สารพอลิแซคคาไรด์ของ *Pseudomonas fluorescens* ส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางชำถุงภายใต้สภาพอุณหภูมิสูง

Polysaccharide of *Pseudomonas fluorescens* Enhances Growth of Poly Bag Rubber Under High Temperature Condition

พันศักดิ์ จิตสว่าง, วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ และดุสิต อธินุวัฒน์*

สาขาการจัดการเกษตรอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Phansak Chitsawhang, Wilawan Chuaboon, and Dusit Athinuwat*

Major of Organic Farming Management, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

ยางชำถุงพันธุ์ RRIM600 ที่ได้รับการพ่นใบด้วยสารพอลิแซคคาไรด์ของ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ความเข้มข้น 100 mg ml^{-1} ทำให้มีความสูงต้น ความยาวราก และเส้นรอบวงลำต้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) ภายใต้สภาพอุณหภูมิ 40-45 °C เท่ากับ 14.1, 15.8, 37.5 % และ 17.3, 15.7, 62.2 % หลังพ่นใบ 30 และ 60 วัน ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นสารพอลิแซคคาไรด์ยังส่งเสริมให้ยางมีจำนวนฉัตรเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) 12.2 % ภายใต้สภาพอุณหภูมิดังกล่าว อย่างไรก็ตาม สารพอลิแซคคาไรด์ยังสามารถกระตุ้นให้ยางมีการผลิตฮอร์โมน indole-3-acetic acid (IAA) และกระตุ้นภูมิต้านทานให้ผลิต guaiacol peroxidase (GPX) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกิจกรรมของ IAA และ GPX จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเท่ากับ 4.56 µg mg^{-1} และ 4.25 min^{-1} mg^{-1} protein ตามลำดับ หลังพ่นใบด้วยสารพอลิแซคคาไรด์ภายใต้สภาพอุณหภูมิ 40-45 °C 4 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ (P = 0.05) การชักนำระบบภูมิต้านทานพืชโดยใช้สารพอลิแซคคาไรด์ของ SP007s ให้ยางต้านทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (อุณหภูมิ 40-45 °C) เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายในเซลล์พืชจากการสะสมของเอนไซม์ต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันและฮอร์โมนพืช ได้แก่ การผลิต GPX และ IAA สารประกอบต่าง ๆ เหล่านี้จึงจัดเป็นตัวบ่งชี้ต่อการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดและระบบภูมิคุ้มกันของพืช ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการใช้สารพอลิแซคคาไรด์ในระบบการผลิตกล้ายางและยางชำถุงภายใต้สภาวะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของโลก

คำสำคัญ : การชักนำระบบภูมิต้านทานพืช; การเกษตรยั่งยืนต้นทุนต่ำ; ส่งเสริมสุขภาพพืช

***Corresponding author:** athinova6@hotmail.com* *DOI: 10.14456/tjst.2015.26*

Abstract

The poly bag rubber cultivar RRIM600 foliar sprayed with the 100 mg ml^{-1} polysaccharides of *Pseudomonas fluorescens* SP007s significantly increased stem height, root length, and stem circumference with 14.1, 15.8, 37.5 % and 17.3, 15.7, 62.2 % after foliar spray for 30 and 60 days, respectively under temperature 40-45 °C (P = 0.05). Moreover, 12.2 % of the number of internode significantly increased by the polysaccharides application under temperature 40-45 °C (P = 0.05). Also, the polysaccharides triggered significantly increase expression of plant growth hormones, indole-3-acetic acid (IAA) and defense-related enzymes, guaiacol peroxidase (GPX). The activity of IAA and GPX were increased immediately after foliar sprayed with the polysaccharides under temperature 40-45 °C reaching peak levels at 4 days after application at 4.56 µg mg^{-1} and 4.25 min^{-1} mg^{-1} protein, respectively compared to control treatments (P = 0.05). Induction of systemic resistance by SP007s polysaccharides against abiotic stress of the poly bag rubber through the biochemical changes brings about accumulation of defense-related enzymes and growth hormones that relates to biosynthesis of GPX and IAA. These defensive compounds are play a marked role in stress response and immunity of plants. Therefore, it possible that polysaccharides can be used in the seedling and poly bag rubber production system under climate change conditions.

Keywords: induced systemic resistance; low input sustainable agriculture; enhance plant health

1. คำนำ

สภาวะโลกร้อนในปัจจุบันส่งผลกระทบให้อุณหภูมิของโลกเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ การปลูกยางพาราจึงได้รับผลกระทบโดยตรงจากการเพิ่มสูงขึ้นของอุณหภูมิ โดยส่งผลต่อระบบรากและการดูดธาตุอาหารพืช การใช้พันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงจึงเป็นวิธีการเดียวที่จะบรรเทาปัญหานี้ได้ (สามารถ, 2553; วิทย์, 2553) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพ่นใบพืชหรือคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วยสารอนินทรีย์กลุ่ม low concentration inorganic salt หรือ osmoprotectant หรือ signaling molecule หรือ antioxidant ต่าง ๆ เช่น H_2O_2 สามารถกระตุ้นให้พืชแสดงกลไกต้านทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงได้ โดยกลไกที่เกี่ยวข้องได้แก่ การปรับ osmotic potential และการปรับอัตราการหายใจและการคายน้ำของปากใบ ตลอดจนปรับกระบวนการทางชีวเคมี ได้แก่ การสร้าง malonialadehyde (MDA), glutathione syntase, guaiacol peroxidase (GPX), superoxide dismutase และ catalase (Dusotoit-Coucsud *et al*., 2009a; Dusotoit-Coucsud *et al*., 2009b) นอกจากนี้ยังมีรายงานการสะสมสาร guaiacol peroxidase ในต้นยางที่ให้น้ำยางปริมาณมากอีกด้วย (จรัญญา, 2546)

ดังนั้นกลไกการชักนำให้พืชเกิดการปกป้องตัวเองโดยใช้สารกระตุ้น (elicitor) จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาเป็นเทคโนโลยีในการเพิ่มความทนต่อสภาพอุณหภูมิสูงของยางชำถุง ซึ่งจากการศึกษาเกี่ยวกับกลไกเหล่านี้พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s มีศักยภาพในการส่งเสริมการผลิตพืชนานาชนิด ด้วยคุณลักษณะพิเศษหลายประการ เช่น สามารถ

เจริญแข่งขันคลุมทับเชื้อโรคได้อย่างรวดเร็ว และผลิต siderophore ที่มีความจำเพาะเจาะจงในการจับกับอนุมูลของธาตุเหล็กในดิน ทำให้ธาตุเหล็กอยู่ในรูปแบบที่แบคทีเรียที่มีประโยชน์และพืชนำไปใช้ได้ดี ตลอดจนเชื้อปฏิปักษ์ SP007s สามารถผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดยับยั้งเชื้อโรคได้โดยตรง รวมทั้งสามารถผลิตฮอร์โมนพืช indole-3-acetic acid (IAA) และ gibberellin กระตุ้นให้พืชเศรษฐกิจเจริญเติบโตสมบูรณ์แข็งแรงอย่างรวดเร็ว รวมทั้งการผลิตสารต่าง ๆ ในระบบภูมิต้านทาน ได้แก่ salicylic acid, jasmonic acid, β-1,3-glucanase, peroxidase, phenolics, guaiacol peroxidase และ glucosinolate ที่ใช้ยับยั้งการเข้าทำลายของโรคและแมลง (สุดฤดี และคณะ, 2552ก; สุดฤดี และคณะ, 2552ข; Athinuwat *et al*., 2007; Athinuwat *et al*., 2014; Buensanteai *et al*., 2008; Buensanteai *et al*., 2012; Prathuangwong and Athinuwat, 2009; Prathuangwong and Buensanteai, 2007; Prathuangwong *et al*., 2005; Prathuangwong *et al*., 2009a; Prathuangwong *et al*., 2009b; Prathuangwong *et al*., 2013) ตลอดจนเพิ่มความทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูง (Chatnaparat *et al*., 2009) สำหรับในยางพารานั้นพบว่าเชื้อปฏิปักษ์ SP007s มีประสิทธิภาพเร่งการงอกของเมล็ดยางพาราพันธุ์ RRIM600 98 % และส่งเสริมความสูงของต้นกล้า อายุ 1 เดือน 16 % (ดุสิต และคณะ, 2557) แต่ยังไม่มีการศึกษารายละเอียดถึงกลไกของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s ที่เกี่ยวข้องในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและความทนต่อสภาพอุณหภูมิสูงของยางชำถุง โดยหากเชื้อปฏิปักษ์ SP007s สามารถชักนำให้ยางชำถุงผลิตฮอร์โมนพืช IAA ทำให้เจริญเติบโตรวดเร็ว และสะสม guaiacol peroxidase เช่นเดียวกับผลการศึกษาวิจัยในพืชอื่น ๆ ที่ผ่านมา ก็จะทำให้สามารถเตรียมความพร้อมของยางชำถุงและลดปัญหาสภาพอุณหภูมิสูงที่จะทำอันตรายต่อยางชำถุงในสภาพแปลงปลูกจริงต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสกัดสารพอลิแซคคาไรด์และสารทุติยภูมิจากเชื้อปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s

นำ *P. fluorescens* SP007s มาเลี้ยงในอาหาร nutrient glucose broth (NGB) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดทำการปั่นแยกเอาเซลล์เชื้อปฏิปักษ์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °C เวลา 15 นาที โดยตกตะกอนสารพอลิแซคคาไรด์เพื่อแยกน้ำใน supernatant ออกโดยใช้ petroleum ether และ anhydrous sodium sulfate จากนั้นระเหยแห้ง petroleum ether ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator สำหรับการสกัดสารทุติยภูมิโดยการปรับ pH ของสาร supernatant ให้ได้เท่ากับ 2.0 จากนั้นเติมเอทานอลที่เย็นจัดลงไปในอัตราส่วน 1:1 (supernatant : เอทานอล) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนสารทุติยภูมิไปอบแห้งและนำไปละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับไปใช้เป็นสารกระตุ้น (elicitor) ต่อไป

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารพอลิแซคคาไรด์และสารทุติยภูมิของเชื้อปฏิปักษ์ต่อการเจริญเติบโตของยางชำถุง

การใช้สารพอลิแซคคาไรด์และสารทุติยภูมิของ *P. fluorescens* SP007s ต่อการเจริญเติบโตและการกระตุ้นให้ยางชำถุงพันธุ์ RRIM600 สะสมสาร guaiacol peroxidase ในสภาพอุณหภูมิ 30-35 และ 40-45 °C ด้วยวิธีการพ่นใบด้วยสารกระตุ้นต่าง ๆ อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อต้น รายละเอียดดังนี้

2.2.1 กรรมวิธีที่ 1 (T1) พ่นใบด้วยสารพอลิแซคคาไรด์ของ SP007s ในสภาพอุณหภูมิ 30-35 °C

2.2.2 กรรมวิธีที่ 2 (T2) พ่นใบด้วยสารทุติยภูมิของ SP007s ในสภาพอุณหภูมิ 30-35 °C

2.2.3 กรรมวิธีที่ 3 (T3) พ่นใบด้วยสาร salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 mM ในสภาพอุณหภูมิ 30-35 °C

2.2.4 กรรมวิธีที่ 4 (T4) พ่นใบด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในสภาพอุณหภูมิ 30-35 °C

2.2.5 กรรมวิธีที่ 5 (T5) พ่นใบด้วยสารพอลิแซคคาไรด์ของ SP007s ในสภาพอุณหภูมิ 40-45 °C

2.2.6 กรรมวิธีที่ 6 (T6) พ่นใบด้วยสารทุติยภูมิของเชื้อ SP007s ในสภาพอุณหภูมิ 40-45 °C

2.2.7 กรรมวิธีที่ 7 (T7) พ่นใบด้วยสาร salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 mM ในสภาพอุณหภูมิ 40-45 °C

2.2.8 กรรมวิธีที่ 8 (T8) พ่นใบด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ในสภาพอุณหภูมิ 40-45 °C

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) รวม 8 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 30 ต้น จำนวน 10 ซ้ำ วัดการเจริญเติบโตของยางชำถุง ได้แก่ ความสูงต้น ความยาวราก จำนวนฉัตร และเส้นรอบวงของลำต้นยางชำถุงเมื่ออายุ 1 และ 2 เดือน หลังจากพ่นใบด้วยสารกระตุ้นต่าง ๆ วิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย Duncan's new multiple range tests (DMRT)

2.3 วิเคราะห์การกระตุ้นให้ยางชำถุงสะสมสาร guaiacol peroxidase

ชั่งตัวอย่างใบยางชำถุงที่แผ่เต็มที่ในตำแหน่งเดียวกัน 0.1 กรัม ของแต่ละกรรมวิธีในข้อ 2 บดในโกร่งที่เย็นจัดให้ละเอียดใน homogenization buffer 1 มิลลิลิตร จากนั้น vortex ให้เนื้อเยื่อพืชที่บดละเอียดผสมกับ homogenization buffer ปั่นให้เศษชิ้นส่วนของพืชตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ดูดของเหลวใสด้านบน (homogenate) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ใน microtubes แช่ไว้ในน้ำแข็งเพื่อหาค่ากิจกรรมของ guaiacol peroxidase โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 1019 ไมโครลิตร ของสารละลายซับสเตรทของ peroxidase (guaiacol 125 ไมโครลิตร + hydrogen peroxide 153 ไมโครลิตร และ 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer CE 1011 1000 SERIES ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร บันทึกตั้งแต่ 0, 30, 60 และ 90 วินาที นำค่าที่ได้มาคำนวณหากิจกรรมของ peroxidase โดยให้ 1 หน่วยของกิจกรรมหมายถึง peroxidase ที่ออกซิไดซ์ 1 ไมโครโมลของซับสเตรทในเวลา 1 นาที (min^{-1} mg^{-1} protein) (Hammerschmidt *et al.*, 1982) โดยวิเคราะห์ guaiacol peroxidase หลังจากพ่นใบพืชทุก ๆ วัน เป็นเวลา 7 วัน

2.4 วิเคราะห์ปริมาณการผลิต IAA ในยางชำถุง

วิเคราะห์ปริมาณ IAA ที่สะสมในยางชำถุงพันธุ์ RRIM600 โดยนำใบยางที่แผ่เต็มที่ในตำแหน่งเดียวกันของแต่ละกรรมวิธีมาชั่งน้ำหนัก 0.1 กรัม นำมาบดในโกร่งที่เย็นจัดด้วย homogenization buffer (0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7, 0.1 M KCl, 1 mM PMSF, 1µg/ml leupeptin, 1 % (v/v) Triton X-100 3 % (w/v) PVPP) ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไป vortex ให้เนื้อเยื่อพืชที่บดละเอียดตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ดูด IAA standard และส่วนน้ำใสของ

แต่ละกรรมวิธีมาใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่หลอดละ 500 µl บนน้ำแข็งเติม reagent หลอดละ 500 µl และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 535 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer CE 1011 1000 SERIES และทำการเขียนกราฟ standard curve ของ IAA โดยให้แนวตั้งเป็นค่าความเข้มข้นของ IAA แนวนอนเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และวิเคราะห์ข้อมูลหาค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย DMRT โดยโปรแกรม R โดยจะทำการวิเคราะห์ IAA ทุก ๆ วัน เป็นเวลา 7 วัน หลังพ่นใบ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ศึกษาประสิทธิภาพของสารพอลิแซคคาไรด์และสารทุติยภูมิของเชื้อปฏิปักษ์ต่อการเจริญเติบโตของยางชำถุง

ผลการทดลองพบว่าสารพอลิแซคคาไรด์ของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s ความเข้มข้น 100 mg ml^{-1} (T1 และ T5) มีประสิทธิภาพส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางชำถุงอายุ 1 เดือน ให้มีความสูงต้น ความยาวราก และเส้นรอบวงลำต้นสูงสุดทั้งในสภาพอุณหภูมิ 30-35 และ 40-45 °C เท่ากับ 24.32, 23.59, 1.34 เซนติเมตร และ 23.83, 22.33, 0.99 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีอื่น ๆ (P = 0.05) (Figure 1) เมื่อยางชำถุงมีอายุ 2 เดือน พบว่าสารพอลิแซคคาไรด์ของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s (T1 และ T5) ยังคงมีประสิทธิภาพส่งเสริมให้ยางชำถุงมีความสูงต้น ความยาวราก และเส้นรอบวงลำต้นสูงสุด 31.75, 29.21, 2.16 เซนติเมตร และ 28.72, 25.07, 1.59 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติ (P = 0.05) กับกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีอื่น ๆ (Figure 2) ยิ่งไปกว่านั้นสารพอลิแซคคาไรด์ของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s ยังส่งผลให้ยางชำถุงมีค่าเฉลี่ยของจำนวนฉัตรสูงที่สุดทั้งในสภาพอุณหภูมิ 30-35 และ 40-45 °C เท่ากับ 1.20 และ 1.10 ฉัตร ตามลำดับ (Figure 2) สอดคล้องกับรายงานของ Munns (2002) ซึ่งพบว่าต้นข้าวสาลีที่ปลูกเชื้อด้วยแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารพอลิ แซคคาไรด์ได้ในปริมาณมากจะมีการเจริญเติบโตที่ดี เนื่องจากสารพอลิแซคคาไรด์จะทำหน้าที่ไปเพิ่มเยื่อบาง ๆ บริเวณรอบรากพืช (rhizosheath) ทำให้รากพืชมีความชุ่มชื้นอยู่เสมอ ส่งผลให้ทนต่อสภาวะแล้งและอุณหภูมิสูงได้ นอกจากนี้สารพอลิแซคคาไรด์ยังทำหน้าที่กระตุ้นการผลิตฮอร์โมนพืชให้พืชอยู่รอดภายใต้สภาวะความเครียดต่าง ๆ เช่น แล้ง อุณหภูมิสูง และน้ำท่วม (Mohr and Schopfer, 1996; Clarke *et al*., 2003; Kuzyakov and Larionova, 2005; Wittenmayer and Merbach, 2005) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสารพอลิแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นในระหว่างการมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันเพื่อรวมกลุ่มกันเป็นโคโลนี (colony) และระหว่างการมีปฏิสัมพันธ์กับพืชและสัตว์ ภายใต้ปฏิสัมพันธ์ต่าง ๆ เหล่านี้แบคทีเรียจะใช้สารพอลิแซคคาไรด์ที่มีลักษณะเป็นสารเหนียวอยู่รอบเซลล์รักษาความชุ่มชื้นและปกป้องเซลล์จากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม รวมทั้งใช้ในการยึดเกาะครอบครองพื้นที่ผิวเซลล์ของพืชและสัตว์ โดยมีรายงานเกี่ยวกับสารพอลิแซคคาไรด์ของ *Klebsiella pneumonia* ทำหน้าที่ในการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ (Nakata and Kurane, 1999) โดยเฉพาะการใช้ H12 polysaccharide ความเข้มข้น 1-100 ppm ร่วมกับ $CaCl_2$ ทำให้เซลล์แบคทีเรียมีประสิทธิภาพยึดติดกับผิวเซลล์พืชได้อย่างแนบแน่น (Leigh, 1992; Roberts, 1996) ซึ่ง Nakata *et al*. (2000) รายงาน adhesion system ระหว่างพืชและแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้เพื่อเสริมสร้างระบบภูมิต้านทานพืช

โดยเฉพาะ *Pseudomonas fluorescens* ที่สามารถยึดครองผิวรากพืชและปกป้องพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคในดิน (soilborne pathogen) ทั้งแบคทีเรียและราสาเหตุโรคพืช แม้ว่าแบคทีเรียจะอาศัยอยู่ในดินเขตรากพืช (rhizosphere) โดยปราศจากการมีปฏิสัมพันธ์ใด ๆ (Cook, 1993)

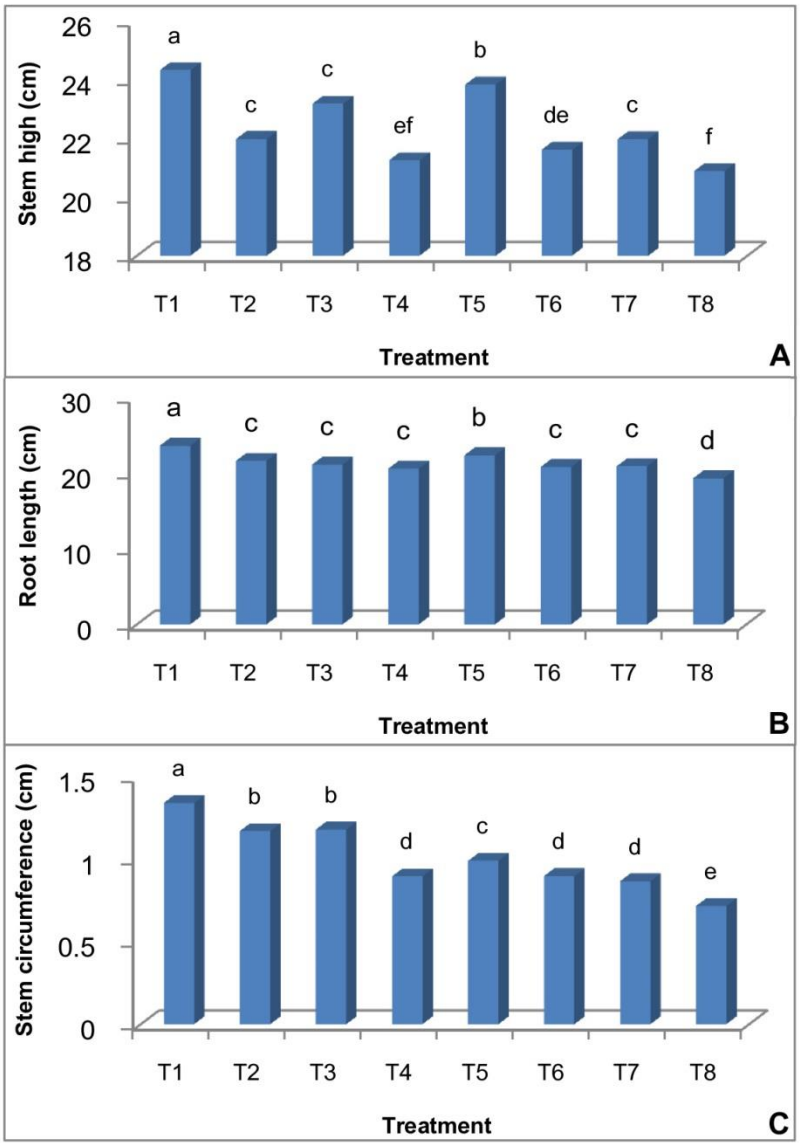

Figure 1 Effect of polysaccharides and secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* SP007s on poly bag rubber growth promotion at 1 month after foliar spray. T1 and T5 = foliar spray with 100 mg ml^{-1} of SP007s polysaccharides, T2 and T6 = foliar spray with 100 mg ml^{-1} SP007s secondary metabolites, T3 and T7 = foliar spray with 2.5 mM salicylic acid, T4 and T8 = negative control. T1-T4 and T5-T8 were conducted under 30-35 and 40-45 °C, respectively.

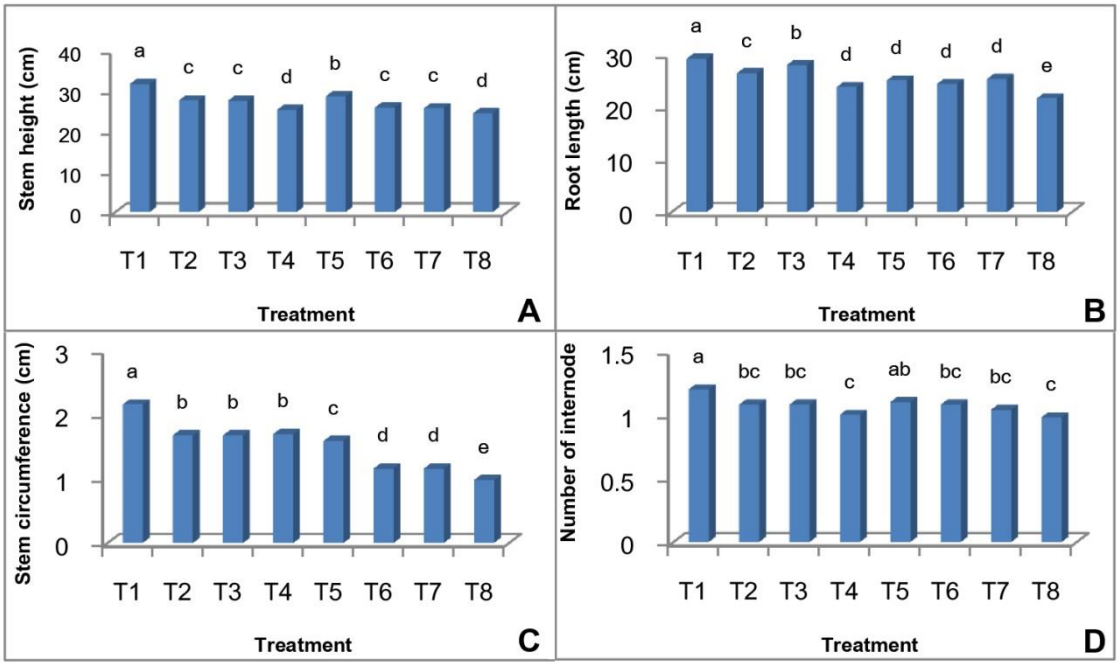

Figure 2 Effect of polysaccharides and secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* SP007s on poly bag rubber growth promotion at 2 months after foliar spray. T1 and T5 = foliar spray with 100 mg ml^{-1} of SP007s polysaccharides, T2 and T6 = foliar spray with 100 mg ml^{-1} SP007s secondary metabolites, T3 and T7 = foliar spray with 2.5 mM salicylic acid, T4 and T8 = negative control. T1-T4 and T5-T8 were conducted under 30-35 and 40-45 °C, respectively.

3.2 วิเคราะห์การกระตุ้นให้ยางชำถุงสะสมสาร guaiacol peroxidase

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ GPX (guaiacol peroxidase) พบว่า T5 พ่นใบยางชำถุงพันธุ์ RRIM600 ด้วยสารพอลิแซคคาไรด์ของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s ในสภาพอุณหภูมิ 40-45 °C มีประสิทธิภาพกระตุ้นให้ยางผลิต guaiacol peroxidase ได้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 4 หลังพ่นใบ เท่ากับ 4.25 min^{-1} mg^{-1} protein รองลงมาคือ T1 พ่นใบยางชำถุงด้วยสารพอลิแซคคาไรด์ของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s ในสภาพอุณหภูมิ 30-35 °C และ T6 พ่นใบยางชำถุงด้วยสารทุติยภูมิของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s ในสภาพอุณหภูมิ 40-45 °C พบการสะสมสาร GPX 3.98 และ 3.76 min^{-1} mg^{-1} protein ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม ($P = 0.05$) (Figure 3) แสดงให้เห็นว่า สารพอลิแซคคาไรด์และสารทุติยภูมิของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s มีศักยภาพในการกระตุ้นให้ยางชำถุงเกิดภูมิคุ้มกันต่อสภาพอุณหภูมิ 40-45 °C ได้ ซึ่งในสภาวะเครียด เช่น สภาพอุณหภูมิสูงนี้ภายในเซลล์จะเกิดการสะสมของ H_2O_2 และ reactive oxygen ในปริมาณมาก ซึ่งเป็นอันตรายโดยตรงต่อเซลล์ อาจทำให้เกิดอาการเซลล์แตกและตายอย่างเฉียบพลัน (oxidative burst) ในการกำจัด H_2O_2 และ reactive oxygen เหล่านี้ เซลล์พืชจึงต้องผลิต GPX ในปริมาณมากชั่วขณะเพื่อทำหน้าที่ในการ

กำจัด H_2O_2 และ reactive oxygen อย่างเร่งด่วน (จรัญญา, 2546) ดังนั้นการศึกษา pathway ของ GPX และเอนไซม์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตอบสนองต่อความเครียดต่าง ๆ จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจและควรศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง

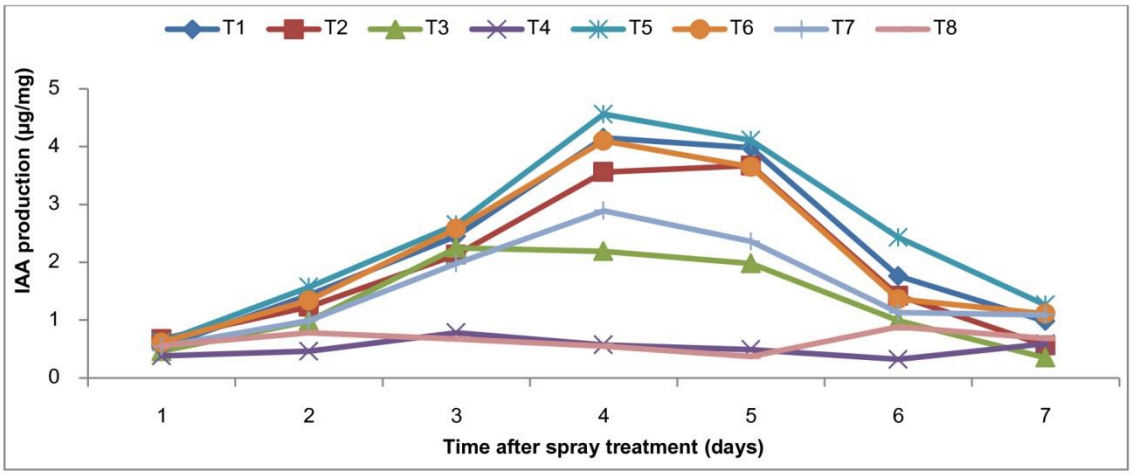

Figure 3 *Pseudomonas fluorescens* SP007s enhanced indole-3-acetic acid accumulation in poly bag rubber leaves cultivar RRIM600 at 7 days after foliar spray. T1 and T5 = foliar spray with 100 mg ml^{-1} of SP007s polysaccharides, T2 and T6 = foliar spray with 100 mg ml^{-1} SP007s secondary metabolites, T3 and T7 = foliar spray with 2.5 mM salicylic acid, T4 and T8 = negative control. T1-T4 and T5-T8 were conducted under 30-35 and 40-45 °C, respectively.

3.3 วิเคราะห์ปริมาณการผลิต IAA ในยางชำถุง

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) ในต้นยางชำถุงพันธุ์ RRIM600 หลังพ่นด้วยสารกระตุ้นต่างชนิดเป็นเวลา 7 วัน พบว่า T5 พ่นใบยางชำถุงด้วยสารพอลิแซคคาไรด์ของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s ในสภาพอุณหภูมิ 40-45 °C มีประสิทธิภาพกระตุ้นให้ยางชำถุงผลิต IAA ได้สูงสุดในวันที่ 4 หลังพ่นใบ เท่ากับ 4.56 µg mg^{-1} แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม ($P = 0.05$) (Figure 4) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับ T1 พ่นใบยางชำถุงด้วยสารพอลิแซคคาไรด์ของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s ในสภาพอุณหภูมิ 30-35 °C และ T6 พ่นใบยางชำถุงด้วยสารทุติยภูมิของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s ในสภาพอุณหภูมิ 40-45 °C (Figure 4) แสดงให้เห็นว่า สารพอลิแซคคาไรด์และสารทุติยภูมิของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นยางชำถุง ถึงแม้อยู่ภายใต้สภาพอุณหภูมิ 40-45 °C ก็สามารถเจริญได้ดี โดยสอดคล้องกับรายงานที่พบว่า *P. fluorescens* จะผลิตสารพอลิแซคคาไรด์และสารปฏิชีวนะ pyoluteorin, 2,4-di-acetylphloroglucinol, phenazine-1-carboxylic acid และ hydrogen cyanide (HCN) ในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยตรงและทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (หัวไชเท้า) ทำให้หัวไชเท้ามี

น้ำหนักเพิ่มขึ้นและรากยาวขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียใช้สารพอลิแซคคาไรด์จากระบบ adhesion system และผลของการแพร่สารปฏิชีวนะรอบ ๆ รากพืชที่ถูกควบคุมโดย homoserine lactone ซึ่งเป็นระบบ autoinducer ที่จะถูกชักนำโดยสภาวะความเครียดต่าง ๆ เช่น ethanol, NaCl และอุณภูมิสูง (Ashraf *et al*., 1999) นอกจากนี้การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชก็ยังสามารถใช้ระบบ autoinducer อื่น ๆ ได้ เช่น N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone หรือสภาวะความเครียดจากเกลือ อุณหภูมิสูง และความแห้งแล้ง (Nakata *et al*., 1999) แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารพอลิแซคคาไรด์ยังมีผลต่อโครงสร้างของดิน หากใช้สารพอลิแซคคาไรด์อัตราที่สูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากการอัดตัวแน่นของเม็ดดิน เหตุผลอีกประการหนึ่งคือ สารพอลิแซคคาไรด์จะแพร่ไปครอบครองผิวรากและดินบริเวณเขตรากพืชและยับยั้งอิทธิพลของสารพอลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (Nakata *et al*., 2000) จึงเป็นเหตุผลรองรับผลของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

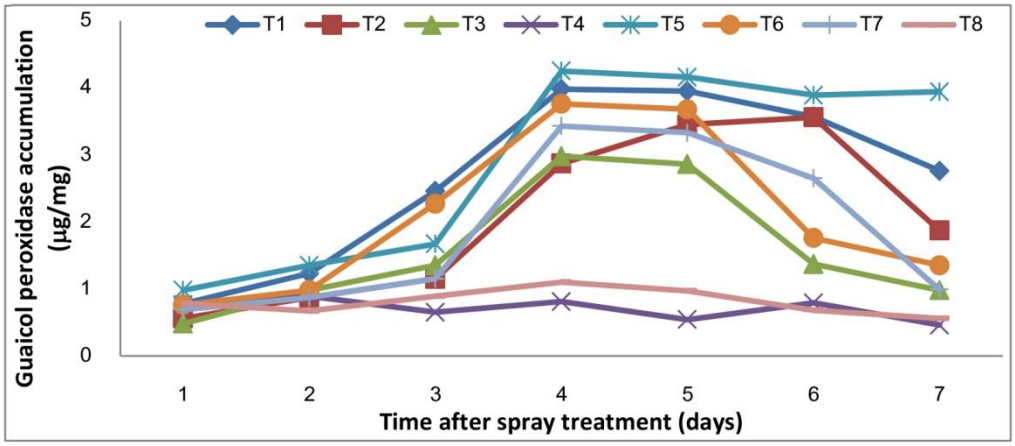

Figure 4 *Pseudomonas fluorescens* SP007s induced guaiacol peroxidase accumulation in poly-bag rubber leaves cultivar RRIM600 at 7 days after foliar spray. T1 and T5 = foliar spray with 100 mg ml^{-1} of SP007s polysaccharides, T2 and T6 = foliar spray with 100 mg ml^{-1} SP007s secondary metabolites, T3 and T7 = foliar spray with 2.5 mM salicylic acid, T4 and T8 = negative control. T1-T4 and T5-T8 were conducted under 30-35 and 40-45 °C, respectively.

4. สรุป

สารพอลิแซคคาไรด์ของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมความสูงต้น ความยาวราก จำนวนฉัตร และเส้นรอบวงลำต้นของยางชำถุง ด้วยการชักนำให้พืชผลิตฮอร์โมนพืช indole-3-acetic acid (IAA) ตลอดจนสารพอลิแซคคาไรด์สามารถเพิ่มความทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงโดยการกระตุ้นให้ยางชำถุงสะสม guaicol peroxidase อย่างรวดเร็วหลังจากการพ่นใบภายใน 4 วัน สารพอลิแซคคาไรด์ของเชื้อปฏิปักษ์ SP007s จึงมีแนวโน้มเป็นสารกระตุ้น (elicitor) การเจริญเติบโตและระบบภูมิต้านทานพืช หากมีการศึกษาในรายละเอียดเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ (active ingredient) กระบวนการผลิต การ

ทดสอบในสภาพแปลงปลูกจริง และการเก็บรักษาให้คงประสิทธิภาพ จะสามารถพัฒนาไปสู่เชิงพาณิชย์ได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการวิจัยแห่งชาติ : ยางพารา สังกัดฝ่ายอุตสาหกรรม สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนการศึกษาวิจัยครั้งนี้ และขอบคุณศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

จรัญญา ณรงคะชวนะ, 2546, การโคลนและการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเปลือกแห้งในต้นยางพารา, รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์, สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปีงบประมาณ 2543-2545, กรุงเทพฯ.

ดุสิต อธินุวัฒน์ วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ และปาริชาติ สถิตธรรมพนา, 2557, ยางพารา, รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยขนาดเล็ก, สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปีงบประมาณ 2555. กรุงเทพฯ.

วิทย์ ประทักษ์ใจ, 2553, ชาวสวนยางอีสานสุดเศร้าวิกฤติภัยแล้งและภาวะอากาศร้อนจัดส่งผลต้นยางยืนตายซากเป็นทิวแถวจังหวัดเลยเสียหายแล้วกว่า 60 %, แหล่งที่มา : http://tonklagroup.blogspot.com, 17 มีนาคม 2555.

สามารถ บุญจรัส, 2553, ยางพารายืนต้นตายที่จังหวัดเลยแก้ไขได้โดยการใช้โพลิเมอร์ที่เป็นการแก้ไขปัญหาเบื้องต้น (รั้งให้รอดเพื่อรอฝน), แหล่งที่มา : http://www.thaigreenagro.com, 17 มีนาคม 2555.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, ติยากร ฉัตรนภารัตน์, สุนันทนาถ นุราภักดิ์ และดุสิต อธินุวัฒน์, 2552ก, *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 ชักนำให้ถั่วเหลืองเกิดการต้านทานโรคด้วยการสร้าง salicylic acid เพิ่มขึ้นภายใต้การผลิตพืชระดับฟาร์ม, น. 13-14, การประชุมวิชาการพืชไร่วงศ์ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 2, โรงแรมจอมเทียน ปาล์ม บีช รีสอร์ท, ชลบุรี.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, สมศิริ แสงโชติ, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, สุรเชรษฐ จามรมาน, วิบูลย์ จงรัตนเมธีกุล, ทศพล พรพรหม, ติยากร ฉัตรนภารัตน์, สุนันทนาถ นุราภักดิ์, ดุสิต อธินุวัฒน์, สุพจน์ กาเซ็ม และจารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์, 2552ข, การตัดสินใจใช้พันธุ์พืชที่เหมาะสมและการลดการใช้สารเคมีในระบบการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานเพื่อการผลิตถั่วเหลืองฝักสด, น. 415-430, การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9, โรงแรมสุนีย์ แกรนด์, อุบลราชธานี.

Ashraf, M., Berge, O., Azam, F. and Heulin, T., 1999, Bacterial exo-polysaccharides and productivity of the salt affected soils: I. Diversity of exo-polysaccharide producing bacteria from the rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in normal and saline Pakistani soils, Pak. J. Biol. Sci., 2:201-206.

Athinuwat, D., Joonlamanop, N. and Prathuangwong, S., 2007, *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 related to both plant growth and pathogen-induced resistance regulation in vegetable soybean, p. 1, Proceeding of International Conference on Integration of science & Technology for Sustainable Development, Bangkok.

Athinuwat, D., Chuaboon, W., Buensantei, N., and Prathuangwong, S., 2014, Efficiency

of new plant growth promoting rhizobacteria on corn diseases control, Afri. J. Microbiol. Res. 8: 710-717.

Buensanteai, N., Athinuwat, D., Chatnaparat, T., Yuen, G.Y. and Prathuangwong, S, 2008, Extracellular proteome of plant growth promoting-bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 and its effect on enhanced growth promotion and induced systemic resistance on soybean, Kasetsart J. (Nat. Sci.) 42: 13-26.

Buensanteai, N., Thumanu, K., Sompong, M., Athinuwatand, D. and Prathuangwong, S., 2012, The FTIR spectroscopy investigation of the cellular components of cassava after sensitization with plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* CaSUT007, Afri. J. Microbiol. Res. 6: 603-610.

Chatnaparat, T., Athinuwat D. and Prathuangwong S., 2009. Bacterial antagonist mediated broad-spectrum resistance of maize against disease and water stress, p. 36, Proceeding of the 1st International Conference on Corn and Sorghum Research and the 34th National Corn and Sorghum Research Conference, Chonburi.

Clarke, L.J., Whalley, W.R. and Barraclough, P.B., 2003, How do roots penetrate strong soil?, Plant Soil 255: 93-104.

Cook, R.J., 1993, Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens, Annu. Rev. Phytopathol. 31: 53-80.

Dusotoit-Coucaud, A., Brunel, N., Kongsawadworakul, P., Viboonjun, U., Lacointe, A. and Julien, J.L., 2009a, Sucrose importation into laticifers of *Hevea brasiliensis*, in relation to ethylene stimulation of latex production, Ann. Bot.104: 635-47.

Dusotoit-Coucaud, A., Brune, N., Franchel, J., Granet, F., Chrestin, H. and Sakr, S., 2009b, Molecular characterization of the sucrose transporter *HbSUT1B* in relation with rubber production in the latex cells, J. Rubb. Res. 12: 125-39.

Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M. and Kuc, J., 1982, Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*, Physiol. Plant Pathol. 20: 73-82.

Kuzyakov, Y. and Larionova, A.A., 2005, Root and rhizomicrobial respiration: A review of approaches to estimate respiration by autotrophic and heterotrophic organisms in soil, J. Plant Nutr. Soil Sci. 168: 503-520.

Leigh, J.A., 1992, Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions, Annu. Rev. Microbial. 46: 307-346.

Mohr, H. and Schopfer, P., 1996, Physiology of hormone action, pp. 383-408, In Lawlor, G., and Lawlor, D.W. (Eds.), Plant Physiology, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany.

Munns, R., 2002, Comparative physiology of salt and water stress, Plant Cell Environ. 25: 239-250.

Nakata, K. and Kurane, R., 1999, Production of an extracellular polysaccharide bioflocculant by *Klebsiella pneumonia*, Biosci.

Biotechnol. Biochem. 63: 2064-2068.

Nakata, K., Yoshimoto, A. and Yamada, Y., 1999. Promotion of antibiotic production by *Pseudomonas fluorescens* S272 under some stress conditions, Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 293-297.

Nakata, K., Harada, N., Sumitomo, K. and Yoneda, K., 2000, Enhancement of plant stem growth by flocculation of the antibiotic-producing bacterium, *Pseudomonas fluorescens* S272, on the root, Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 459-465.

Prathuangwong, S. and Athinuwat, D., 2009, Mixtures of bacterial antagonist strains enhanced biocontrol efficacy and reduce fungicide use of green soybean production, p. 30, Proceeding of World Soybean Research Conference VIII, Beijing.

Prathuangwong, S. and Buensanteai, N., 2007, *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 induced systemic resistance against bacterial pustule pathogen with increased phenols, peroxides, and 1,3-β-glucanase in soybean plant, Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung. 42: 321-330.

Prathuangwong, S., Kasem, S., Thowthampitak, J. and Athinuwat, D., 2005, Multiple plant response to bacterial mediated protection against various diseases, J. of ISSAAS 11: 79-87.

Prathuangwong, S., Tsuyumu, S., Thowthampitak, J., Athinuwat, D., Buensanteai, N. and Chatnaparat, T., 2009a, *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 increases IAA and phenolic content for enhanced growth promotion and induced systemic resistance in IPM program of green soybean production, p.159, Proceeding of the 1st Joint Seminar of Asian Core Program, Bangkok.

Prathuangwong, S., Chuaboon, W., Kasem, S., Athinuwat, D., Suyamaand, K. and Negishi, H., 2009b, Potential for application time of *Pseudomonas fluorescens* SP007s and biofertilizer for alternaria leaf spot management of Chinese kale, Proceeding of the ISSAAS International Congress, Bangkok.

Prathuangwong, S., Athinuwat, D., Chuaboon, W., Chatnaparat, T. and Bueansanteai, N., 2013, Bioformulation *Pseudomonas fluorescens* SP007s against dirty panicle disease of rice, Afr. J. Microbiol. Res. 7: 5274-5283.

Rehm, B.H.A., 2010, Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications, Nat. Rev. Microbiol. 8: 578-592.

Roberts, I.S., 1996, The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria, Ann. Rev. Microbiol. 50: 285-315.

Wittenmayer, L. and Merbach, W., 2005, Plant responses to drought and phosphorus deficiency: Contribution of phytohormones in root related processes, J. Plant Nutr. Soil Sci. 168: 531-540.