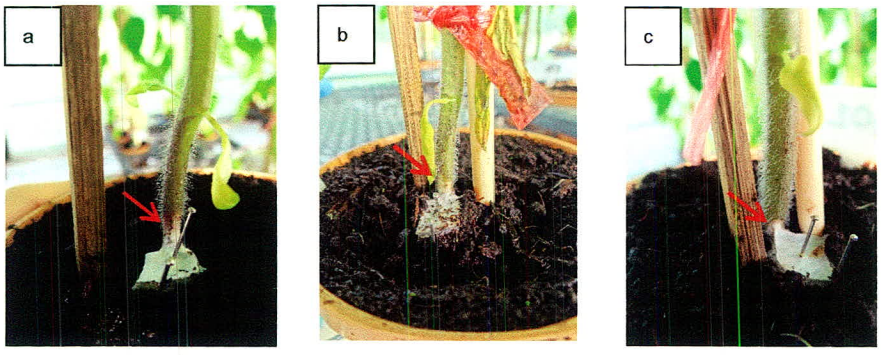
โรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ

พัฒนาการเกิดโรคเหี่ยวเหลืองกับมะเขือเทศมีทิศทางเช่นเดียวกันกับพัฒนาการเกิดโรคของพริกชี้ฟ้าแต่เกิดขึ้นเร็วกว่า ใบล่างบางส่วนของต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ ซึ่งอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงอาการเหี่ยว และปรากฏอาการตายของเนื้อเยื่อจากบริเวณปลายใบเข้ามายังลำต้นภายหลังการปลูกเชื้อนาน 3 วัน (รูปที่ 52) นอกจากนี้เนื้อเยื่อของลำต้นด้านล่างที่สัมผัสกับเชื้อสาเหตุโรคแสดงอาการยุบตัวเป็นแผลลึกเข้าไปยังเนื้อเยื่อลำเลียงอีกทั้งมีการขยายของเนื้อเยื่อที่ตายขึ้นไปยังด้านบนของลำต้น ในขณะที่ต้นมะเขือเทศซึ่งต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคในกรรมวิธีใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด

wild-type ปรากฏเพียงอาการตายของเนื้อเยื่อบริเวณชั้น cortex ของลำต้นเท่านั้น และพืชมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ (รูปที่ 53)

ภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคให้กับมะเขือเทศนาน 6 วัน พบว่าต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type ติดเชื้อโรคเหี่ยวเหลืองเพียง 45% ของจำนวนต้นทั้งหมด ในขณะที่ต้นมะเขือเทศกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ แสดงอาการติดเชื้อ 100% หรือทุกต้น (ตารางที่ 4 และ รูปที่ 54) นอกจากนี้ต้นพืชที่ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองในกรรมวิธีที่ใส่เชื้อชนิด wild-type ยังมีการเจริญเป็นปกติแม้ว่าจะตรวจเช็คการติดเชื้อของต้นพืชอีก 2 สัปดาห์ต่อมา

รูปที่ 52 แสดงศักยภาพของมะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type ในการต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง (ต้นกลาง) ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *S. rolfsii* ภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคให้กับพืชนาน 3 วัน เปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีควบคุม (ต้นซ้าย) และมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด mutant (ต้นขวา) ที่อ่อนแอต่อโรคโดยการแสดงอาการเหี่ยวของใบบริเวณด้านล่างและด้านบนของลำต้น



รูปที่ 53 แสดงอาการยุบตัวและการคอดของเนื้อเยื่อบริเวณลำต้นด้านล่างของมะเขือเทศในกรรวิธีควบคุม (a) และมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ mutant (b) ภายหลังการปลูกเชื้อ *S. rolfsii* นาน 3 วัน เปรียบเทียบกับการเกิดอาการตายของเนื้อเยื่อเพียงเล็กน้อยของต้นมะเขือเทศที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type (c) ปรากฏตามลูกศรชี้

รูปที่ 54 ศักยภาพของเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type ในการกระตุ้นมะเขือเทศต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ภายหลังการปลูกเชื้อโรค 6 วัน เปรียบเทียบกับพริกซี้ฟ้าในกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด mutant

1.3 ศึกษาความเกี่ยวข้องของกรดซาลิไซลิก (salicylic acid; SA) ของเชื้อสายพันธุ์ RS83

ย้ายเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type และเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ RS91 (โดยที่สายพันธุ์ RS91 เคยมีรายงานว่าเป็นเชื้อที่สามารถกระตุ้นพริกต้านทานต่อโรคเหี่ยวเขียว โรคเหี่ยวเหลือง และโรคแอนแทรคโนส) จากตู้แช่แข็งความเย็นยิ่งยวดอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA และบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง

การทดลองแรก: ย้ายเชื้อแต่ละชนิดจากอาหารแข็ง TSA เลี้ยงในอาหารเหลว Casamino acid (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) ความเข้มข้น 1% และ 2% ปริมาตรความเข้มข้นละ 200 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืดนาน 48 ชั่วโมง

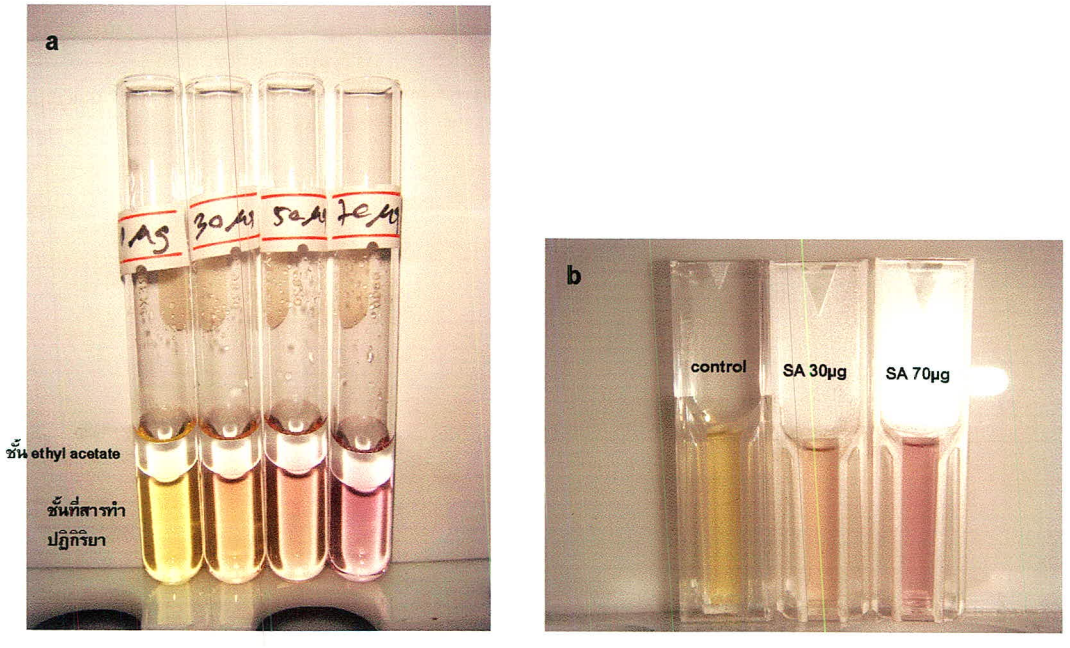
การทดลองที่สอง: ย้ายเชื้อแต่ละชนิดจากอาหารแข็ง TSA เลี้ยงในอาหารเหลว Casamino acid ความเข้มข้น 1% และ 2% ในปริมาตรเช่นเดียวกันกับการทดลองแรกที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร แต่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในที่มืดนาน 48 ชั่วโมง

นำอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อในการทดลองแรก และการทดลองที่สองมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,800*g* (SORVALL Biofuge Stratos, Kendro Laboratory Products, Germany) นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำใสไปปรับ pH ด้วย 10N HCl ให้ได้ประมาณ 2.0 สกัด SA ออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ ethyl acetate ปริมาตรเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสกัด 2 ครั้ง กรองชั้น ethyl acetate ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 Whatmann (Germany) นำส่วนที่กรองมาทำการกลั่นระเหยโดยใช้เครื่องกลั่นสารระเหยแบบหมุน ตั้งอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเพื่อกลั่น ethyl acetate ออกมาบางส่วนโดยกลั่นให้เหลือ 1 ใน 3 ส่วนของปริมาตรทั้งหมด ทำให้มีความเข้มข้นของ SA ในสารละลายมากขึ้น (ดัดแปลงกรรมวิธีของ Shanmugam and Narayanasamy, 2009, The Internet Journal of Microbiology 2009 : Volume 6 Number 1)

วัดปริมาณ SA ด้วยวิธี Qualitative โดยดูดสารสกัดหยาบที่เข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 2M $FeCl_3$ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 20 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 527 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น DR/4000U (Hach Company, Loveland, Colorado) เปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน SA ใช้สารสกัดจากอาหารเหลว Casamino acid ทั้งสองความเข้มข้นที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นกรรมวิธีควบคุม ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

ผลการศึกษา

โดยทั่วไป SA จะทำปฏิกิริยากับ 2M $FeCl_3$ แล้วกลายเป็นสารเชิงซ้อนสีม่วงระหว่างเหล็ก และ SA ในสารละลาย (รูปที่ 55)



รูปที่ 55 a) แสดงการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง 2M $FeCl_3$ และ สารมาตรฐาน salicylic acid (SA) ที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ SA ภายหลังการทำปฏิกิริยานาน 20 นาทีเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่มี SA (หลอดซ้ายมือสุด) **b)** สีของสารละลายที่ปรากฏด้านล่างภายหลังการทำปฏิกิริยาก่อนที่จะนำไปวัดค่าการดูดกลืนของแสงความยาวคลื่น 527 นาโนเมตร ภายในเครื่อง spectrophotometer

จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ผลิต SA ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยที่เชื้อสายพันธุ์ RS91 ผลิต SA มากกว่าเชื้อสายพันธุ์ RS83 ซึ่งเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อปัจจัยทางด้านอุณหภูมิ และความเข้มข้นของอาหารต่างกัน (ตารางที่ 2)

โดยทั่วไปพบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร 2% CAS ผลิต SA ในปริมาณที่มากกว่า ถ้าพิจารณาปัจจัยของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิต SA แล้วจะเห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ RS83 ผลิต SA มากกว่าเล็กน้อยเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ของอาหาร CAS ทั้งสองความเข้มข้น ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ RS91 ผลิต SA ในอาหาร CAS ทั้งสองความเข้มข้นในปริมาณที่มากกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 ผลิต SA ในปริมาณที่น้อยมาก ผู้วิจัยคาดว่า SA อาจไม่ใช่ตัวกำหนดของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ที่เกี่ยวข้องกับกระตุ้นพืชต้านทานโรค ประกอบกับมีหลายผลงานวิจัยได้รายงานไว้ว่า SA ที่ปลดปล่อยจากเชื้อแบคทีเรียที่มีกลไกกระตุ้นพืชต้านทานโรคนั้นไม่ได้เป็นตัวกำหนดของเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นพืชต้านทานโรค (Pieterse et al. 1996, The Plant Cell, 8, 1225-1237; Audenaert et al. 2002, MPMI Vol. 15 (11), 1147–1156; Siddiqui and Shaukat, 2004, J. Phytopathology 152, 48–54)

ตารางที่ 5 ปัจจัยของอุณหภูมิ และความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิต salicylic acid ของเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 และเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ RS91

ชนิดของแบคทีเรีย	ปริมาณ salicylic acid (µg/ml)[u]			
	อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส		อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส	
	1% CAS[v]	2% CAS	1% CAS	2% CAS
สายพันธุ์ RS83	4.50	5.50	7.00	8.50
สายพันธุ์ RS91	25.00	29.00	18.00	19.00

[u]ปริมาณ salicylic acid ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสภาวะต่างๆ เป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 2 ครั้ง ซึ่งวัดค่าจากเครื่อง spectrophotometer ความยาวคลื่น 527 nm โดยเทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ SA

[v]CAS คืออาหารเหลว Bacto Casamino Acids

1.4 ศึกษาความเกี่ยวข้องของสารอินทรีย์ระเหยที่ปลดปล่อยจากเชื้อสายพันธุ์ RS83

1.4.1 *การศึกษาในสภาวะ in vitro bioassay system ภายในห้องปฏิบัติการ*

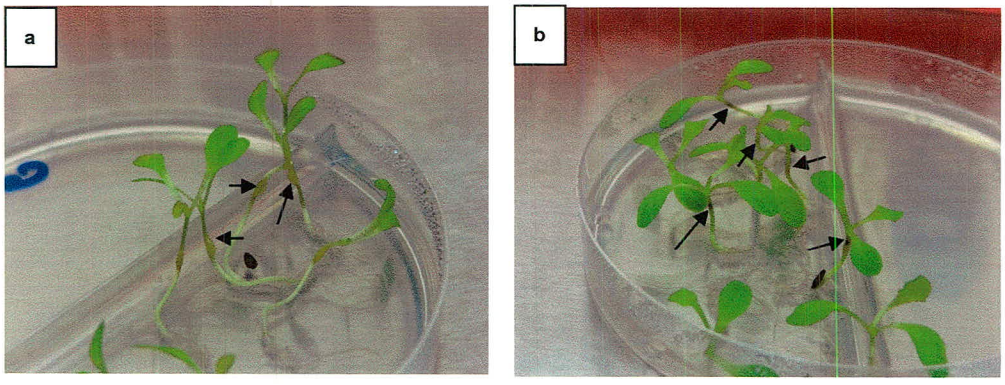
โมเดลที่ใช้ทดสอบ pathogenesis system คือผักกาดหอม (*Lactuca sativa*) และเชื้อก่อโรคเน่าเละที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ Pcc. รูปแบบการทดลองคือการสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 4 กรรมวิธีคือกรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 กรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ RS87 และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ RS91 แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ โดยที่ซ้ำของการทดลองคือจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ขนาด 90X15 มิลลิเมตร มีผนังกั้นตรงกลาง หรือเรียกว่า I-plates; Hycon Plastic, China) ด้านหนึ่งบรรจุอาหารแข็ง 50% MS ที่ใช้เลี้ยงพืชทดสอบ อีกด้านหนึ่งบรรจุอาหารแข็ง 50% MS ที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ส่วนกรรมวิธีควบคุมเป็นเพียงอาหาร 50%MS ที่ไม่มีการเลี้ยงแบคทีเรีย ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

แช่เมล็ดผักกาดหอมในสารละลาย 1%NaOCl นาน 20 นาที เพื่อฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดพืช ล้างเมล็ดพืชด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง บ่มเมล็ดบนกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อยู่ในจานอาหารเปล่าในที่มืดนาน 3 คืน จากนั้นย้ายต้นกล้าผักกาดหอมมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง 50%MS ที่บรรจุในจานอาหาร I plate ด้านหนึ่ง โดยวางต้นกล้าพืชจำนวน 9 ต้นต่อจานอาหาร วางแผ่น disc ที่ฆ่าเชื้อแล้ว (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร Schleicher & Schuell, Einbeck, Germany) ลงบนผิวอาหารแข็ง 50%MS อีกด้านหนึ่งของจานอาหารที่อยู่ตรงกันข้ามกับต้นพืช หยดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 RS87 หรือ RS91 (ความเข้มข้น 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB; BD, MD, USA) นาน 24 ชั่วโมง ปริมาตร 30 ไมโครลิตร/disc ส่วนกรรมวิธีควบคุมเป็นเพียงอาหาร 50%MS อีกด้านหนึ่งของจานอาหาร I-plate พันขอบจานอาหารด้วยพาราฟิล์มสองชั้น วางจานอาหารบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตั้งระบบการให้แสงฟลูออเรสเซนส์ ขนาด 18W กับพืชนาน 14 ชั่วโมง และไม่ให้แสงกับพืชนาน 10 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50-60% เป็นเวลานาน 5 วัน ก่อนปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละ (Pcc) ให้กับต้นผักกาดหอมทุกต้นในทุกกรรมวิธีภายในตู้ปลอดเชื้อ ใช้ sterilize disposable syringe ขนาด 1 มิลลิลิตรที่มีเข็มตรงปลายแทงเป็นบาดแผลเล็กน้อยบริเวณกึ่งกลางของลำต้นพืชแต่ละต้นที่อยู่เหนืออาหาร 50%MS ประมาณ 10 มิลลิเมตร จากนั้นใช้ปลายเข็มแตะโคโลนีของเชื้อ Pcc เล็กน้อยที่เจริญบนอาหารแข็ง TSA นาน 24 ชั่วโมงมาแตะตรงตำแหน่งบาดแผล ปิดฝาจานอาหารและพันขอบจานอาหารด้วยพาราฟิมล์ก่อนย้ายไปวางบนชั้นเลี้ยงต้นพืช สังเกตและบันทึกพัฒนาการเกิดโรคของพืชทุกวันภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคจนกระทั่งต้นพืชในกรรมวิธีควบคุมแสดงอาการเน่าเละทุกต้น นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกรรมวิธี (follow-up test) ด้วย least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

<u>ผลการศึกษา</u>

ภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคให้กับพืชเป็นเวลา 1 วัน พบว่าต้นผักกาดหอมในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 และ RS87 ปรากฏอาการตายของเนื้อเยื่อตรงกลางบาดแผลที่

ติดเชื้อประมาณ 50% ส่วนต้นผักกาดหอมในกรรมวิธีที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS91 แสดงอาการตายของเนื้อเยื่อบริเวณกลางบาดแผลประมาณ 20% ในขณะที่ต้นผักกาดหอมทุกต้นในกรรมวิธีควบคุมยังคงมีกลุ่มแบคทีเรียเกาะติดตรงบริเวณที่ปลูกเชื้อ อีกทั้งเนื้อเยื่อที่อยู่ถัดจากบริเวณที่ติดเชื้อแสดงอาการฉ่ำน้ำเล็กน้อย (รูปที่ 56)



รูปที่ 56 ต้นผักกาดหอมในกรรมวิธีควบคุมที่มีกลุ่มของแบคทีเรียก่อโรคเน่าเละปรากฏตรงบริเวณที่ติดเชื้อตรงตำแหน่งลูกศรชี้ (a) เปรียบเทียบกับต้นผักกาดหอมในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ที่แสดงอาการตายของเนื้อเยื่อบริเวณที่ติดเชื้อ ปรากฏตามลูกศรชี้ (b) ภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละ Pcc ให้กับพืชนาน 1 วัน

พัฒนาการโรคเน่าเละบนพืชผักกาดหอมในกรรมวิธีควบคุมเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยที่เนื้อเยื่อฉ่ำน้ำบริเวณลำต้นที่อยู่ถัดจากบริเวณที่ติดเชื้อทั้งด้านบนและด้านล่างของลำต้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลช้ำภายหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคนาน 3 วัน อีกทั้งต้นพืชมีลักษณะผอม-ยาว ในขณะที่พืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ยังมีการเจริญเป็นปกติ ใบสีเขียวเข้ม ปรากฏเพียงอาการตายของเนื้อเยื่อบริเวณที่ติดเชื้อเท่านั้น

อาการโรคเน่าเละของพืชในกรรมวิธีควบคุมเริ่มปรากฏให้เห็นภายหลังปลูกเชื้อก่อโรคให้กับพืชนาน 5 วัน โดยที่พืชในกรรมวิธีควบคุมเกิดอาการโรคเน่าเละประมาณ 50% ในขณะที่พืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ยังไม่ปรากฏโรคเน่าเละ ส่วนพืชที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS87 และสายพันธุ์ RS91 เกิดโรคเน่าเละ 4% และ 6% ตามลำดับ

ต้นผักกาดหอมในกรรมวิธีควบคุมแสดงอาการเน่าเละทุกต้นภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรคนาน 6 วัน อย่างไรก็ต้นผักกาดหอมที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 มีพัฒนาการเกิดโรคเพียง 7% และ 11% ภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละให้กับพืชนาน 6 วัน และ 7 วันตามลำดับ ส่วนผักกาดหอมในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS87 เกิดโรคเน่าเละประมาณ 16% และ 20% ภายหลังการปลูก

เชื้อก่อโรคนาน 6 วันและ 7 วันตามลำดับ สำหรับผักกาดหอมในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS91 เกิดโรคเน่าเละประมาณ 25% ซึ่งผักกาดหอมทุกกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อไรโซแบคทีเรียทุกสายพันธุ์เกิดโรคเน่าเละน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธิควบคุม โดยที่เชื้อสายพันธุ์ RS83 กระตุ้นให้พืชต้านทานโรคเน่าเละมากที่สุด รองลงมาคือสายพันธุ์ RS87 และสายพันธุ์ RS91 ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และรูปที่ 57)

ตารางที่ 6 ผลของสารอินทรีย์ระเหยที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อไรโซแบคทีเรียกระตุ้นผักกาดหอมต้านทานโรคเน่าเละที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) ในสภาวะ *in vitro* bioassay system

Treatment[w]	Numbers of symtomatic plants infected by Pcc[x]		
	5 days after challenge	6 days after challenge	7 days after challenge
Nonbacterized control	4.83a[y]	9.00a	9.00a
RS83	0.00b	0.66d	1.00c
RS87	0.33b	1.50c	1.83b
RS91	0.50b	2.33b	2.33b
$LSD_{0.05}$	0.53	0.69	0.54

[w]แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย 3 ซ้ำ ซึ่งซ้ำคือจานอาหาร I-plate ที่เลี้ยงต้นผักกาดหอมจำนวน 9 ต้นด้านหนึ่งของจานอาหาร ส่วนอีกด้านหนึ่งของจานอาหารหยดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 30 ไมโครลิตร/disc (10^8 เซลล์/มล.) ที่วางบนอาหาร 50%MS สำหรับกรรมวิธีควบคุมเป็นอาหาร 50%MS (RS83=*Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83; RS87=*Bacillus cereus* สายพันธุ์ RS87; RS91=*Bacillus megaterium* สายพันธุ์ RS91)

[x]เป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นผักกาดหอมที่แสดงอาการเน่าเละจากผลการทดลองสองครั้ง

[y]ตัวเลขที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยใช้การทดสอบ least significant difference (LSD)

แช่เมล็ดผักกาดหอมในสารละลาย 1%NaOCl นาน 20 นาที ล้างเมล็ดพืชด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง วางเมล็ดบนกระดาษเพาะเมล็ดที่ฆ่าเชื้อแล้วบรรจุในจานอาหารเปล่าและบ่มในที่มืดนาน 3 คืน จากนั้นย้ายต้นกล้าผักกาดหอมมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง 50%MS ที่บรรจุในจานอาหาร I plate ด้านหนึ่ง โดยวางต้นพืชจำนวน 9 ต้นต่อจานอาหาร วางแผ่น disc ที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Schleicher & Schuell, Einbeck, Germany) ลงบนผิวอาหารแข็ง 50%MS อีกด้านหนึ่งของจานอาหารที่อยู่ตรงกันข้ามกับต้นพืช หยดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 RS87 หรือ RS91 (10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร/disc ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB; BD, MD, USA) นาน 24 ชั่วโมง ส่วนกรรมวิธีควบคุมเป็นเพียงอาหาร 50%MS พันขอบจานอาหารด้วยพาราฟิล์มสองชั้น วางจานอาหารบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตั้งระบบการให้แสงฟลูออเรสเซนส์ ขนาด 18W กับพืชนาน 14 ชั่วโมงและไม่ให้แสงกับพืชนาน 10 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50-60% นาน 5 วันแล้วปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละ Pcc กับต้นผักกาดหอมทุกต้นภายในตู้ปลอดเชื้อยกเว้นต้นพืชในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค สำหรับวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคทำโดยใช้ sterilize disposable syringe ขนาด 1 มิลลิลิตรที่มีเข็มตรงปลายแทงเป็นบาดแผลเล็กน้อยบริเวณลำต้นพืชแต่ละต้นที่อยู่เหนืออาหาร 50%MS ประมาณ 10 มิลลิเมตร จากนั้นใช้ปลายเข็มแตะโคโลนีของเชื้อก่อโรค Pcc เล็กน้อยที่เจริญบนอาหารแข็ง TSA นาน 24 ชั่วโมงมาแตะตรงตำแหน่งบาดแผล ปิดฝาจานอาหารและพันขอบจานอาหารด้วยพาราฟิมล์ก่อนย้ายไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหมือนเดิม

เก็บตัวอย่างพืชของแต่ละกรรมวิธีเป็นระยะตามเวลาที่กำหนดไว้ข้างต้นโดยใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดเนื้อเยื่อใบพืชบริเวณที่ติดกับก้านใบของแต่ละต้นซึ่งเป็นเนื้อเยื่อปกติอยู่เหนือตำแหน่งที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค แต่ละครั้งที่เก็บตัวอย่างพืชนำเนื้อเยื่อของพืชในกรรมวิธีเดียวกันมารวมกันแล้วสุ่มเลือกเนื้อเยื่อพืชชั่งน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัมใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อแล้ว ก่อนนำไปแช่เก็บในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวิเคราะห์เอนไซม์ในวันต่อไป ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

1.4.2.1 การสกัดและวัดปริมาณโปรตีนของพืช

นำตัวอย่างพืชที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสออกมาแล้วเติมสารละลายแช่เย็น 0.1M Tris-HCl buffer (pH 6.0) ที่มีส่วนผสมของ 1% polyvinyl polypyrrolidone (Sigma-Aldrich, Inc, MO, USA) ในสัดส่วน 1:10 เท่าของน้ำหนักเนื้อเยื่อพืช บดเนื้อพืชให้ละเอียดโดยใช้ sterile disposable polypolyrene pestle ความยาว 8.5 เซนติเมตร (Bel-Art Scienceware®, NJ, USA) ปั่นเหวี่ยงเนื้อเยื่อที่บดละเอียดแล้วในเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (SORVALL® Biofuge Stratos, Kendro Laboratory Products, Geramany) ที่ความเร็ว 12,000*g* นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนน้ำใสด้านบนใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

ตรวจวัดปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ SOD และ PO โดยวิธี colorimetric assay ด้วยเครื่อง DR/4000 Spectrophotometer (HACH Company, CO, USA) ซึ่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์หรือโปรตีนที่ใส่ลงไปในปฏิกิริยา ทำกราฟโปรตีนมาตรฐานด้วยวิธีการของ Bradford assay (1976) ใช้สารมาตรฐาน Bovine serum almumin (Sigma-Aldrich, Inc, MO, USA) ความเข้มข้นต่างเพื่อใช้ตรวจความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดออกมาเนื้อเยื่อพืช

1.4.2.2 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ SOD

ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ SOD ในสารสกัดเอนไซม์ทั้งหมดโดยใช้ระบบ riboflavin/methionine ที่พัฒนาโดย Beauchamp and Fridovich (1971) บรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตรในหลอดแก้วขนาด 3 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 13 mM methionine, 75 µM nitroblue tetrazolium, 2 µM riboflavin และเอ็นไซม์ที่อยู่ในสารสกัด ใส่ riboflavin เป็นส่วนผสมสุดท้ายก่อนคนสารให้เข้ากันแล้วเริ่มปฏิกิริยาโดยนำไปฉายแสงภายใต้หลอด fluorescent ขนาด 18 วัตต์ จำนวนสองหลอดเป็นเวลานาน 10 นาที เทส่วนผสมในหลอดลงใน cuvette ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้ววัดกิจกรรมเอนไซม์ SOD ทั้งหมด ด้วยเครื่อง

spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยที่หนึ่งหน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ SOD คือ ปริมาณที่ยับยั้ง photoreaction ของ nitro-blue tetrazolium ได้ 50% ภายใต้สภาวะของการทดสอบ

1.4.2.3 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ PO

ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ PO ในสารสกัดเอนไซม์โดยดัดแปลงวิธีการทดสอบจาก Hammerschimdt และคณะ (1982) ใช้ guaiacol เป็น hydrogen donor ทำปฏิกิริยาส่วนผสมปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตรใน cuvette ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 0.25%(v/v) guaiacol ใน 0.01M sodium phosphate buffer (pH 6.0) สารสกัดเอนไซม์ และ 0.1M H_2O_2 ใส่สารสกัดเอนไซม์สุดท้ายเพื่อเป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา บันทึกการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 30 วินาที ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร นาน 2 นาที กิจกรรมของเอนไซม์แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงต่อนาทีของปริมาณโปรตีนทดสอบ 1 มิลลิกรัม สารเคมีที่ใช้ทดสอบทุกชนิดซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich, Inc.

1.4.2.4 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) และใช้ Fisher's protected least significant difference (LSD) test ความเชื่อมั่น 95% ของโปรแกรม SAS (SAS Institute, Gary, NC, USA) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกรรมวิธีทดสอบ

ผลการศึกษา

กิจกรรมเอนไซม์ SOD: ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุก่อโรคเน่าเละให้กับพืช พบว่าผักกาดหอมในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยสารอินทรีย์ระเหยซึ่งปลดปล่อยออกมาจากเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ SOD มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยที่พืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 มีกิจกรรมเอนไซม์ SOD ทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS87 และ RS91 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมเอ็นไซม์ SOD ของพืชที่กระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ พบว่าพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยสายพันธุ์

RS83 มีกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS87 และ RS91 (ตารางที่ 7)

ภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละให้กับพืช 1 วัน พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ SOD ของพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญประมาณ 40% เมื่อเปรียบเทียบกับพืชในกรรมวิธีควบคุม แม้ว่าพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS87 และ RS91 มีกิจกรรมเอนไซม์ SOD มากกว่าในกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคก็ตาม แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อติดตามกิจกรรมเอนไซม์ SOD ของพืชทุกกรรมวิธีภายหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคในอีก 2 วันต่อมา พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ SOD ทั้งหมดในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง อีกทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวมีมากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค โดยที่กรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อไรโซแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 มีกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด รองลงมาคือพืชที่กระตุ้นด้วยสายพันธุ์ RS87 และ RS91 ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคนั้นมีกิจกรรมเอนไซม์ SOD ทั้งหมดเพิ่มขึ้นถึงวันที่ 2 ของการปลูกเชื้อก่อโรค แต่กิจกรรมดังกล่าวลดลงในวันที่สามของการติดเชื้อ สำหรับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อสาเหตุโรคมีกิจกรรมเอนไซม์ SOD ในธรรมชาติจำนวนเล็กน้อยตลอดระยะการเก็บตัวอย่างพืช (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลของสารอินทรีย์ระเหยที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อไรโซแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ในการชักนำกิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ก่อนและหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) ให้กับผักกาดหอม

Treatment[w]	Total SOD activity/mg protein[x]			
	0DAC	1DAC	2DAC	3DAC
Nonchallenged control	148.75c[y]	136.94c	153.92e	149.11d
Challenged control	151.10c	220.22b	240.28d	212.28c
E. asburiae strain RS83	242.50a	311.21a	342.30a	391.36a
B. cereus strain RS87	189.17b	235.56b	299.39b	317.18b
B. megaterium strain RS91	184.81b	251.80b	267.03c	300.89b
$LSD_{0.05}$	12.19	34.42	23.03	44.90

[w]แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย 3 ซ้ำโดยที่หนึ่งซ้ำคือจานอาหารบรรจุอาหารแข็ง 50%MS ที่มีต้นผักกาดหอมจำนวน 9 ต้น ปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละ Pcc ให้กับพืชภายหลังย้ายต้นกล้าเลี้ยงบนอาหารแข็ง 50%MS นาน 5 วัน

[x]เป็นค่าเฉลี่ย total SOD activity จากผลการทดลองสองครั้ง (0DAC=ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุโรค; 1DAC=1วันภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค; 2DAC=2วันภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค; 3DAC=3วันภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค)

[y]ตัวเลขที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยใช้การทดสอบ least significant difference (LSD)

กิจกรรมเอนไซม์ PO: ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละให้กับพืชพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ PO ทั้งหมดในกรรมวิธีที่ถูกกระตุ้นด้วยสารอินทรีย์ระเหยที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อไรโซแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์มีมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญประมาณเกือบ 60% เมื่อเปรียบเทียบกับพืชในกรรมวิธีควบคุม ภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละให้กับพืชพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ PO ของพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 มีกิจกรรม PO ทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ ภายหลังการปลูกเชื้อ 1 วัน 2 วัน และ 3 วันตามลำดับ ขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ของพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS87 และ RS91 ลดลงเล็กน้อยภายหลังการปลูกเชื้อ 1 วัน และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังการปลูกเชื้อในอีกสองวันต่อมา กิจกรรมเอนไซม์ PO ของพืชในกรรมวิธี

ควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละเพิ่มขึ้นเล็กน้อยภายหลังการปลูกเชื้อ 1 วัน และเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ อย่างไรก็ตามกิจกรรมดังกล่าวยังมีน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วยเชื้อไรโซแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ สำหรับพืชในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละนั้นมีกิจกรรมเอนไซม์ PO เล็กน้อยและค่อนข้างคงที่ตลอดระยะการทดลอง (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลของสารอินทรีย์ระเหยที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อไรโซแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในการชักนำกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ก่อนและหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) ให้กับผักกาดหอม

Treatment[w]	Total PO activity/mg protein[x]			
	0DAC	1DAC	2DAC	3DAC
Nonchallenged control	17.75b[y]	16.05c	17.56c	18.06e
Challenged control	19.18b	20.48c	28.32b	51.05d
E. asburiae strain RS83	30.05a	35.57a	47.01a	125.00a
B. cereus strain RS87	29.18a	28.42b	44.77a	103.42b
B. megaterium strain RS91	29.38a	26.65b	44.06a	73.76c
$LSD_{0.05}$	5.59	5.10	7.15	10.26

[w]แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย 3 ซ้ำโดยที่หนึ่งซ้ำคือจานอาหารบรรจุอาหารแข็ง 50%MS ที่มีต้นผักกาดหอมจำนวน 9 ต้น ปลูกเชื้อก่อโรคเน่าเละ Pcc ให้กับพืชภายหลังย้ายต้นกล้าเลี้ยงบนอาหารแข็ง 50%MS นาน 5 วัน

[x]เป็นค่าเฉลี่ย total PO activity จากผลการทดลองสองครั้ง (0DAC=ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุโรค; 1DAC=1วันภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค; 2DAC=2วันภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค; 3DAC=3วันภายหลังการปลูกเชื้อก่อโรค)

[y]ตัวเลขที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยใช้การทดสอบ least significant difference (LSD)

วัตถุประสงค์ที่ 2: เพื่อค้นหากลไกที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชซึ่งถูกกระตุ้นด้วยสายพันธุ์ RS83

2.1 ศึกษาความสามารถของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ในการผลิต indole-3-acetic acid (IAA)

2.1.1 *วัดปริมาณ IAA ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี*

วิเคราะห์การผลิต IAA ของเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 ตามกรรมวิธีของ Gordon และ Weber (1951) โดยใช้ ferric chloride-perchloric acid reagent ($FeCl_3$-$HClO_4$) เป็นตัวทำปฏิกิริยาซึ่งวิธีการนี้สามารถวัดปริมาณของ IAA ที่ผลิตจากแบคทีเรียซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของ L-tryptophan บันทึกสีที่เกิดขึ้นภายในเครื่อง UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 nm

การศึกษาครั้งนี้ใช้แบคทีเรียชนิด *Bacillus cereus* สายพันธุ์ RS87 เป็นเชื้ออ้างอิงเนื่องจากสายพันธุ์ดังกล่าวมีรายงานว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้หลากหลายชนิด และสามารถผลิต IAA ได้ (Jetiyanon et al., Canadian Journal of Microbiology; 2008)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 และ เชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* สายพันธุ์ RS87 ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลว Nutrient Broth-M26 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อใน Environmental-Shaker Incubator ES-20 (BIOSAN, Riga, Latvia) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเชื้อไปเลี้ยงในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลว Minimal salt ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ตามกรรมวิธีของ Frankenberger and Poth (1988) อีก 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่ความเร็ว 12,000*g* อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ปิเปตส่วนน้ำใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วขนาด 20 มิลลิเมตร X 150 มิลลิเมตร ที่บรรจุสารละลาย $FeCl_3$-$HClO_4$ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (Gordon and Weber, 1951) เขย่าสารให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ Vortex mixture ทิ้งไว้ 25 นาที ก่อนเทสารลงใน cuvette ขนาด 4.5 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530

นาโนเมตร ในเครื่อง UV-spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน IAA บริสุทธิ์ 98% (Sigma-Aldrich, USA) ทำการทดสอบอย่างน้อย 3 ซ้ำ

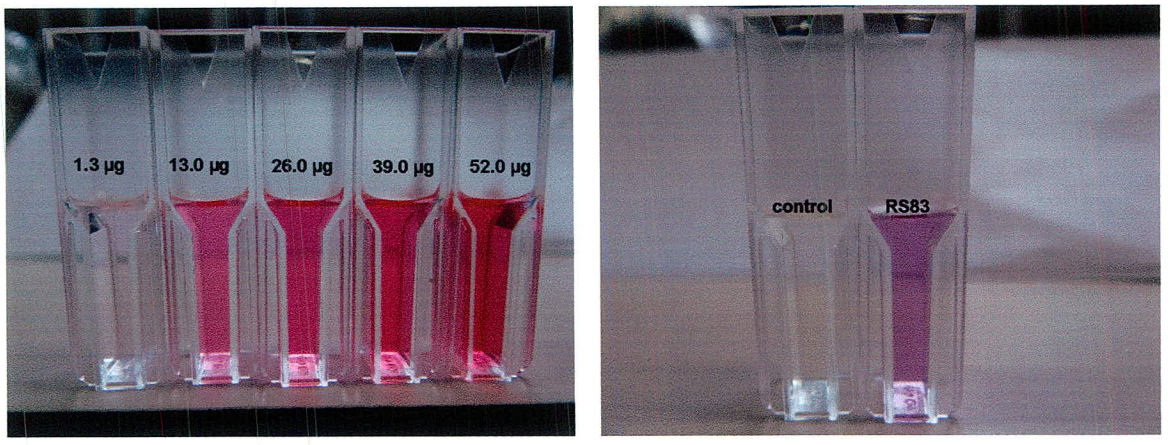
ผลการศึกษา

การปรากฏสีชมพูในสารละลายภายหลังการทำปฏิกิริยาของสารแสดงว่ามีสาร IAA ในสารละลาย ซึ่งปริมาณ IAA เป็นสัดส่วนแปรผันตรงกับความเข้มของสีชมพูที่ปรากฏ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 ผลิต IAA ประมาณ 68.29 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ RS87 ผลิต IAA ประมาณ 29.43 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อสายพันธุ์ RS83 ผลิต IAA มากกว่าเชื้อสายพันธุ์ RS87 ประมาณ 2.3 เท่า (ตารางที่ 9 และรูปที่ 58)

ตารางที่ 9 การผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) โดยเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 และเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ RS87

ชนิดของแบคทีเรีย	ปริมาณ IAA ที่ผลิต* (μmol ml^{-1})
Enterobacter asburiae สายพันธุ์ RS83	68.29
Bacillus cereus สายพันธุ์ RS87	29.43

*ปริมาณ IAA ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ซึ่งค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 ซ้ำ และตัวเลขที่ปรากฏในตารางเป็นค่าเฉลี่ยการผลิต IAA ของแต่ละสายพันธุ์



รูปที่ 58 แสดงผลของปฏิกิริยาระหว่าง ferric chloride-perchloric acid reagent ($FeCl_3$-$HClO_4$) กับสาร IAA มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ (รูปซ้าย) และสาร reagent กับ IAA ที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อแบคทีเรีย *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 เปรียบเทียบกับสารละลายควบคุมที่ไม่มี IAA (รูปขวา)

2.1.2 *วิเคราะห์สาร IAA ด้วยวิธี HPLC*

ย้ายเชื้อสายพันธุ์ RS83 จากตู้แช่แข็งความเย็นยิ่งยวดอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเลี้ยงบนอาหาร TSA บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายแต่ละเชื้อเลี้ยงในอาหารเหลว modified NB-M26 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเหลว minimal salt medium (MS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มีส่วนผสมของ 5 mM L-tryptophan ตามกรรมวิธีของ Frankenberger and Poth (1988) บ่มเชื้อในเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง

ปั่นเหวี่ยงเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่ความเร็ว 12,000*g* อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเก็บส่วนน้ำใสเพื่อนำมาปรับค่า pH เป็น 2.8 ด้วย 1N HCl (ดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Tien et al 1979, Applied and Environmental Microbiology, 1016-1024) ก่อนสกัดสารออกจากส่วนน้ำใสด้วย

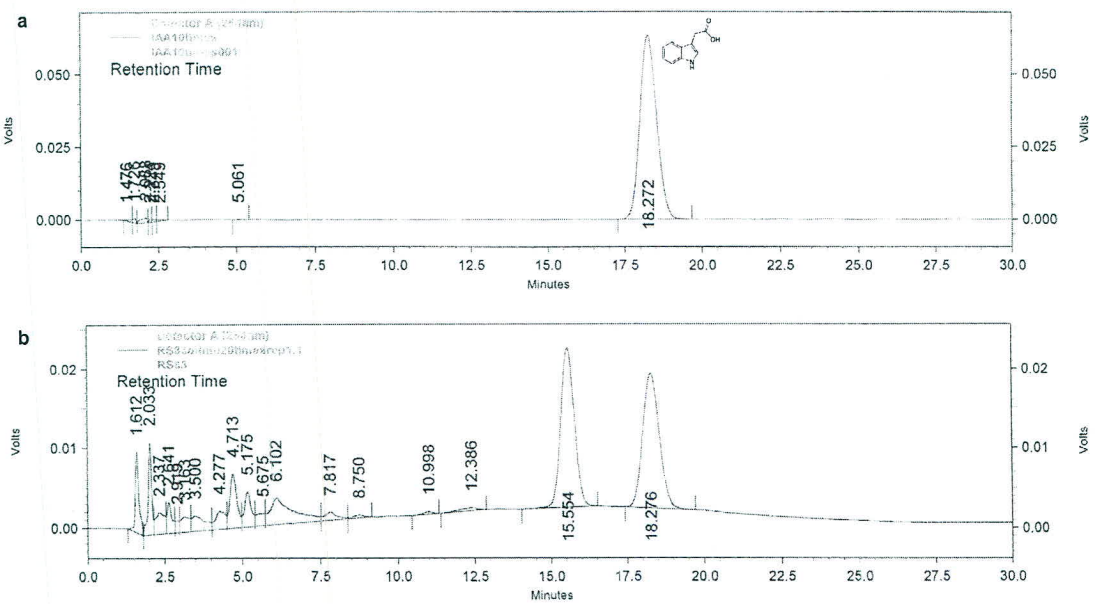
ethyl acetate โดยใช้ปริมาตรระหว่างส่วนน้ำใส และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:3 ส่วน นำส่วนของ ethyl acetate มากลั่นระเหยโดยใช้เครื่องกลั่นสารระเหยแบบหมุน (BÜCHI Rotavapor model R200, BÜCHI Labortechnik GmbH, Deutschland, Germany) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเพื่อกลั่น ethyl acetate ออกมาจากสารสกัดหยาบ จนกระทั่งเหลือเพียงสารสกัดหยาบที่เป็นคราบสีน้ำตาลติดบริเวณด้านล่างของ evaporator flask ละลายคราบสีน้ำตาลออกด้วย Absolute Methanol (HPLC grade, Lab Scan) ปิเปตสารละลายใส่ในขวดสีชาขนาดเล็ก และหากไม่วิเคราะห์สารทันทีให้เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ต่อไป

กรองสารสกัดหยาบผ่านเยื่อกรองขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร และเจือจางสารสกัดหยาบจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 ประมาณ 20 เท่า ก่อนฉีดสารตัวอย่างที่สกัดปริมาตร 30 ไมโครลิตรเข้าไปในเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์ IAA (Shimadzu CLASS-VP V6.14 SP1, Tokyo, Japan) โดยผ่าน VertiSep™ Silica-Based IRS C18 HPLC column (3.9X300 mm, 10µm, Vertical Chromatography Co., Ltd, Thailand) สารสกัดหยาบในตัวอย่างจะถูกแยกออกมาโดยการนำพาของ solvent A (น้ำ: acetonitrite:acetic acid ในอัตราส่วน 84:15:1; ปริมาตร/ปริมาตร) อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที และควบคุมความดัน 40% สำหรับ solvent B (30% methanol ในน้ำ) มีอัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที และควบคุมความดันที่ 60% ดัดแปลงกรรมวิธีจาก Tien et al. (1979; Environmental Microbiology; page 1016-1024) ตรวจวิเคราะห์สาร IAA โดยใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ใช้สาร IAA มาตรฐานบริสุทธิ์มากกว่า 98% ความเข้มข้น 1.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Sigma-Aldrich Co., USA) ที่เจือจาง 10 เท่า ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC เป็นตัวเปรียบเทียบ

<u>ผลการศึกษา</u>

พบว่าสารมาตรฐาน IAA ปรากฏ peak เด่นขึ้นมาเพียง peak เดียวที่ตำแหน่ง retention time 18.272 นาที โดยมีพื้นที่ใต้กราฟคือ 2,385,405 คิดเป็น 97.40% ของพื้นที่ทั้งหมด ส่วนสารสกัดหยาบจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 ปรากฏ peak จำนวนมาก อย่างไรก็ตามมี peak ที่ตรงกับสารมาตรฐาน IAA ที่

ตำแหน่ง retention time 18.276 นาที มีพื้นที่ใต้กราฟ 634,414 คิดเป็น 30% ของพื้นที่ทั้งหมด (รูปที่ 59) เมื่อคำนวณค่า IAA ของสารสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 โดยคำนวณย้อนกลับไปยังความเข้มข้นเดิมก่อนการเจือจาง และเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน IAA ที่ทราบความเข้มข้นเริ่มต้นแล้ว พบว่าเชื้อสายพันธุ์ RS83 ผลิต IAA ปริมาณ 118.44 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ซึ่งเครื่อง HPLC มีความไว (sensitive) ในการตรวจวัดปริมาณ IAA ดีกว่าเครื่อง Spectrophotometer ถึง 1.7 เท่า



รูปที่ 59 การวิเคราะห์ HPLC ของ indole-3-acetic acid (IAA) ที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 และ *B. cereus* สายพันธุ์ RS87 a) โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานบริสุทธิ์ IAA (Sigma-Aldrich) b) โครมาโตแกรมสารสกัดหยาบจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83

2.2 ศึกษาความสามารถของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ในการผลิตกรดอินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟต

2.2.1 *ตรวจสอบกรดอินทรีย์ด้วยวิธี qualitative method*

ทดสอบศักยภาพของเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 ในการย่อยสลายฟอสเฟต ในอาหารเหลว National Botanical Research Institute's phosphate growth medium ที่มีส่วนผสมของ bromophenol blue (NBRIP-BPB) ตามกรรมวิธีของ Mehta and Nautiyal (2001) ใช้แบคทีเรียชนิด

Bacillus cereus สายพันธุ์ RS87 เป็นเชื้ออ้างอิงเนื่องจากสายพันธุ์ดังกล่าวมีรายงานว่าสามารถผลิตกรดอินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟตได้ (Jetiyanon and Plianbangchang, Canadian Journal of Microbiology; 2010) นอกจากนี้ยังใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ RS91 เป็นเชื้ออ้างอิงเนื่องจากเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้หลายสายพันธุ์ (กัญชลี และคณะ 2551)

เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 สายพันธุ์ RS87 และสายพันธุ์ RS91 ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB: Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มเชื้อใน Environmental-Shaker Incubator ES-20 (BIOSAN, Riga, Latvia) ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ย้ายเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml) จากอาหาร TSB ลงในหลอดแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 20 มิลลิเมตร X 150 มิลลิเมตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว NBRIP-BPB ปริมาตร 5 มล. (ประกอบด้วย glucose 10 กรัม; $Ca_3(PO_4)_2$ 5 กรัม; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5 กรัม; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 กรัม; KCl 0.2 กรัม; $(NH4)_2SO_4$ 0.1 กรัม และ bromophenol blue 0.025 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร; ปรับ pH ของอาหารให้ได้ประมาณ 7.0 ก่อนนำไปฆ่าเชื้อ) บ่มเชื้อใน Environmental-Shaker Incubator ES-20 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงและค่า pH ในอาหาร NBRIP-BPB ที่มีและไม่มีเชื้อแบคทีเรีย ทุกวันจนกระทั่งถึงวันที่ 5 ของการบ่มเชื้อ ทำการลองซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

2.2.1.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงในอาหาร NBRIP-BPB

ปั่นเหวี่ยงอาหาร NBRIP-BPB ที่ผ่านการเลี้ยงแบคทีเรีย และกรรมวิธีควบคุมในเครื่องปั่นเหวี่ยง (SORVALL Biofuge Stratos, Kendro Laboratory Products, Germany) ความเร็ว 10,000*g* อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดสารละลายด้านบนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน cuvette ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในเครื่อง UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร หากสี bromophenol blue ในอาหารเหลวจางลงจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงการย่อยสลายฟอสเฟตที่

เกิดจากการกระทำของเชื้อแบคทีเรียซึ่งปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมา กรดอินทรีย์ดังกล่าวจะเปลี่ยนสี bromophenol blue ให้จางลง วัดอย่างน้อย 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี

2.2.1.2 วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในอาหาร NBRIP-BPB

นำหลอดแก้วที่บรรจุอาหารเหลว NBRIP-BPB ซึ่งเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ และกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย ของแต่ละวันมาเขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixture (Genie2®, USA) ปั่นเหวี่ยงเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียด้วยความเร็ว 10,000*g* อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของส่วนน้ำใสที่อยู่ด้านบนด้วยเครื่อง Sartorius Docu-pH_{Meter} (Göettingen, Germany) วัด 3 ซ้ำของแต่ละกรรมวิธี

ผลการศึกษา

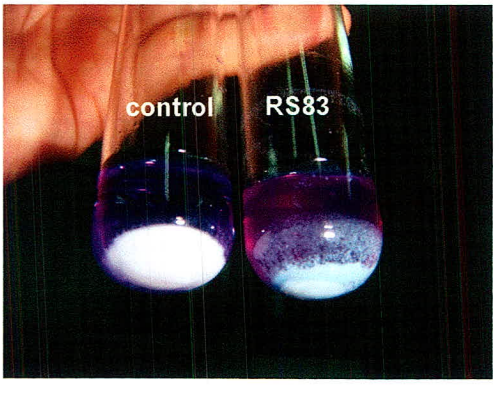
จากผลการทดลองพบว่าภายหลังการเลี้ยงเชื้อเบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ในอาหารเหลว NBRIP-BPB พบว่าสีของอาหารที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์จางลงอย่างต่อเนื่องภายหลังการเลี้ยงเชื้อ โดยในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อนั้นเมื่อนำอาหารไปปั่นเหวี่ยงและวัดค่าการดูดกลืนแสงในกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 เชื้อสายพันธุ์ RS87 และเชื้อสายพันธุ์ RS91 พบว่าลดลงประมาณ 0.154 0.121 และ 0.219 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในอาหารกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ อีกทั้งค่าการดูดกลืนแสงของอาหารในกรรมวิธีควบคุมลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับวันแรกก่อนการบ่มเชื้อ (ตารางที่ 10 และ รูปที่ 60 รูปซ้ายมือ)

สำหรับค่า pH ในอาหารเหลว NBRIP-BPB ที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 สายพันธุ์ RS87 และสายพันธุ์ RS91 นั้นพบว่ามีค่า pH ลดลงเหลือ 3.27 4.39 และ 4.67 ตามลำดับภายหลังการเลี้ยงเชื้อในอาหารนาน 5 วัน ส่วนค่า pH ในหลอดของกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียมีค่า pH =6.47 (ตารางที่ 10) ซึ่งในสภาพความเป็นกรดมากขึ้นนี้เป็นตัวชี้วัดได้ว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์มีศักยภาพในผลิตกรดอินทรีย์มาย่อยสลายฟอสเฟตได้ โดยสังเกตเห็นการย่อยสลายบางส่วนของฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำ ($Ca_3(PO_4)_2$ อยู่บริเวณกันหลอดที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 60; รูปขวามือ)

ตารางที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงและ pH ของอาหารเหลว National Botanical Research Institute's phosphate growth medium ที่มีส่วนผสมของ bromophenol blue (NBRI-BPB) ภายหลังการเลี้ยงเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 เชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ RS87 และเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 นาน 5 วัน

กรรมวิธี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm	ค่า pH
กรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ	0.863	6.47
กรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83	0.713	3.27
กรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS87	0.746	4.39
กรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS91	0.648	4.67

[y]ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ครั้งโดยที่แต่ละครั้งมีการทดสอบ 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี



รูปที่ 60 สีของอาหารเหลว NBRI-BPB ที่เปลี่ยนไปภายหลังการเลี้ยงเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 เชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ RS87 และเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 นาน 5 วัน (รูปซ้าย) และการย่อยสลายของฟอสเฟตบริเวณก้นหลอดที่เลี้ยงเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 เปรียบเทียบกับอาหารในหลอดกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ (รูปขวา)

2.2.2 *วิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์ที่ย่อยสลายฟอสเฟตด้วยเครื่อง HPLC*

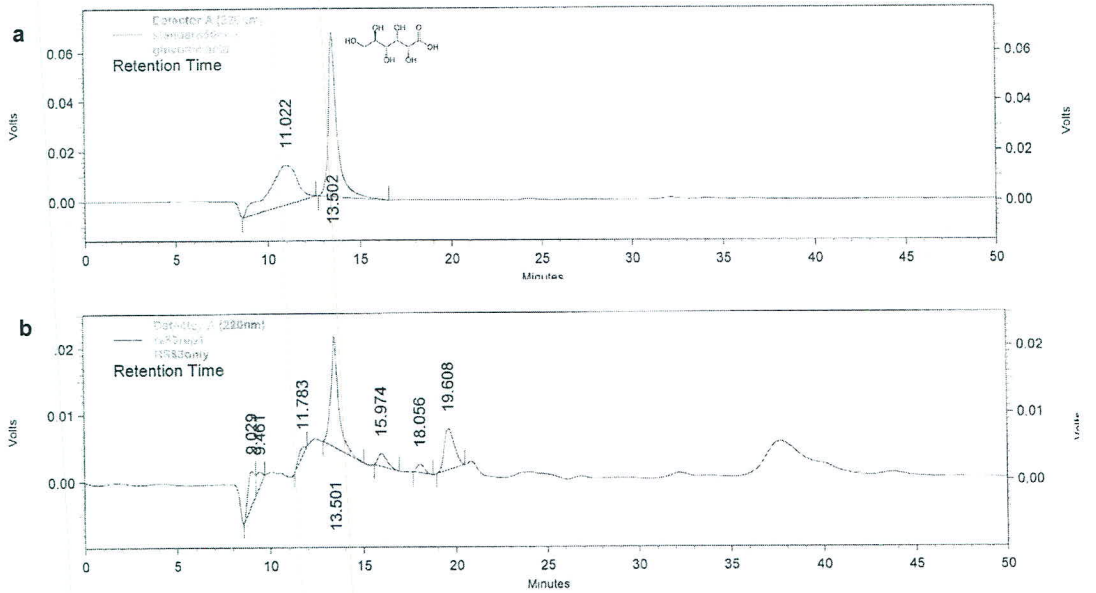
เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 ในอาหารเหลว Luria broth (LB; Becton and Dickinson Company, USA) ที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) อย่างน้อยสองครั้ง และทำเป็นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียอีกครั้งโดยเติมบัฟเฟอร์ชนิดเดิมลงไปเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับความเข้มข้นที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว LB ปิเปตเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 5 มิลลิลิตรเลี้ยงในอาหารเหลว GSM (ประกอบด้วย glucose 10 กรัม/ลิตร; $(NH4)_2SO_4$ 2 กรัม/ลิตร; $MgCl_26H_2O$ 0.3 กรัม/ลิตร; $MnCl_24H_2O$ 1 มิลลิกรัม/ลิตร; $FeSO_47H_2O$ 6 มิลลิกรัม/ลิตร; $NaMoO_4$ 6 มิลลิกรัม/ลิตร; Thiamine 20 ไมโครลิตร/ลิตร และ Tricalcium phosphate 20 มิลลิกรัม/ลิตร; ดัดแปลงจาก Safura et al., 1995 Journal of Biotecnology V.84, 155-161) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียในเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000*g* อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน10 นาที กรองส่วนน้ำใสผ่าน minisart syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Sartorius Biotech, GmbH, Goettingen, Geramany) ก่อนนำไปวิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Shimadzu CLASS-VP, model V6.14 SP1, Japan) โดยฉีดส่วนที่กรองแล้วปริมาตร 30 ไมโครลิตรผ่านเฟสอยู่กับที่ชนิด VertiSep™ IRS C18 HPLC column (3.9x300 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 10 ไมโครเมตร; Vertical Chromatography Co., Ltd, Thailand) วิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์ด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้สำหรับชะหรือแยกตัวอย่างผ่านเฟสอยู่กับที่ (column) คือสารละลายที่ประกอบด้วย 50mM sodium phosphate และ 5mM tetra-butyl-ammonium hydrogen sulfate (pH 6.5) ร่วมกับ 5% acetonitrite ใช้อัตราการไหล 0.25 มิลลิลิตร/นาที นาน 50 นาที (ดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Song และคณะ; Brazilian Journal of Microbiology, 2008) ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

ใช้กรดอินทรีย์ชนิด gluconic acid (50% solution in water; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ความเข้มข้น 1,240mg/1mL ปริมาตร 30 ไมโครลิตร หรือ 37.2 มิลลิกรัม เป็นสารมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบกับสารที่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ปลดปล่อยออกมายังอาหาร GSM

ผลการศึกษา

โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดอินทรีย์ชนิด gluconic acid ที่ฉีดเข้าไปยัง column ปรากฏ peak ที่เด่นขึ้นมาเพียง peak เดียว ตรงตำแหน่ง retention time ประมาณ 13.502 นาที โดยมีพื้นที่ใต้กราฟประมาณ 2,130,411 คิดเป็น 55% ของพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับสารมาตรฐานที่ใช้ที่มี 50% gluconic acid in water ส่วนโครมาโตแกรมของอาหารที่กรองแล้วซึ่งผ่านการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 ปรากฏหลาย peaks แต่มี peak ที่เด่นและสูงที่สุดตรงตำแหน่ง retention time ประมาณ 13.501 นาที โดยที่มีพื้นที่ใต้กราฟ 479,125 คิดเป็น 46% ของพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด อีกทั้งเป็นตำแหน่งเดียวกันกับสารมาตรฐาน gluconic acid (รูปที่ 61) เมื่อคำนวณปริมาณของสาร gluconic acid ของสารสกัดหยาบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว พบว่าเชื้อสายพันธุ์ RS83 ปลดปล่อยสาร gluconic acid ปริมาณ 278.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ RS83 สามารถผลิตกรดอินทรีย์ชนิด gluconic acid และกรดอินทรีย์ดังกล่าวน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟอสเฟตที่ตรึงอยู่ในดินให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถเอาไปใช้ประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตได้



รูปที่ 61 การวิเคราะห์ HPLC ของ gluconic acid ที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 a) โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 50% gluconic acid in water ;Merck, Germany b) โครมาโตแกรมอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83

2.3 ศึกษาความสามารถของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

ใช้ Gas-Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) ตรวจสอบฮอร์โมนจิบเบอเรลลินชนิด GA3 ที่อาจปลดปล่อยออกมาจากเชื้อสายพันธุ์ RS83 ซึ่งในช่วงแรกทำกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ของ GA3 โดยชั่งสาร GA3 บริสุทธิ์จำนวน 5 10 และ 15 นาโนกรัม จากนั้นทำอนุพันธุ์ GA3 โดยละลายใน pyridine ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ *N,O* -Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) ที่มีส่วนผสมของ 1% Trimethylchlorosilane (TMCS) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มใน water bath อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 30 นาที ก่อนทำการวิเคราะห์สาร GA3 ด้วยเครื่อง GC-MS (รูปที่ 62) ตามขั้นตอนของ Zuo และคณะ (*J. Agric. Food Chem.* 2002, *50,* pp.3789-3794) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำต่อความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ GA3

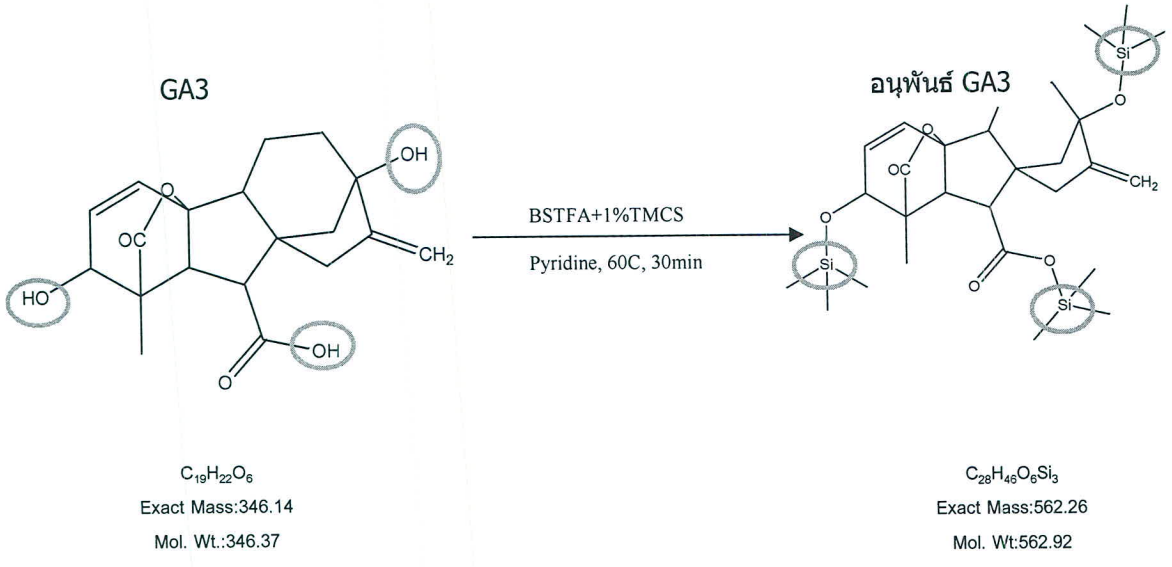
รูปที่ 62 การบ่มสาร GA3 บริสุทธิ์ที่ทำปฏิกิริยากับ pyridine และ BSTFA ที่มีส่วนผสมของ 1% TMCS ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (รูปซ้าย) ก่อนนำไปวิเคราะห์สารในเครื่อง GC-MS (รูปขวา)

เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 และเชื้อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจำนวน 4 ชนิด คือเชื้อ *Bacillus mycoides* สายพันธุ์ RS8 เชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ RS87 และเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 (กัญชลี และศักดิ์ชัย 2551, รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สกว. ฝ่ายเกษตร) ในอาหารเหลว GY ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ บ่มเชื้อใน Environmental-Shaker Incubator ES-20 ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ตามกรรมวิธีของ Joo และคณะ (*Biotechnology Letters* 2004, 26: pp. 487–491) ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ออกจากอาหารเหลวโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 12,000*g* นาน 10 นาที ปรับความเป็นกรด-ด่างของส่วนน้ำใสโดยใช้ 10N HCl ให้ได้ค่า pH=2.50 ก่อนนำไปสกัดแยก GA3 โดยใช้บิวทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตรสกัดสาร GA3 ออกมาจากอาหารเหลว 3 ครั้ง นำส่วนบิวทานอลมาทำการกลั่นระเหยโดยใช้เครื่องกลั่นสารระเหยแบบหมุน (Rotary Evaporator) รุ่น R210 ยี่ห้อ Buchi ประเทศเยอรมันนี เก็บสารที่สกัดได้ใส่ในขวดแก้ว vial สีชา เป่าให้สารสกัดแห้งโดยใช้ไอไนโตรเจนเหลวเพื่อให้น้ำระเหยออกไปจากสารที่สกัดได้ ก่อนทำอนุพันธ์กับสาร pyridine และ BSTFA+1%TMCS ตามกรรมวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น แล้ววิเคราะห์หาสาร GA3 ด้วยเครื่อง GC-MS ต่อไป สำหรับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้เปรียบเทียบนั้นทำโดยเติมสารบริสุทธิ์ GA3 จำนวน 20 นาโนกรัมลงในอาหารเหลว GY ที่

ปราศจากเชื้อแบคทีเรียแล้วดำเนินการสกัด GA3 ออกจากอาหารเหลว GY เช่นเดียวกันกับอาหารที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ทำการทดลอง 2 ซ้ำต่อเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์เพื่อดูศักยภาพของเชื้อในการสร้างกรดจิบเบอเรลลิก

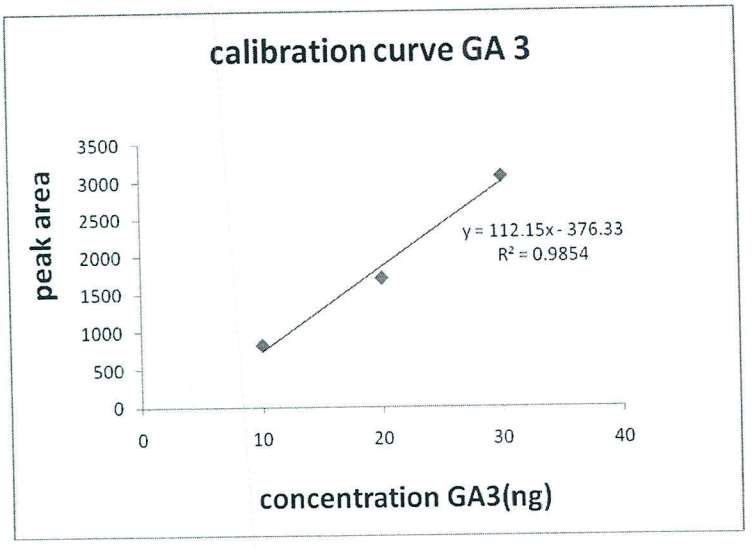
ผลการศึกษา

การเกิดอนุพันธ์ของ GA3 ภายหลังการเติมสาร pyridine และ BSTFA+1%TMCS เกิดขึ้นโดยที่ pyridine จะช่วยคลายโครงสร้างของ GA3 ทำให้กลุ่ม hydroxyl คลายตัวออกมาเพื่อที่กลุ่มของ Si ของสาร BSTFA สามารถเข้าไปแทนที่ (รูปที่ 63) และทำให้สาร GA3 มี Boiling point ลดลง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำสารไปวิเคราะห์ที่เครื่อง GC-MS

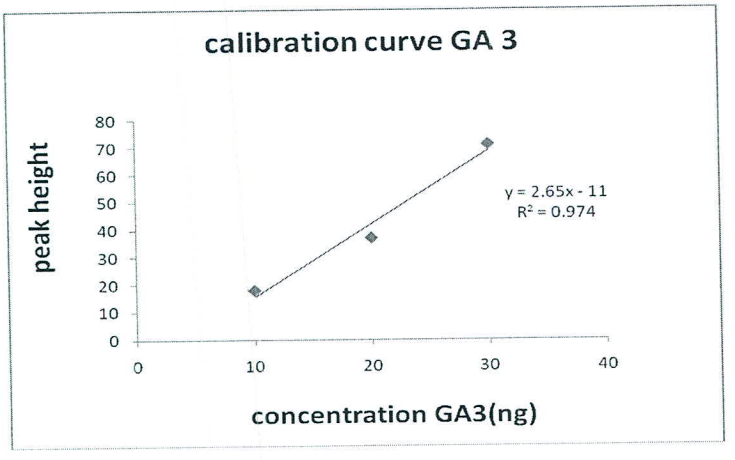


รูปที่ 63 แสดงการเกิดอนุพันธ์ของสาร GA3 ภายหลังทำปฏิกิริยากับสาร pyridine และ BSTFA+1%TMCS

ผลการสร้างกราฟมาตรฐานพบว่าความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ GA3 แปรผันตรงกับ peak area และ peak height ที่ตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง GC-MS โดยแสดงค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์คือ 0.9854 และ 0.974 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 64 และ 65 แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ GA3 หลังทำปฏิกิริยากับสาร BSTFA+1%TMCS สามารถยืนยันวิธีการวิเคราะห์ GA3 ด้วย GC-MS ได้

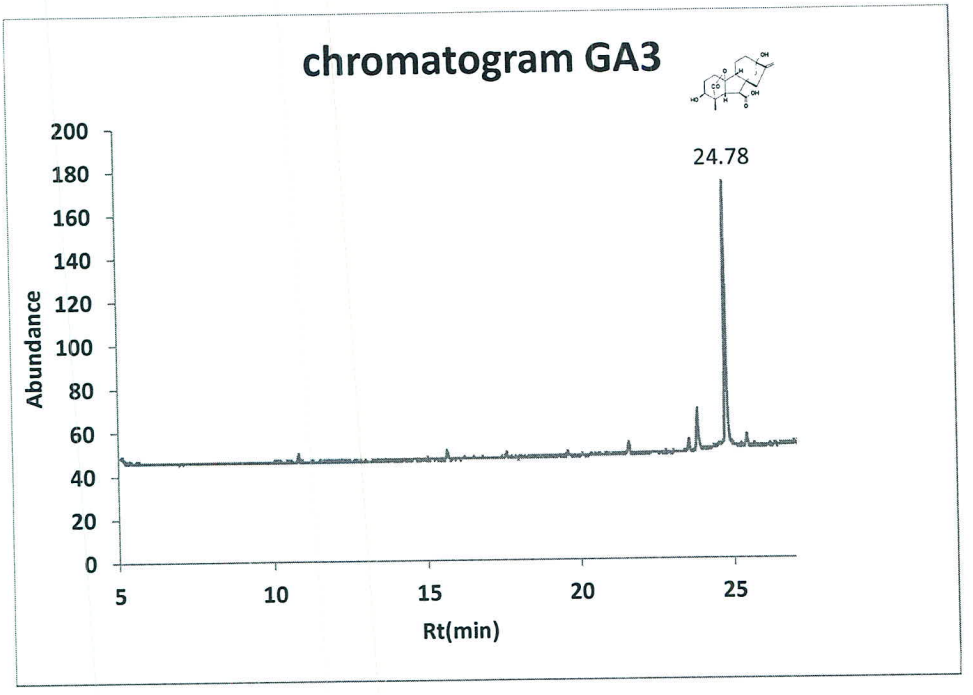


รูปที่ 64 แสดง peak area ของสารบริสุทธิ์ GA3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายหลังการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS



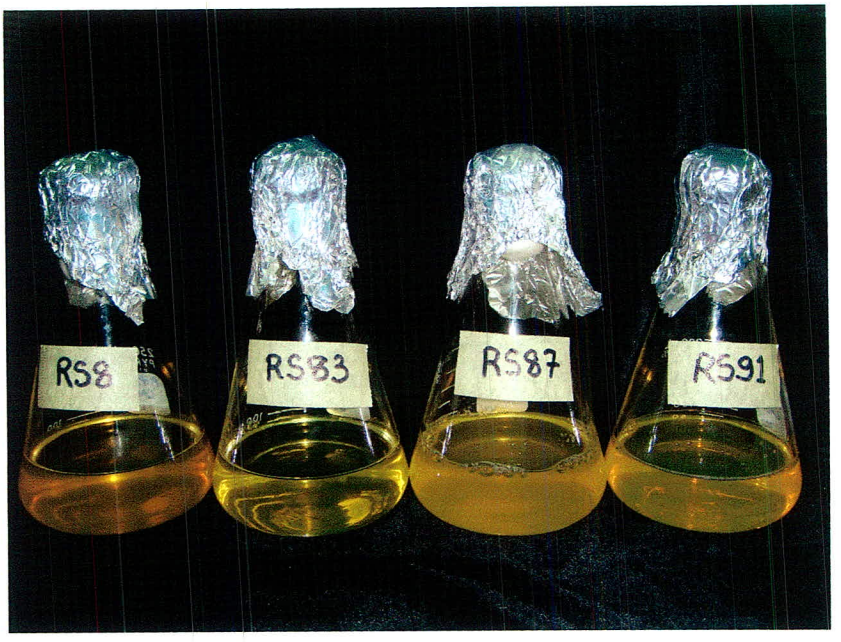
รูปที่ 65 แสดง peak height ของสารบริสุทธิ์ GA3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายหลังการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

ผลการวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ GA3 ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่าตำแหน่ง retention time ของสาร อยู่ที่24.78 นาที (รูปที่ 66) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใกล้เคียงกันกับสารบริสุทธ์ที่ทำในกราฟมาตรฐาน จึงชี้ให้เห็นว่าสารบิวทานอลสามารถสกัด GA3 ออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อได้



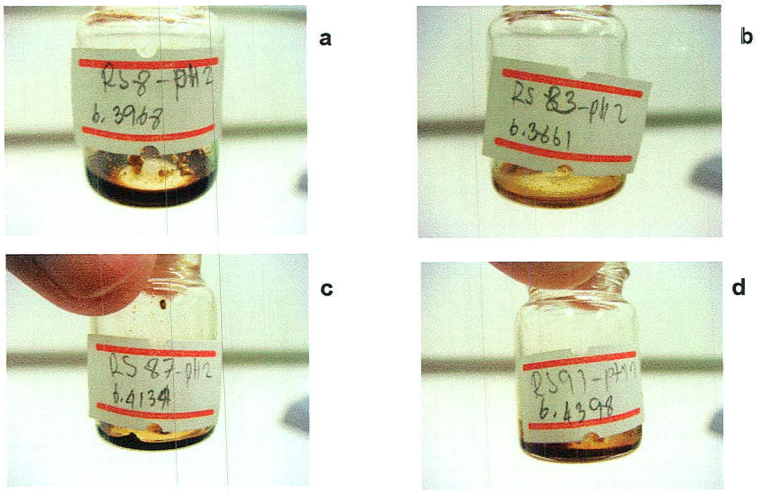
รูปที่ 66 โครมาโตแกรมแสดงการปรากฏของ GA3 ที่สกัดออกมาจากอาหารเหลว GY ซึ่งมีส่วนผสมของสารบริสุทธิ์ GA3 ปริมาณ 20 นาโนกรัมในตำแหน่ง retention time ประมาณ 24.78 นาที ภายหลังการวิเคราะห์ด้วย GC-MS

ภายหลังเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งสี่สายพันธุ์คือ RS8 RS83 RS87 และ RS91 ในอาหารเหลว GY เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง พบว่า pH ของอาหารเหลวเปลี่ยนเป็นด่างอ่อนประมาณ 8.88 8.49 8.66 และ 8.53 ตามลำดับ แสดงว่าแบคทีเรียทั้งสี่สายพันธุ์ปลดปล่อยสารที่มีองค์ประกอบของเอมีน ($-NH_2$) ออกมาทำให้ pH สูงขึ้น เมื่อปรับ pH ของอาหารเหลวลดลงเหลือ 2.5 พบว่าอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS8 RS87 และ RS91 มีลักษณะขุ่น โดยที่อาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อ RS87 มีความขุ่นของอาหารมากที่สุด ในขณะที่อาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 ยังมีลักษณะใส (รูปที่ 67)



รูปที่ 67 ลักษณะความขุ่น-ใสของอาหารเหลว GY ที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ภายหลังการปรับ pH ให้เหลือ 2.5 ด้วย 10N HCl

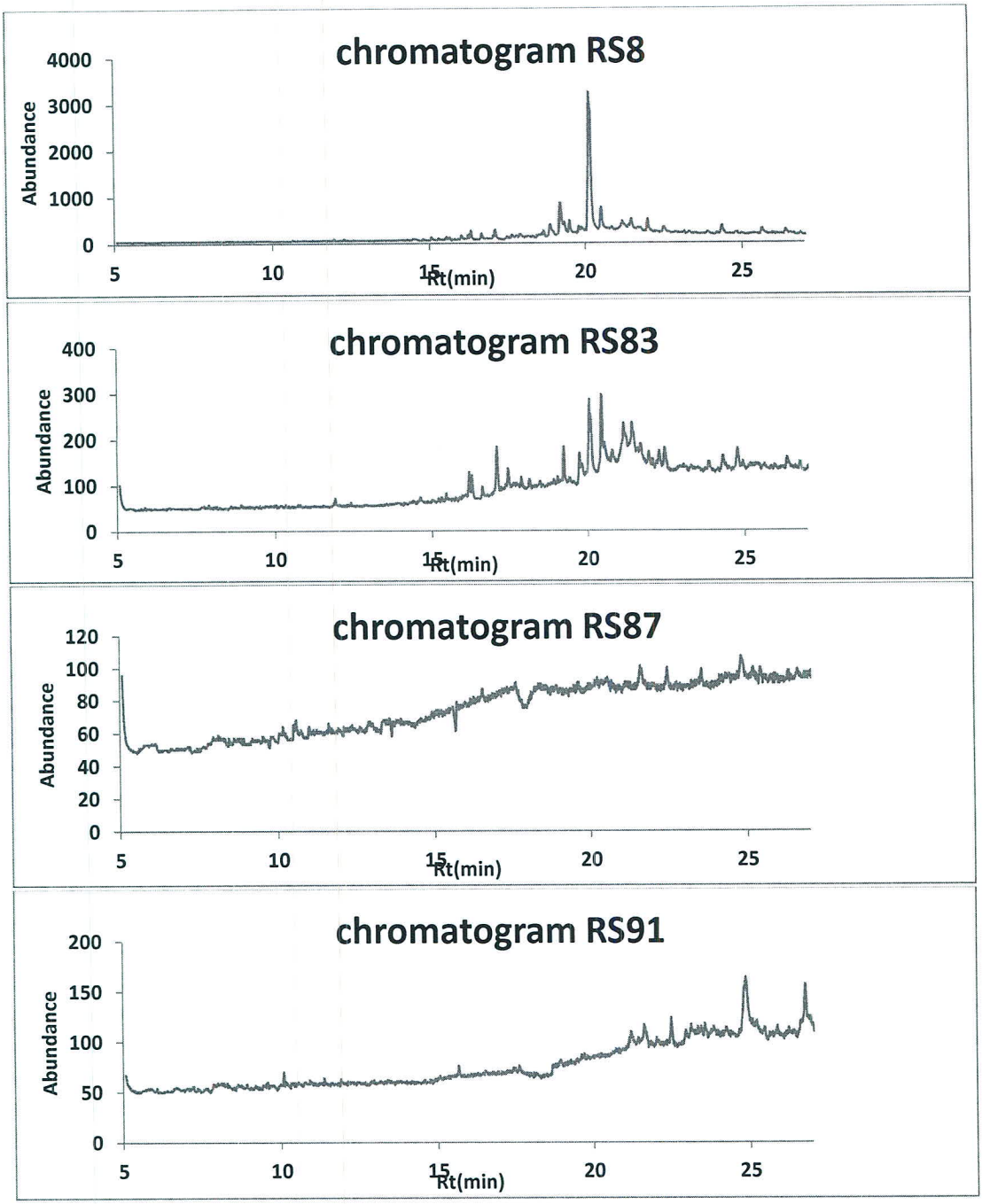
ภายหลังการกลั่นระเหยด้วยเครื่องกลั่นสารระเหยแบบหมุน และปล่อยให้สารสกัดหยาบแห้งติดก้นขวด vial แล้วพบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดออกมาจากอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS8 RS87 และ RS91 มีสีน้ำตาลเข้ม ในขณะที่สารสกัดหยาบที่สกัดออกมาจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 มีสีน้ำตาลอ่อน (รูปที่ 68) สารสกัดหยาบภายหลังการสกัดอาหารเหลว GY ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS8 สายพันธุ์ RS83 สายพันธุ์ RS87 และ สายพันธุ์ RS91 เมื่อปล่อยให้แห้งสนิทแล้วมีน้ำหนัก 165.2 มิลลิกรัม 118.1 มิลลิกรัม 108.4 มิลลิกรัม และ 115.2 มิลลิกรัม ตามลำดับ



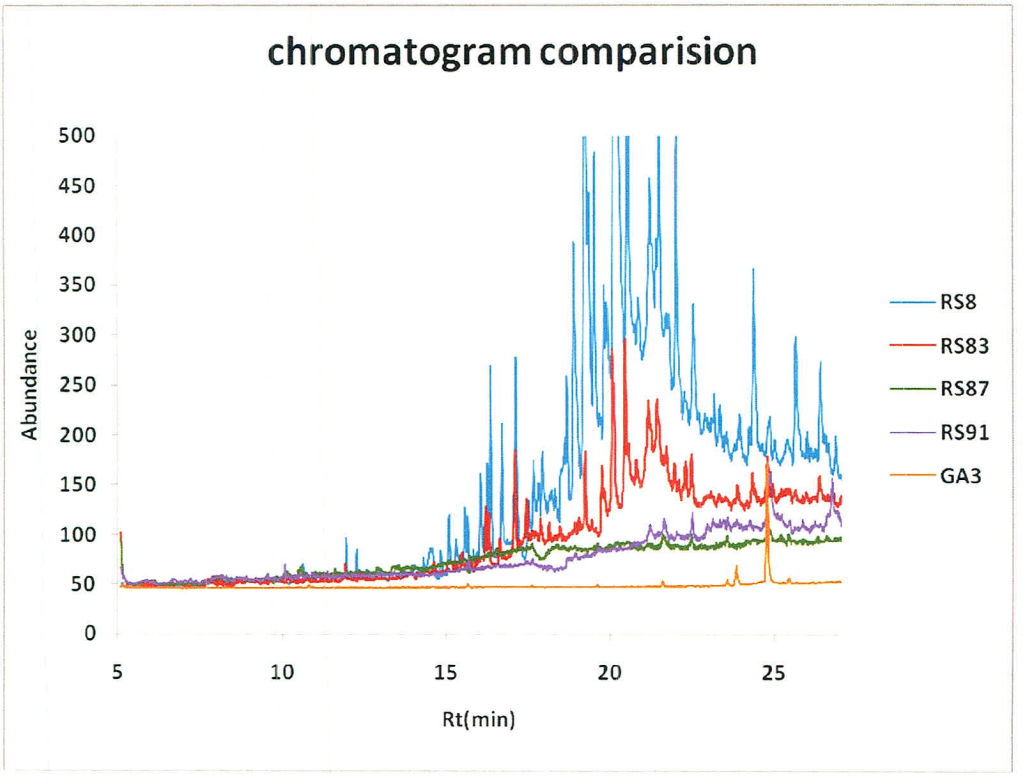
รูปที่ 68 สีของสารสกัดหยาบแห้งที่สกัดจากอาหาร GY ซึ่งผ่านการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์คือ a) เชื้อ *B. mycoides* สายพันธุ์ RS8 b) เชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 c) เชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ RS87 และ d) เชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ RS91

เมื่อวิเคราะห์สารด้วย GC-MS พบว่าโครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งสี่สายพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 69 นำโครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบที่ผ่านการที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งสี่สายพันธุ์มาเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน GA3 จะสังเกตเห็นว่าสารสกัดหยาบที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อทั้งสี่สายพันธุ์มี peak จำนวนมากที่อาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดอาจปลดปล่อยสารหลายชนิดออกมาช่วงระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว GY ทำให้ยากต่อการพิจารณา peak ของสารสกัดหยาบตรงตำแหน่ง retention time ของสารมาตรฐาน GA3 (รูปที่ 70) แต่เมื่อปรับ baseline และขยายการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบ และสารมาตรฐาน GA3 กลับพบว่าสารสกัดที่แยกได้จากอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 มี peak ที่เกิดขึ้นตรงตำแหน่ง retention time ของสาร GA3 มาตรฐานเท่านั้น ส่วนโครมาโตแกรมของเชื้ออื่นๆ ปรากฏ peak ใกล้กับ retention time ของสารมาตรฐาน GA3 ซึ่งอาจเป็นสารชนิดอื่นที่มีโครงสร้างหรือองค์ประกอบคล้ายหรือใกล้เคียงกับ GA3 ดังแสดงในรูปที่ 71 เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดหยาบที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน GA3 ความเข้มข้น 10

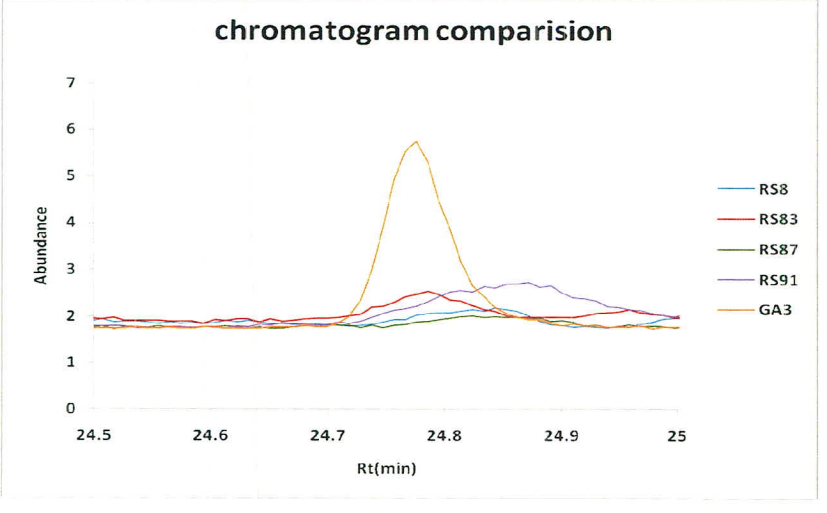
20 และ 30 นาโนกรัมนั้นพบว่าเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 สามารถผลิต GA3 ได้ประมาณ 20 นาโนกรัม (รูปที่ 72)



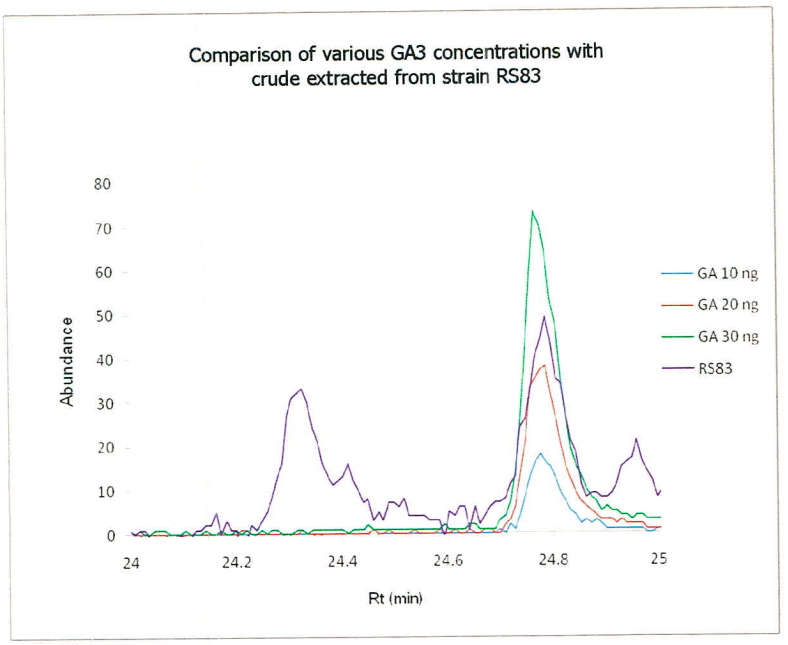
รูปที่ 69 โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบที่สกัดจากอาหารเหลว GY ซึ่งผ่านการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus mycoides* สายพันธุ์ RS8 เชื้อ *Enterobacter asburia* สายพันธุ์ RS83 เชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ RS87 และ เชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ RS91



รูปที่ 70 เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารมาตาฐาน GA3 (20 นาโนกรัม) และสารสกัดหยาบที่สกัดออกมาจากอาหารเหลว GY ซึ่งผ่านการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS8 RS83 RS87 และ RS91



รูปที่ 71 รูปขยายการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมตรงตำแหน่ง retention time ของสารบริสุทธิ์ GA3 ภายหลังการปรับ baseline ระหว่างสารมาตรฐาน GA3 และสารสกัดจากอาหารเหลว GY ซึ่งผ่านการเลี้ยงเชื้อทั้งสี่สายพันธุ์



รูปที่ 72 เปรียบเทียบปริมาณ GA3 ของสารสกัดหยาบที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 ซึ่งปรากฏ peak ตรงตำแหน่ง retention time 24.78 นาทีเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน GA3 ความเข้มข้นระดับต่างๆ

2.4 ศึกษาความสามารถของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ในการผลิตสารอินทรีย์ระเหย (volatile organic compound)

2.4.1 *ทดสอบ in vitro bioassay system ภายใต้ห้องปฏิบัติการ*

พืชทดสอบคือผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L.) สายพันธุ์เพชรงาม (บริษัทเจียไต๋ จำกัด) จัดอยู่ในวงศ์ Asteraceae หรือ Compositae อาหารที่ใช้เลี้ยงต้นพืช และเชื้อแบคทีเรียคือ 50% Murashige and Skoog, modified Basal Medium with GAMBORG vitamins (*Phyto*Technology Laboratories®, KS, USA) หรือ 50%MS ข้อดีของการใช้อาหาร 50%MS เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียคือ เชื้อจำกัดการเจริญเติบโตเฉพาะบริเวณที่หยดเชื้อลงบนอาหาร ไม่เจริญเติบโตแผ่ขยายเป็นรัศมีกว้างเหมือนอาหาร rich media อาหารแข็ง 50% MS (ประกอบด้วย 2.2 กรัม MS, 15 กรัม sucrose และ วุ้น 12 กรัม ต่อปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH=5.7 ก่อนฆ่าเชื้อ)

รูปแบบการทดลองคือ Completely Randomized Design การทดลองประกอบด้วย 4 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีควบคุมที่ปราศจากการใส่เชื้อแบคทีเรีย กรรมวิธีที่ใส่เชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์

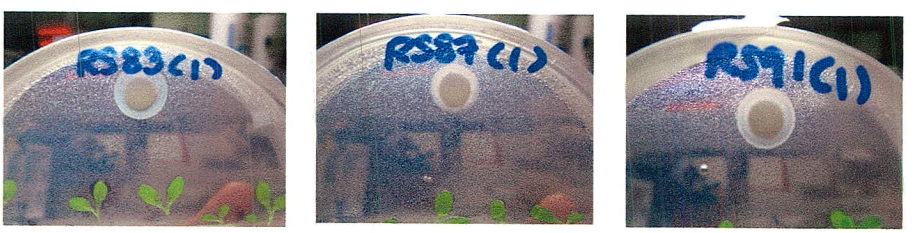
RS83 กรรมวิธีที่ใส่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ RS87 และกรรมวิธีที่ใส่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ RS91 แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ โดยที่ซ้ำของการทดลองคือจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (90X15 มิลลิเมตร มีผนังกั้นตรงกลาง หรือ I-plates; Hycon Plastic, China) ด้านหนึ่งบรรจุอาหารแข็ง 50% MS ที่ใช้เลี้ยงพืชทดสอบ อีกด้านหนึ่งบรรจุอาหารแข็ง 50% MS ที่วางแผ่น disc เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วหยดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย สำหรับกรรมวิธีควบคุมนั้นมีเพียงอาหาร 50%MS เท่านั้น ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

แช่เมล็ดผักกาดหอมในสารละลาย 1%NaOCl นาน 20 นาที ล้างเมล็ดพืชด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง วางเมล็ดบนกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อยู่ในจานอาหารเปล่า บ่มเมล็ดในที่มืดนาน 3 คืน จากนั้นย้ายต้นกล้าผักกาดหอมมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง 50%MS ที่บรรจุในจานอาหาร I plate ด้านหนึ่ง โดยวางต้นพืชจำนวน 9 ต้นต่อจานอาหาร วางแผ่น disc ที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Schleicher & Schuell, Einbeck, Germany) ลงบนผิวอาหารแข็ง 50%MS อีกด้านหนึ่งของจานอาหารที่อยู่ตรงกันข้ามกับต้นพืช หยดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 RS87 หรือ RS91 (ความเข้มข้น 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB; BD, MD, USA) นาน 24 ชั่วโมง ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อแผ่น disc ส่วนกรรมวิธีควบคุมเป็นเพียงอาหาร 50%MS อีกด้านหนึ่งของจานอาหาร I-plate พันขอบจานอาหารด้วยพาราฟิล์มสองชั้น วางจานอาหารบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตั้งระบบการให้แสงฟลูออเรสเซนส์ ขนาด 18W กับพืชนาน 14 ชั่วโมงและไม่ให้แสงกับพืชนาน 10 ชั่วโมงต่อวัน ความชื้นสัมพัทธ์ 50-60% ที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญเติบโตของพืชทุกวัน บันทึกความกว้างใบเลี้ยงคู่ทุกต้นของแต่ละกรรมวิธีหลังการเลี้ยงต้นกล้าในอาหาร 50% MS ร่วมกับเชื้อนาน 5 วัน เมื่อเลี้ยงต้นพืชในอาหารแข็งร่วมกับแบคทีเรียนาน 10 วันดึงต้นพืชผักกาดหอมแต่ละต้นจากแต่ละกรรมวิธีอย่างระมัดระวังออกมาจากอาหารแข็ง 50% MS ล้างวุ้นที่ติดบริเวณรากพืชโดยน้ำสะอาด บันทึกความสูงของต้นพืช ความยาวราก และจำนวนรากแขนงของแต่ละต้นในแต่ละกรรมวิธี นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of

variance) จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกรรมวิธี (follow-up test) ด้วย least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

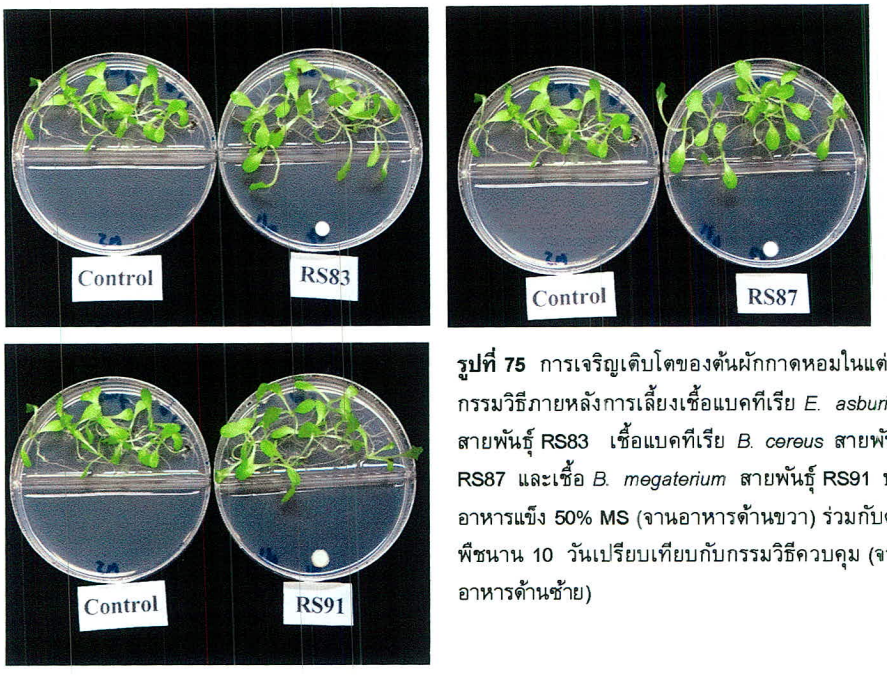
ผลการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ปรากฏโคโลนีใสเป็นรัศมีล้อมรอบแผ่น disc ประมาณ 2 มิลลิเมตรภายหลังหยดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์บนแผ่น disc นาน 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไปเชื้อทุกสายพันธุ์ไม่มีการเจริญเติบโตแผ่ขยายเป็นรัศมีกว้างออกไปจากเดิม หากแต่ปรากฏเพียงความขุ่นของโคโลนีเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (รูปที่ 73) เมื่อสังเกตการเจริญเติบโตของผักกาดหอมของแต่ละกรรมวิธีภายหลังการย้ายต้นพืชมาเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียในจานอาหารเดียวกันนาน 5 วัน พบว่าใบเลี้ยงคู่ของผักกาดหอมในกรรมวิธีที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีขนาดความกว้างเฉลี่ยมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดใบเลี้ยงคู่ของต้นพืชในกรรมวิธีควบคุม ซึ่งใบเลี้ยงคู่ในกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ฝั่งตรงกันข้ามของต้นพืชมีขนาดความกว้างเฉลี่ยมากที่สุด รองลงไปคือกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS87 และสายพันธุ์ RS91 ตามลำดับ (รูปที่ 74 และตารางที่ 11)



รูปที่ 73 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่เจริญบนอาหาร 50%MS ปรากฏล้อมรอบแผ่น disc ภายหลังการเลี้ยงเชื้อร่วมกับต้นผักกาดหอมนาน 5 วัน

ข้ามกับต้นพืชมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า สังเกตจากการเจริญของต้นพืชที่แออัดกันในจานอาหาร (รูปที่ 75) เมื่อดึงรากพืชแต่ละต้นของทุกกรรมวิธีออกมาจากอาหาร 50%MS เพื่อวัดความยาวราก ความสูงของต้นพืช และจำนวนรากแขนงที่แตกออกมาจากรากแรก พบว่าโดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 ปลดปล่อยสารอินทรีย์ระเหยกระตุ้นพืชให้มีความยาวของราก ความสูงของต้นพืช และจำนวนรากแขนงมากที่สุด รองลงมาคือกรรมวิธีที่เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS91 กรรมวิธีที่เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS87 และกรรมวิธีควบคุมตามลำดับ เมื่อพิจารณาความแตกต่างทางสถิติพบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ส่งเสริมพืชมีความยาวราก และความสูงของต้นพืชแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับต้นพืชในกรรมวิธีควบคุม แต่มีเพียงเชื้อสายพันธุ์ RS83 เท่านั้นที่ส่งเสริมให้พืชปรากฏจำนวนรากแขนงมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมควบคุม (ตารางที่ 12 และรูปที่ 76)



รูปที่ 75 การเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอมในแต่ละกรรมวิธีภายหลังการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 เชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* สายพันธุ์ RS87 และเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ RS91 บนอาหารแข็ง 50% MS (จานอาหารด้านขวา) ร่วมกับต้นพืชนาน 10 วันเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (จานอาหารด้านซ้าย)

ตารางที่ 12 ผลของสารอินทรีย์ระเหยที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอมภายหลังการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร 50%MS ร่วมกับต้นพืชนาน 10 วัน

กรรมวิธี	ความยาวเฉลี่ยของราก (เซนติเมตร)[u]	ความสูงเฉลี่ยของต้นพืช (เซนติเมตร)[v]	จำนวนรากแขนงเฉลี่ยต่อต้น[w]
กรรมวิธีควบคุม	2.95c[x]	3.33c	4.59b
Enterobacter asburiae สายพันธุ์ RS83	3.88a	4.67a	7.11a
Bacillus cereus สายพันธุ์ RS87	3.35b	4.20b	5.33b
Bacillus megaterium สายพันธุ์ RS91	3.52ab	4.57a	5.51b
$LSD_{0.05}$	0.38	0.33	1.10

[u]เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองสองครั้ง แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ โดยที่แต่ละซ้ำมี 9 ต้น ความยาวรากวัดจากโคนต้นพืชแต่ละต้นลงมาปลายสุดของรากแรก

[v]เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองสองครั้ง แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ โดยที่แต่ละซ้ำมี 9 ต้น ความสูงของลำต้นวัดจากโคนต้นพืชแต่ละต้นขึ้นไปยังปลายสุดของใบจริงแรก

[w]เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองสองครั้ง แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ โดยที่แต่ละซ้ำมี 9 ต้น นับจำนวนรากแขนงที่แตกออกจากรากแรกของแต่ละต้น

[x]ตัวเลขที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยใช้การทดสอบ least significant difference (LSD)

รูปที่ 76 ลักษณะของผักกาดหอมในกรรมวิธีที่เลี้ยงเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 บนอาหาร 50% MS ร่วมกับต้นพืชนาน 10 วัน (ขวา) เปรียบเทียบกับพืชในกรรมวิธีควบคุม (ซ้าย)

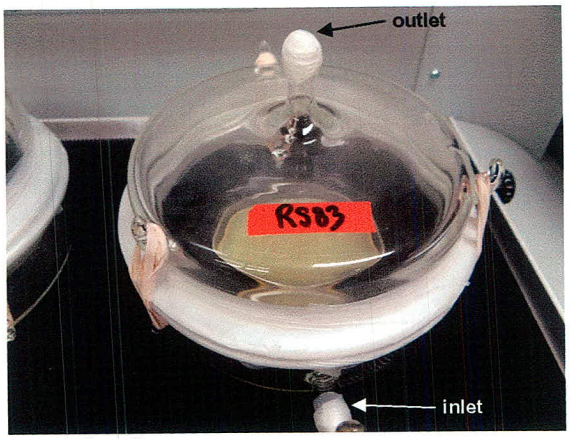
2.4.2 *วิเคราะห์สารระเหยอินทรีย์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC)*

2.4.2.1 การเลี้ยงเชื้อและการสกัดสารอินทรีย์ระเหย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937a เป็นเชื้อที่เคยมีรายงานว่าปลดปล่อยสารอินทรีย์ระเหยสองชนิดคือ 3-hydroxy-2-butanone และ 2,3-butanediol ที่มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช *Arabidopsis* sp. (Ryu et al.,2003, PNAS 100(8): 4927-4932) เชื้อแบคทีเรียทดสอบในครั้งนี้คือ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 และ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ RS87 บนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA; Becton, Dickinson and Company, USA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ใช้ห่วงพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้วขูดโคโลนีของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ประมาณครึ่งห่วงลงในแต่ละหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อแล้วซึ่งบรรจุน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร คนให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอโดยใช้ vortex mixture (Genie 2, Fisher Scientific, USA) ดูดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรหยดลงบนผิวอาหารแข็ง TSA ที่บรรจุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เกลี่ยให้ทั่วผิวอาหาร จากนั้นย้ายจานอาหารของ

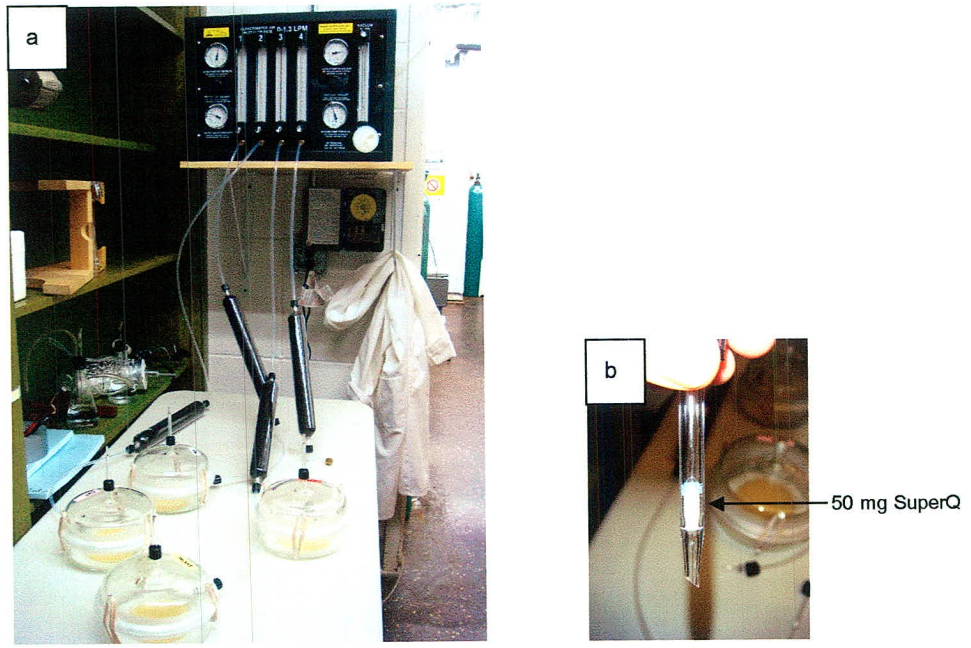
แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ใส่ลงในโถแก้ว (pyrex quality) ด้านล่างที่อบฆ่าเชื้อแล้ว (อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร นำฝาจานอาหารออก ครอบฝาโถแก้วด้านบน (รูปที่ 77) พันพาราฟิล์มรอบขอบโถแก้วด้านล่างและด้านบนรวมทั้งช่องปล่อยลมเข้า inlet และปล่อยลมออก outlet ของโถแก้วเพื่อให้เกิดเป็นระบบปิดและเกิดการสะสมสารระเหยอินทรีย์ภายในโถแก้ว สำหรับกรรมวิธีควบคุมใส่เพียงจานอาหารที่บรรจุอาหารแข็ง TSA ลงในโถแก้ว บ่มโถแก้วทั้งหมดในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (รูปที่ 78) ทำการทดลองเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นอีกครั้งแต่เลี้ยงเชื้อบนอาหาร 50% MS แทน

นำโถแก้วของแต่ละกรรมวิธีไปต่อเข้ากับอุปกรณ์ Olfactometer system (Analytical Research Systems, Gainesville, FL) จากนั้นปล่อยลมจากเครื่อง Olfactometer ที่มีท่อแก้วบรรจุ charcoal-filtered เพื่อปล่อยอากาศบริสุทธิ์เข้าสู่บริเวณ inlet ของแต่ละโถแก้วโดยมีสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วอุดตรงบริเวณ inlet อีกครั้ง ปล่อยลมเข้าสู่โถแก้วแต่ละโถในอัตราที่คงที่คือ 500 มิลลิลิตร/นาที จากนั้นลมจะพัดผ่านสารอินทรีย์ระเหยที่ปลดปล่อยออกมาจากแบคทีเรียขึ้นไปจับกับ adsorbent trap ที่อยู่ด้านบนของโถแก้วซึ่งบรรจุ 50 มิลลิกรัม SuperQ (Alltech Associates, Deerfield, IL, USA) ดังแสดงในรูปที่ 79 ปล่อยลมเข้าสู่โถแก้วอย่างต่อเนื่องเป็นนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดสารอินทรีย์ระเหยจาก filter ที่อยู่ใน SuperQ adsorbent trap ของแต่ละกรรมวิธีโดยใช้ methylene chloride (Fisher, USA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อกรรมวิธี (รูปที่ 80) นำสารที่สกัดใส่หลอดแก้วขนาด 1 มิลลิลิตรและเก็บไว้ในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography ต่อไป (ดัดแปลงจาก Ngumbi et al. J Chem Ecol (2009) 35:1009–1020)

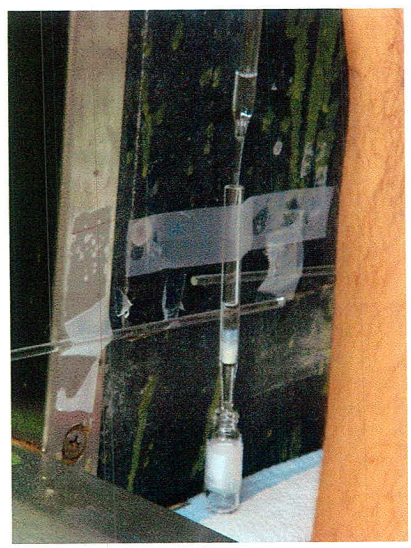


รูปที่ 77 โถแก้วที่บรรจุจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้านใน พันด้วยพาราฟิมล์บริเวณขอบฝาด้านบนและด้านล่าง รวมทั้งบริเวณ inlet และ outlet ของโถแก้วเพื่อให้เป็นระบบปิด

รูปที่ 78 บ่มเชื้อแบคทีเรียของแต่ละกรรมวิธีในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง



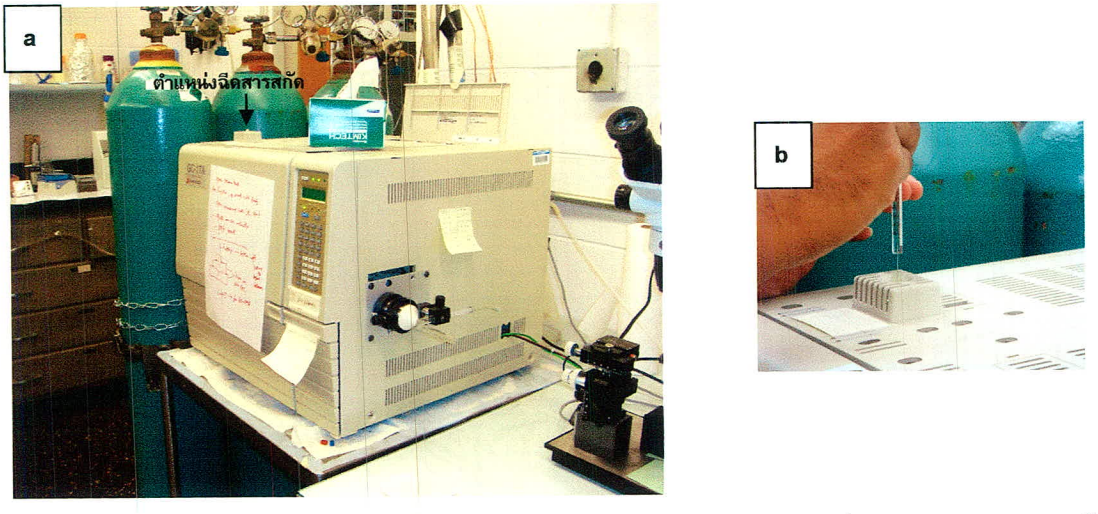
รูปที่ 79 แสดงการปล่อยลมจากเครื่อง Olfactometer system ผ่าน charcoal-filtered เข้าไปยังโถแก้วของแต่ละกรรมวิธี โดยมี SuperQ adsorbent trap เชื่อมอยู่ด้านบนของแต่ละโถแก้วเพื่อจับสารอินทรีย์ระเหยที่ปลดปล่อยออกมาจากแบคทีเรียในแต่ละสายพันธุ์ (a) และลักษณะของ adsorbent trap ที่ติดอยู่ด้านบนโถแก้ว (b)



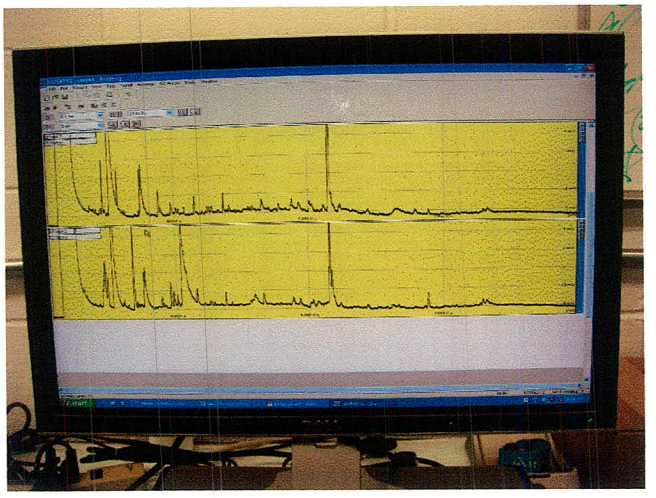
รูปที่ 80 การสกัดสารอินทรีย์ระเหยออกมาจาก SuperQ adsorbent trap โดยใช้ methylene chloride

2.4.2.2 การวิเคราะห์สารสกัดอินทรีย์ระเหย

ฉีดสารสกัดอินทรีย์ระเหยของแต่ละกรรมวิธีปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าไปในเครื่องวิเคราะห์ Gas Chromatography (Shimadzu GC-17A, Japan) ดังแสดงในรูปที่ 81 ประกอบด้วย flame ionization detector (FID) และขนาดของ GC capillary column คือ Rtx-1MS, 0.25 mm I.D., 0.25µm film thickness (Restek, Bellefonte, PA, USA) ปล่อยแก๊ซ helium ในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อนาทีเพื่อเป็นตัวพาสารผ่าน capillary column ตั้งโปรแกรม GC oven ตามลำดับดังนี้ ฉีดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนาน 2 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสทุกๆ นาที จนถึง 200 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที (รูปที่ 82)



รูปที่ 81 เครื่อง Gas Chromatography (GC) ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์สารอินทรีย์ระเหยที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อแบคทีเรีย (a) และการฉีดสารสกัดเข้าสู่เครื่อง GC บริเวณตำแหน่งฉีดสารที่อยู่ด้านบนของเครื่อง (b)

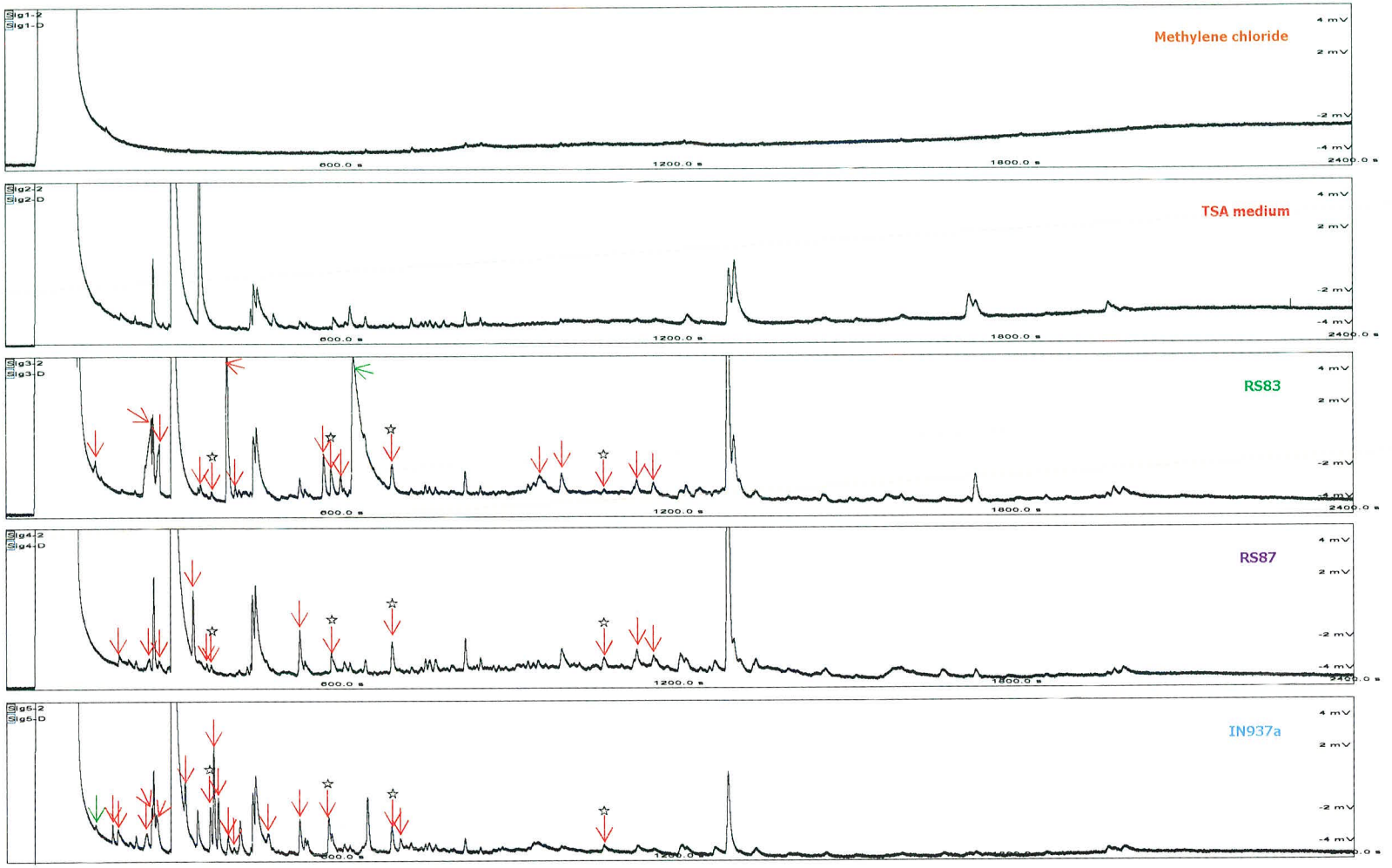


รูปที่ 82 ลักษณะ peak ของกรรมวิธีที่ปรากฏบนจอภาพภายหลังการฉีดสารสกัดอินทรีย์ระเหยผ่านเข้าไปยังเครื่อง GC นาน 40 นาที

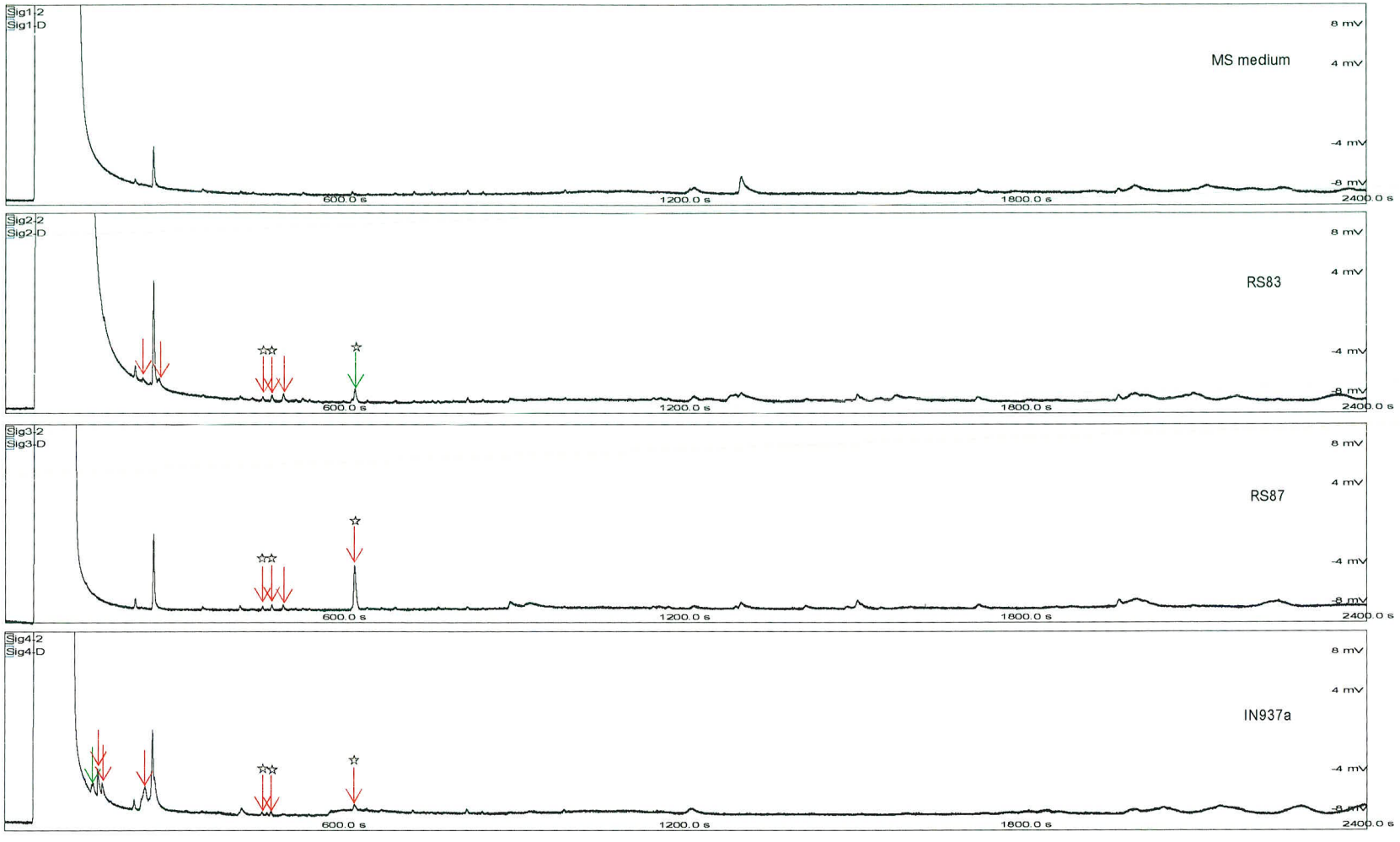
ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาพบว่า เมื่อฉีด methylene chloride เพียงอย่างเดียวเข้าไปในเครื่อง GC พบว่า peak ของสารดังกล่าวปรากฏขึ้นเวลาประมาณ 1.30 นาทีภายหลังการฉีด และไม่ปรากกฏ peak ใด ๆ อีกเลยตลอดระยะเวลาของการ run เครื่อง GC สารอินทรีย์ระเหยในกรรมวิธีควบคุมคืออาหาร TSA เพียงอย่างเดียวปรากฏ peak จำนวนมาก อย่างไรก็ตาม จำนวน peak ของสารอินทรีย์ระเหยในกรรมวิธีที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ซึ่งเจริญบนอาหาร TSA มีมากกว่ากรรมวิธีควบคุม เมื่อเปรียบเทียบระยะ peak ของสารอินทรีย์ระเหย ตามเวลาต่าง ๆ ที่ปรากฏในกรรมวิธีที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกับกรรมวิธีที่มีเพียงอาหาร TSA อย่างเดียว พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 สายพันธุ์ RS87 และสายพันธุ์ IN937a ปลดปล่อยสารอินทรีย์ระเหยที่แตกต่างและไม่ปรากกฏในอาหาร TSA ซึ่งไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ จำนวน 17 peaks 12 peaks และ 18 peaks ตามลำดับ (รูปที่ 83) ดังแสดงตามลูกศรที่ปรากฏอยู่ด้านบนของ peaks นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ปลดปล่อยสารอินทรีย์ระเหยเหมือนกันจำนวน 4 peaks ตรงตำแหน่งที่มีสัญลักษณ์ดาวปรากฏบนลูกศรสีแดงเมื่อเปรียบเทียบ

ระหว่างเชื้อสายพันธุ์ RS83 และ IN937a ซึ่งเป็น positive control พบว่ามีจำนวน peaks ของสารอินทรีย์ระเหยที่เหมือนกันถึง 7 peaks ด้วยกัน



รูปที่ 83 แสดงโครมาโตแกรมของสารอินทรีย์ระเหยที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 *Bacillus* sp. สายพันธุ์ RS87 และ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937a เปรียบเทียบกับอาหาร tryptic soy agar (TSA) ที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ และตัวทำละลาย methylene chloride ที่ใช้สกัดสารอินทรีย์ระเหยออกมาจาก SuperQ trap (ลูกศรสีแดงหรือเขียวแสดงตำแหน่ง peak ของสารอินทรีย์ระเหยที่ปรากฏเฉพาะกรรมวิธีที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย; ดาวที่ปรากฏเหนือตำแหน่งลูกศรสีแดงแสดงถึงตำแหน่ง peak ของสารอินทรีย์ระเหยที่ปรากฏทั้งแบคทีเรียสามสายพันธุ์)



รูปที่ 84 แสดงโครมาโตแกรมของสารอินทรีย์ระเหยที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 *Bacillus* sp. สายพันธุ์ RS87 และ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937a เปรียบเทียบกับอาหาร 50% MS ที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ (ลูกศรสีแดงหรือเขียวแสดงตำแหน่ง peak ของสารอินทรีย์ระเหยที่ปรากเฉพาะกรรมวิธีที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย; ดาวที่ปรากฏเหนือตำแหน่งลูกศรสีแดงหรือเขียวแสดงถึงตำแหน่ง peak ของสารอินทรีย์ระเหยที่ปรากฏในแบคทีเรียสามสายพันธุ์

สำหรับสารอินทรีย์ระเหยที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อแบคทีเรียซึ่งเจริญบนอาหาร 50%MS นั้นกลับพบว่ามีจำนวน peak ที่ปรากฏน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารอินทรีย์ระเหยของเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร TSA ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอาหาร MS เป็นอาหารที่ไม่มีสารอาหารมากเช่นเดียวกับอาหาร TSA ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตไม่ดีนัก โดยที่เชื้อสายพันธุ์ IN937a มีการเจริญเติบโตดีที่สุด รองลงมาคือเชื้อสายพันธุ์ RS83 และ RS87 ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบจำนวน peaks ของสารอินทรีย์ระเหยระหว่างอาหารที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและอาหาร 50%MS อย่างเดียวพบว่าเชื้อสายพันธุ์ RS83 สายพันธุ์ RS87 และสายพันธุ์ IN937a ปลดปล่อยสารอินทรีย์ระเหยที่แตกต่างและไม่ปรากฏในอาหาร 50%MS เพียงอย่างเดียวจำนวน 6 4 และ 7 peaks ตามลำดับ โดยมีสารอินทรีย์ระเหยจำนวน 3 peaks ปรากฏเหมือนกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ ดังแสดงตรงตำแหน่งดาวที่ปรากฏบนลูกศรสีแดง (รูปที่ 84)

เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่ง peak สารอินทรีย์ระเหยของเชื้อแบคทีเรียที่ปลดปล่อยออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง TSA และ 50%MS แล้วพบว่าเชื้อสายพันธุ์ RS83 ปลดปล่อยสารอินทรีย์ระเหยที่เหมือนกันจำนวนเพียงหนึ่ง peak โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มีความสูงของ peak มากกว่าอาหาร 50%MS ดังแสดงในรูป 83 และ 84 ที่มีลูกศรสีเขียวชี้ไปยังตำแหน่งของ peak ดังกล่าว เช่นเดียวกับเชื้อสายพันธุ์ IN937a ซึ่งปรากฏสารอินทรีย์ระเหยจำนวน 1 peak ที่เหมือนกันทั้งสองอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ปรากฏในตำแหน่งที่ต่างกับเชื้อสายพันธุ์ RS 83

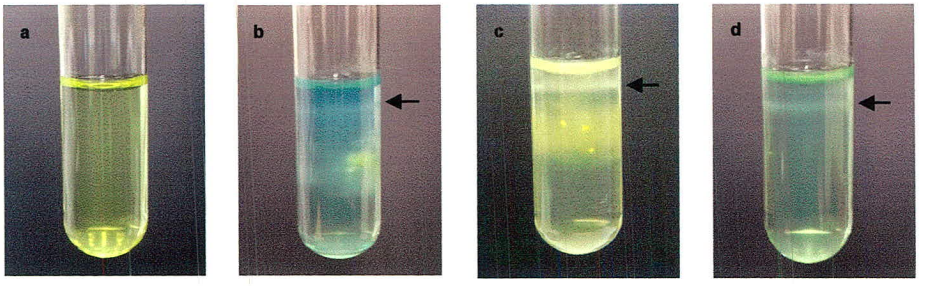
เนื่องจากการศึกษาข้างต้นที่ทดสอบศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอมที่เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง 50%MS ผู้วิจัยคาดว่า peak บางส่วนของสารอินทรีย์ระเหยที่เชื้อปลดปล่อยออกมาแต่ไม่ปรากฏในอาหาร 50%MS เพียงอย่างเดียว น่าจะเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งจำเป็นต้องวิเคราะห์ชนิดของสารเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่เคยมีรายงานว่าส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

2.5 ศึกษาความสามารถของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ในการตรึงไนโตรเจน

การตรึงไนโตรเจนในอากาศของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อพืชส่วนใหญ่มีรายงานศึกษากับเชื้อแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับพืชในลักษณะของ symbiosis โดยที่เชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่ภายในเซลล์ของรากพืช เช่น *Rhizobium* sp. *Bradyrhizobium* sp. เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับเชื้อไรโซแบคทีเรียหลายจีนัสที่หากินอิสระในดินบริเวณรอบๆ รากพืช เช่น *Azotobacter* sp. *Azospirillum* sp. *Enterobacter cloacae* เป็นต้น สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศมาเป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืช การศึกษาความสามารถของเชื้อไรโซแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศทำได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนซึ่งมีลักษณะทั้งกึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารแข็ง

ผู้วิจัยเลือกใช้อาหาร JNFb ชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว และ JNFb ชนิดแข็ง เพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 ในการสร้าง pellicle (ชั้นบางๆ ที่เป็นกลุ่มของเชื้อ) ปรากฏในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว หากย้าย pellicle มาเลี้ยงบนอาหาร JNFb ชนิดแข็ง และเชื้อสามารถเจริญบนอาหารแข็งได้ เป็นการชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อในการตรึงไนโตรเจนในอากาศ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 เชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ RS87 และเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ RS91 บนอาหาร Tryptic Soy Agar (Becton, Dickinson and Company, USA) บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ใช้ห่วงพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดในปริมาณเล็กน้อย จากนั้นแทงลงไปตรงกลางประมาณกึ่งกลางของอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว JNFb ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดแก้วขนาด 15 มิลลิลิตร X 150 มิลลิลิตร ปั่นห่วงพลาสติกเพื่อให้เชื้อกระจายในอาหารอย่างสม่ำเสมอ บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเกิดชั้นบางๆ สีขาวที่เรียกว่า “pellicle” ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียมาเกาะรวมกันใกล้บริเวณผิวอาหาร (ดัดแปลงจาก Olivares, F.L et al. 1996, Biology and Fertility of Soils. 21(3): 197-200) จากนั้นย้ายเชื้อบริเวณ pellicle ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง JNFb สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหารทุกวันเป็นเวลานาน 7 วัน (จาก



รูปที่ 85 ลักษณะ pellicle (บริเวณลูกศรชี้) ปรากฏในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว JNFb และการเปลี่ยนสีของอาหารที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ นาน 4 วัน {a=อาหารที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อ; b=อาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83; c=อาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS87; d=อาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS91}

เมื่อย้ายเชื้อบริเวณที่ปรากฏ pellicle ของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว JNFb มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง JNFb แล้วพบว่าเชื้อทั้งสามสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างเป็นปกติ (รูปที่ 76) แสดงให้เห็นเป็นข้อมูลเบื้องต้นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ การพิสูจน์ว่าเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ตรึงไนโตรเจนในอากาศได้หรือไม่นั้น สามารถทำการทดสอบ nitrogenase activity ของเชื้อโดยการตรวจ acetylene reduction ด้วยวิธี Gaschromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) ในการศึกษาต่อไป

รูปที่ 86 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 *Bacillus cereus* สายพันธุ์ RS87 และ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ RS91 ภายหลังการย้าย pellicle ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่ปรากฏในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว JNFb มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง JNFb นาน 7 วัน

Baldani et al., 1986, *Int. J. System. Bacteriol.* 36:86-93) บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุกวัน ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง โดยที่แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ

ผลการศึกษา

ภายหลังการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวชนิด JNFb ประมาณ 24 ชั่วโมงพบว่าเกิด pellicle ชัดเจนใกล้ผิวอาหารที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS87 และสายพันธุ์ RS91 พบการเปลี่ยนแปลงของสีจากเดิมสีเหลืองนวลเป็นสีฟ้าจางบริเวณผิวอาหารที่เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 ร่วมกับการเกิด pellicle บางๆ ซึ่งสีของอาหารในกรรมวิธีที่เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 เริ่มเปลี่ยนเป็นสีฟ้าเข้มขึ้นจากด้านบนลงมาด้านล่างของหลอดแก้วในอีก 3-4 วันต่อมาพร้อมกับการปรากฏ pellicle จางๆ บริเวณใกล้ผิวอาหาร ส่วนกรรมวิธีที่เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS87 นั้นปรากฏ pellicle ชัดเจนมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปแต่สีอาหารไม่เปลี่ยนแปลง สำหรับกรรมวิธีที่เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS91 พบว่าสีของอาหารเริ่มเปลี่ยนเป็นสีฟ้าแกมเขียวจากผิวอาหารแผ่ลงมาด้านล่างของหลอดแก้วมากขึ้นแต่สีจางกว่าอาหารที่เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 ประกอบกับการเกิด pellicle ที่ชัดเจนขึ้น (รูปที่ 85) การเปลี่ยนแปลงสีของ bromothymol blue ซึ่งเดิมเป็นสีเหลืองในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว JNFb ไปเป็นสีฟ้าหรือฟ้าอมเขียวในกรรมวิธีที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 และ RS91 ตามลำดับนั้นอาจเป็นเพราะเชื้อทั้งสองผลิตสารที่มีความเป็นเบสเมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว JNFb ทำให้สีของ bromothymol blue เปลี่ยนเป็นสีฟ้าหรือฟ้าอมเขียวดังผลการทดลองที่ปรากฏ

2.6 ศึกษาความเกี่ยวข้องของสารซิเดอร์โรฟอร์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองโดยทดสอบซ้ำอย่างน้อยสองครั้งดังนี้ การทดลองแรกเป็นการทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธุ์ RS83 ที่มีต่อแตงกวาในระยะต้นกล้า ส่วนการทดลองที่สองเป็นการทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธุ์ RS83 กับต้นแตงกวาในระยะเจริญ โดยที่แต่ละการทดลองประกอบด้วย 3 กรรมวิธีคือ กรรมวิธีควบคุมควบคุม กรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type (ผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์) และกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ชนิดกลายพันธุ์ (ลดการผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์ 80%)

เชื้อสายพันธุ์ RS83 มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ พริกชี้ฟ้า ผักกาดหอม และ แตงกวา เป็นต้น (กัญชลี เจดียานนท์ 2546 รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์มูลนิธิโทเรเพื่อการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ประเทศไทย) ผู้วิจัยเลือกพืชแตงกวาเป็นพืชทดสอบในครั้งนี้เนื่องจากเป็นพืชที่เจริญเติบโตรวดเร็วในระยะเวลาสั้น

2.6.1 *ทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแตงกวาในระยะต้นกล้า*

เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild type และชนิดกลายพันธุ์ ในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในตู้ incubator shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ปั่นเหวียงเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียในเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ความเร็ว 10,000*g* อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสออก แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วสองครั้งก่อนทำเป็นเซลล์แขวนลอยอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วสองครั้ง ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ทำการทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

แช่เมล็ดแตงกวาพันธุ์หยกขาว (Lionseeds CO., LTD, Thailand) ในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type และชนิดกลายพันธุ์นาน 60 นาทีก่อนปลูกเมล็ดในถาดเพาะกล้าที่บรรจุ soilless peat ที่ฆ่าเชื้อแล้วในเรือนทดลอง ส่วนกรรมวิธีควบคุมแช่เมล็ดในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วก่อนปลูก

เมล็ดลงในถาดเพาะกล้า หยอดเมล็ดแตงกวาของแต่ละกรรมวิธี 30 หลุมๆละ 1 เมล็ด สุ่มเก็บตัวอย่างต้นกล้าแตงกวาจำนวน 24 ต้นต่อกรรมวิธีภายหลังปลูกเมล็ดนาน 5 วัน ดึงต้นกล้าออกมาจากแต่ละหลุมอย่างระมัดระวัง ล้างรากโดยผ่านน้ำไหลเพื่อกำจัด soilless peat ที่ติดมากับราก บันทึกผลความสูงของต้น ความยาวราก และความกว้างของใบเลี้ยงคู่ สำหรับการวัดความยาวของรากนั้นวัดตั้งแต่บริเวณที่รากงอกออกมาจากเมล็ดจนถึงปลายสุดของรากหลัก ส่วนความกว้างของใบเลี้ยงแตงกวาวัดตรงตำแหน่งที่อยู่กลางใบ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) แยกความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความสูงของลำต้น และค่าเฉลี่ยความยาวของราก และค่าเฉลี่ยความกว้างของใบเลี้ยงคู่ของแต่ละกรรมวิธีโดยใช้ Fisher's protected least significant difference (LSD) ที่ $P \leq 0.05$

ผลการศึกษา

ต้นกล้าแตงกวาในกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type ก่อนปลูกมีความสูงและความกว้างของใบเลี้ยงมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าในกรรมวิธีควบคุม และต้นกล้ากรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ (ตารางที่ 13) โดยทั่วไปพบว่าต้นกล้าในกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อแบคทีเรียชนิดกลายพันธุ์มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับต้นกล้าแตงกวาในกรรมวิธีควบคุม แตงกวาในกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อชนิด wild-type มีความยาวของรากมากที่สุด รองลงไปคือแตงกวาในกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อชนิดกลายพันธุ์ และแตงกวาในกรรมวิธีควบคุมตามลำดับ มีเพียงแตงกวาในกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อชนิด wild-type เท่านั้นที่มีความยาวของรากมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (รูปที่ 87 และตารางที่ 13)

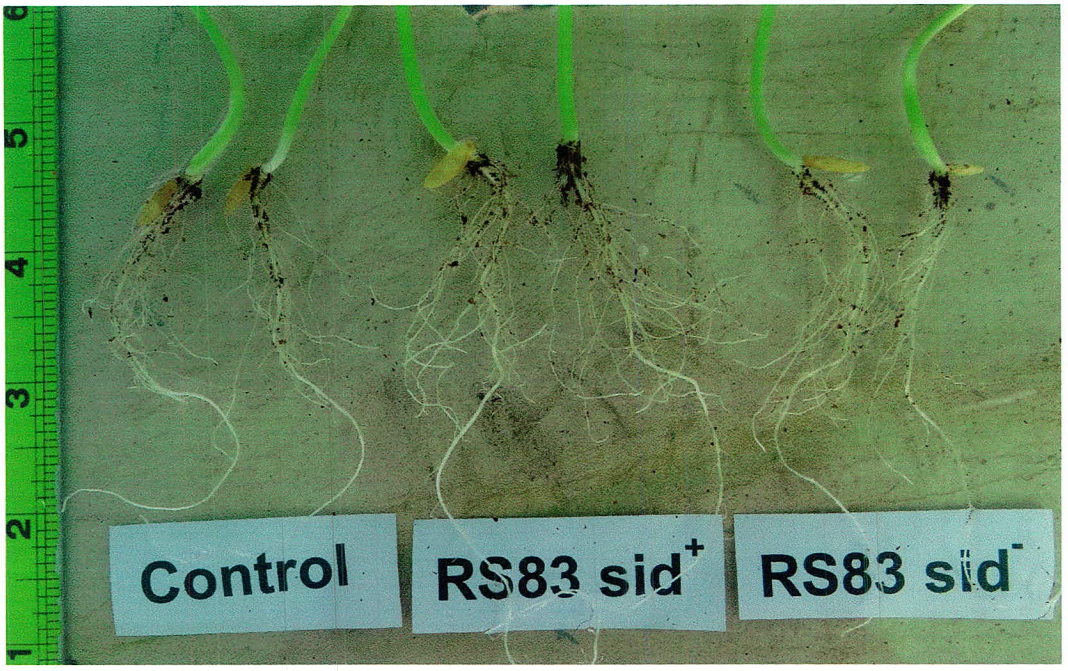
ตารางที่ 13 ผลของเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type และชนิดกลายพันธุ์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของแตงกวาในระยะต้นกล้าภายหลังการปลูก 5 วัน[u]

Treatment[v]	Mean Plant Height (cm)	Mean Root Length (cm)	Mean Cotyledon Width (mm)
Nonbacterized control	7.88b[w]	8.67b	16.36b
Wild-type RS83	9.19a	10.36a	18.79a
Mutant RS83	7.60b	9.17ab	16.38b
$LSD_{0.05}$	0.55	1.66	1.22

[u]การทดลองประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ กรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type และกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ชนิดกลายพันธุ์ โดยที่ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองสองครั้งที่ทำแยกกัน

[v]แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย (10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) นาน 60 นาที ก่อนปลูกลงในถาดเพาะกล้าที่บรรจุ soilless peat ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เมล็ดในกรรมวิธีควบคุมแช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ

[w]ตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังตัวเลขแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยการทดสอบด้วย Least significant difference



รูปที่ 87 ผลของเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type (RS83 sid$^+$) ที่มีต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าแตงกวาภายหลังการปลูกใน soilless peat นาน 5 วัน เปรียบเทียบกับแตงกวาในกรรมวิธีควบคุม (control) และกรรมวิธีที่แช่เมล็ดด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ (RS83 sid$^-$)

2.6.2 *ทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแตงกวาในระยะเจริญ*

รูปแบบการทดลองคือ Randomized complete block (RCB) ประกอบด้วย 3 กรรมวิธีคือ กรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type และกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ แต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ โดยที่ซ้ำคือแตงกวา 1 ต้น/กระถางพลาสติก ทำการทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

แช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type และกลายพันธุ์ (10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) นาน 60 นาทีก่อนปลูกเมล็ดในถาดเพาะกล้าที่บรรจุ soilless peat ที่ฆ่าเชื้อแล้วในเรือนทดลอง ส่วนกรรมวิธีควบคุมแช่เมล็ดในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว หยอดเมล็ด 10 หลุมๆละ 1 เมล็ดต่อกรรมวิธี

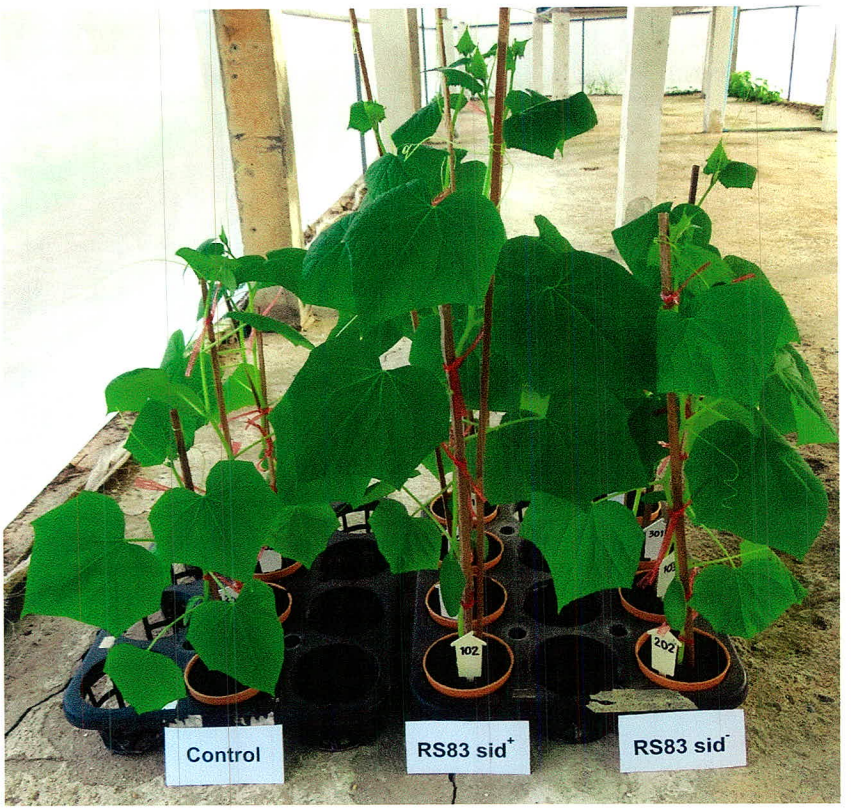
ย้ายต้นกล้าแตงกวาอายุ 3 วันภายหลังปลูกในถาดเพาะกล้า ลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว ที่บรรจุ soilless peat t ที่ฆ่าเชื้อแล้ว อุณหภูมิเฉลี่ยตอนกลางวัน และตอนกลางคืนในเรือนทดลองคือ 33 และ 27 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ความชื้นสัมพัทธ์ในเรือนทดลองคือ 80-85%

ราดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type และชนิดกลายพันธุ์ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อกระถาง (10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) ภายหลังย้ายต้นกล้าจากถาดเพาะกล้าลงในกระถางพลาสติก นาน 4 วัน ส่วนกรรมวิธีควบคุมราดน้ำเปล่าที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อกระถาง บันทึกความสูงของของต้นแตงกวา จำนวนใบจริง และพื้นที่ใบภายหลังการราดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียนาน 14 วัน สำหรับการวัดพื้นที่ใบนั้นทำโดยเด็ดใบจริงที่สองของแต่ละต้นในแต่ละกรรมวิธี มาแสกนในเครื่องแสกนยี่ห้อ Epson รุ่น Perfection 1270 (CA, USA) จากนั้นนำข้อมูลที่แสกนได้ไปคำนวณพื้นที่ใบกับโปรแกรม ASSESS Image Analysis Software for Plant Disease Quantification version 1 (Lamari 2002, APS Press, Minnesota, USA).

ผลการศึกษา

ภายหลังการราดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียให้กับแตงกวานาน 14 วัน แตงกวาในกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อชนิด wild-type มีความสูงมากที่สุด และมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญประมาณ 22% และ 31% เมื่อเปรียบเทียบกับแตงกวาในกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อชนิดกลายพันธุ์ และกรรมวิธีควบคุมตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าแตงกวาในกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อชนิด wild-type มีจำนวนใบจริง และขนาดพื้นที่ใบจริงที่สองมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญประมาณ 30% และ 33% เมื่อเปรียบเทียบกับแตงกวาในกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อชนิดกลายพันธุ์ และกรรมวิธีควบคุมตามลำดับ (รูปที่ 88 และตารางที่ 14)

โดยทั่วไปพบว่าแตงกวาในกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์มีความสูงของลำต้น จำนวนใบจริง และขนาดพื้นที่ใบจริงที่สองมากกว่าแตงกวาในกรรมวิธีควบคุมเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 88 ลักษณะของต้นแตงกวาในกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อ *E. asburiae* สายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type (RS83 sid^+) เปรียบเทียบกับแตงกวาในกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS83 ชนิดกลายพันธุ์ (RS83 sid^-) และแตงกวาในกรรมวิธีควบคุม (control) ภายหลังการราดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียให้กับพืชนาน 14 วัน

ตารางที่ 14 ผลของเชื้อ *Enterobacter asburiae* สายพันธุ์ RS83 ชนิด wild-type และชนิดกลายพันธุ์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของแตงกวาภายหลังการราดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียให้กับพืช 14 วัน[u]

Treatment[v]	Mean plant height (cm)	Mean number of true leaves per plant	Mean second leaf area (cm^2)[w]
Nonbacterized control	39.37b[x]	5.75b	81.02b
Wild-type RS83	57.00a	6.75a	114.12a
Mutant RS83	44.62b	6.12b	84.67b
$LSD_{0.05}$	6.12	0.55	10.95

[u]รูปแบบการทดลองคือ Randomized complete block ประกอบด้วย 4 ซ้ำต่อกรรมวิธี ในการทดลองประกอบด้วย 3 กรรมวิธีคือ กรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ กรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อชนิด wild-type และกรรมวิธีที่ treat ด้วยเชื้อชนิดกลายพันธุ์ ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองสองครั้ง

[v]แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย (10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) นาน 60 นาที ก่อนปลูกลงในถาดเพาะกล้าที่บรรจุ soilless peat ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เมล็ดในกรรมวิธีควบคุมแช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ ราดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย (10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อกระถางภายหลังย้ายต้นกล้าลงกระถางนาน 4 วัน ส่วนกรรมวิธีควบคุมราดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

[w]วัดพื้นที่ใบจริงที่สองโดยการแสกนใบก่อนนำไปคำนวณพื้นที่ใบด้วยโปรแกรม ASSESS: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification version 1.0 (Lamari, L. 2002, APS Press)

[x]ตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังตัวเลขแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยการทดสอบด้วย Least significant difference